

Tesis Doctoral

Leptina regula la supervivencia e invasión de células trofoblásticas

Toro, Ayelén Rayen

2016-06-07

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:

Toro, Ayelén Rayen. (2016-06-07). Leptina regula la supervivencia e invasión de células trofoblásticas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Toro, Ayelén Rayen. "Leptina regula la supervivencia e invasión de células trofoblásticas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-06-07.

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

Leptina regula la supervivencia e invasión de células trofoblásticas

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Ayelén Rayen Toro

Director de Tesis: Dra. Cecilia Laura 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, IQUIBICEN-CONICET.

Buenos Aires, 2016

Leptina regula la supervivencia e invasión de células trofoblásticas

En los mamíferos el crecimiento y la supervivencia del feto durante su desarrollo dependen exclusivamente de la placenta, un órgano altamente especializado que produce un gran número de factores de crecimiento. Leptina, una hormona producida principalmente por el tejido adiposo que se asocia con la saciedad y el balance energético, presenta un papel importante en reproducción. Se ha evidenciado la expresión de leptina y de sus receptores en placenta y se ha demostrado que durante la gestación tiene efectos sobre el crecimiento, la angiogénesis y la inmunomodulación, afectando tanto funciones maternas como fetales. Sin embargo, muchos de los mecanismos de acción de leptina sobre la implantación y el crecimiento embrionario son aún desconocidos.

El presente trabajo ha sido desarrollado con el objetivo de investigar la acción de leptina sobre la supervivencia e invasión de células placentarias. Se utilizaron como modelos la línea celular Swan-71 y explantos de placenta humana a término bajo distintas condiciones de estrés celular y daño como el hambreado de factores de crecimiento, la radiación UV, la hipertermia y la acidificación del medio de cultivo. Determinamos que leptina promueve la proliferación de células Swan-71, aumentando la expresión de ciclina D1, Ki-67 y p21. Asimismo demostramos que leptina disminuye la muerte celular por apoptosis evidenciada por la disminución de distintos parámetros como la activación de caspasa-3, el clivado de PARP-1 y la fragmentación del ADN. También hallamos que leptina modifica los niveles de intermediarios mitocondriales aumentando la relación Bcl-2/Bax y disminuyendo la expresión de Bid. Al profundizar en el mecanismo involucrado en el efecto de leptina sobre la supervivencia de células trofoblásticas, evidenciamos que leptina disminuye los niveles de expresión, actividad y fosforilación en serina 46 del factor de transcripción p53, pieza clave en la modulación del ciclo celular y apoptosis. Leptina además aumenta los niveles de la proteína Mdm-2, reguladora principal de la vida media de p53. Más aún, por ensayos

con cicloheximida demostramos que la vida media de p53 disminuye en presencia de leptina. Por otro lado mediante el uso de inhibidores farmacológicos y de ensayos de transfección transitoria, observamos que las vías de MAPK (ERK 1/2) y PI3K/Akt median los efectos de leptina sobre p53. En último lugar, demostramos que leptina promueve la migración e invasión trofoblástica. Analizamos la expresión de proteínas involucradas en la adhesión celular y observamos que en presencia de leptina disminuye la expresión de E-cadherina y aumentan los niveles de Integrina $\beta 1$. Probamos también que leptina modula la expresión y actividad de metaloproteasas, favoreciendo la invasión celular.

Los resultados obtenidos refuerzan la noción de leptina como una citoquina placentaria involucrada en la regulación de procesos de suma relevancia durante la gestación como la proliferación, apoptosis e invasión, sustentando su importancia en la biología de la reproducción.

Palabras clave: Leptina, placenta, proliferación, apoptosis, p53, vías de señalización, invasión.

Leptin regulates survival and invasion of trophoblastic cells

In mammals the growth and survival of the fetus during its development depend exclusively on the placenta, a highly specialized organ that produces several growth factors. Leptin, a hormone produced mainly by adipose tissue that is associated with satiety and energy balance, has an important role in reproduction. It has been found that leptin and its receptor are expressed in placenta and it has been shown that during pregnancy leptin modulates growth, angiogenesis and immunomodulation, affecting both maternal and fetal functions. However, many of the mechanisms of leptin action on embryo implantation and growth are still unknown.

This work has been developed in order to investigate leptin action on survival and invasion of placental cells. Swan-71 cell line and human placental explants were used as models and were exposed under different conditions of cellular stress and damage as starved of growth factors, UV irradiation, hyperthermia and acidification of the culture medium. We found that leptin promotes proliferation of Swan-71 cells by increasing cyclin D1, Ki-67 and p21 expressions. We demonstrated that leptin decreases cell death by apoptosis as evidenced by reduction of various parameters such as the activation of caspase-3, cleaved PARP-1 and DNA fragmentation. We also found that leptin influences mitochondrial intermediates by augmenting Bcl-2/Bax ratio and decreasing Bid expression. By delving into the mechanisms involved in leptin effect on the survival of trophoblast cells, we showed that leptin decreased expression, activity and phosphorylation of serine 46 of p53 transcription factor, a key element in the modulation of cell cycle and apoptosis. Leptin also increases the levels of Mdm-2, the main regulator of p53 protein half-life. Moreover, using cycloheximide we showed that p53 half-life decreases in the presence of leptin. Furthermore by using pharmacological inhibitors and transient transfection assays, we observed that MAPK (ERK 1/2) and PI3K/Akt pathways mediate leptin effects on p53. Moreover, we showed that leptin promotes trophoblastic migration and invasion. We analyzed the expression

of proteins involved in cell adhesion and found that leptin decreases E-cadherin expression and increased $\beta 1$ integrin levels. We also demonstrated that leptin modulates the expression and activity of metalloproteinases, promoting cell invasion.

In summary, our results reinforce the notion of leptin as a placental cytokine involved in the regulation of processes extremely important during pregnancy as proliferation, apoptosis and invasion, supporting the importance of leptin in the biology of reproduction.

Key words: Leptin, placenta, proliferation, apoptosis, p53, signaling pathways, invasion.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todo mi grupo, en todas sus conformaciones.

Gracias Ceci por haberme dado la oportunidad de incorporarme al laboratorio, por confiar en mí, por guiarme y acompañarme. Gracias por todo lo que aprendí y crecí con vos. Gracias por el *“no te desanimes...”* y por el *“ojo con lo que deseas... (porque se puede hacer realidad)”*.

Gracias Doc. Gracias Doc. Gracias Doc. Gracias Doc, ene más una veces. Podría escribir una extensión equivalente a la tercera parte de esta Tesis agradeciéndote, pero aprendí que a veces es mejor ser clara y concisa.

Gracias Yesi por todo lo que me enseñaste y por haber estado siempre predispuesta a darme una mano.

Gracias Malenita por tu bondad a flor de piel, por tu compañía, por tu oído, por estar siempre.

Gracias Rodri por tu apoyo, por tus palabras simples y certeras y por hacerme reír.

Gracias Pauluchi por tu entrega, por haberme hecho crecer tanto al lado tuyo, por tu dulzura, por siempre tener algo lindo para decir y por ser como sos. Gracias por haber confiado en mí y por bancarme en todas.

Gracias Berni por las placentas y por venir con ellas hasta Ciudad las veces que fue necesario.

Gracias Victor por recibirme en Sevilla y darme la confianza y todo lo necesario para que trabaje sintiéndome como en casa. Gracias Toni por tomarte el tiempo de enseñarme cómo funcionan las cosas allá, por los paseos dentro y fuera de Sevilla, por abrirme las puertas de tu casa, por haberme hecho conocer a tu gente, por estar siempre dispuesto a ayudarme y por levantarme el ánimo cada vez que lo necesité. Gracias Flori (Flooooooooooooooooooooo) por ser tan Flori (porque en el diccionario de la RAE debería aparecer el término *Flori*), por las charlas y por tu compañía. Gracias Kety por hacerme reír tanto y aliviar las largas horas de trabajo.

Gracias Jotacé por el cariño y por haber estado siempre dispuesto a ayudarme. Gracias Vanu, no te das una idea de lo que aprendí de vos. Gracias por enseñarme a hacer los zimogramas y gracias infinitas punto rojo por estar siempre, ya sea con una palabra, un

mail, un mensaje, una mirada o un abrazo. Gracias Chanchu por ser tan linda y tan buena.

Gracias a todo el Departamento de Química Biológica y al IQUIBICEN. Particularmente gracias a los pasillos de QB, a los que uno sale con cualquier excusa y siempre se topa con alguna sonrisa, charla, palabra de aliento o lo que sea necesario. Gracias a los Cánepa por haberme dejado entrar a su labo sin restricciones y siempre estar dispuestos a darnos una mano. Gracias a los Pérez Leirós por las células, la buena onda y la compañía, especialmente a Dai por todo lo que me enseñaste e hicimos juntas. Gracias a los Guberman por ser unos genios del Universo y por hacerme sentir en casa estando en su labo. Gracias Mati Gabrielli por estar siempre para lo que sea. Gracias a los chicos no docentes por las charlas matutinas y por siempre sacarme una sonrisa.

Gracias a todos los docentes, tanto del DFBMC como del DBBE, con los que tuve la suerte de cruzarme durante estos años. De todos ellos aprendí muchísimo y, como todo tiene que ver con todo, muchas de las cosas que me enseñaron están reflejadas en esta Tesis. Particularmente quiero agradecerle a Paula Cramer, por haber confiado en mí tanto dentro como fuera de Exactas y haberme permitido vivir experiencias tan lindas haciendo también lo que me gusta, y a Lili Daín y Eze Surace por ser mis “*Lili y Eze*”, dos grandes de los que no sólo aprendí sobre ciencia y docencia, sino también sobre la vida misma.

Gracias al destino que hizo que varios de mis amigos también estudiaran en Exactas y nos permitió estar más cerca y compartir más. Gracias Meu y Kingui por acompañarnos mutuamente en este camino y en todos nuestros caminos. Gracias a Exactas por los amigos que me dio y los cuales forman parte de mi vida más allá de la facu. Gracias a Vic y Ema, mis compañeros, amigos, vecinos, que estuvieron y están siempre. Gracias Rochita por todo lo compartido durante todos estos años y por la inmensa ayuda, vos y Marina le hicieron ganar un capítulo a esta Tesis. Gracias a Marquitos, mi tocayo de nacimiento además de ser mi amigo, quien se encargó de seguirme de cerca siempre que fue necesario.

Gracias a la UBA, especialmente a Exactas, por haberme formado, por permitirme seguir creciendo, por el pensamiento crítico, por acercarme realidades distintas y por demostrarme que el esfuerzo vale la pena. Gracias al CONICET por haberme permitido hacer mi Doctorado.

Gracias a toda mi familia.

Gracias Mamá por haberme dejado dibujar las paredes cuando era chica, por dejarme ser y por dejarme ser como vos en tantos aspectos. Gracias Papá por rebobinar y darle play al pasacassette del auto rojo todas las veces que fue necesario para que pudiera entender la canción del día y por siempre transmitirme confianza. Gracias a los dos por todas las herramientas que me brindaron y por el apoyo incondicional durante todo este tiempo.

Gracias tutormanos y Cyn por estar siempre dispuestos a ayudarme. Gracias a mi abuela, tíos, tías y primos por acompañarme y alentarme siempre.

Gracias Kepler, Greta y Mora por acompañarme las infinitas horas que estuve frente a Antonia en casa. Gracias Antonia por aguantar mis maltratos y por haber llegado hasta acá a pesar de estar viejita.

¡Gracias Lau! Gracias por estar conmigo siempre, por tanta paciencia, por tanta ayuda, por tanto apoyo (por tanto apoyo + incentivo cuando fue necesario), por sacarme una sonrisa en momentos grises y por quererme tanto. Extremadamente gracias por haber hecho juntos el mejor experimento de estos últimos cinco años (y de toda mi vida).

Gracias Colombina porque sin existir (materialmente), fuiste uno de mis principales motores durante estos últimos años. Gracias por sacarme de mi zona de confort, por mostrarme una realidad completamente distinta (y extremadamente hermosa), por cambiar mis prioridades, por enseñarme tanto en tan poco tiempo, por profundizar mis instintos e INFINITAMENTE GRACIAS por tu sonrisa (la sonrisa más bella y poderosa que existe, capaz de transformar el día más cansador, tedioso y triste en el día más hermoso del mundo).

A Colombina

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

- “Leptin antiapoptotic effect in placental cells involves p53 downregulation”

Ayelén Toro, Julieta L. Maymó, Federico Ibarbalz, Antonio Pérez Pérez, Bernardo Maskin, Alicia Faletti, Víctor Sánchez-Margalet and Cecilia L. Varone. PLoS One (2014) Jun 12;9(6):e99187. doi: 10.1371/journal.pone.0099187.

- “Leptin favors HLA-G expression on placental trophoblasts via the MEK/Erk and PI3K signaling pathways”

Gabriela Barrientos, Ayelén Toro, Petra Moschansky, Marie Cohen, Mariana G. Garcia, Matthias Rose, Bernardo Maskin, Víctor Sánchez Margalet, Sandra M Blois and Cecilia L Varone. Placenta.2015 Apr;36(4):419-26. doi: 10.1016/j.placenta.2015.01.006. Epub 2015 Jan 22.

- “Mechanisms involved in p53 downregulation by leptin in trophoblastic cells”

Ayelén Rayen Toro, Antonio Pérez-Pérez, Isabel Corrales Gutiérrez, Víctor Sánchez-Margalet and Cecilia Laura Varone. Placenta. 2015 Nov;36(11):1266-75. doi: 10.1016/j.placenta.2015.08.017. Epub 2015 Sep 1.

- “Leptin reduces apoptosis triggered by high temperature in human placental villous explants: the role of the p53 pathway”

Antonio Pérez-Pérez; Ayelen R Toro; Pilar Guadix; Julieta L Maymó; Jose L Dueñas; Cecilia L Varone; Victor Sánchez-Margalet. En prensa. Placenta (2016), doi: 10.1016/j.placenta.2016.03.009.

ABREVIATURAS

- **FDC:** Factor de crecimiento
- **AIF:** Factor inductor de apoptosis
- **ARNm:** ARN mensajero
- **Asp:** Ácido aspártico
- **CDK:** Quinasa dependiente de ciclina
- **CNTF:** Factor ciliar neurotrófico
- **CRH:** Hormona corticotropina
- **CT-1:** Cardiotrofina-1
- **CTB:** Citotrofoblasto
- **CTBev:** Citotrofoblasto extraveloso
- **CTBv:** Citotrofoblasto veloso
- **DMG:** Diabetes mellitus gestacional
- **DR:** *Death receptor*
- **E₂:** 17 β -estradiol
- **EGF:** Factor de crecimiento epidermal
- **ERK:** *Extracellular-signal-regulated kinases*
- **FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos
- **FSH:** Hormona folículo estimulante
- **GFBP-1:** Factor de crecimiento de insulina
- **GnRH:** Hormona liberadora de gonadotrofina
- **HB-EGF:** Factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina
- **hCG:** Gonadotrofina coriónica humana
- **HLA-G:** Antígeno leucocitario humano G
- **hPL:** Lactógeno placentario

- **IFN- γ** : Interferón γ
- **IGF**: Factor de crecimiento tipo insulina
- **IL**: Interleuquina
- **JAK**: Quinasa Janus
- **JNK**: quinasa N-terminal de cJun
- **LepR**: Receptor de leptina
- **LepRI**: Isoforma larga del receptor de leptina
- **LepRs**: Isoforma corta del receptor de leptina
- **LH**: Hormona luteinizante
- **LIF**: Factor inhibidor de leucemia
- **MAPK**: Proteínas quinasas activadas por mitógenos
- **MCI**: Macizo celular interno
- **MEC**: Matriz extracelular
- **MMP**: Metaloproteasa de matriz
- **MT-MMP**: MMP de membrana
- **NK**: *Natural killer*
- **OSM**: Oncostatina-M
- **PARP-1**: Poli (ADP-ribosa) polimerasa-1
- **PE**: Preeclampsia
- **PEG2**: Prostaglandina E2
- **PG**: Prostaglandina
- **PI3K**: Fosfatidilinositol-3 quinasa
- **PKC**: Proteína quinasa C
- **PRL**: Prolactina
- **Rb**: Proteína retinoblastoma
- **RCIU**: Restricción del crecimiento intrauterina

- **SLR:** Receptor soluble de leptina
- **STAT:** *Signal transducer and activator of transcription*
- **STB:** Sinciotrofoblasto
- **STBv:** Sinciotrofoblasto veloso
- **TEM:** Transición epitelio mesenquimal
- **TGF- β :** Factor de crecimiento transformante β
- **TIMP:** Inhibidor tisular de metaloproteasa
- **TNF:** Factor de necrosis tumoral
- **TRAIL:** *TNF-related apoptosis inducing ligand*
- **TRH:** Hormona liberadora de tirotrófina
- **VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular
- **VEGF-R2:** Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
IMPLANTACIÓN Y PLACENTACIÓN	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Implantación del blastocisto.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Placentación	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Anatomía y función de la placenta.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Migración e invasión trofoblástica	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
REGULACIÓN DE LA IMPLANTACIÓN.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Moléculas de adhesión.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Metaloproteasas	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Factores de crecimiento y citoquinas.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Hormonas.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
LA LEPTINA COMO HORMONA PLACENTARIA	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Caracterización de leptina y sus receptores	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Características de la leptina	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Características y localización de receptores de leptina.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Cascadas de señalización activadas por leptina	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Funciones de leptina.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Función energética	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Función reproductiva	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Rol de leptina en la implantación embrionaria.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Leptina y patologías asociadas al embarazo.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Ciclo celular.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Regulación del ciclo celular	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Apoptosis	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Proteína supresora de tumores p53.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Proliferación celular y apoptosis en placenta.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Rol de leptina en la proliferación celular y apoptosis.....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
<i>Hipótesis de trabajo</i>	<i>48</i>
<i>Objetivo general.....</i>	<i>49</i>
<i>Objetivos específicos</i>	<i>49</i>
MATERIALES Y MÉTODOS	50
I. MODELOS EXPERIMENTALES	51
I.1. Cultivos celulares	51
I.1.1. Determinación del número de células	51
I.1.2. Congelamiento de células	51
I.1.3. Tratamiento de las células en cultivo.....	52
I.2. Explantos de placentas humanas.....	52
I.2.1. Tratamiento de los explantos de placenta.....	53
II. MODELOS DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS.....	53

II.1. Modelo de inducción de apoptosis por privación de suero.....	53
II.2. Modelo de inducción de apoptosis por radiación ultravioleta	53
II.3. Modelo de inducción de apoptosis por hipertermia	54
II.4. Modelo de inducción de apoptosis por disminución del pH de cultivo	54
III. METODOLOGÍA.....	54
III.1. Ensayo de proliferación.....	54
III.2. Ensayo de viabilidad.....	55
III.3. Determinación de la expresión de proteínas.....	55
III.3.1. Preparación de extractos celulares proteicos.....	55
III.3.2. Determinación de la concentración de proteínas.....	56
III.3.3. Geles desnaturizantes de proteínas.....	56
III.3.4. Western blot	56
III.4. Determinación de los niveles de ARNm	58
III.4.1. Extracción de ARN total	58
III.4.2. Retrotranscripción del ARN.....	58
III.4.3. <i>Real time</i> PCR	59
III.5. Ensayos de transfecciones transitorias	59
III.5.1. Preparación de bacterias competentes	59
III.5.2. Transformación de bacterias competentes	60
III.5.3. Minipreparación de plásmidos	60
III.5.4. Midipreparación de plásmidos	61
III.5.5. Electroforesis en gel de agarosa	61
III.5.6. Transfecciones transitorias	62
III.5.7. Plásmidos utilizados en los ensayos de transfección	62
III.5.8. Determinación de la actividad de luciferasa	63
III.5.9. Determinación de la actividad β -galactosidasa	63
III.6. Ensayo de fragmentación del ADN.....	63
III.7. Determinación de la vida media	64
III.8. Ensayo de migración celular	64
III.9. Ensayo de invasión en cámaras <i>transwell</i>	65
III.10. Zimografías.....	65
III.11. Análisis estadístico	66
RESULTADOS.....	67
<i>CAPÍTULO I: “Leptina promueve la supervivencia de células trofoblásticas”</i>	<i>68</i>
I.1: Acción de leptina sobre la proliferación de células trofoblásticas	69
Leptina promueve la proliferación de células Swan-71	69
La acción proliferativa de leptina estaría mediada por la vía de MAPK.....	69
Leptina incrementa los niveles de ARNm de ciclina D1	70
Leptina aumenta los niveles de Ki-67	71
Leptina induce la expresión de p21	72
I.2: Acción de leptina sobre la apoptosis de células trofoblásticas	74
Leptina disminuye la fragmentación del ADN.....	74
Leptina inhibe la activación de caspasa-3.....	75
Leptina aumenta la relación Bcl-2/Bax	79
Leptina inhibe la activación de Bid	81
<i>CAPÍTULO II: “La acción antiapoptótica de leptina involucra la regulación del eje de p53”</i>	<i>83</i>
II.1: Caracterización del efecto de leptina sobre la actividad y expresión de p53.....	84

Leptina inhibe la actividad de p53 en células Swan-71.....	84
Leptina disminuye los niveles proteicos de p53 en células Swan-71.....	85
Leptina disminuye los niveles de ARNm y proteicos de p53 en explantos placentarios	85
II.2: Mecanismos de acción de leptina involucrados en la inhibición de p53.....	87
Leptina disminuye la fosforilación de p53 en serina 46.....	87
Leptina aumenta la expresión de Mdm-2 en células placentarias	88
Leptina reduce la vida media de p53 en células Swan-71	89
II.3: Análisis de algunas de las vías de señalización involucradas en la regulación del eje de p53 por leptina	90
Las vías de señalización de MAPK y PI3K están involucradas en el efecto inhibitorio de leptina sobre los niveles de p53 en células placentarias	90
Estudio de las vías de MAPK y PI3K sobre el efecto de leptina sobre la fosforilación de p53 en serina 46.....	95
CAPÍTULO III: "Leptina posee un efecto protector frente a distintas condiciones de estrés celular"	97
III.1: Efecto de leptina sobre la apoptosis inducida por radiación ultravioleta	99
Efecto de la radiación UV sobre la expresión de p53.....	99
Leptina disminuye la activación de caspasa-3	99
Leptina inhibe la activación de JNK.....	101
Leptina disminuye la expresión de p53 y su fosforilación en serina 46 y aumenta la expresión de Mdm-2	102
Leptina disminuye la expresión de mediadores proapoptóticos mitocondriales	105
III.2: Efecto de leptina sobre la apoptosis inducida por alteraciones en las condiciones de cultivo	106
III.2.1: Apoptosis inducida por hipertermia	106
Temperaturas elevadas aumentan la apoptosis en explantos placentarios.....	106
Efecto del estrés por calor sobre los niveles de p53 y la fosforilación de su serina 46	107
Leptina revierte el efecto de la hipertermia sobre la relación Bcl-2/Bax	108
III.2.2: Apoptosis inducida por la disminución del pH extracelular	109
Leptina disminuye la activación de caspasa-3 generada por la disminución del pH extracelular	109
Leptina contrarresta el aumento en la expresión y actividad proapoptótica de p53 generado en condición de acidosis	111
Leptina modifica el balance de mediadores mitocondriales apoptóticos alterado por la disminución del pH	113
CAPÍTULO IV: "Leptina favorece la migración e invasión de células placentarias"	116
IV.1: Estudio del efecto de la leptina sobre los procesos de migración e invasión trofoblástica	117
Leptina favorece la migración de células trofoblásticas involucrando a la vía de MAPK	117
Leptina promueve la invasión de células trofoblásticas	118
IV.2: Mecanismos moleculares involucrados en la acción de leptina sobre el proceso de invasión trofoblástica.....	119
Leptina regula la expresión y actividad de metaloproteasas.....	119
Leptina disminuye los niveles de E-cadherina	121
Leptina aumenta la expresión proteica de Integrina β 1	124
DISCUSIÓN	128
<i>Leptina promueve la supervivencia de células placentarias</i>	<i>129</i>
<i>El mecanismo antiapoptótico de leptina involucra la vía de señalización de p53</i>	<i>134</i>
<i>Mecanismos antiapoptóticos de leptina frente a distintas situaciones de injuria</i>	<i>137</i>

<i>Leptina posee un efecto protector frente a radiación ultravioleta.....</i>	<i>137</i>
<i>Leptina preserva a las células trofoblásticas frente a temperaturas elevadas</i>	<i>140</i>
<i>Leptina disminuye la apoptosis generada en condiciones de acidosis</i>	<i>142</i>
<i>Leptina promueve la migración e invasión de células placentarias</i>	<i>144</i>
CONCLUSIONES.....	151
BIBLIOGRAFÍA	154

INTRODUCCIÓN

IMPLANTACIÓN Y PLACENTACIÓN

Implantación del blastocisto

El proceso de fertilización implica la fusión de un ovocito con un espermatozoide y se produce en el tercio superior de la trompa de Falopio. La fusión de los núcleos origina al cigoto, el cual irá sufriendo varias divisiones durante su migración hacia el útero materno. El número de células del embrión aumenta por mitosis, alcanzando el estadio de mórula y luego de blastocisto (Figura 11). En el blastocisto se observa una cavidad interna y la polarización del embrión. El macizo celular interno (MCI) es el que dará origen al embrión propiamente dicho y el trofoectodermo, originará la placenta y el cordón umbilical (Curtis H 2000). A partir del trofoectodermo se diferencian los trofoblastos, esenciales para el mantenimiento del embarazo ya que se adhieren al útero y comienzan el proceso de implantación (Lunghi et al. 2007).

El momento preciso y breve en el que el endometrio se vuelve receptivo al trofoblasto se denomina “ventana de implantación” o “fase de receptividad” y ocurre entre el día 10 y 24 del ciclo (Pacheco 1999). Durante este período se generan cambios bioquímicos y morfológicos en la pared del útero desencadenados por señales provenientes del embrión y del trofoblasto. Se modifican las relaciones célula-célula del epitelio endometrial, así como también la secreción de proteínas y de ligandos. La efectividad del proceso implantacional implica una sincronización espacio-temporal apropiada entre la maduración del útero materno y el desarrollo del embrión (Dey 2006).

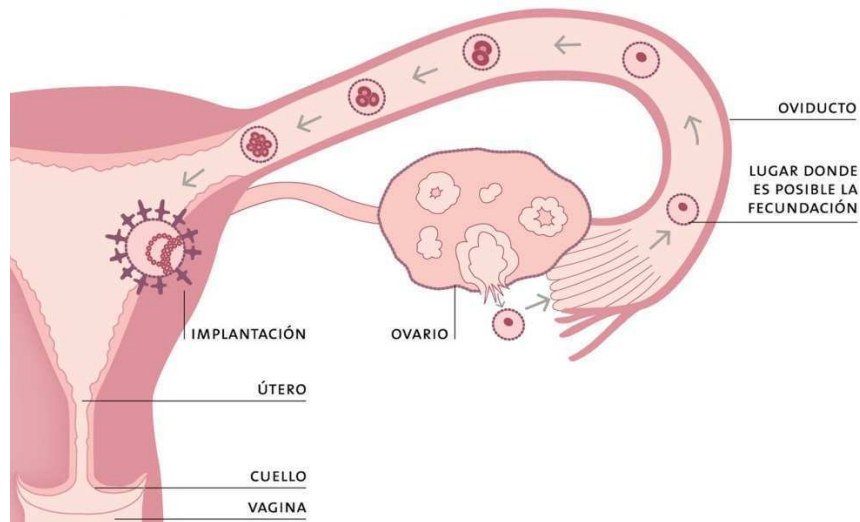


Figura I1: Etapas tempranas del desarrollo embrionario humano. Con la fusión de los núcleos se origina el cigoto, que a continuación iniciará una migración hacia el útero, durante la cual ocurre su segmentación. La sucesión de divisiones mitóticas genera la mórula, una masa de células totipotenciales envuelta por la zona pelúcida. Entre la fase de 8 y 16 células, la superficie de la mórula se vuelve más lisa y esférica; formándose luego una cavidad central llena de líquido, el blastocelo, quedando conformado el blastocisto. Es en el estadio de blastocisto que el embrión, tres o cuatro días después de la ovulación, alcanza la cavidad uterina.

En el estadio de blastocisto el embrión alcanza la cavidad uterina y se implanta en la pared del útero. El proceso de implantación embrionaria puede dividirse en tres etapas: aposición, donde el blastocisto se adhiere de forma inestable a la pared del útero; adhesión, donde se establece un contacto físico estable entre el blastocisto y la pared uterina y por último la etapa de invasión, donde los trofoblastos penetran a través del epitelio uterino y la lámina basal y migran a través del estroma hasta los vasos sanguíneos maternos (Figura I2) (Bischof y Campana 1996, Staun-Ram y Shalev 2005).

En respuesta a la implantación del blastocisto y a la progesterona producida por el cuerpo lúteo, las células endometriales se hipertrofian y el endometrio se decidua. La decidua es un elemento nutritivo muy importante para el embrión durante el inicio del embarazo, obstruye los movimientos del trofoblasto formando una barrera física para la penetración celular y genera un ambiente local de citoquinas que promueven la fijación trofoblástica más que la invasión (Dey et al. 2004).

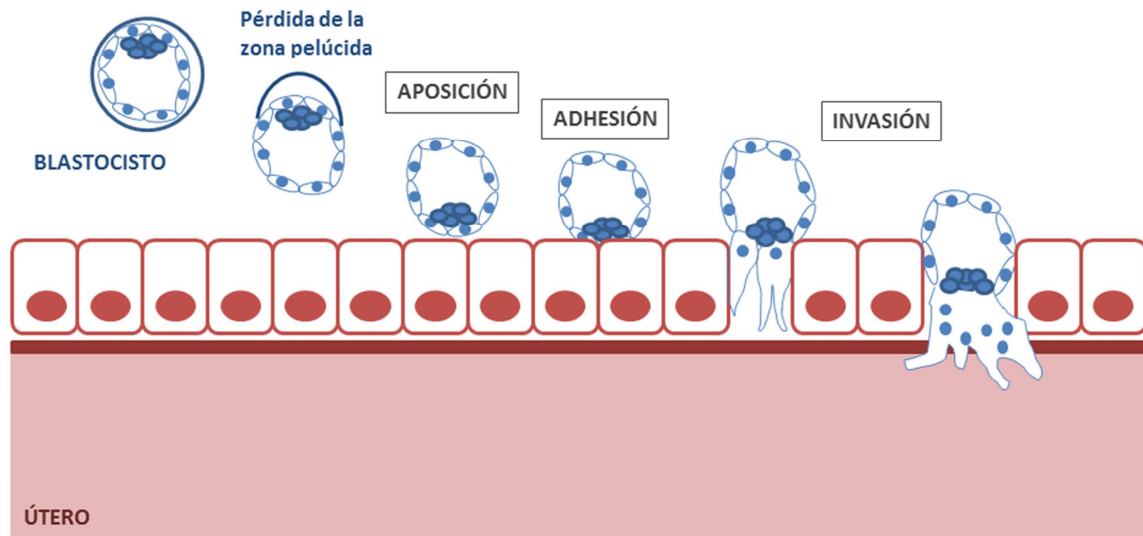


Figura 12: Etapas del proceso de implantación embrionaria. El blastocisto llega al útero materno y mediante ruptura mecánica y enzimática pierde la zona pelúcida. Se establecen interacciones débiles con el epitelio uterino (aposisión) que se estrechan durante la adhesión permitiendo la penetración de los trofoblastos en el útero (invasión).

Placentación

En los mamíferos el crecimiento y la supervivencia del feto durante su desarrollo dependen exclusivamente de la placenta, compuesta por tejido materno y fetal. La placentación es un fenómeno posterior a la implantación e implica el establecimiento de una íntima relación trófica entre la madre y el embrión (Roa et al. 2012).

Una vez que el blastocisto se implanta las células trofoectodérmicas pasan a denominarse citotrofoblastos (CTBs). A fines de la segunda semana de gestación, comienzan a formarse proyecciones citotrofoblásticas bien definidas denominadas vellosidades coriónicas. Las vellosidades coriónicas son las unidades funcionales de la placenta y pueden distinguirse dos subtipos: vellosidades flotantes y vellosidades de anclaje. Las vellosidades flotantes se mueven libremente en la sangre materna y los CTBs que las conforman se fusionan y dan lugar al sinciotrofoblasto (STB), una capa externa y multinucleada (Rodríguez-Cortés y Mendieta-Zerón 2014). Las vellosidades

de anclaje unen el embrión a la pared uterina y están formadas por dos tipos de CTB: veloso (CTBv) y extraveloso (CTBev). Los CTBv invaden el tejido uterino anclando la placenta al útero, mientras que los CTBev migran hacia las arterias espirales y las modifican, generando un aumento en el flujo sanguíneo hacia el embrión (Goldman-Wohl y Yagel 2002).

Durante su desarrollo las vellosidades coriónicas pueden pasar por distintos estadios. En primer lugar se forman las vellosidades primarias, constituidas sólo por CTB y STB, que luego se expanden dando lugar a las vellosidades secundarias, las cuales se caracterizan por tener una zona central mesenquimal. Finalmente, las vellosidades secundarias se convierten en vellosidades terciarias, que están ramificadas y poseen su zona mesenquimal atravesada por vasos sanguíneos fetales. El mesénquima contiene células de Hofbauer dispersas, que actúan como macrófagos fetales (Figura I3) (Llusiá 1992, Staun-Ram y Shalev 2005).

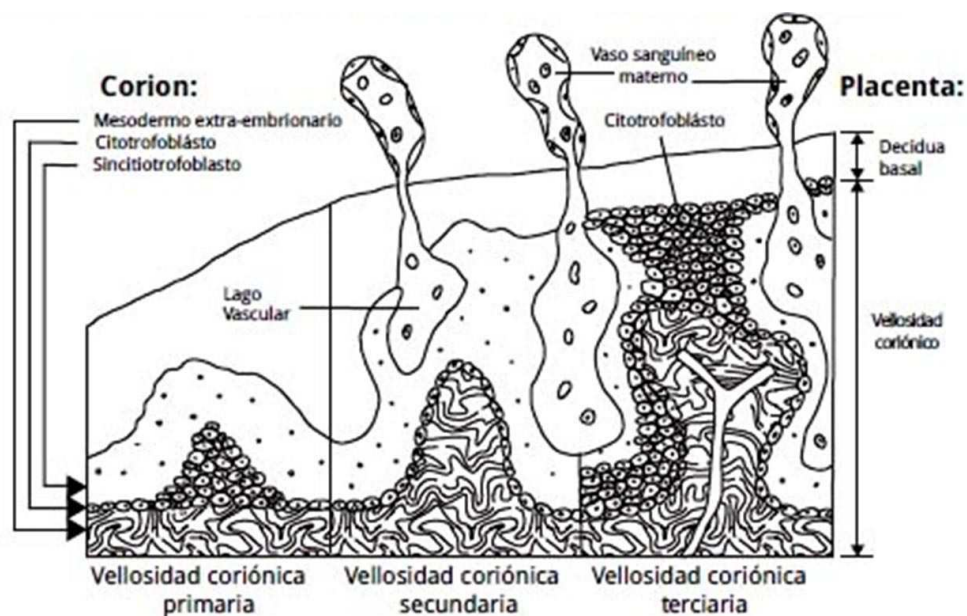


Figura I3: Esquema de vellosidades coriónicas. Las vellosidades coriónicas constituyen la unidad funcional de la placenta y pueden encontrarse en tres estadios distintos: primarias; secundarias, que presentan mesénquima, y terciarias, que atraviesan los vasos maternos. Tomado de www.emaze.com.

Durante el proceso de placentación, los CTB funcionan como población de células troncales progenitoras, proliferan y se diferencian constantemente. Los CTBv son células epiteliales inmovilizadas mientras que los CTBev son células motiles e invasivas. Los CTBev migran hacia el endometrio materno decidualizado y remodelan

las arterias espirales para optimizar la provisión de oxígeno y nutrientes a la placenta y al feto. En dicho proceso cambian su apariencia y se adaptan a diferentes microambientes dominados por fibroblastos endometriales y células endoteliales. Por otra parte, el STB será el responsable del intercambio de gases y nutrientes entre la madre y el feto, así como también de la producción de hormonas placentarias y factores de crecimiento (FDC). Ya que el crecimiento, y por ende la demanda de nutrientes del feto, aumenta con el progreso del embarazo, el área de la superficie sincicial también debe aumentar de manera de asegurar un transporte de nutrientes adecuado hacia el feto. La capa de STB posee un lapso de vida breve y su actividad transcripcional está disminuida; es por ello que durante el embarazo la misma es mantenida y expandida por la constante proliferación, diferenciación y fusión de los CTB progenitores (Forbes y Westwood 2010).

Anatomía y función de la placenta

La placenta es un órgano altamente especializado que mantiene el crecimiento y desarrollo normal del feto durante el embarazo (Gude et al. 2004). La placenta humana madura es de tipo hemocorial, ya que la sangre materna entra en contacto directo con las células trofoblásticas fetales (Gude et al. 2004). Su forma es discoidal y en promedio posee 3 cm de grosor, 20 cm de diámetro y una masa de 500 g. Presenta dos superficies: la placa corial, en la cara embrionaria, donde se observa el cordón umbilical y las grandes ramas placentarias de las arterias y venas umbilicales; y la placa basal, que toma contacto con el endometrio materno (Figura 14) (Burton y Watson 1997, Carlson 2005).

La cara materna está subdividida en lóbulos, y los espacios entre los mismos están ocupados por los tabiques placentarios, que se originan a partir de la decidua. En cada lóbulo hay varios cotiledones, cada uno de los cuales contiene una vellosidad principal con todas sus ramificaciones (Carlson 2005).

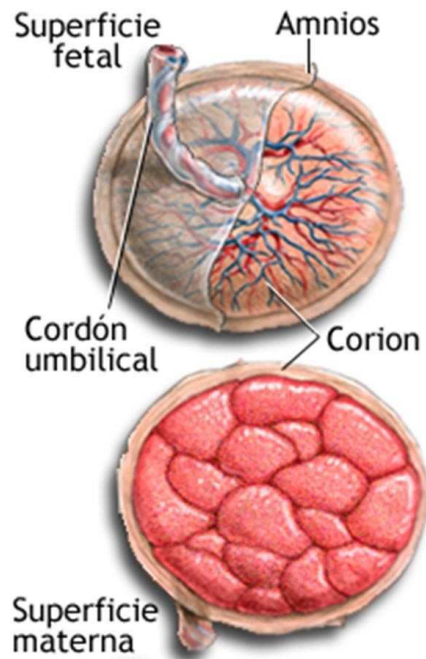


Figura 14: Placenta humana. Esquema de la cara fetal y materna. La cara fetal está cubierta por el amnios a través del cual se visualizan las ramificaciones de los vasos que convergen hacia el cordón umbilical. La cara materna presenta una superficie irregular debido a la presencia de cotiledones, que están cubiertos por decidua y separados por surcos que se forman a partir de los tabiques deciduales.

Internamente la placenta consiste en un vasto arreglo de vellosidades. Éstas surgen de la placa corial y se ramifican dando las vellosidades terminales, que representan el sitio más importante para el intercambio materno-fetal ya que se extienden hasta el interior de la placa basal, quedando bañadas en sangre materna que se renueva de modo continuo (Burton y Watson 1997). Asimismo, el embrión queda fijado por el cordón umbilical y permanece suspendido en la cavidad corial rodeado por la membrana amniótica (Carlson 2005).

La placenta es un órgano transitorio que posee funciones muy diversas que le permiten al feto desarrollarse de manera adecuada. Principalmente está destinada al intercambio fisiológico entre la madre y el feto, siendo el intercambio gaseoso su función primordial, seguida por la absorción de nutrientes y la excreción de productos de desecho. Existe en la placenta una intensa actividad de intercambio y de síntesis, pasando de la madre al feto oxígeno, agua, glucosa, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, hormonas, anticuerpos y también algunos patógenos (Roa et al. 2012, Rodríguez-Cortés y Mendieta-Zerón 2014). La capacidad para proveer nutrientes al feto depende de varios factores, tales como el tamaño y morfología de la placenta, el

flujo sanguíneo, la abundancia de transportadores y la tasa de consumo y producción de nutrientes (Fowden et al. 2008).

La comunicación entre la madre y el feto se establece mediante sustancias que viajan vía sanguínea y pueden ejercer su acción sobre la misma placenta, el útero o el feto. La placenta produce un gran número de hormonas (Tabla I1) y entre ellas se encuentran la gonadotrofina coriónica (hCG) que es producida tempranamente por el STB y su principal función es mantener el cuerpo luteo funcional; la progesterona que es utilizada por el feto como sustrato para la síntesis de corticoides fetales y el lactógeno placentario (hPL) que es producido por el STB y estimula el desarrollo de la glándula mamaria, como el crecimiento de órganos fetales y de la placenta (Llusá 1992, Roa et al. 2012).

Hormona	Función
Gonadotrofina coriónica humana (hCG)	Angiogénesis, diferenciación trofoblástica, implantación, inducción de factores secundarios que permiten el estado gestacional
Lactógeno placentario (hPL)	Crecimiento fetal
Progesterona	Decidualización, crecimiento uterino, mantenimiento del embarazo
Relaxina y Oxitocina	Dilatación y relajación uterina
Activina e inhibina	Regulación de la hormona folículo estimulante (FSH)
Hormona del crecimiento placentario	Nutrición

Tabla I1: Principales hormonas placentarias. Adaptado de Rodríguez-Cortés y Mendieta-Zerón 2014

La placenta no sólo produce hormonas sino también genera un ambiente tolerogénico para el feto de la respuesta inmune materna. En este sentido, el trofoblasto desde estadios tempranos produce factores inmunosupresores e inmunomoduladores. Sin embargo, la función de protección no es sólo inmune, ya que la placenta protege al feto también de xenobióticos, infecciones y enfermedades maternas (Roa et al. 2012).

Migración e invasión trofoblástica

La migración celular, proceso que permite la translocación de las células sobre o a través de un sustrato, es crucial en la defensa inmunológica, la morfogénesis embrionaria, la reparación de heridas y la regeneración de los tejidos. Es un fenómeno complejo que requiere de la integración de señales mecánicas y químicas que llevan a la represión en la expresión de moléculas de adhesión por una regulación epigenética de las mismas y a cambios en el volumen y en el citoesqueleto celular. La migración es iniciada por la protrusión de la membrana celular en el frente de avance por medio de una estructura, el lamelipodio, que se adhiere al sustrato generando la fuerza necesaria para el desplazamiento celular. La regulación aberrante de este proceso permite la progresión de enfermedades, como ocurre en la invasión de los tumores malignos (del Mónaco et al. 2008).

Como se mencionó anteriormente, durante la implantación del embrión los trofoblastos migran e invaden el útero materno. En los humanos la invasión trofoblástica alcanza una mayor profundidad que en la mayoría de los mamíferos y se ha sugerido que la deciduización puede iniciar y estimular la invasión del trofoblasto (Jones et al. 2006, Villasmil et al. 2014).

La diferenciación de CTB a CTBev implica modificaciones a nivel de integrinas y metaloproteasas (MMPs), cambios en la expresión de cadherinas, alteraciones en la vía de señalización de Wnt y la adquisición de marcadores mesenquimales. Se ha propuesto entonces que dicha diferenciación implica una “pseudo” transición epitelio-mesenquimal (TEM). De esta manera los trofoblastos pierden su fenotipo epitelial caracterizado por la adhesión a través de uniones estrechas, para adoptar un fenotipo mesenquimal de tipo invasivo (DaSilva-Arnold et al. 2015).

Durante la placentación las células trofoblásticas penetran a través del epitelio luminal, alcanzan la membrana basal y se extienden posteriormente hasta el estroma donde el CTBev invade rápidamente hasta llegar a las arterias espirales (Villasmil et al. 2014). La invasión trofoblástica está asociada con una extensa remodelación de los segmentos miométriales y deciduales de las arterias espirales (Lyll 2003) e implica una serie de cambios específicos que incluyen: i) el reemplazo del endotelio y la capa

media de músculo liso por los trofoblastos invasivos, ii) la pérdida de elasticidad, iii) el aumento del diámetro y iv) la pérdida del control vasomotor materno. De esta manera se reduce la resistencia al flujo sanguíneo y aumenta la perfusión útero-placentaria. Asimismo la pérdida de la contractibilidad y del control materno garantiza el suministro de sangre materna a la placenta independientemente de la regulación de la distribución sanguínea a nivel central (Figura 15) (Kaufmann et al. 2003).

Después de la invasión endovascular del estroma decidual y miometrial interno, ocurre una segunda invasión endovascular en las arterias espirales del lecho placentario. Este periodo de invasión profunda y su subsecuente progresión lateral para incluir arterias espirales adicionales, puede finalmente determinar el funcionamiento óptimo de la placenta (Villasmil et al. 2014).

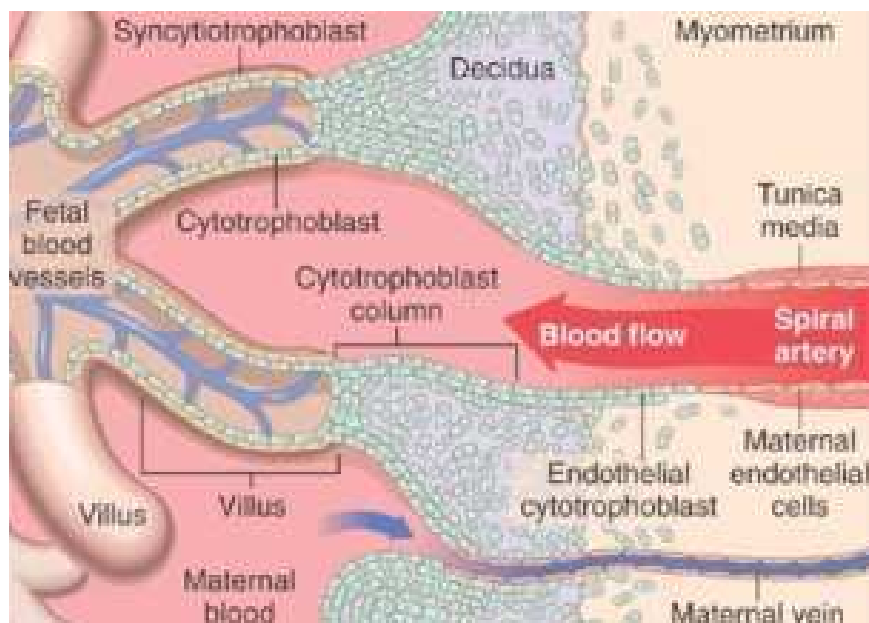


Figura 15: Invasión trofoblástica. Los citotrofoblastos vellosos proliferan, se diferencian y se fusionan dando lugar al sincitiotrofoblasto, que recubre a las vellosidades. Los citotrofoblastos extravellosos invaden la decidua, el miometrio y los vasos sanguíneos uterinos, generando un aumento del flujo sanguíneo hacia el feto.

Las propiedades adhesivas de los trofoblastos cambian durante la invasión. La invasión trofoblástica conlleva una disminución de las moléculas de adhesión características de los CTB progenitores, generando además un aumento de los receptores de adhesión

característicos de las células endoteliales. Dichos cambios permiten a los CTB “enmascararse” como células endoteliales y a su vez incrementan la habilidad del trofoblasto para invadir el útero materno. Más adelante nos referiremos con más detalle a la modulación del repertorio de integrinas de los CTB durante la invasión del endometrio. De manera similar, el cambio en la expresión de cadherinas también juega un rol importante en la adquisición de propiedades invasivas en el trofoblasto, asociándose la pérdida de E-cadherina con la diferenciación y adquisición de motilidad por parte del trofoblasto (Ferretti et al. 2007).

Por otra parte, la adquisición del fenotipo invasivo de los trofoblastos también requiere de mecanismos inmunomoduladores que eviten que los CTBev sean rechazados por linfocitos aloreactivos y células *natural killer* (NK) presentes en la sangre materna y en la decidua (Hutter et al. 1998). En este sentido, como uno de los mecanismos tolerogénicos reportados, los CTBev expresan un patrón particular de antígenos de histocompatibilidad, siendo característica la expresión de HLA-G, que se relaciona con efectos inmunosupresores que promueven la apoptosis de linfocitos T CD8⁺ y previene la citotoxicidad mediada por células NK (Solier et al. 2002, Chen et al. 2010). De hecho, investigaciones recientes indican que además de sus propiedades inmunomoduladoras, HLA-G podría jugar un papel importante en la regulación de la función placentaria debido a sus efectos sobre la invasividad de los trofoblastos (McCormick et al. 2009, Liu et al. 2013). En particular, HLA-G1 es la isoforma predominante en la superficie de los trofoblastos y su expresión se considera como un marcador de diferenciación hacia el fenotipo invasivo (McMaster et al. 1995).

REGULACIÓN DE LA IMPLANTACIÓN

El proceso de implantación embrionaria implica complejos eventos moleculares y celulares entre el útero y el embrión, que están regulados por factores autocrinos y paracrinos (Bischof y Campana 2000). Los procesos de migración e invasión trofoblástica a través de la pared uterina están determinados por el microambiente

materno y por el mismo trofoblasto (Staun-Ram y Shalev 2005). La Tabla I2 describe los principales factores involucrados en la regulación del proceso de implantación y a continuación haremos hincapié en los más relevantes para este trabajo.

Moléculas de adhesión

Las cadherinas son una familia de moléculas de adhesión cuya actividad es dependiente de calcio. La adhesión celular a través de cadherinas tiene un papel importante en la morfogénesis y en la estabilización, polarización y diferenciación de los tejidos. La región extracelular de las cadherinas contiene los sitios que determinan la especificidad de la molécula para unirse a otras moléculas, mientras que la región intracelular es la que conecta con los filamentos de actina del citoesqueleto. La actividad de adhesión celular de las cadherinas depende de la formación de dímeros entre moléculas que se encuentran en células opuestas (Córdova 2008).

La E-cadherina es considerada una molécula supresora de invasividad y en cáncer una reducción de su expresión se asocia al proceso de TEM, favoreciendo la invasión tumoral y metástasis (Bremnes et al. 2002, Ferretti et al. 2007). Durante el período preimplantatorio en respuesta a la progesterona aparecen en la membrana apical del epitelio uterino pinópodos, éstos consisten en protrusiones que permiten el intercambio de fluidos, electrolitos y proteínas de bajo peso molecular. La membrana de los pinópodos expresa E-cadherina y se sugiere que esta proteína media la adhesión entre el trofoectodermo del blastocisto y el epitelio uterino (Staun-Ram y Shalev 2005).

Las integrinas son una familia de receptores transmembrana que pueden influir directa o indirectamente diversos aspectos del comportamiento celular, como la adhesión, la migración y la proliferación. Además, tienen un rol importante en los eventos de transducción de señales, la expresión de genes y la regulación de la apoptosis (dos Santos et al. 2012). Son proteínas heterodiméricas, constituidas por una subunidad α y una subunidad β , que se caracterizan por facilitar la integración celular al medio circundante mediante la adhesión de células entre sí y de células a la matriz

extracelular (MEC). A diferencia de otros receptores, poseen muy baja afinidad por sus ligandos y se encuentran presentes en un número mayor. Estas características constituyen la base del “efecto velcro”, que permite a las células adherirse débil pero simultáneamente a un gran número de moléculas de la matriz extracelular, logrando de este modo explorar su medio ambiente sin perder totalmente su afinidad con el mismo (Jaitovich y Jaim Etcheverry 2004, Zúñiga Cerón et al. 2008).

En particular, las integrinas pertenecientes a la subfamilia $\beta 1$ median la adhesión a la membrana basal y participan principalmente en la adhesividad de las células al fibrinógeno, colágeno y laminina. A su vez, son capaces de activar receptores de FDC o citoquinas, favoreciendo la supervivencia celular. Esta subfamilia se expresa en células normales así como también en células tumorales, donde están involucradas en el control de la angiogénesis, la progresión tumoral y la metástasis (dos Santos et al. 2012).

Las integrinas del endometrio juegan un rol importante para una implantación exitosa, ya que estabilizan el anclaje de las vellosidades coriónicas permitiendo su adhesión a los espacios intersticiales e intravasculares. Las integrinas $\alpha V\beta 3$ y $\alpha 4\beta 1$ son consideradas marcadores de la receptividad del útero; mientras que el trofoectodermo expresa integrinas $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ y $\beta 5$, posiblemente implicadas en la adhesión del blastocisto a la superficie endometrial (Staun-Ram y Shalev 2005, Vitiello y Patrizio 2007).

Las integrinas de los CTB también poseen un rol importante durante la invasión del endometrio. Los CTB progenitores expresan la integrina $\alpha 6\beta 4$, un receptor de laminina, en forma agrupada hacia la membrana basal. Cuando estas células dejan el árbol velloso para formar columnas celulares, aún expresan integrina $\alpha 6\beta 4$, pero de manera no agrupada, permitiéndole al CTB volverse móvil e iniciar la invasión del endometrio. Luego pierden la capacidad de expresar integrina $\alpha 6\beta 4$ pero expresan la integrina $\alpha 5\beta 1$, el mayor receptor de fibronectina, que le permite avanzar por la matriz rica en fibronectina de las columnas trofoblásticas. La llegada a la pared uterina se caracteriza por la expresión de la integrina $\alpha 1\beta 1$, receptor de laminina y colágeno tipo IV, que contribuye a la adquisición del fenotipo invasivo de los CTBev. Posteriormente,

una vez alcanzada la vasculatura materna, los CTB expresan la integrina $\alpha v \beta 3$, que aumenta su motilidad e invasividad (Figura I6) (Damsky et al. 1994, Ferretti et al. 2007).

Por otro lado se encuentran las selectinas, moléculas capaces de unir tanto glicoproteínas como hidratos de carbono. Cabe mencionar a la L-selectina, que se expresa en el blastocisto y juega un papel importante en el proceso de implantación ya que interactúa con hidratos de carbono del epitelio uterino y favorece su anclaje (Vitiello y Patrizio 2007).

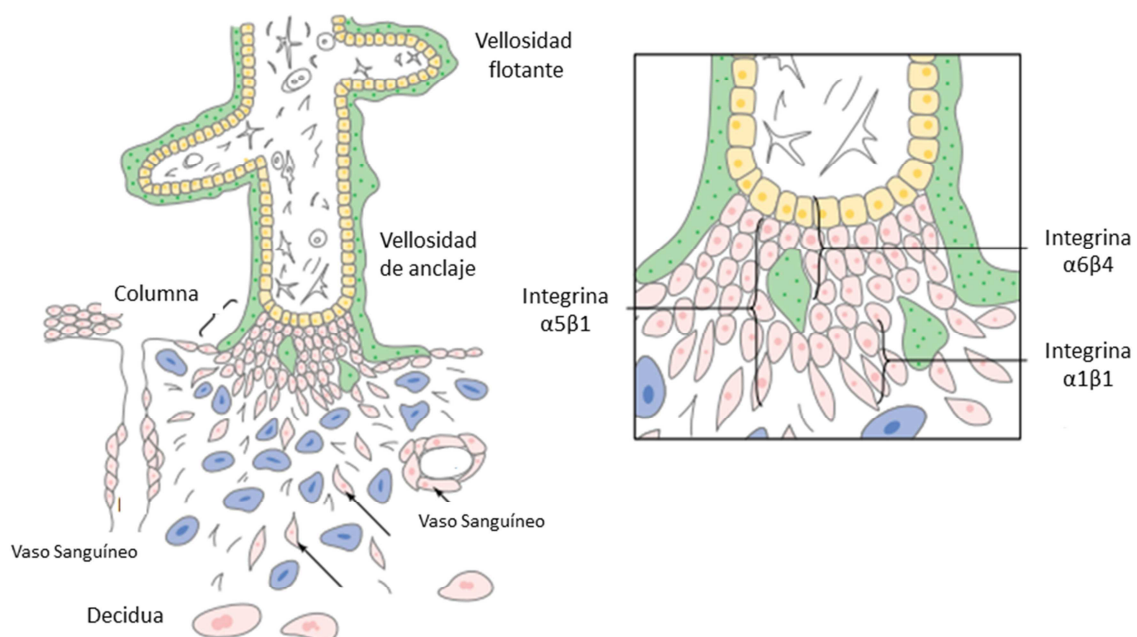


Figura I6: Perfil de Integrinas durante la invasión trofoblástica. En las vellosidades de anclaje se pueden observar citotrofoblastos progenitores (amarillo) que dan lugar al sincitiotrofoblasto (verde) o a las columnas de citotrofoblastos extravellosos (rojo) que invaden la decidua y los vasos sanguíneos uterinos. En el esquema de la derecha se muestra el patrón de expresión de Integrinas característico durante el desarrollo de las columnas de citotrofoblastos extravellosos. Modificado de Aplin 1997.

Metaloproteasas

Al penetrar la pared uterina las células trofoblásticas interactúan con varias proteínas de la MEC y de la membrana basal que afectan la adhesión, migración, diferenciación y expansión celular (Staun-Ram y Shalev 2005). Atravesar la membrana

basal e invadir la MEC requiere de una proteólisis activa de sus constituyentes, como el colágeno, fibronectina y laminina.

Los componentes de la MEC son degradados por MMPs, enzimas dependientes de zinc que tienen un rol fundamental durante la implantación embrionaria, el desarrollo de órganos y la remodelación de tejidos. La estructura de las MMPs comprende varios dominios comunes a la mayoría de ellas: i) péptido señal o predominio, necesario para el desplazamiento intracelular de la enzima hasta la membrana y que es eliminado después de la secreción de la proteasa; ii) dominio propeptídico o prodominio con capacidad enzimática latente, formado por una secuencia peptídica con un residuo de cisteína, que interactúa con el sitio catalítico; iii) dominio catalítico carboxiterminal que contiene un átomo de zinc y otros dominios variables; iv) dominio tipo hemopexina, en la posición carboxiloterminar que interviene en la unión a sustratos específicos de las metaloproteasas y con los inhibidores endógenos; v) dominio transmembrana, en el caso de las MMPs asociadas a la membrana plasmática (Figura I7). Según su estructura y sustrato pueden clasificarse en colagenasas (MMP-1, 8, 13 y 18), gelatinasas (MMP-2 y 9), estromelisin (MMP-3), matrilisinas (MMP-7 y 27), MMPs asociadas a membranas (MT-MMPs) y existe un sexto grupo integrado por las MMPs que no se ubican en los grupos anteriores (MMP-12, 19, 20, entre otras) (Coronato et al. 2012).

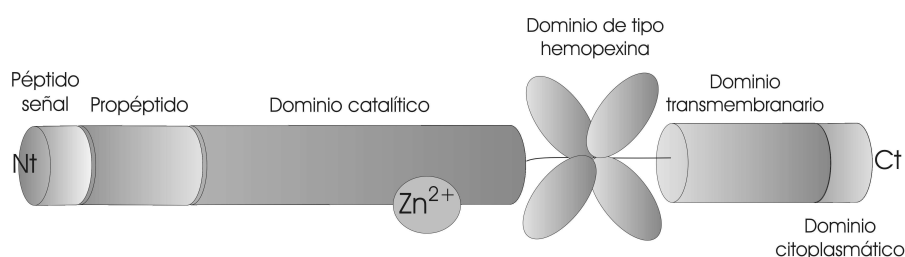


Figura I7: Estructura de las metaloproteasas. Representación de la estructura básica de las MMPs. Generalmente poseen un péptido señal, un propéptido o prodominio, un dominio catalítico y un dominio de hemopexina; las MMPs de membrana poseen además un dominio transmembrana. Se detalla en la parte inferior los dominios que poseen las principales MMPs. Tomado de Coronato et al. 2012.

Las MMPs puede ser reguladas a nivel transcripcional por acción de citoquinas, FDC u hormonas; a nivel de la secreción y a nivel proteico por modificaciones postraduccionales, activación de proenzimas y localización en la superficie celular (Cohen et al. 2006).

Los CTB secretan principalmente MMP-2 y MMP-9, que degradan colágeno tipo IV, el principal componente de las membranas basales. MMP-2 y MMP-9 son consideradas enzimas claves en la implantación, ya que permiten la invasión de la decidua y la vasculatura materna. Se ha sugerido que la MMP-9 poseería un rol más importante durante la implantación, ya que es expresada constitutivamente por el CTB e *in vitro* se ha demostrado que anticuerpos contra MMP-9 inhiben la invasión en matrigel (Librach et al. 1991, Bischof et al. 1995). Sin embargo, recientemente se ha sugerido que la capacidad de invasión del trofoblasto estaría regulada especialmente por MMP-2, ya que se detecta en trofoblastos de fenotipo invasivo, mientras que MMP-9 se expresa en trofoblastos vellosos (Isaka et al. 2003).

La actividad de las MMPs es inhibida de modo específico por los inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs), que actúan uniéndose al zinc del sitio activo de las MMPs. Se conocen cuatro tipos de TIMPs, los TIMPs 1-3 son producidos por el trofoblasto y la decidua durante la gestación, mientras que el TIMP 4 es producido por el blastocisto. Los TIMPs podrían tener otras funciones adicionales además de inhibir a las MMPs, como incrementar la proliferación celular y el desarrollo embrionario (Bischof y Campana 2000, Staun-Ram y Shalev 2005).

Factores de crecimiento y citoquinas

El desarrollo embrionario temprano requiere de la acción de numerosos FDC que son expresados en los folículos ováricos, los oviductos y el endometrio. Los receptores para muchos de estos factores se han encontrado en los blastocistos sugiriendo su importante rol durante la implantación (Richter 2008).

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 (Hofmann et al. 1991). También aumenta la actividad de MMP-2 y MMP-9 induciendo la invasión celular y estimula la secreción de hCG y de hPL por parte de los trofoblastos. Existen otros FDCs importantes, como lo son el factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (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 (Li y Zhuang 1997).

Diversos FDC están involucrados en el desarrollo de la vasculatura placentaria, proceso esencial para el crecimiento y el mantenimiento del desarrollo embrionario. Entre ellos se encuentra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y la angiopoyetina (Reynolds y Redmer 2001). El VEGF induce la angiogénesis y aumenta la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Se expresa en el blastocisto, en el endometrio y en las células trofoblásticas, y permitiría la inducción de la angiogénesis por parte del embrión que se está implantando (Staun-Ram y Shalev 2005).

Las citoquinas, que 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 factor inhibidor de leucemia (LIF) es sintetizado principalmente en la fracción epitelial del endometrio. Tanto los oocitos como los embriones humanos expresan receptores para LIF, sugiriendo una posible respuesta del blastocisto a LIF durante la implantación. Luego de la implantación, la expresión de LIF disminuye en el embrión, sin embargo aumenta en la decidua y en la placenta, indicando que LIF es un factor importante en el desarrollo de la interfase materno-fetal (Pacheco 1999). Se ha reportado que las ratonas que carecen de LIF funcional son fértiles, pero sus blastocistos fallan al implantarse y que la expresión de LIF está disminuida en el endometrio de mujeres infértiles (Stewart et al. 1992). Además se encontró que LIF regula múltiples procesos previos y posteriores a la implantación, como lo son la receptividad uterina, la decidualización, el desarrollo y

crecimiento del blastocisto, la interacción del embrión con el endometrio, la invasión trofoblástica y la inmunomodulación (Salleh y Giribabu 2014).

La interleuquina-1 (IL-1) también está implicada en la regulación de la interfase materno-fetal y es producida tanto por el estroma decidualizado como por las células trofoblásticas (Sharkey et al. 1999). Es considerada una de las primeras señales del blastocisto que actúa sobre el endometrio ya que *in vitro* la IL-1 induce la secreción endometrial de prostaglandinas E2 (PGE2), LIF y de la subunidad de integrina $\beta 3$. A su vez, estimula la actividad de MMP-9 en los trofoblastos y su expresión en las células endometriales epiteliales, induciendo la invasión trofoblástica (Bischof et al. 1995).

El interferón gamma (IFN- γ) es una citoquina que participa en la tolerancia inmune materna ya que induce la producción de HLA-G que, como se mencionó anteriormente, protege a los trofoblastos de la acción de linfocitos T citotóxicos y células NK (Bowen et al. 2002).

Hormonas

La progesterona, el 17β -estradiol (E_2) y la hCG han sido descritas como hormonas esenciales para un embarazo exitoso. A continuación describiremos las principales características y funciones de cada una de ellas.

La progesterona es una hormona esteroidea cuya acción esta mediada por la unión a su receptor que actúa como factor de transcripción regulando la expresión génica. Durante el ciclo menstrual, la progesterona es producida por el cuerpo lúteo y estimula la actividad secretoria del endometrio (Thijssen 2005). Luego de la fecundación y la implantación, el cuerpo lúteo continúa secretando progesterona en respuesta al estímulo de la hCG producida por los STB. Alrededor de la octava semana la placenta se convierte en la principal fuente de esta hormona. La progesterona induce la decidualización de las células estromales y estimula y mantiene las funciones uterinas durante el embarazo, preparando el endometrio para la implantación, promoviendo el crecimiento uterino y suprimiendo la contractibilidad del miometrio. Los antagonistas de los receptores de progesterona inducen el aborto si se administran

antes de la séptima semana de embarazo. En forma similar, la remoción quirúrgica del cuerpo lúteo produce la pérdida espontánea del embarazo. Estos datos sugieren que la producción adecuada de progesterona es crítica para el mantenimiento del embarazo (Villasmil et al. 2014). Además se ha reportado que la acción de la progesterona disminuye la invasividad del trofoblasto a través de la inhibición de las MMPs y suprime la reacción del sistema inmune materno a los antígenos fetales (Tuckey 2005).

La implantación también requiere un aumento en la secreción de E_2 , una hormona esteroidea que influencia varios aspectos del funcionamiento placentario y del desarrollo fetal, regulando la diferenciación y la invasividad de los trofoblastos, la remodelación de las arterias uterinas, la modulación del sistema inmune y la producción hormonal (Chardonens et al. 1999, Gambino et al. 2012). El E_2 cumple un papel central en la regulación del crecimiento fetal, en el trabajo de parto, en la esteroideogénesis placentaria, en la liberación de neuropéptidos y glicoproteínas y en la secreción de leptina por el tejido adiposo (Chardonens et al. 1999).

La hCG es una hormona glicoproteica comprendida por dos subunidades, α y β , unidas no covalentemente y media su acción a través del receptor de hormona luteinizante (LH)/hCG. Es producida principalmente por los STB y su función principal es la de mantener la producción de progesterona por el cuerpo lúteo durante el embarazo temprano (Filicori et al. 2005). Además, promueve la diferenciación de los CTB a STB, favoreciendo la circulación materno-fetal. Estimula parámetros de implantación, induciendo la expresión de LIF y VEGF y promoviendo la secreción de MMP-9. También suprime el sistema inmune materno de los tejidos placentarios y fetales, y prepara los tejidos deciduales y miometriales para la recepción de las células trofoblásticas (Villasmil et al. 2014).

Como ya mencionamos, la acción de estas hormonas es imprescindible para la correcta implantación y desarrollo de la interfase materno-fetal, pero no son las únicas hormonas involucradas en el proceso de gestación. En 1997, Masuzaki y colaboradores describieron a la leptina como una nueva hormona placentaria en humanos (Masuzaki et al. 1997). Se sugiere que esta hormona podría tener efectos sobre el crecimiento fetal, la angiogénesis y la inmunomodulación, afectando tanto funciones maternas

como fetales (Hoggard et al. 2001). Sin embargo, muchos de los efectos fisiológicos y moleculares de la leptina durante el embarazo y su posible rol como hormona reguladora del proceso implantacional no se comprenden totalmente.

Tipo de factor	Nombre	Función sugerida
Moléculas de adhesión	Integrinas $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$	Aumentan la motilidad e invasividad trofoblástica
	L-Selectina	Favorece anclaje del blastocisto
Metaloproteasas e Inhibidores	MMP-2 MMP-9 TIMP-3	Regulación de la invasión trofoblástica
	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa	Facilita invasión vascular del trofoblasto
	Catepsina B y L	Regulación de la invasión del trofoblasto
Citoquinas y Factores de crecimiento	L-1 IL-6 LIF EGF HB-EGF TGF- β IGF I IGF II	Facilitan la comunicación entre el blastocisto y el útero, promueven la deciduización e invasión trofoblástica
Hormonas	Progesterona	Mantenimiento del embarazo
	17 β -estradiol	Diferenciación trofoblástica, crecimiento fetal, inmunomodulación
	hCG	Producción de progesterona, diferenciación trofoblástica, expresión de LIF y VEGF, inmunomodulación
Factores inmunológicos	HLA-G	Previene el rechazo inmune al feto
Otros factores	PGE2	Promueve la apoptosis endometrial
	Ciclooxigenasa 2	Regula la producción de PG
	Tensión de oxígeno	Facilita la invasión vascular trofoblástica

Tabla I2: Factores implicados en la regulación de la implantación embrionaria. Modificado de Villasmil et al. 2014.

Ya que en el presente trabajo planteamos a la leptina como una hormona y citoquina placentaria mediadora del proceso de implantación embrionaria, describiremos a continuación sus características generales y su importancia en la reproducción.

LA LEPTINA COMO HORMONA PLACENTARIA

Caracterización de leptina y sus receptores

Características de la leptina

Zhang y colaboradores describieron y clonaron en 1994 el gen de leptina, una hormona polipeptídica no glicosilada de 16 KDa y 146 aminoácidos (Zhang et al. 1994). En humanos está codificada por el gen LEP (anteriormente conocido como OB) (Henson y Castracane 2006), constituido por tres exones y dos intrones, que está localizado en el brazo largo del cromosoma 7 (7q31). Su secuencia se encuentra altamente conservada en mamíferos. La región codificante está presente en los exones 2 y 3 y a partir de ellos se transcribe un ARNm de 4,5 Kb, del cual se traduce el precursor de la leptina. Esta pro-hormona presenta 167 aminoácidos y una señal de secreción de 21 aminoácidos en la región aminoterminal (Considine y Caro 1997, Münzberg y Morrison 2015).

Estudios de cristalografía y resonancia magnética nuclear mostraron que la estructura tridimensional del precursor de la leptina consiste en cuatro alfa hélices antiparalelas, unidas por dos uniones cruzadas largas y un loop corto (Figura I8) (Zhang et al. 1997), siendo similar a las proteínas de la familia de citoquinas helicoidales de cadena larga, que incluye a LIF, al factor ciliar neurotrófico, la oncostatina-M y la cardiotrofina-1, así como también a las interleuquinas IL-6, IL-11 y IL-12 y a las citoquinas helicoidales de cadena corta (Fruhbeck 2006). Las distintas regiones estructurales de la leptina tienen diferentes funciones. La región aminoterminal,

comprendida entre los aminoácidos 22 al 115, es esencial para su actividad biológica y su unión al receptor (Imagawa et al. 1998). Otros estudios mostraron que la actividad biológica de la leptina también estaría localizada, al menos en parte, en la región carboxiterminal de la misma, entre los residuos 106 y 167 (Frühbeck et al. 1998). El puente disulfuro conformado entre las cisteínas 96 y 146 es necesario para el plegamiento estructural y la unión al receptor, y la mutación en cualquiera de estos residuos genera una proteína biológicamente inactiva (Fruhbeck 2006). Mientras que el puente disulfuro presente entre las cisteínas 117 y 167 es necesario para el correcto plegamiento de la leptina y su posterior secreción (Boute et al. 2004).

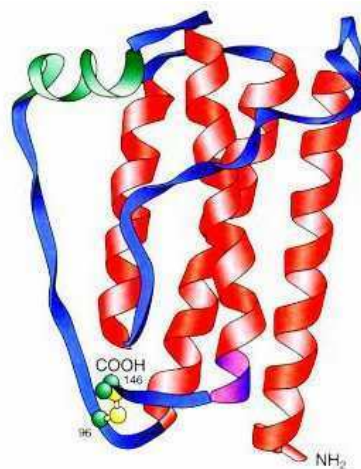


Figura I8: Estructura de la leptina. Leptina es una proteína de 167 aminoácidos y un péptido señal de 21 aminoácidos. Su estructura tridimensional presenta cuatro alfa hélices y un puente disulfuro entre las cisteínas 96 y 146, necesario para su actividad biológica.

En humanos, la expresión del gen de leptina se ha detectado en tejido adiposo, mucosa gástrica, células del epitelio mamario, testículos, ovarios y en placenta (Margetic et al. 2002). La leptina circula en el plasma libre o unida a proteínas (Landt et al. 1997), entre las cuales se encuentra la forma soluble de su receptor (Fruhbeck 2006). Posee un tiempo de vida media aproximado de entre 20 y 30 minutos, y se elimina a nivel renal (Klein et al. 1996, Meyer et al. 1997).

Características y localización de receptores de leptina

Las acciones de la leptina se encuentran mediadas por su receptor. El receptor de leptina (LepR) forma parte de la superfamilia de receptores de citoquinas clase I, que incluye a los receptores de IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, LIF, factor estimulante de colonias de granulocitos, hormona de crecimiento, prolactina y eritropoyetina (Fruhbeck 2006).

Se han descrito seis isoformas del receptor de leptina generadas por splicing alternativo: una larga (LepRI), cuatro cortas (LepRs) y una soluble (SLR). Las isoformas comparten el dominio extracelular y el dominio transmembrana, siendo el dominio intracelular variable y característico de cada isoforma (Fruhbeck 2006). Ya que los receptores de leptina carecen de actividad quinasa propia, la asociación con otras moléculas de señalización es crucial para la activación de componentes río abajo de la vía de transducción de señales (Sweeney 2002). LepRa, LepRb, LepRc, LepRd y LepRf son las isoformas de membrana, mientras que LepRe es la isoforma soluble (Münzberg y Morrison 2015).

Todas las isoformas de membrana poseen el dominio box 1, necesario para la unión a quinasas Janus (JAK), particularmente LepRb presenta un dominio intracelular más largo y posee dos sitios de unión a JAK, un sitio de unión al transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) y tres tirosinas (Y985, Y1077, Y1138) que pueden ser fosforiladas por JAK2. La fosforilación en cada tirosina activa cascadas de señalización específicas: la fosforilación en Y985 activa SHP-2 y MAPK, la fosforilación en Y1077 activa la señalización por STAT5 (que media las funciones reproductivas de leptina) y la fosforilación en Y1138 activa la señalización por STAT3 (el principal mediador de las funciones neurondocrinas de leptina). A su vez, JAK2 puede fosforilarse en distintos residuos que determinan su activación y por lo tanto la señalización por LepRb; siendo esta isoforma capaz de activar la vía de señalización de PI3K mediante la fosforilación de IRS. SOCS-3 y PTP-1B son moléculas adaptadoras asociadas a la señalización por LepRb y generan la inhibición de la señalización por leptina. SOCS-3 es capaz de unirse a la Y985 y a JAK2, inhibiendo la señalización del

receptor, sin embargo aún se desconoce a qué sitio de LepRb se une PTP-1B (Figura I9) (Barr et al. 1999, Henson y Castracane 2000, Münzberg y Morrison 2015).

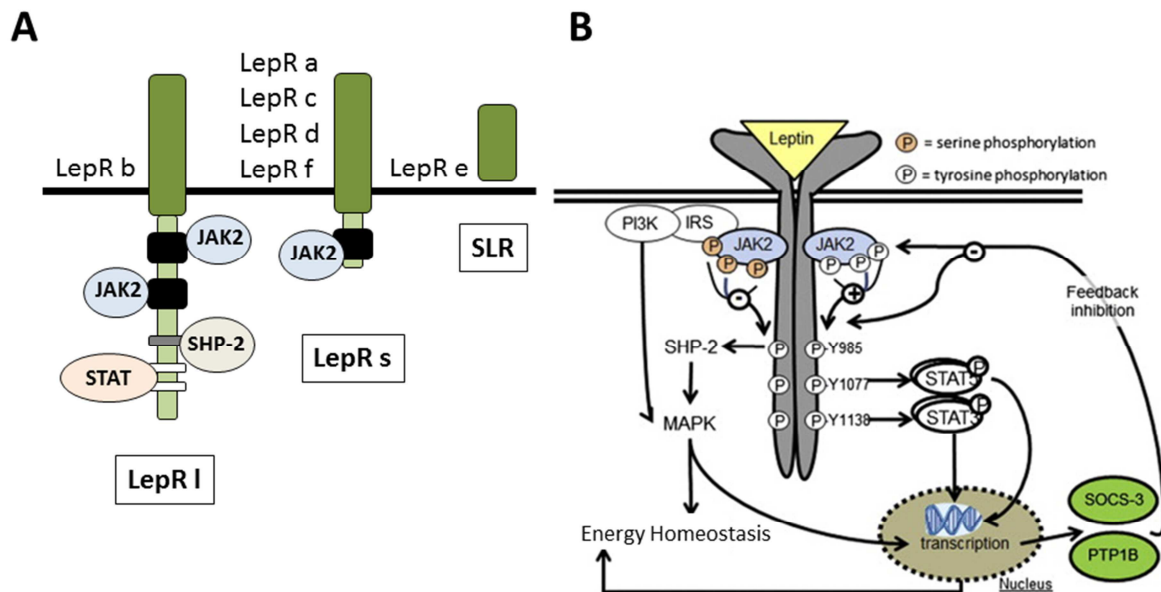


Figura I9: Receptores de leptina. A) Isoformas. Existen seis isoformas del receptor de leptina, una larga (LepRI), cuatro cortas (LepRs) y una soluble (SLR). Las cajas negras representan los sitios de unión a JAK2 (box1), las grises a SHP-2 y las blancas a las proteínas STAT. Adaptado de Benítez et al. 2012. **B) Señalización por LepRb.** La unión de leptina a la isoforma larga de receptor de membrana permite el reclutamiento de JAK2, que una vez activa puede fosforilar a LepRb en tres trosinas distintas (Y985, Y1077, Y1138) o unirse a IRS, activando las vías de STAT, MAPK y PI3K. SOCS-3 y PTP-1B regulan negativamente la señalización por leptina. Adaptado de Munzberg y Morrison 2015.

Se cree que SLR es la principal proteína sérica que interactúa con la leptina circulante, pudiendo de esta manera estabilizarla, secuestrarla o simplemente funcionar como un transportador (Allison y Myers 2014, Münzberg y Morrison 2015). Se cree que esta isoforma podría mejorar la señalización por leptina mediante la reducción de su degradación, aunque se postula que el exceso de SLR disminuye la capacidad de unión de leptina al receptor de membrana (Tessier et al. 2013). La existencia de esta isoforma podría explicar la resistencia a leptina durante el embarazo, donde elevadas concentraciones de leptina no disparan la señal de saciedad en la madre (Lammert et al. 2001).

La leptina se une a su receptor en una relación estequiométrica 1:1 y, al formar homodímeros LepR, resulta en un complejo ligando-receptor tetramérico (Tu et al.

2007). El cambio conformacional que se genera por la formación del complejo es crítico para la activación de la señalización por leptina (Hegyi et al. 2004).

Con respecto a su localización, la isoforma larga es la predominante en el hipotálamo y participa en los efectos neuroendocrinos y en la regulación de la homeostasis energética ejercidos por leptina (Cauzac et al. 2003). Su expresión también se ha descrito en diversos órganos y tipos celulares en humanos y roedores: pulmón, hígado, adipocitos, células endoteliales, células sanguíneas mononucleares, estómago, músculo, islotes pancreáticos, osteoblastos, endometrio, placenta y cordón umbilical (Hegyi et al. 2004). En humanos la isoforma larga fue localizada en las células citotrofoblásticas, en el epitelio luminal y en células estromales de la decidua materna, así como también en oocitos humanos y en embriones aún no implantados (Cervero et al. 2004).

Cascadas de señalización activadas por leptina

En cuanto a las vías de señalización involucradas, ya mencionamos que LepR es capaz de activar la vía de JAK/STAT. Las isoformas larga y cortas del receptor de leptina poseen en su dominio intracelular secuencias consenso capaces de unir a JAK2. Una vez activa, JAK2 puede activar a IRS y activar la señalización por PI3K o fosforilar al receptor en tirosinas, que funcionarán como sitios de anclaje para otras proteínas que tengan secuencia SH2, o a su principal blanco: las proteínas de la familia STAT. Se ha reportado la activación de STAT3 junto a la de STAT5 y STAT6 en relación al receptor de leptina (Sweeney 2002). Una vez activas, las proteínas STAT dimerizan y translocan al núcleo donde se unen a los promotores de sus genes blanco (Figura I7) (Akira 1999).

Otra vía de señalización involucrada es la de MAPK (Bifulco et al. 2003, Cauzac et al. 2003). Las MAPK constituyen una familia de serín/treonín quinasas activadas por FDC y estrés. Estas proteínas desempeñan un papel clave en la transducción intracelular de señales, permitiendo a la célula integrar distintos estímulos extracelulares. De esta manera, las MAPK regulan procesos como mitosis, cambios en los patrones de expresión génica, movimiento, metabolismo y muerte celular

programada, permitiendo a las células sobrevivir, proliferar, inducir apoptosis e interactuar con múltiples tipos celulares. Cada subfamilia de MAPK está compuesta por un módulo de señalización de tres quinasas evolutivamente conservadas que se activan de forma secuencial. Así, la MAPK quinasa quinasa (MAPKKK o MEKK) activa a la MAPK quinasa (MAPKK o MEK), que a su vez activa a la MAPK por fosforilación. Las MAPKKK son proteínas a menudo activadas por fosforilación o por interacción directa con proteínas de unión a guanósín trifosfato (GTP) (como la familia Ras/Rho) en respuesta a estímulos extracelulares. Mediante fosforilación dual en residuos treonina y tirosina, las MAPK son activadas. Una vez activas, fosforilan a sus sustratos en residuos serina o treonina (Salinas-Sánchez et al. 2012). FDC y mitógenos activan la cascada de ERK1/2, induciendo la proliferación y el crecimiento celular (Figura I10). La estimulación de esta vía activa, a través de la acción de una MAPKK, a MEK1/2 que posteriormente fosforila a ERK1/2, generando su activación. ERK1/2 posee múltiples sustratos, entre ellos proteínas de membrana, fosfolipasas citoplasmáticas y factores de transcripción. Se ha descrito que la vía de ERK1/2 está activa en CTB de primer trimestre (Kita et al. 2003) y que promueve la diferenciación trofoblástica en placenta humana (Daoud et al. 2005).

La vía de PI3K también es activada por el receptor de leptina en células placentarias (Donato Jr et al. 2010, Perez-Perez et al. 2010). Como ya hemos mencionado, la señalización celular está controlada por proteínas quinasas a través de pasos secuenciales de fosforilación. La subunidad reguladora p85 de PI3K es predominantemente activada por receptores tirosina quinasa y regula funciones celulares tales como crecimiento, supervivencia y migración, siendo la activación irregular de esta vía asociada a procesos tumorales (Pinzón et al. 2009). La proteína Akt o PKB es activada principalmente por PI3K y fosforila a proteínas involucradas en la supervivencia celular como lo son MDM-2, p53, BAD, mTOR y p27 (Manning y Cantley 2007).

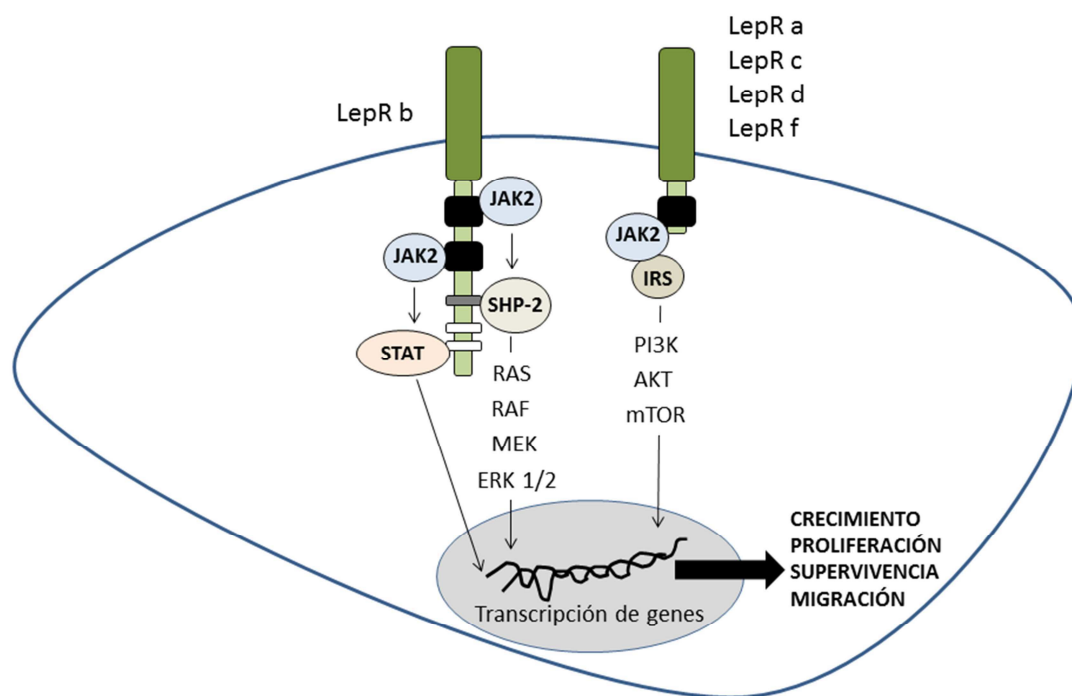


Figura I10: Cascadas de señalización activadas por leptina. La unión de leptina a sus receptores puede generar la activación de las vías de JAK/STAT, MAPK o PI3K/Akt. Se muestra en la figura los intermediarios y acciones principales de las cascadas de señalización de MAPK (ERK1/2) y PI3K/Akt.

Funciones de la leptina

Se han descrito numerosas funciones biológicas de la leptina (Figura I11). En este apartado describiremos en primer lugar su función clásica de inhibición del apetito y luego haremos hincapié en sus funciones ligadas a la reproducción. Sin embargo no queremos dejar de destacar la interacción de la leptina con distintos neurotransmisores interviniendo en procesos neurocognitivos (Farr et al. 2015), su participación en la regulación de la homeostasis de la glucosa (Savage y O Rahilly 2002, Perez-Perez et al. 2013) y el remodelamiento óseo (Kishida et al. 2005), su acción inmunomoduladora (Houseknecht et al. 1998, Maruna et al. 2001) y angiogénica (Bouloumie et al. 1998), así como las acciones que faltan dilucidar sobre el tracto gastrointestinal y el sistema cardíaco (Allison y Myers 2014).

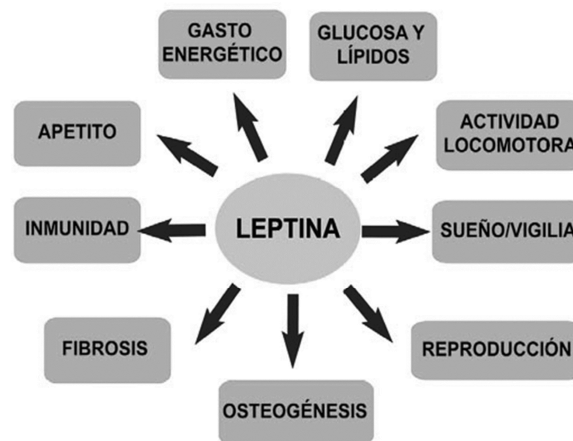


Figura I11: Funciones de leptina. Se han descrito numerosos efectos fisiológicos de la leptina, tanto en animales de experimentación como en humanos. Modificado de Tessier et al. 2013.

Función energética

La leptina es una hormona secretada principalmente por las células adiposas y tiene la función de limitar la ingesta de alimentos y aumentar el gasto de energía determinando de esta manera el balance energético del organismo. Estos efectos se logran mediante la interacción con receptores específicos del sistema nervioso central a nivel del hipotálamo (Ahima y Flier 2000). Se ha demostrado que lesiones tempranas en el hipotálamo generalmente producen obesidad severa (Münzberg y Morrison 2015).

En ratones, mutaciones en el gen de la leptina genera obesidad (Zhang et al. 1994) y un efecto similar se observa en humanos deficientes de LepRb (Allison y Myers 2014). Tanto en roedores como en humanos sus niveles plasmáticos están altamente correlacionados con el índice de masa corporal y la masa de tejido adiposo, sugiriendo que la leptina funciona como un sensor de las reservas y del balance energético del organismo (Henson y Castracane 2000).

Los receptores de leptina fueron clonados e identificados en el plexo coroides y en el hipotálamo, una región involucrada en la regulación del apetito, la ingesta y el peso corporal. La leptina interactuaría en el encéfalo con la mayoría de los

neuropéptidos involucrados en la regulación del balance energético y la ingesta (Wauters et al. 2000). La leptina disminuye los niveles de péptidos orexígenos y aumenta los niveles de péptidos anorexígenos. A su vez, las neuronas que sintetizan hormona liberadora de corticotropina (CRH), hormona liberadora de tirotrofina (TRH) y oxitocina en el núcleo paraventricular, son controladas indirectamente por la leptina y median los efectos inhibidores de la leptina sobre la ingesta de comida, la termogénesis y la secreción neuroendocrina (Ahima 2005).

Función reproductiva

Luego del descubrimiento de la leptina se encontró que hembras que carecen de expresión de leptina (*LEP/LEP*) tienen niveles muy reducidos de hormonas sexuales, no ovulan, no tienen ciclos estrales y permanecen en estado prepuberal indefinidamente. La implantación de ovarios de hembras *LEP/LEP* en hembras normales restituye la capacidad ovulatoria de estos tejidos, indicando que la infertilidad no es debida a defectos ováricos primarios. El tratamiento con leptina recombinante en hembras *LEP/LEP* restaura todos sus parámetros hormonales, así como sus ciclos estrales y la fertilidad (Goldenberg et al. 2014). De esta manera, la función de leptina de regulación de la reserva energética se ha extendido a la reproducción, al establecimiento de la pubertad y a la gestación (Tabla I3) (Reitman et al. 2001, Bajoria et al. 2002).

La leptina controla el eje hipotalámico hipofisiario gonadal a distintos niveles, estimulando la síntesis y liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), de la hormona folículo estimulante (FSH) y LH (Yu et al. 1997). En humanos, los niveles de leptina se correlacionan con los de LH, FSH, E₂ y testosterona, sugiriendo que la leptina podría actuar como un factor permisivo para la iniciación de la pubertad (Casabiell et al. 2001).

Sitio de acción	Blanco de acción	Proceso	Función biológica
Sistema nervioso central	Hipotálamo	Secreción GnRH	Regulación de la secreción de LH y FSH
	Hipófisis	Ciclo estral y ovulación	Secreción LH y FSH
Periferia	Ovario	Esteroideogénesis	Producción de estrógenos vía regulación de P450 aromatasa y P450 17 α hidroxilasa
		Foliculogénesis	Promoción de desarrollo folicular (de folículo primordial a primario)
	Embrión	Embriogénesis	Estimulación de la proliferación celular, promoviendo el crecimiento embrionario
	Útero	Angiogénesis	Estimulación de la actividad de MMPs

Tabla I3: Efectos de leptina en la reproducción femenina. Modificado de Herrid et al. 2014.

Los órganos reproductivos también son influenciados por la leptina. Diversos estudios han demostrado que leptina inhibe la producción de hormonas esteroideas en el ovario, tanto en roedores como en humanos (Spicer y Francisco 1997, Lin et al. 2009). Se le atribuye también un rol importante a la leptina en el desarrollo del oocito, la ovulación y la expresión de VEGF en el ovario (Joo et al. 2010). En roedores se ha descrito que leptina modula el estado oxidativo del tejido ovárico y ejerce efectos tanto estimulatorios como inhibitorios del proceso ovulatorio, encontrándose los efectos estimulatorios mediados por la activación de STAT3 y ERK1/2. Particularmente se ha encontrado que bajas concentraciones de leptina tienen un papel protector, mientras que altas concentraciones de esta hormona parecerían estar implicadas en la muerte celular (Di Yorio et al. 2013, Bilbao et al. 2015). Se ha reportado también la expresión de leptina en el fluido folicular y en mujeres con síndrome de ovario poliquístico se observó una correlación entre los niveles séricos de leptina y una disminución en la tasa de fertilización, implantación y embarazo luego de ensayos de fertilización *in vitro* (Laughlin et al. 1997).

En humanos se reportó la expresión de leptina en blastocistos, en STB, en CTB, en cultivos primarios de células amnióticas, en endometrio y en células endoteliales de

la vasculatura de las vellosidades coriónicas (Ashworth et al. 2000, Gonzalez et al. 2000). A su vez, el receptor de leptina se expresa en la decidua materna y se ha evidenciado que el endometrio uterino es blanco para la acción de leptina, por lo que se propone que la leptina es importante en la señalización de la implantación del embrión en mamíferos (Herrid et al. 2014).

La placenta, tanto en ratas como en humanos, produce grandes cantidades de leptina. En mujeres embarazadas el nivel de leptina en suero aumenta en comparación a las no embarazadas, principalmente durante el segundo y tercer trimestre y decae rápidamente luego del parto, lo que sugiere un rol de la leptina durante la gestación. Se ha reportado que leptina aporta al correcto desarrollo fetal y a una adecuada función placentaria ya que en placenta regula el transporte de nutrientes, la angiogénesis, la mitogénesis trofoblástica y la inmunomodulación (Holness et al. 1999, Tessier et al. 2013).

Por otro lado se ha evidenciado que la leptina produce un aumento en la secreción de hCG como así también de citoquinas proinflamatorias y prostaglandinas, actuando de esta manera como una hormona reguladora de la función endócrina placentaria (Islami et al. 2003).

Rol de leptina en la implantación embrionaria

Experimentos *in vitro* con embriones murinos mostraron que el agregado de leptina promueve el desarrollo de blastocistos y que los mismos, independientemente de ser cocultivados o no con células endometriales, secretan leptina (Perez-Perez et al. 2015). Otros trabajos demostraron que en ratones la expresión de LepR en células endometriales está influenciada por la preñez y que la implantación se ve impedida por la inyección intrauterina de un anticuerpo o un péptido antagonista para leptina, sugiriendo que el endometrio también es un blanco de acción de leptina (Alfer et al. 2000). A su vez, se han detectado altos niveles de leptina en el fluido uterino de hembras preñadas (Kawamura et al. 2003). En particular, se ha descrito que LepRI se

regula de forma diferente en los sitios de interimplantación e implantación, con una expresión más baja en este último. Esto sugiere que la expresión temporal y espacial de LepR puede ser un mecanismo para establecer el entrecruzamiento molecular crucial entre el endometrio y el blastocisto en el momento de la implantación (Yoon et al. 2005).

En humanos, las células epiteliales y estromales del endometrio expresan leptina y LepR. Los oocitos también expresan LepR y la acción del mismo estaría involucrada en su desarrollo y maduración (Perez-Perez et al. 2015). En el blastocisto también se detectó la presencia del ARNm de leptina y de LepR, y se demostró que la secreción de leptina por parte de las células endometriales puede ser regulada positivamente por la presencia de blastocistos (Gonzalez et al. 2000). Se ha reportado que pacientes con problemas de fertilidad muestran una expresión disminuida de LepR en el endometrio y en mujeres que han sufrido abortos espontáneos recurrentes los niveles séricos de leptina también son menores a las de mujeres que transitan un embarazo normal (Alfer et al. 2000, Bajoria et al. 2002), lo que sustentaría un rol de leptina en la implantación embrionaria.

Resultados de nuestro grupo demostraron que en células placentarias humanas leptina regula la proliferación celular (Magarinos et al. 2007), promueve la síntesis de proteínas (Perez-Perez et al. 2009, Perez-Perez et al. 2010) y aumenta la expresión de HLA-G1 involucrando a las vías de señalización de MEK/ERK y PI3K (Barrientos, 2015 #755). Además probamos que leptina Estudios con explantos placentarios humanos mostraron que tanto leptina como LepR se expresan en los CTBev, donde leptina promueve la síntesis y secreción de MMP-2 y MMP-9, sugiriendo que leptina promueve la invasión trofoblástica (Castellucci et al. 2000). Se encontró también que leptina induce la fosforilación del receptor 2 de VEGF (VEGF-R2), promoviendo la angiogénesis (Tessier et al. 2013).

Los factores mencionados apoyan la noción de leptina como una citoquina placentaria que contribuye a la creación de un ambiente favorable para la implantación del embrión (Dos Santos et al. 2015).

Leptina y patologías asociadas al embarazo

La desregulación de la función autocrina y paracrina de la leptina en la interfase materno-fetal puede estar asociada al desarrollo de diversas patologías del embarazo (Bajoria et al. 2002). Se ha encontrado que los niveles plasmáticos de leptina maternos y fetales están desregulados en la diabetes mellitus gestacional (DMG), preeclampsia (PE) y restricción del crecimiento intrauterino (RCIU); pudiendo significar un efecto o causa de las perturbaciones (Linnemann et al. 2001).

El embarazo se caracteriza por ser un estado de resistencia a la insulina que se genera como resultado de la conjunción de diversos factores como lo son la secreción de cortisol, hPL, estrógenos y progesterona, y es cuando el funcionamiento de las células beta pancreáticas no es suficiente para contrarrestar dicho ambiente diabetogénico que se desencadena la DMG (Ural y Repke 2008). Esta patología se asocia con un incremento en los niveles de leptina y se ha reportado que la expresión de LepR es similar a la de embarazos normales, sugiriendo que la DMG sólo se asocia con cambios en la expresión de leptina (Al-Badri et al. 2015). Sin embargo Challier y colaboradores encontraron que la isoforma soluble del receptor se encuentra elevada, favoreciendo el incremento de la expresión de leptina y proponen que es dicho aumento una de las posibles causas de la alteración del desarrollo y la función placentaria (Challier et al. 2003).

La PE o hipertensión inducida durante el embarazo se caracteriza por hipertensión arterial y proteinuria luego de la semana 20 de gestación y se debe a una invasión trofoblástica y remodelación de las arterias espirales deficiente, lo que genera un menor flujo sanguíneo hacia la placenta, aumento del estrés oxidativo y disfunción endotelial. Estudios recientes han evidenciado que una alteración en la circulación de factores antiangiogénicos conduce a la PE (Mutter y Karumanchi 2008). En mujeres con PE los niveles plasmáticos de leptina son mayores, así como también la expresión del ARNm de leptina en placenta (Michael et al. 2004, Grisaru-Granovsky et al. 2008) y de la forma soluble de su receptor (Tessier et al. 2013); indicando que la alteración en los niveles de leptina y de sus receptores podría alterar la angiogénesis y los eventos de remodelación aportando a la disfunción endotelial. Estudios en células BeWo muestran

que en condiciones de hipoxia la expresión de leptina es significativamente mayor que en células cultivadas a presiones normales de oxígeno, sugiriendo que el aumento en la expresión de leptina observado en pacientes con PE podría ser resultado de la hipoxia producto de la deficiente circulación útero-placentaria (Mise et al. 1998).

La RCIU se caracteriza por una disminución en la velocidad de crecimiento fetal usualmente asociada a una mala nutrición del feto (Aydin et al. 2015). Sin embargo puede ser causada por factores nutricionales, genéticos o de circulación en la placenta, y se cree que una falla en la invasión trofoblástica o un impedimento en el desarrollo placentario podrían ser desencadenantes de esta patología (Mandrizzato et al. 2008). Se ha propuesto que una falla en la producción de leptina podría estar ligada con la RCIU (Linnemann et al. 2001), sin embargo los resultados obtenidos son discordantes. Estudios mostraron que mayores niveles de leptina en la madre, el feto y en el cordón se asocian a RCIU, mientras que los niveles de leptina placentarios no se modifican (Grisaru-Granovsky et al. 2008). Otros autores afirman que no existen diferencias en los niveles de leptina encontrados en el cordón umbilical de embarazos complicados con RCIU, en comparación con embarazos normales (Aydin et al. 2015). Sin embargo, otro estudio mostró que los niveles séricos de leptina en la madre no difieren, pero los niveles de ARNm y proteicos de leptina están aumentados en las placentas de embarazos con RCIU, sugiriendo que leptina podría ser un posible marcador de insuficiencia placentaria (Kyriakakou et al. 2008).

PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR

Ciclo celular

El ciclo celular es un conjunto de eventos que culmina con el crecimiento de la célula y su división. Para que ocurra una apropiada división y proliferación, toda célula eucariota debe seguir un correcto programa genético, el cual hace que ésta pase por

diferentes fases y culmine en la división celular. Para asegurar una correcta división, las proteínas que están íntimamente involucradas en su regulación deben ser expresadas dentro de una ventana de tiempo específica (Fragoso et al. 2004).

En un ciclo celular la célula se divide en dos, y cada una de las células formadas cuenta con los elementos estructurales y funcionales que le permiten repetir el proceso de crecimiento y división. Para que esto suceda se necesita la replicación del genoma, la distribución equitativa de la masa celular y una segregación precisa de cromosomas. La ejecución de esos eventos divide al ciclo celular en cuatro fases: crecimiento 1 (G1), síntesis (S), crecimiento 2 (G2) y mitosis (M). Durante G1 la célula aumenta de tamaño y se sintetiza nuevo material citoplasmático, sobre todo proteínas y ARN, mientras que durante la fase S se lleva a cabo la duplicación del ADN. En la fase G2 se continúa sintetizando ARN y proteínas, se incrementan las proteínas citoplasmáticas y organelas, por lo que la célula aumenta de tamaño y hay cambios visibles en la estructura celular. Al periodo de tiempo que transcurre entre dos mitosis, y que comprende los periodos G1, S y G2, se le denomina interfase. Durante la mitosis ocurre la división nuclear y celular, en este periodo los cromosomas se separan y ocurre la citocinesis (Alberts et al. 2002).

Las células de mamífero proliferan sólo cuando son estimuladas para hacerlo a través de señales intracelulares (factores de transcripción) y extracelulares (FDC, hormonas o mitógenos). Si se priva de tales señales, el ciclo celular se detendrá en un punto de control G1 y la célula entrará en un estado de quiescencia, denominado G0. La célula puede permanecer en G0 por días, semanas, o incluso años antes que se divida otra vez. Una vez que recibe nuevamente señales, sobre todo extracelulares, son estimuladas a salir de G0 y entran a G1 para iniciar un nuevo ciclo de división (Alberts et al. 2002, Blagosklonny y Pardee 2002).

Regulación del ciclo celular

La progresión del ciclo es de suma importancia para la célula y el organismo, por lo que es altamente monitoreada y regulada. Una gran variedad de proteínas

participan en la regulación del ciclo celular y fueron las ciclinas las primeras en descubrirse. Las ciclinas son proteínas que aparecen y desaparecen durante el ciclo celular, y son claves en la transición del ciclo celular. Luego se descubrieron las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), que están estructuralmente relacionadas unas con otras y requieren estar asociadas con sus respectivas ciclinas para ejercer su actividad (Velez y Howard 2015).

La actividad ciclina-quinasa es especialmente requerida en los llamados puntos de control en la transición de las diferentes fases del ciclo celular. Las ciclinas D forman complejos con las quinasas CDK4 y CDK6, que son necesarios para la transición de fase G1-S. En células G0, los niveles de ciclina D son bajos y probablemente por esta razón la célula se mantiene en esta fase. El complejo ciclina D/CDK4-6 tiene como función fosforilar a la proteína Retinoblastoma (Rb), que inhibe la proliferación celular. Una vez que esto ocurre la célula pasa el punto de restricción, un paso esencial para la transición de G0 a G1. En humanos se han descrito tres isoformas de ciclina D: D1, D2 y D3 (Kato 1999).

Existen también las ciclinas E, A y B. El complejo ciclina E/CDK2 desempeña un papel crucial en la transición de fase G1-S y actúa cooperativamente con el complejo ciclina D/CDK. El complejo ciclina A/CDK2 se requiere para la progresión de G1-S, mientras que el complejo ciclina A/CDK1 se requiere para la transición G2-M. Por último, el complejo ciclina B/CDK2 es necesario para la transición G2-M (Kato 1999, Dehay y Kennedy 2007).

La inhibición de quinasas constituye un poderoso mecanismo de control del ciclo y proporciona un importante enlace con otras vías que participan en la regulación de la proliferación, diferenciación y senescencia. Existen dos familias de inhibidores: la INK4 y la Cip/Kip. Los inhibidores que forman parte de la familia INK4 poseen la capacidad de unirse a las CDK y evitar que formen el complejo con las ciclinas, entre ellos se encuentran p16, p18 y p19. Mientras que los inhibidores de la familia Cip/Kip se unen directamente al complejo ciclina-CDK y modifican su actividad; ejemplos de ellos son p21, p27 y p57 (Pietras et al. 2011).

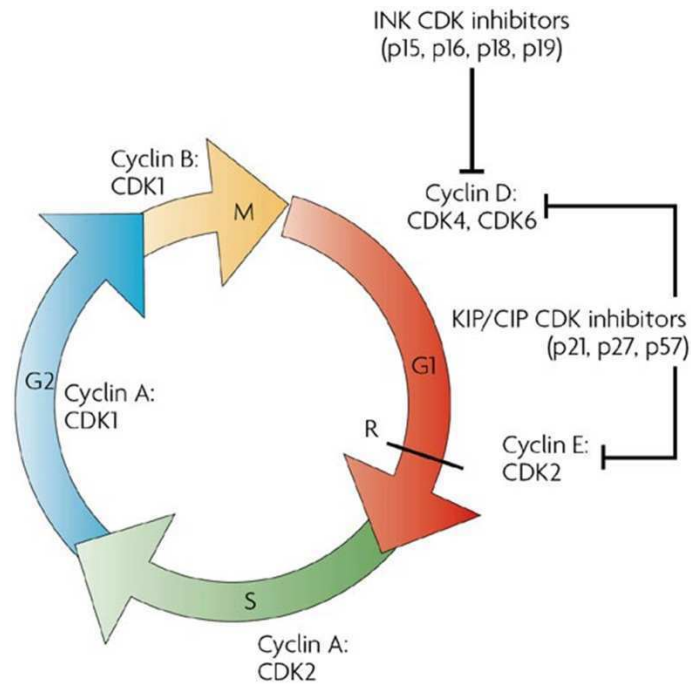


Figura I12: Regulación del ciclo celular. El ciclo celular se divide en cuatro fases: G1, S, G2 (que conforman la interfase) y M, donde ocurre la citocinesis. La progresión del ciclo celular está regulada por la activación e inactivación de un conjunto de dos grandes familias de proteínas que son las quinasas dependientes de ciclina (CDKs) y las ciclinas. En cada fase del ciclo se produce la aparición y activación de complejos CDK/ciclina, que actúan sobre sustratos específicos, activándolos o inhibiéndolos y haciendo así que el ciclo progrese a través de sus diferentes etapas. A su vez, existen dos familias de inhibidores: INK y Cip/Kip. Tomado de Dehay y Kennedy 2007.

Apoptosis

En todo organismo multicelular debe existir un equilibrio entre la proliferación y muerte de las células que lo componen. Fue en 1972 cuando Kerr implantó el término apoptosis, que evoca a la caída de las hojas de los árboles (Kerr et al. 1972). La apoptosis es considerada como una muerte natural fisiológica, resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas o dañadas. Morfológicamente se caracteriza por cambios en la composición de la membrana celular que permiten la unión de fagocitos, evitando de esta manera la liberación del contenido celular y la posible reacción de inflamación. Se altera también el citoesqueleto y se condensa y fragmenta la cromatina (Jordán 2003).

El proceso apoptótico puede ser dividido en tres etapas: la primera fase es la de iniciación, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte; en la segunda o de ejecución, se dan la mayor parte de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis, y por último, en la tercera etapa o de eliminación, los restos celulares son degradados por los macrófagos y células adyacentes (Torres y Vargas 2012).

Una de las características distintivas del proceso apoptótico es la activación de caspasas. Las caspasas son proteasas caracterizadas por poseer una cisteína en su sitio activo y por clivar a sus proteínas blanco en sitios específicos que contienen ácidos aspárticos (Asp). Las caspasas son sintetizadas en la célula como precursores inactivos o procaspasas, los cuales se activan por clivaje en un ácido aspártico, por parte de otras caspasas (NunÁez et al. 1998). Una vez activas, las caspasas clivan y por lo tanto activan otras caspasas, lo que resulta en una cascada proteolítica de amplificación. Aquéllas que están ubicadas río abajo, clivan finalmente sustratos celulares específicos, entre los que se encuentran citoqueratinas, Poli ADP-Ribosa Polimerasa (PARP), proteínas del citoesqueleto y membrana plasmática e inhibidores de DNasas (Salazar 2009).

La apoptosis puede inducirse por estímulos externos (vía extrínseca) o internos (vía intrínseca). La vía de señalización extrínseca puede ser iniciada por unión del factor de necrosis tumoral (TNF) a su receptor, por unión de TRAIL (del inglés, TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) a los receptores de muerte 4 y 5 (DR4 y DR5) o por unión de FasL (del inglés, Fatty acid synthetase Ligand) al receptor FasR. Estas asociaciones reclutan a moléculas adaptadoras, como FADD o TRADD, las cuales activan a las caspasas iniciadoras -8 y -10, activándose finalmente las caspasas ejecutoras -3, -6 y -7 (Figura I13) (Martínez 2009).

En la cascada de señalización intrínseca son una serie de estímulos intracelulares sobre la mitocondria los que desencadenan cambios en su membrana que conllevan una liberación hacia el citosol de proteínas proapoptóticas. La liberación de citocromo c activa a la proteína Apaf-1 y la procaspasa-9, estableciéndose un complejo denominado apoptosoma, que activa a la caspasa-3, iniciando la vía efectora

de apoptosis (Figura 113). También pueden ser liberados factores inductores de apoptosis (AIF), endonucleasa G y la DNasa activada por caspasas (CAD), que entran al núcleo y fragmentan el ADN (Martínez 2009).

Actualmente se conoce que las proteínas reguladoras de los cambios estructurales en la membrana mitocondrial son de la familia Bcl-2, cuya función puede ser pro o antiapoptótica, quienes a su vez están controladas por la proteína supresora de tumores p53. Estas proteínas se caracterizan por la presencia de hasta cuatro motivos de secuencia relativamente cortos, de menos de 20 aminoácidos, denominados dominios de homología Bcl-2 (Reed 2006). Las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 incluyen a Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xL y Bcl-Xs, proteínas que inhiben la apoptosis interaccionando con miembros proapoptóticos de la familia y bloqueando así la liberación del citocromo c desde la mitocondria. A su vez, dentro de las proapoptóticas se destacan Bax, Bid, Bad y Bak (Elmore 2007). Bid activa a Bak y Bax, que promueven la liberación del citocromo c, mientras que Bad inhibe a los reguladores antiapoptóticos (Alberts et al. 2002).

Proteína supresora de tumores p53

La renovación celular está estrictamente regulada, de manera de mantener un balance entre la proliferación y la muerte celular. p53 es la principal proteína reguladora de la división celular, ya que está implicada en el crecimiento celular, en el arresto del ciclo celular, en la muerte celular por apoptosis, en la reparación del ADN y en la inducción de la senescencia (Sohr y Engeland 2011). En este sentido p53 previene la propagación de células anormales, especialmente cuando se produce daño en el ADN (Yamauchi et al. 2007).

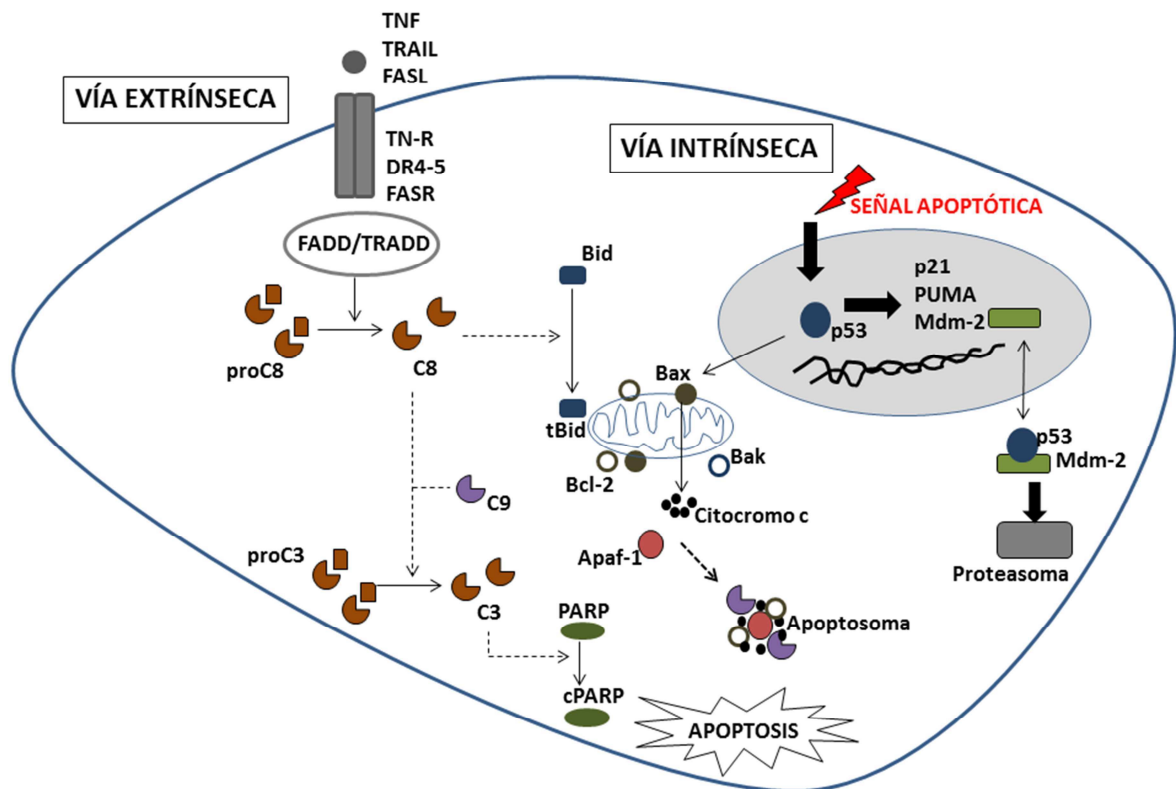


Figura I13: Vías extrínseca e intrínseca para la generación de apoptosis. La vía extrínseca es iniciada por TNF, TRAIL o FasL, activando a caspasa-8 (C8) que activa a caspasa-3 (C3). A su vez C8 transforma Bid en tBid. La vía intrínseca es iniciada por varias señales, principalmente estímulos externos (drogas, hipoxia, remoción de factores de crecimiento, luz UV, etc). Las proteínas Bid, Bad, Noxa y Puma se unen a la familia de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 para anular su inhibición sobre Bax y Bak y así activarlas. Bax y Bak oligomerizan y permeabilizan la membrana mitocondrial externa generando la liberación de citocromo c al citoplasma donde forma el apoptosoma junto a APAF-1, activando a caspasa-9 (C9) que activa a C3, donde ambas vía apoptóticas convergen.

Como se mencionó anteriormente p53 participa en una amplia variedad de procesos celulares y es por esta razón que su regulación es muy compleja e implica una amplia red de reguladores positivos y negativos. En condiciones normales los niveles de p53 se mantienen bajos y su función es reprimida por Mdm-2 y MdmX. Mdm-2 es una E3 ubiquitina ligasa y consiste en la principal proteína reguladora de p53. En su dominio regulatorio c-terminal p53 posee seis lisinas que pueden ser ubiquitinadas por Mdm-2 y se observa que en presencia de altos niveles de Mdm-2 p53 es poliubiquitinada mientras que sólo se monoubiquitina cuando los niveles de Mdm-2 son bajos. De esta manera, Mdm-2 promueve la translocación de p53 del núcleo al

citoplasma, donde se produce su degradación vía proteasoma (Dai y Gu 2010). Es importante destacar que p53 también actúa como factor de transcripción del gen de Mdm-2 y en condiciones de estrés promueve su transcripción, generando un *feedback* negativo (Heazell et al. 2011). Tanto Mdm-2 como MdmX interactúan con p53 y forman un complejo sobre los promotores de los genes blanco que reprime la función de p53, impidiendo su unión a coactivadores de la transcripción. Por otro lado, MdmX también es capaz de promover la degradación de p53 independientemente de Mdm-2 (Chen et al. 2010).

El gen de p53 está compuesto por once exones y posee en los exones 2 y 4 sitios alternativos de inicio de la traducción. p53 posee múltiples dominios, entre los que se encuentran dos dominios de transactivación, necesarios para activar la transcripción de sus genes blanco; un dominio rico en prolinas, requerido para la interacción con otras proteínas; un dominio de unión al ADN; un dominio de tetramerización y un dominio regulatorio que posee de localización nuclear y es capaz de unirse de forma inespecífica al ADN dañado (Olsson et al. 2007).

Los distintos dominios de p53 poseen sitios conservados que pueden ser regulados por diversas modificaciones post-traduccionales, incluyendo fosforilación, acetilación, ubiquitinación, sumoilación y neddilación (Dai y Gu 2010). En condiciones de estrés p53 se fosforila en residuos específicos, principalmente en Ser15 y Ser20, que disminuyen su afinidad por Mdm-2 y de esta manera se estabiliza y se activa (Gewies 2003). Una vez activa, p53 es capaz de unirse al ADN, activar la transcripción de sus genes blanco y de esta manera promover la apoptosis, pudiendo hacerlo tanto por vía intrínseca como extrínseca (Yamauchi et al. 2007).

Para poder actuar como factor de transcripción p53 debe estar en su conformación tetramérica, compuesta por dos homodímeros. De esta manera, regula la expresión de una gran cantidad de genes involucrados en diversas funciones celulares. Particularmente, los genes blanco de p53 relacionados con la ejecución de la apoptosis pueden dividirse en dos clases, agrupándose según su participación en las vías de señalización intrínseca o extrínseca. Entre los componentes de la vía extrínseca pueden encontrarse CD95/Fas/Apo-1, DR4 y DR5; mientras que entre los componentes

de la vía intrínseca pueden encontrarse APAF-1, Bax, Puma, Noxa y Bid (Olsson et al. 2007, Heazell et al. 2011). Por otra parte, p21 es uno de los principales genes blanco de p53 y uno de los responsables del arresto del ciclo celular en G1, siendo c-MYC otro de los genes que contribuye a la regulación en este punto del ciclo (Sirotkin et al. 2012). p53 también es capaz de generar el arresto del ciclo en G2, pero en este caso la regulación ya es más complicada e involucra la expresión de varios genes capaces de influenciar la progresión del ciclo, como ciclina B, o la maquinaria de la mitosis, como la topoisomerasa II (Brown et al. 2007).

La fosforilación de p53 en Ser46 es crítica para la inducción de genes proapoptóticos, como por ejemplo p53AIP1, no obstante no es necesaria para la inducción de genes involucrados en el arresto celular (Dai y Gu 2010). Diversas quinasas son capaces de fosforilar este sitio, entre ellas se pueden mencionar a mutada en ataxia-telangiectasia (ATM), proteína quinasa C δ (PKC δ) y a la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (p38 MAPK). El hecho de que diferentes quinasas sean capaces de fosforilar a p53 en Ser46 sugiere que ésta puede ser una importante modificación para la regulación y función de p53. En este sentido se ha evidenciado que el tratamiento con Actinomicina D y Etopósido aumenta el pegado de p53 pS46 a genes relacionados con el desarrollo de apoptosis, destacando la importancia de este sitio (Smeenk et al. 2011).

Proliferación celular y apoptosis en placenta

El linaje trofoblástico es el primero en diferenciarse durante el desarrollo humano. Luego de que el blastocisto se adhiere al útero materno, los trofoblastos se fusionan y se forma el STB, que crece a medida que se incorporan nuevos trofoblastos mononucleados. Durante el desarrollo placentario, tanto los CTBv como los CTBev mantienen un subconjunto de células en contacto con la membrana basal de las vellosidades. Dichas células conservan su potencial generativo y son capaces de proliferar en respuesta a diversos factores de crecimiento. En el compartimento

extravelloso los trofoblastos proliferan y avanzan hasta el estroma uterino, donde dejan de proliferar y comienzan a invadir como resultado de su diferenciación. Por otra parte, las células que proliferan en el compartimento velloso se fusionan y aportan al STB (Huppertz et al. 2006).

Como ya mencionamos, la interacción física de los CTB proximales con la membrana basal les permite retener un fenotipo proliferativo, de esta manera el proceso de proliferación es restringido y está finamente regulado. Una vez completado su desarrollo, la placenta continúa atravesando distintos estados de proliferación y apoptosis de manera de mantener el recambio celular y la homeostasis del tejido (Genbacev y Miller 2000).

Es interesante destacar que el mecanismo por el cual los trofoblastos se fusionan dando lugar al sincicio está relacionado con la etapa inicial del proceso de apoptosis. La cromatina condensada en el núcleo es una característica típica del STB y una proporción variable de estos núcleos se agregan en grupos denominados nudos sinciciales que exhiben una morfología apoptótica mientras protruyen el espacio intervelloso y luego son liberados a la circulación materna. En los CTB que originan el sincicio se observa fosfatidilserina en superficie, activación de caspasa-8, fragmentación del ADN y condensación de la cromatina, relacionando así la extrusión de los nudos sinciciales con las etapas de ejecución tardía de la apoptosis (Huppertz 2004, Huppertz et al. 2006).

El proceso apoptótico está involucrado en diversos aspectos del desarrollo placentario como los son el crecimiento, el recambio celular y el parto. Durante la gestación aumentan los niveles de apoptosis dentro de las vellosidades terciarias, incrementándose en gran medida transcurridas las 40 semanas de embarazo (Heazell y Crocker 2008). La expresión de p53 en los embarazos normales predomina en los CTB, siendo mayor durante el primer trimestre y excepcionalmente se la detecta en el STB (Heazell y Crocker 2008). CTBev también expresan p53 y se describió recientemente su expresión en el estroma de las vellosidades (Korkmaz et al. 2013).

Los niveles de apoptosis se encuentran alterados en diversas patologías asociadas al embarazo. Tanto en abortos recurrentes durante el primer trimestre

como en coriocarcinomas, molas hidatiformes, RCIU y PE se encuentran elevados los niveles de apoptosis. En particular, se reportó que explantos placentarios de embarazos asociados a RCIU y PE tienen una respuesta exacerbada a la exposición a TNF α o hipoxia (Chiu et al. 2001, Kale et al. 2001, Heazell y Crocker 2008). La expresión de p53 también puede verse alterada en embarazos patológicos, por ejemplo los niveles de p53 se encuentran aumentados en placentas provenientes de pacientes con RCIU. En este sentido, distintos grupos de investigación reportaron que los niveles de p53 también se encuentran alterados en condiciones de hipoxia (Cervar-Zivkovic et al. 2007, Chen et al. 2010). A su vez, se ha observado que la expresión de p53 también está incrementada en placentas de mujeres que han sufrido abortos espontáneos (Shang et al. 2013) y que la PE se asocia con alteraciones en la vía de p53 (Sharp et al. 2014). Al haberse encontrado la expresión de p53 aumentada en diversas patologías asociadas al embarazo se propuso que el estudio de p53 puede ayudar en el diagnóstico de enfermedades trofoblásticas gestacionales (Kale et al. 2001).

Rol de leptina en la proliferación celular y apoptosis

Numerosos estudios se han centrado en el rol de la leptina en el crecimiento, proliferación celular y apoptosis. Diversos grupos de investigación han evaluado la acción de leptina sobre la proliferación de células del sistema inmune. Leptina promueve la proliferación de linfocitos T *naive*, sin embargo inhibe la proliferación de los linfocitos T regulatorios, involucrados en la prevención de enfermedades autoinmunes (Park y Ahima 2014). Se ha reportado que leptina estimula la producción de IL-6 y TNF α en monocitos y de esta manera promueve su proliferación y activación, sugiriendo entonces a la leptina como una citoquina proinflamatoria (Santos-Alvarez et al. 1999). A su vez, se encontró que leptina promueve la supervivencia de monocitos a través de la vía de ERK1/2 (Najib y Sanchez-Margalet 2002).

Abundantes grupos de investigación evaluaron la acción de leptina en células tumorales que, debido a las particularidades de la placenta, suelen presentar características similares a las células trofoblásticas y encontraron que leptina

promueve la proliferación celular de manera dosis dependiente. En células de adenocarcinoma esofágico el efecto proliferativo de leptina está mediado por las vías de ERK, p38, PI3K/Akt y JAK2 (Ogunwobi et al. 2006), mientras que en células de cáncer de colon estaría involucrada la vía de NF-kappaB (Rouet-Benzineb et al. 2004). Se ha encontrado que en células provenientes de tumor mamario leptina aumenta su crecimiento, disminuye el arresto en G1, aumenta la expresión de ciclina D1 y a su vez disminuye la expresión de p53 y p21; siendo las vías de JAK2-PI3K/Akt-MEK/ERK necesarias para su acción (Chen et al. 2006).

Estudios en porcinos mostraron que en células de la granulosa leptina aumenta la expresión de p53, Bax y del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), mientras que disminuye la expresión de ciclina B1; sugiriendo que p53 es mediadora de la acción de leptina (Sirotkin et al. 2012). Sin embargo, en células de la granulosa de pollos, se encontró que leptina disminuye la expresión de Bax y p53, mientras que aumenta los niveles de Bcl-2 (Sirotkin y Grossmann 2007).

Existen diversos estudios sobre el efecto de leptina sobre la apoptosis. Se reportó que en células endoteliales leptina inhibe la apoptosis regulando los niveles de Bcl-2 (Artwohl et al. 2002). En eosinófilos leptina previene la muerte celular de manera dosis dependiente, retrasando el clivado de Bax y la liberación de citocromo c por la mitocondria y las vías de PI3K y MEK/Erk estarían involucradas en dichos efectos (Conus et al. 2005). Resultados similares se describieron en neutrófilos, donde a su vez mostraron que leptina inhibe la activación de caspasa-8 y -3 (Bruno et al. 2005).

Particularmente en células placentarias, se encontró que en la línea de coriocarcinoma humana BeWo leptina promueve la proliferación e inhibe la apoptosis a través del receptor Siglec-6 (Rumer et al. 2012). Resultados de nuestro grupo de investigación mostraron que el tratamiento con leptina exógena aumenta la proliferación y disminuye la apoptosis de células JEG-3, mientras que la disminución de la expresión de la leptina endógena mediante el uso de antisense, aumenta la actividad de caspasa 3 y disminuye la proliferación celular (Magarinos et al. 2007, Perez-Perez et al. 2008). Leptina también estimula la síntesis proteica de células JEG-3 a través de las vías de MAPK y PI3K (Perez-Perez et al. 2009). Por último, en células JAR

se encontró que la leptina inducida en condiciones de hipoxia, no es capaz de proteger frente a la apoptosis (Meißner et al. 2005).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo

La hipótesis de trabajo se basa sintéticamente en las siguientes premisas a partir de los datos aportados por la literatura y nuestros resultados preliminares:

- La leptina si bien originalmente fue descrita 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.
- 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.

Por lo tanto planteamos que la leptina, como citoquina placentaria, es una molécula clave regulatoria del proceso implantacional, que favorece la supervivencia e invasión de las células trofoblásticas.

Objetivo general

El presente trabajo ha sido desarrollado con el fin de estudiar el efecto de leptina y los mecanismos involucrados en los procesos de apoptosis, proliferación e invasión de células placentarias.

Objetivos específicos

CAPÍTULO I:

- I.1.** Caracterizar la acción de leptina sobre la proliferación de las células Swan-71.
- I.2.** Estudiar el efecto de leptina sobre la apoptosis de células placentarias.

CAPÍTULO II:

- II.1.** Analizar la regulación de leptina sobre el factor de transcripción p53 en células placentarias.
- II.2.** Evaluar las vías de señalización involucradas en la acción antiapoptótica de leptina.

CAPÍTULO III:

- III.1.** Estudiar el efector protector de leptina en células placentarias sometidas a distintas condiciones de estrés.

CAPÍTULO IV:

- IV.1.** Estudiar el efecto de leptina sobre los procesos de migración e invasión en células Swan-71.
- IV.2.** Caracterizar los mecanismos involucrados en la acción promotora de la invasión de leptina.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. MODELOS EXPERIMENTALES

I.1. Cultivos celulares

Los ensayos se realizaron con las líneas celulares Swan-71, células citotrofoblásticas humanas de primer trimestre, y BeWo, células trofoblásticas derivadas de coriocarcinoma. Las células Swan-71 fueron generadas en el laboratorio del Dr. Gil More (Straszewski-Chavez et al. 2009) y gentilmente cedidas por las Dras. Claudia Pérez Leirós y Rosanna Ramhorst (Dto. de Qca. Biológica, FCEyN-UBA, IQIBICEN-CONICET). Los cultivos se manipularon en estrictas condiciones de esterilidad, dentro de una cámara de flujo laminar y se hicieron crecer en botellas de 75 cm², a 37°C y atmósfera de 5% CO₂. Se mantuvieron en medio DMEM-F12 (Gibco) suplementado con penicilina-estreptomicina 50 U/ml, glutamina 4 mM, piruvato 1 mM (Invitrogen) y suero fetal bovino (SFB) 10% (Natocor)

I.1.1. 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 10 µl de la suspensión obtenida, en el borde de un cubreobjeto cubriendo la cámara de Neubauer. El conteo de las células se realizó con un 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.

I.1.2. Congelamiento de células

Para la preservación de stocks de las líneas, se prepararon suspensiones celulares de las mismas. Las células se despegaron con tripsina y se cuantificaron. Luego se centrifugaron y se resuspendieron en SFB conteniendo dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%. La suspensión se dividió en alícuotas en crioviales, los cuales se

enfriaron lentamente hasta una temperatura final de -70°C y se los transfirió a nitrógeno líquido.

I.1.3. Tratamiento de las células en cultivo

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 Swan-71 o BeWo se incubaron en medio DMEM-F12 0% o 1% SFB con leptina recombinante (Sigma), PD98059, LY294002, cicloheximida (Sigma). La leptina recombinante fue preparada en solución HCl 15 mM / NaOH 7,5 mM. El PD98059, LY294002 y la cicloheximida se prepararon en DMSO. En todos los experimentos se incluyó una muestra control que contiene el vehículo utilizado. En los experimentos diseñados para disminuir la expresión de leptina endógena, se utilizó un oligonucleótido antisentido (AS) (Invitrogen), complementario a los 5 primeros aminoácidos de la secuencia del ARNm de leptina, cuya secuencia es: GCACAGGGTTCCCAATGCAT. Se probaron diferentes concentraciones del AS desde 1 µM hasta 4 µM durante 48 horas de incubación. Los tratamientos con el AS se realizaron en DMEM-F12 0% SFB.

I.2. Explantos de placentas humanas

Placentas humanas a término de embarazos normales se obtuvieron luego de partos naturales o cesáreas, inmediatamente se colocaron en recipientes con PBS frío y se transportaron al laboratorio. Luego, se lavaron 3 veces con PBS estéril de manera de remover la sangre excedente. Se eligió para extraer los explantos el tejido vellosa libre de infarto, calcificación o hematoma. Con pinzas y tijera de cirugía se extrajeron muestras de al menos 5 cotiledones. De estas muestras se cortaron trozos de explantos de aproximadamente 10-15 g y se colocaron en PBS para un último lavado. Ninguna de las pacientes donantes sufría de embarazo anómalo. El uso de las muestras está aprobado con el consentimiento escrito de las donantes y por el comité de ética del Hospital “Profesor A. Posadas”.

I.2.1. Tratamiento de los explantos de placenta

Los tratamientos realizados en cada experimento se detallan en la leyenda de las figuras mostradas en el apartado de resultados. Luego de la extracción, los explantos de placenta se colocaron en placas de 24 pocillos, conteniendo 1 ml de medio DMEM-F12 0% o 1% SFB. Las placas con los explantos se colocaron en estufa a 37°C durante 20 minutos para la aclimatación y luego se reemplazó el medio por medio fresco y se agregaron las drogas correspondientes.

II. MODELOS DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS

Durante la realización de esta Tesis se utilizaron cuatro modelos distintos para inducir apoptosis. En cada uno de ellos se evaluó la activación de caspasa-3 como marcador de apoptosis.

II.1. Modelo de inducción de apoptosis por privación de suero

En este modelo para inducir apoptosis las líneas celulares o los explantos placentarios se cultivaron en medio DMEM-F12 0% SFB. La falta de los nutrientes presentes en el suero representa una condición de estrés para las células y comprobamos que en esta condición aumenta el proceso de muerte celular. Como control se utilizó el medio de cultivo suplementado con 10% SFB.

II.2. Modelo de inducción de apoptosis por radiación ultravioleta

El segundo modelo se basó en la inducción de apoptosis por el daño al ADN generado por la radiación ultravioleta (UV). En este caso células Swan-71 se sometieron a distintas dosis de UV, las que se calcularon según el tiempo de exposición con una lámpara de 15W a 80 centímetros de altura. Se probaron los siguientes tiempos de exposición: 4, 8 y 16 segundos, los que representan una dosis aproximada de UV de: 1, 2 y 4 mJ/cm² calculada en base a la fórmula:

$$\text{Energía/Superficie} = \text{Potencia} / (4\pi r^2)$$

Donde r = distancia

Para exponer a las células a la radiación UV se aspiró el medio de las placas. Una vez finalizada la exposición, se agregó DMEM-F12 1% SFB y dosis crecientes de leptina en el caso que correspondiera durante 5 horas. En base al aumento generado en la expresión de p53 se decidió utilizar una dosis UV de 2 mJ/cm^2 . Como control se utilizaron células no irradiadas tratadas o no con leptina.

II.3. Modelo de inducción de apoptosis por hipertermia

Este tercer modelo se basó en el estrés generado por el calor y se implementó aumentando la temperatura de incubación normalmente utilizada para los explantos placentarios. Se utilizaron baños térmicos con agitación a 37 (temperatura habitual de cultivo), 40 y 42°C y se incubaron los explantos en medio DMEM-F12 1% SFB. Transcurridos 30 minutos de incubación se agregaron 100 ng/ml de leptina al medio y se incubaron los explantos durante 3 horas.

II.4. Modelo de inducción de apoptosis por disminución del pH de cultivo

Este último modelo se basó en el estrés generado en las células por la disminución del pH extracelular, estímulo suficiente para la inducción de apoptosis. Durante la puesta a punto se evaluaron distintos pH menores a 7,4 (pH habitual del medio DMEM-F12): 7,2, 7, 6,8 y 6,6; eligiéndose el pH 6,8 para los ensayos. Los explantos placentarios se incubaron a 37°C en ausencia o presencia de leptina durante 20 horas.

III. METODOLOGÍA

III.1. Ensayo de proliferación

Las células Swan-71 (25000/pocillo) sembradas en una placa de 24 pocillos en medio DMEM-F12 1% SFB fueron incubadas en presencia o ausencia de 100 ng/ml de leptina. Para el estudio de las vías de señalización involucradas, las células se pretrataron durante 30 minutos con el inhibidor PD98059 (50μM). Se colocaron en

estufa a 37°C y transcurridas 24 horas se evaluó el número de células mediante conteo en cámara de Neubauer.

III.2. Ensayo de viabilidad

Las células Swan-71 (15000/pocillo) sembradas en una placa de 24 pocillos en medio DMEM-F12 1% SFB fueron incubadas en presencia o ausencia de 100 ng/ml de leptina. Se colocaron en estufa a 37°C y transcurridas 24 horas se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). Para tal fin las células se lavaron con PBS, se agregaron 60 µl de MTT en medio DMEM-F12 1% SFB y se incubaron las células durante 15 minutos a 37°C. La enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de células metabólicamente activas transforma al MTT (5 mg/ml) en formazán, un compuesto azul. De esta manera, la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Para cuantificar el color azul obtenido se retiró el medio, se disolvió el formazán producido en 200 µl de etanol absoluto frío, se incubó a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 570nm.

III.3. Determinación de la expresión de proteínas

III.3.1. Preparación de extractos celulares proteicos

Para la obtención de lisados proteicos las células Swan-71 o BeWo se cultivaron en placas de 10 cm de diámetro. Finalizado el tratamiento 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%). En el caso de los explantos placentarios, una vez finalizado el tratamiento se colocaron en tubos Eppendorf conteniendo 300 µl de buffer de lisis y se incubaron a -20°C durante 30 minutos. Luego se mezclaron con agitador y se centrifugaron a 10000g por 20 minutos.

De las muestras obtenidas 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 (Tris 50 mM; HCl pH 7,1; 2% SDS; 2% β -mercaptoetanol; 10% glicerol; EDTA 0,1 M; 0,1% azul de bromofenol).

III.3.2. Determinación de la concentración de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas en los extractos celulares por el método colorimétrico de Bradford (Bradford 1976). 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).

III.3.3. Geles desnaturalizantes de proteínas

Las muestras fueron analizadas mediante la técnica de SDS-PAGE. En cada gel se sembró igual cantidad de proteínas de cada muestra (50 μ g de proteínas/calle). En una calle en paralelo se sembraron marcadores de peso molecular preteñidos (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific). La electroforesis se realizó en buffer de corrida (Tris 250 mM, glicina 1,92 M), a 120 V durante aproximadamente 2 horas.

III.3.4. 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) a 120 V durante 90 minutos en frío. 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 (**ver tabla A**). Al día siguiente, la membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween 0,05% durante y luego se la incubó, en agitación a temperatura ambiente durante 90 minutos, con el anticuerpo

secundario de cabra anti-conejo o anti- ratón acoplado a peroxidasa (Santa Cruz), en PBS-leche 5%, dilución 1/2000. A continuación se efectuaron 3 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, anti-GAPDH y anti-tubulina. Las bandas se visualizaron con el detector Bio-Imaging Analyzer Fujifilm LAS-1000. Fueron cuantificadas con el software Image J y se relativizaron a la señal detectada en el control de carga correspondiente.

Anticuerpo	Dilución	Especie	Marca
anti-Bax	1:1000	Conejo	Santa Cruz
anti-Bcl-2	1:1000	Conejo	Epitomics
anti-Bid	1:1000	Conejo	Cell Signaling
anti-caspasa-3	1:1000	Conejo	Cell Signaling
anti-E-cadherina	1:1000	Conejo	Santa Cruz
anti-Ki67	1:1000	Conejo	Millipore
anti-leptina	1:1000	Conejo	Santa Cruz
anti-Mdm-2	1:1000	Conejo	Oncogene
anti-p21	1:1000	Conejo	Santa Cruz
anti-p53	1:1000	Ratón	Santa Cruz
anti-p53pS46	1:1000	Conejo	Cell Signaling
anti-pAkt	1:1000	Conejo	BD Biosciences Pharmingen
anti-PARP-1	1:500	Conejo	Santa Cruz
anti-pERK1/2	1:3000	Conejo	BD Biosciences Pharmingen
anti-Integrina β1	1:1000	Conejo	Santa Cruz
anti-β-actina	1:5000	Conejo	Santa Cruz
anti-GAPDH	1:10000	Ratón	Calbiochem
Anti-Tubulina	1:10000	Ratón	Santa Cruz

Tabla A. Especificaciones de los anticuerpos primarios utilizados.

III.4. Determinación de los niveles de ARNm

III.4.1. 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 disgregados en 1ml de Trisure 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 12000 rpm 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 12000 rpm 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 9000 rpm 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 midió la concentración de ARN obtenida en un espectrofotómetro para microvolúmenes (*NanoDrop*).

III.4.2. Retrotranscripción del ARN

El ARN total (5 µg) 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 *real time* PCR o se guardó a -20°C para ser utilizado posteriormente.

III.4.3. Real time PCR

La mezcla de reacción se preparó con 10 μ M de los *primers* sentido y antisentido (**ver tabla B**), 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 $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen 2001). Los experimentos se realizaron por triplicado con un mínimo de dos muestras por experimento.

Gen	Primer sentido	Primer antisentido
Ciclofilina	5' CTT CCC CGA TAC TTC A 3'	5' TCT TGG TGC TAC CTC 3'
p53	5' GGA AGA GAA TCT CCG CAA 3'	5' AGC TCT CGG AAC ATC TCG AAG 3'
Mdm-2	5' TTA CCC AGG CTG GAG TGC AG 3'	5' GAG AAT GGT GCG AAC CCG 3'
MMP-2	5' CAC CTA CAC CAA GAA CTT CC 3'	5' TGG CAC CCA TTT ACA CCT AC 3'
E-cadherina	5' GAC CAA GTG ACC ACC TTA GA 3'	5' CTC CGA AGA AAC AGC AAG AGC 3'
ITGB1	5' ACC AAG GTA GAA AGT CGG GAC 3'	5' TCT GGA CCA GTG GGA CAC TC 3'
Ciclina D1	5' AGA CCT TCG TTG CCC TCT GT 3'	5' CAG TCC GGG TCA CAC TTG AT 3'
p21	5' GAT GGC ACC AGA GGT GGT TA 3'	5' TCC CGA AAT ATT GGG GAA AG 3'

Tabla B. Secuencias de los *primers* utilizados.

III.5. Ensayos de transfecciones transitorias

III.5.1. Preparación de bacterias competentes

Una alícuota de cultivo de *E. coli* DH5 α , conservado a -70°C, se creció a 37°C durante toda la noche en 500 μ l de medio LB (10 g triptona, 5 g extracto de levadura, 5 g NaCl, pH 7.4). Luego, se sembraron 100 μ l 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 μ l 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.

III.5.2. 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), incluyendo una placa control sembrada con bacterias competentes sin transformar.

III.5.3. 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 horas 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, 1% SDS) 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 20 µl de agua.

III.5.4. Midipreparación de plásmidos

Una vez confirmada la presencia del plásmido en alguna de las colonias obtenidas, se realizaron preparaciones de plásmido en mayor escala y pureza, para obtener masa de ADN a ser transfectado en las células Swan-71. 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 se 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.

III.5.5. Electroforesis en gel de agarosa

Los plásmidos obtenidos tanto en las minipreparaciones como en las midipreparaciones se analizaron en geles de agarosa (Sigma) 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%, xileno cianol 0,25% y glicerol 30%) por pocillo. Se sembraron en otra calle 5 µl 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). Las bandas obtenidas se observaron por fluorescencia a la luz ultravioleta en un detector de fluorescencia y quimioluminiscencia (GBox, Syngene).

III.5.6. Transfecciones transitorias

Para realizar las transfecciones transitorias se utilizó el método de liposomas Lipofectamina Plus (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del producto. Células Swan-71 (120000 células/pocillo) fueron crecidas durante 24 horas en medio DMEM-F12 10% SFB, en placas de 6 pocillos con 2 ml de cultivo por pocillo. A continuación se preparó por un lado cada mezcla de plásmido más 100 μ l de medio DMEM-F12 carente de antibióticos y de suero, y por otro lado la mezcla de 4 μ l de reactivo Lipofectamina (1 mg/ml, Invitrogen) y 100 μ l 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 adicionando 800 μ l de medio más de manera de alcanzar 1 ml final de medio de incubación. Transcurridas 5 horas de incubación en estufa a 37°C, se removió la mezcla de transfección y se reemplazó por 2 ml de medio DMEM-F12. Se agregaron las drogas correspondientes según el experimento y se incubaron las células durante 40 horas a 37°C.

III.5.7. Plásmidos utilizados en los ensayos de transfección

Se utilizó una construcción derivada del vector pGL3 (Promega), que posee clonado un promotor mínimo conteniendo elementos de respuesta para p53 (pGL3-p53) río arriba del gen de luciferasa, gentilmente cedido por Dr. Martín Monte (Dto. de Qca. Biológica, FCEyN-UBA, IQUIBICEN-CONICET); y una construcción derivada del vector pGL2, que posee clonada la región promotora del gen de p21 río arriba del gen de luciferasa. Se utilizó también un vector para la sobreexpresión de p53 (SN3), gentilmente cedido por la Dra. Luciana Giono (IFYBINE-CONICET). Se emplearon también vectores que expresan de manera constitutiva la mutante dominante negativa para las proteínas MAPK kd (dominante negativo de ERK 1/2), MEK kd y Akt kd que fue generosamente cedidos por el Dr. Silvio Gutkind (NIH/NIDCR). Se utilizó en todos los casos como control de eficiencia de transfección un plásmido de expresión constitutiva en células eucariotas del gen de la β -galactosidasa (pRSV β -gal).

III.5.8. Determinación de la actividad de luciferasa

Para el ensayo de gen reportero de luciferasa se utilizó el sistema de determinación de Promega. Para ello, 30 μ l de cada extracto celular se mezclaron con 50 μ l 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 se relativizaron 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.

III.5.9. Determinación de la actividad β -galactosidasa

La actividad de β -galactosidasa se determinó en 20 μ l de cada extracto celular a los que se les agregó 150 μ l de Buffer Z (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM, 0,07% β -mercaptoetanol) 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 μ l de Na_2CO_3 1M por pocillo. La medición de absorbancia a 420 nm se realizó en un lector de Elisa Bio Rad.

III.6. Ensayo de fragmentación del ADN

Finalizados los tratamientos correspondientes los explantos se lavaron con PBS y se lisaron con buffer de lisis (1% SDS, EDTA 50 mM, Tris HCl 50 mM). Luego se agregó proteinasa K (10 mg/ml) y los lisados fueron incubados a 55°C durante 2 horas. Finalizada la incubación se agregó NaCl 5M, se mezcló por inversión y se centrifugaron las muestras a 15000 rpm durante 15 minutos. Se transfirieron los sobrenadantes a tubos Eppendorf limpios y se agregó etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y se dejaron las muestras toda la noche a -20°C. Al día siguiente, se centrifugaron a 15000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, se secaron los pellets de ADN a temperatura ambiente y se resuspendieron en 100 μ l de agua estéril. Se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2% y mediante tinción con bromuro de

etidio se visualizó el patrón de bandas del ADN fragmentado. Se cuantificó la banda de menor peso molecular mediante densitometría.

III.7. Determinación de la vida media

Células Swan-71 fueron tratadas con 10 µg/ml de cicloheximida (CHX, Sigma). Luego de 30 minutos se agregaron, en el caso correspondiente, 100 ng/ml de leptina. Se levantaron las células, de forma mecánica con un rastrillo de goma, a distintos tiempos: 0, 4, 8, 16 y 24 horas. Se obtuvieron lisados celulares (como se describió en III.3.1) y mediante *Western blot* se midió la expresión de p53 y GAPDH. La expresión de p53 se relativizó tanto los valores obtenidos de GAPDH como a los valores de p53 a tiempo 0 para cada tratamiento (CHX o CHX + leptina), obteniéndose así los porcentajes de p53 en cada punto de tiempo. Las curvas obtenidas para porcentaje de p53 en función del tiempo se linealizaron mediante su transformación al logaritmo natural y a partir de las pendientes (λ) obtenidas se calculó el valor de vida media ($t_{1/2}$) mediante la fórmula:

$$t_{1/2} = \ln 2 / \lambda.$$

Agradecemos a Sergio Nemirovsky (IQUIBICEN-CONICET) por la ayuda brindada para el abordaje y posterior análisis estadístico de los datos obtenidos.

III.8. Ensayo de migración celular

Las Células Swan-71 (125000 células/pocillo) fueron crecidas a confluencia en medio DMEM-F12 10% SFB en placas de 6 pocillos, las cuales previamente fueron marcadas con rayas paralelas en el reverso. Alcanzada la confluencia el medio fue sustituido por DMEM-F12 0.5% SFB durante 24 horas, con el objetivo de detener el ciclo. Al día siguiente se eliminó el medio, se realizó la herida (transversal a las rayas realizadas en el reverso de las placas) con un *tip* p100, se lavó dos veces con PBS para eliminar las células levantadas y se agregó medio fresco con distintas dosis de leptina y/o los inhibidores farmacológicos correspondientes. Se tomaron fotografías a distintos tiempos ($T_0=0$ horas y $T_f= 8$ horas) en 6 campos distintos por pocillo y se

evaluó mediante el programa ImageJ el área cubierta a cada tiempo. Se calculó el porcentaje de cierre de herida como:

$$\% \text{ cierre de herida} = (\text{área } T_f / \text{área } T_0) \times 100$$

III.9. Ensayo de invasión en cámaras *transwell*

En primer lugar se realizó una dilución 1:5 del matrigel (Geltrex, ThermoScientific) en DMEM-F12 0% SFB sin antibiótico ni glutamina. Se agregaron 20 µl de la dilución del matrigel en la parte superior de las cámaras *transwell* de 6,5 mm de diámetro, cuya membrana posee poros de 8 µm (Corning) y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Luego las células Swan-71 (100000 células/inserto) se sembraron en medio DMEM-F12 1% SFB y se incubaron durante 40 horas en ausencia o presencia de 100 ng/ml de leptina agregados tanto en la cámara superior como en la inferior. Concluido el tiempo de incubación, se descartó el medio de cultivo, se retiraron los insertos, se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con metanol frío durante 20 minutos las células presentes en la membrana del inserto. Luego con un hisopo se retiró cuidadosamente el matrigel de la cámara superior y se tiñeron los núcleos con una solución de DAPI (Sigma) durante 15 minutos. Por último se removieron las membranas de los insertos, se montaron sobre un portaobjetos y utilizando un microscopio de epifluorescencia se tomaron imágenes de 4 campos aleatorios de las células presentes en la cara inferior de la membrana. Se contaron los núcleos presentes en cada caso y se calculó el porcentaje de células que invadieron con respecto al control. El ensayo fue realizado en colaboración con el grupo de la Dra. Claudia Pérez Leirós.

III.10. Zimografías

Células Swan-71 (250000 células/pocillo) fueron sembradas en placas de 6 centímetros en medio DMEM-F12 10% SFB. Al día siguiente se reemplazó el medio por medio conteniendo 1% SFB y se trataron las células con 50, 100 y 250 ng/ml de leptina durante 48 horas. Finalizado dicho tiempo de incubación, se reemplazó el medio por DMEM-F12 0% SFB durante 24 horas. Finalizada la incubación se colectaron los medios

condicionados en tubos Eppendorf e inmediatamente se guardaron a -20°C . Los medios condicionados se mezclaron con buffer de siembra y se sembraron en geles de poliacrilamida al 12% con gelatina (1mg/ml). Finalizada la electroforesis, los geles se lavaron 4 veces durante 5 minutos con Tritón X-100 2,5% en PBS, luego se lavaron 2 veces durante 10 minutos con PBS y por último se incubaron en agitación de un día para el otro en el buffer de reacción conteniendo calcio (pH 7). Como control negativo se incubaron en buffer de reacción con EDTA. Finalizada la incubación los geles fueron teñidos durante 15 minutos con Coomassie Brilliant Blue. La actividad gelatinasa se detectó como bandas claras, cuya intensidad fue cuantificada con el programa ImageJ.

III.11. Análisis estadístico

Los valores obtenidos en los distintos ensayos se analizaron estadísticamente utilizando el programa GraphPad Prism 4. Los resultados se evaluaron por el método de ANOVA y a posteriori se aplicaron los test de Tukey o Bonferroni. Se consideró un $P < 0.05$ como criterio de diferencia significativa.

RESULTADOS

CAPÍTULO I

“Leptina promueve la supervivencia de células trofoblásticas”

El mantenimiento de un equilibrio entre la proliferación y la muerte de las células es necesario para el correcto funcionamiento de los diversos tejidos que componen a un organismo. Particularmente, el proceso de muerte celular o apoptosis es crítico durante el desarrollo ya que es necesario para la correcta implantación embrionaria y posterior placentación. A su vez, durante el desarrollo placentario, el proceso de proliferación es restringido y está finamente regulado (Genbacev y Miller 2000).

Diversos estudios han evaluado la capacidad de leptina de promover el crecimiento y la proliferación celular en distintos modelos experimentales (Gainsford et al. 1996, Santos-Alvarez et al. 1999, Martin-Romero et al. 2000, Lang et al. 2004, Misztal-Dethloff et al. 2004). Además, resultados previos de nuestro grupo han demostrado que leptina induce la proliferación celular en las líneas trofoblásticas humanas BeWo y JEG-3 (Magarinos et al. 2007). En base a los antecedentes mencionados, en este primer capítulo nos propusimos evaluar el efecto de leptina sobre la proliferación de células Swan-71 así como también sobre la apoptosis tanto en células en cultivo como en explantos de placenta humana a término.

I.1: Acción de leptina sobre la proliferación de células trofoblásticas

Leptina promueve la proliferación de células Swan-71

Para estudiar el efecto de leptina sobre la proliferación de células Swan-71 se realizaron experimentos de recuento en cámara de Neubauer a las 24 horas de tratamiento con 100 ng/ml de leptina en medio DMEM-F12 1% SFB. Observamos que leptina aumentó significativamente el número de células (**Figura R1A**). Por otro lado se determinó la viabilidad celular por el ensayo de MTT en similares condiciones experimentales. En este caso el tratamiento con leptina no mostró diferencias (**Figura R1B**).

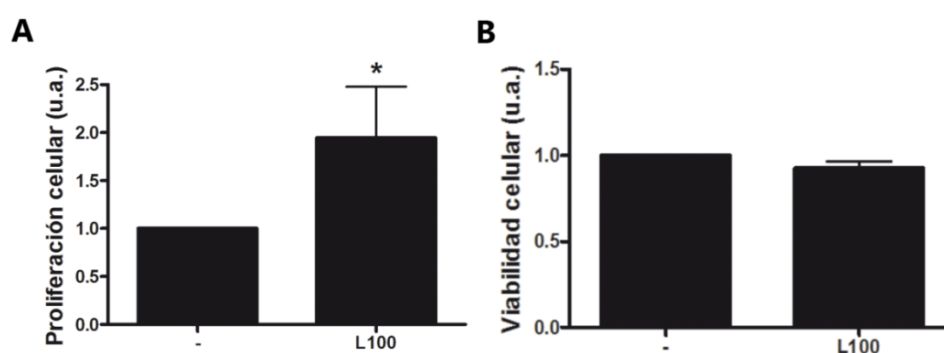


Figura R1. Leptina estimula la proliferación de células Swan-71. Se trataron células Swan-71 por 24 horas en medio DMEM-F12 1% SFB con 100 ng/ml de leptina y posteriormente se determinó el número de células en cámara de Neubauer (**A**) o la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT (**B**). Se muestra en los gráficos la cuantificación de los resultados obtenidos en cuatro ensayos independientes. * $p < 0,05$ con respecto al control.

La acción proliferativa de leptina estaría mediada por la vía de MAPK

Al observar que leptina incrementó la proliferación de células Swan-71 quisimos estudiar si la vía de señalización de MAPK (ERK1/2) estaba involucrada en este efecto. Para ello se utilizó el inhibidor farmacológico específico para MEK (quinasa de ERK1/2), PD98059 (PD). Se trataron las células con 50 μ M del inhibidor, 30 minutos más tarde se estimularon con 100 ng/ml de leptina y a las 24 horas se determinó el número de células por recuento en cámara de Neubauer (**Figura R2**).

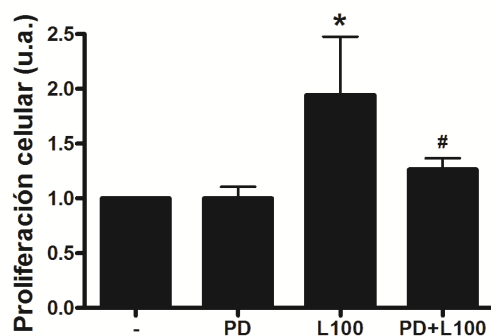


Figura R2. La vía de MAPK estaría involucrada en el efecto proliferativo de leptina. Células Swan-71 fueron incubadas en medio DMEM-F12 1% SFB en ausencia o presencia de 50 μ M del inhibidor PD98059 (PD) y tratadas o no con 100 ng/ml de leptina (L100) durante 24 horas. Finalizado el tratamiento, se determinó el número de células totales por recuento en cámara de Neubauer. Se muestra en los gráficos la cuantificación de los resultados obtenidos en tres ensayos independientes. * $p < 0,05$ con respecto al control (-) y # $p < 0,5$ con respecto al control con leptina (L100).

En la **Figura R2** se observa que el inhibidor PD bloqueó la acción proliferativa de leptina. Encontramos entonces que el efecto de leptina sobre la proliferación de células Swan-71 estaría mediado por la vía de señalización de MAPK.

Leptina incrementa los niveles de ARNm de ciclina D1

Se sabe que la progresión a través de la fase G1 es acompañada por la expresión de ciclina D1 y, a su vez, se ha demostrado que leptina aumenta la expresión de ciclina D1 en células hepáticas estelares (Saxena et al. 2004) y en trofoblastos humanos (Magarinos et al. 2007). Por esta razón decidimos evaluar si leptina induce la expresión de ciclina D1.

Células Swan-71 fueron tratadas durante 48 horas con dosis crecientes de leptina. Finalizado el tratamiento se evaluaron por *real time* RT-PCR los niveles de expresión de ciclina D1. En la **Figura R3** se puede observar que 100 ng/ml de leptina aumentó significativamente los niveles de ARNm de dicho regulador del ciclo celular.

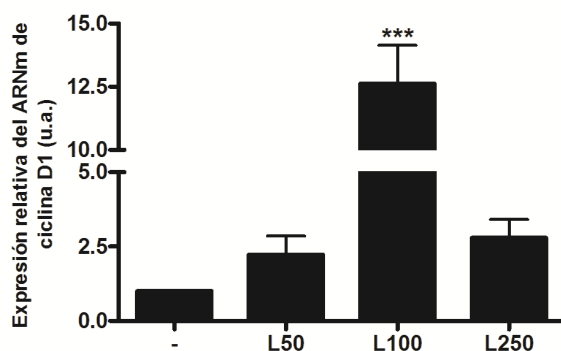


Figura R3. Leptina induce la expresión de ciclina D1. Células Swan-71 fueron incubadas con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 48 horas. Se determinó por *real time* RT-PCR la abundancia de ARNm de ciclina D1. Se muestra en los gráficos la cuantificación de los resultados obtenidos en tres ensayos independientes. ***p<0,001 con respecto al control (-).

Leptina aumenta los niveles de Ki-67

Ki-67 es una proteína muy usada como marcador de proliferación celular, por esta razón decidimos estudiar si leptina era capaz de regular su expresión. Para tal fin, células Swan-71 fueron cultivadas con concentraciones crecientes de leptina durante 48 horas y se evaluó por *Western blot* la expresión de Ki-67. En la **Figura R4** se puede observar que el tratamiento con leptina, independientemente de la dosis utilizada, generó un aumento en la expresión de Ki-67.

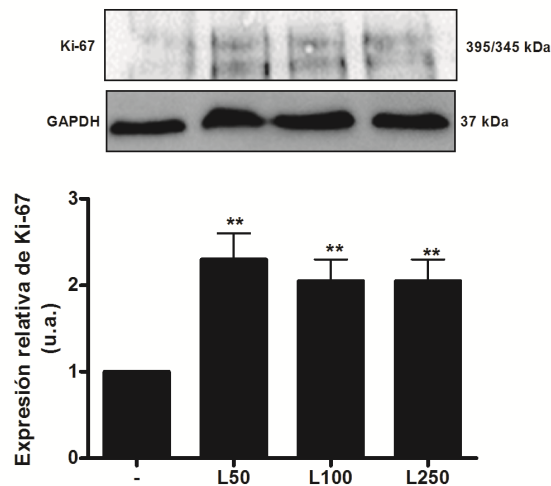


Figura R4. Leptina aumenta la expresión de Ki-67 en células Swan-71. Células Swan-71 fueron incubadas con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 48 horas. Se determinó por *Western blot* la expresión de Ki-67. Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. ** $p < 0,01$ con respecto al control (-).

Leptina induce la expresión de p21

El factor p21 interactúa con los complejos ciclina-CDK generando la inhibición de la progresión del ciclo celular (Harper et al. 1995, Gewies 2003). Quisimos averiguar entonces si leptina es capaz de modular la expresión de p21. En primer lugar se evaluó la actividad del promotor de p21. Para dicho fin, células Swan-71 fueron transfectadas transitoriamente con un plásmido reportero para p21 que posee clonada la región promotora de p21 río arriba del gen de la luciferasa. En la **Figura R5** se observa que el tratamiento con leptina incrementó de manera dosis dependiente la actividad promotora de p21.

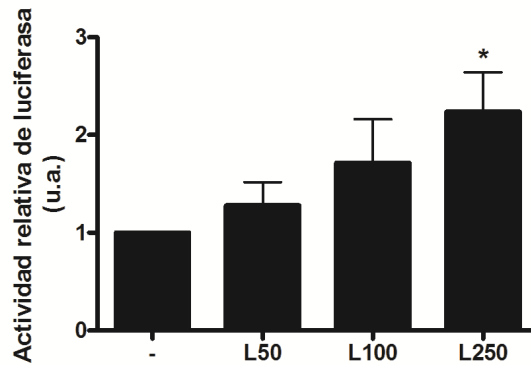


Figura R5. Leptina aumenta la actividad promotora de p21 en células Swan-71. Células Swan-71 fueron transfectadas transitoriamente con un plásmido reportero para el promotor de p21. Luego fueron incubadas con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 48 horas. Se determinó la actividad de luciferasa en cada caso, la cual fue relativizada con los valores de actividad de β -galactosidasa obtenidos en el mismo ensayo. Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. * $p < 0,05$ con respecto al control (-).

Con el objetivo de profundizar el estudio de la acción de leptina sobre p21 realizamos ensayos de *real time* RT-PCR y *Western blot*. Observamos que el tratamiento con 250 ng/ml de leptina aumentó de manera significativa la expresión de p21 tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico (**Figura R6**).

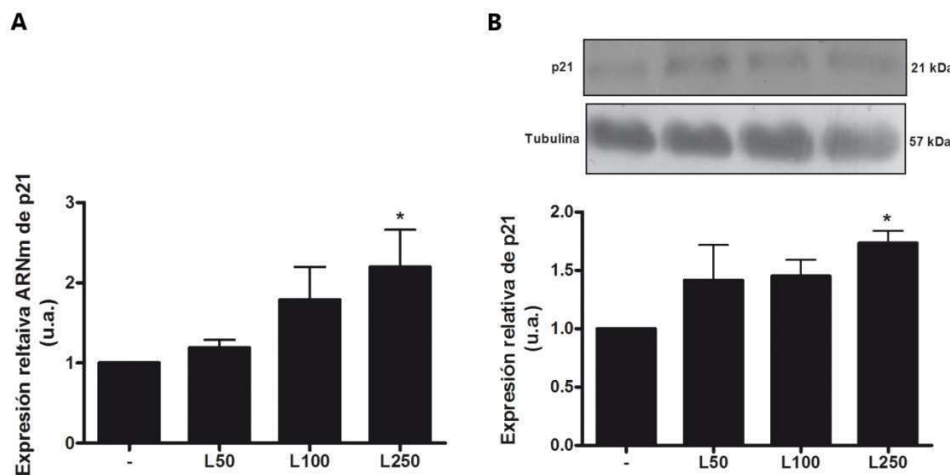


Figura R6. Leptina incrementa la expresión de p21. Células Swan-71 se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 48 horas, se extrajo el ARN total, se realizó una retrotranscripción para obtener el ADN copia y mediante *real time* RT-PCR se evaluó la expresión de p21 (**A**) o se realizaron extractos proteicos para evaluar los niveles de p21 mediante *Western blot* (**B**). Los ensayos se realizaron por triplicado. * $p < 0,05$ con respecto al control (-).

I.2: Acción de leptina sobre la apoptosis de células trofoblásticas

Dado que el aumento en el número de células luego del tratamiento con leptina podría deberse a una mayor proliferación o a una disminución de la muerte celular, decidimos estudiar la acción de leptina sobre la apoptosis de células placentarias utilizando distintas estrategias experimentales. En esta sección mostraremos los resultados obtenidos en el modelo de inducción de apoptosis por ausencia de factores de crecimiento.

Leptina disminuye la fragmentación del ADN

Durante el proceso de apoptosis se produce el corte internucleosomal del ADN en múltiplos de 180-200 pb. Si se somete al ADN de células apoptóticas a una electroforesis y subsiguiente tinción con bromuro de etidio se puede evidenciar un patrón de “*ladder*” o “escalera” debido a la fragmentación del ADN (Salazar 2009). Decidimos evaluar entonces si el tratamiento con leptina genera cambios en el patrón de la corrida electroforética de los fragmentos de bajo peso molecular de ADN. Se encontró que en células cultivadas en ausencia de suero, se cuadruplica la aparición de fragmentos pequeños de ADN, evidenciando una mayor fragmentación en dicha condición. El tratamiento con leptina redujo el porcentaje de fragmentación, llegando a alcanzar niveles similares a los observados en el control con 10% de suero (**Figura R7**).

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación demostraron que leptina al unirse a su receptor estimula las vías de señalización de MAPK (ERK 1/2) y PI3K/Akt en células placentarias (Perez-Perez et al. 2008, Perez-Perez et al. 2010). Por esta razón quisimos estudiar qué vías de señalización estaban involucradas en el efecto de leptina sobre la fragmentación del ADN utilizando inhibidores farmacológicos para las vías de señalización de MAPK y PI3K. Cuando los explantos fueron tratados con PD98059, se perdió el efecto inhibitorio de leptina, sugiriendo que la vía de MAPK estaría involucrada en el efecto antiapoptótico de leptina. Cuando se inhibió la vía de PI3K mediante el inhibidor LY294002, se redujo la cantidad de fragmentos pequeños de

ADN sin llegar a alcanzar los niveles observados con el tratamiento con 100 ng/ml de leptina (**Figura R7**).

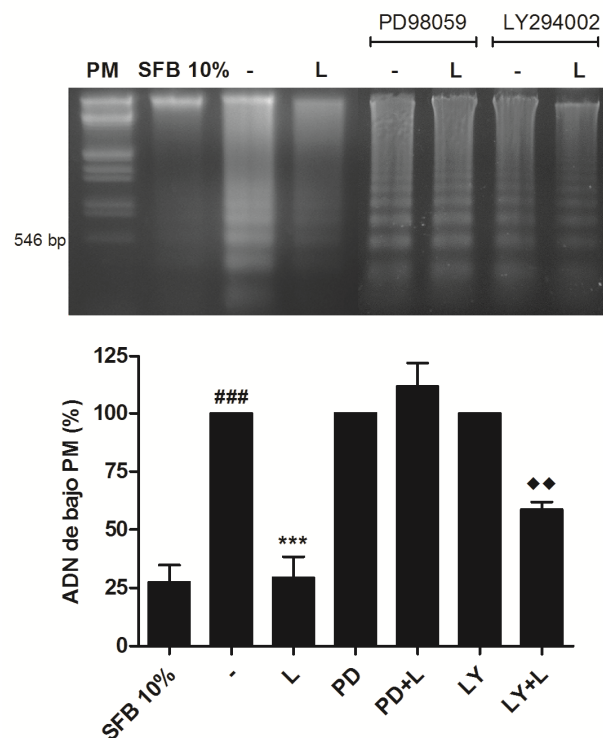


Figura R7. Leptina disminuye la fragmentación del ADN. Explantos placentarios fueron pretratados durante media hora con inhibidores farmacológicos para MEK (PD98059, PD, 50μM) o PI3K (LY294002, LY, 10μM). Los ensayos se realizaron cultivando los explantos con medio DMEM-F12 0% SFB en ausencia o presencia de leptina (L, 100 ng/ml) durante 24 horas. Se muestra en el gráfico la cuantificación de las bandas de menor peso molecular de tres ensayos independientes. ### $p < 0,001$ con respecto al control con suero al 10% (SFB 10%); *** $p < 0,001$ con respecto al control sin suero (-) y ♦♦ $p < 0,01$ con respecto al control con inhibidor (LY).

Estos resultados demuestran que leptina disminuye los niveles de fragmentación del ADN en células placentarias incubadas en ausencia de suero y que principalmente la vía de señalización de MAPK estaría implicada en este efecto.

Leptina inhibe la activación de caspasa-3

Las caspasas son proteasas sintetizadas como zimógenos inactivos, procaspasas, que se activan por clivaje. Diferentes vías apoptóticas convergen en la

activación tardía de un efector apoptótico clave como lo es la caspasa-3 (Salazar 2009). Con el objetivo de confirmar las vías involucradas en la acción antiapoptótica de leptina evaluamos la activación de caspasa-3 por *Western blot*, estudiando la aparición de su fragmento clivado. Células BeWo se cultivaron en ausencia de suero y se trataron con concentraciones crecientes de leptina. Como se muestra en la **Figura R8**, la ausencia de suero aumentó tres veces la aparición del fragmento clivado de caspasa-3. Sin embargo leptina previno la activación de caspasa-3 de manera dosis dependiente, llegando a alcanzar niveles de activación comparables con el control con 10% SFB.

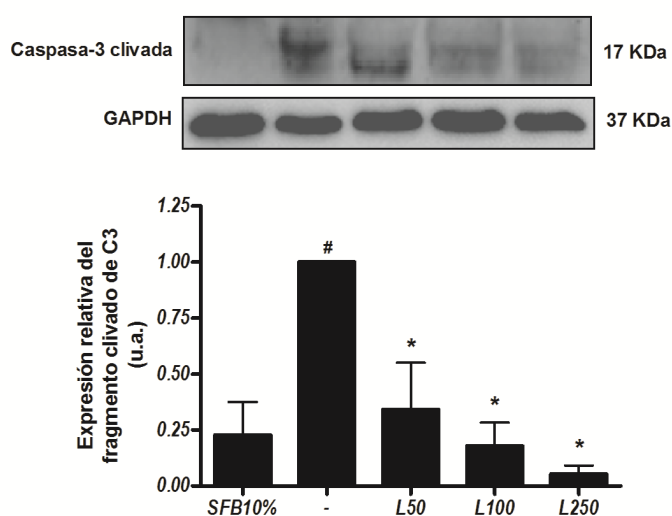


Figura R8. Leptina disminuye la activación de caspasa-3 en células placentarias en cultivo. Células BeWo se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) durante 48 horas en DMEM-F12 0% SFB. Se evaluó por *Western blot* la presencia del fragmento clivado de caspasa-3. Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. # $p < 0,05$ con respecto al control con suero al 10% (SFB 10%) y * $p < 0,05$ con respecto al control sin suero (-).

A partir de lo observado anteriormente, quisimos evaluar el rol de la leptina endógena en la regulación de la activación de caspasa-3. Para tal fin, células BeWo fueron tratadas con concentraciones crecientes de un oligonucleótido antisentido (AS) para leptina. Como se observa en el panel inferior de la **Figura R9**, el tratamiento con el AS disminuyó la expresión de leptina endógena y aumentó la activación de caspasa-3. Estos resultados refuerzan el rol antiapoptótico ejercido por leptina en células placentarias.

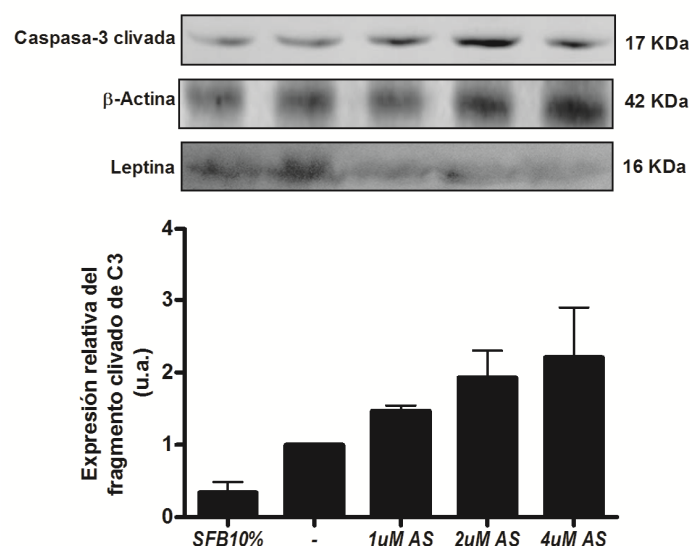


Figura R9. Efecto de la disminución de leptina endógena en la activación de caspasa-3. Células BeWo se trataron con dosis crecientes de antisense (AS) para leptina (1, 2 y 4 μ M) en medio DMEM-F12 0% SFB durante 48 horas. Se evaluó por *Western blot* la presencia del fragmento clivado de caspasa-3. Se comprobó la disminución de la expresión de leptina endógena como consecuencia del tratamiento con AS, las bandas obtenidas se muestran en el panel inferior ($p < 0,01$ con respecto al control sin suero y sin AS). Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes.

También estudiamos la activación de caspasa-3 en placentas humanas a término que representan un modelo más fisiológico. Para ello, explantos placentarios fueron incubados durante 24 horas en ausencia de suero y tratados con concentraciones crecientes de leptina. En la **Figura R10** se observa que aumentó la activación de caspasa-3 en ausencia de suero y que dicha activación fue inhibida de manera dosis dependiente por leptina.

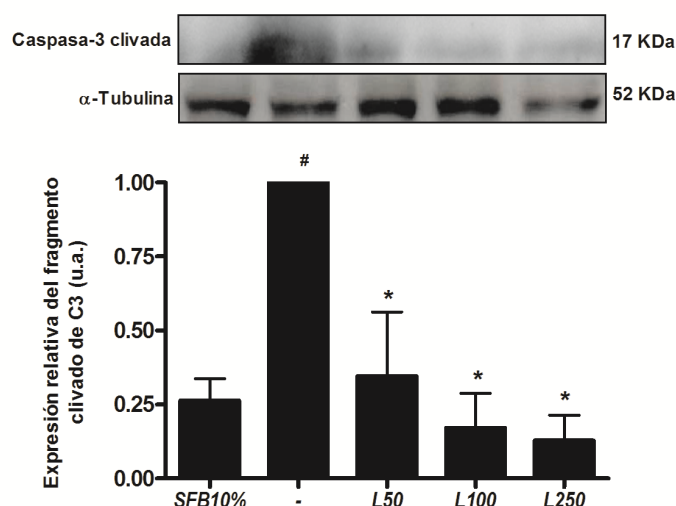


Figura R10. Leptina disminuye la activación de caspasa-3 en explantos placentarios. Explantos de placentas humanas a término se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) en medio DMEM-F12 0% SFB durante 24 horas. Se evaluó por *Western blot* la presencia del fragmento clivado de caspasa-3. Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. # $p < 0,05$ con respecto al control con suero al 10% (SFB 10%) y * $p < 0,05$ con respecto al control sin suero (-).

Como estrategia complementaria para confirmar la inhibición de la activación de caspasa-3 por leptina evaluamos la expresión de PARP-1, una proteína involucrada en la reparación del ADN que durante el proceso de apoptosis es clivada por caspasa-3 dando lugar a la aparición de un fragmento clivado de PARP (cPARP). Se evaluó la presencia de cPARP en células Swan-71 y en explantos placentarios tratados con las dosis de leptina utilizadas anteriormente. En la **Figura R11** se observa que la ausencia de suero aumentó la aparición de cPARP, tanto en células en cultivo como en explantos placentarios, coincidente con la activación de caspasa-3 ya descripta. Mientras que el tratamiento con leptina disminuyó su aparición.

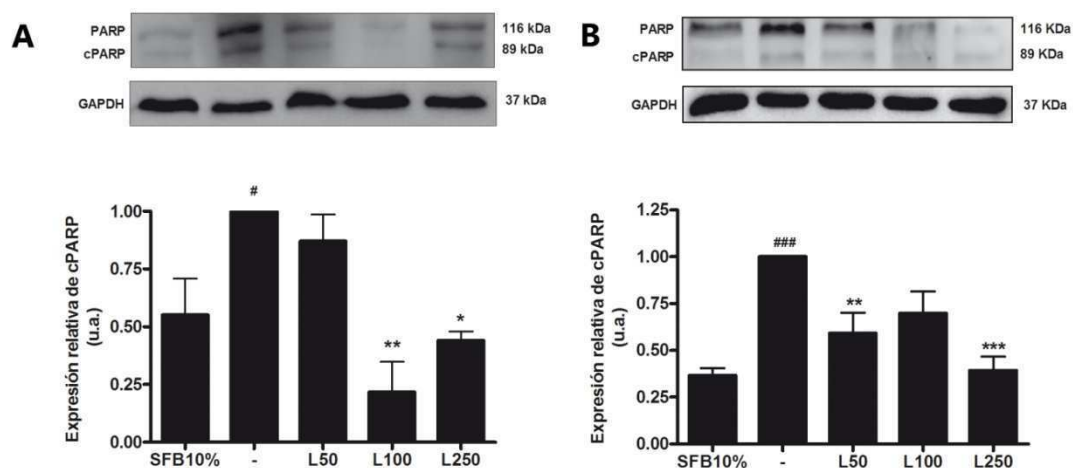


Figura R11. Leptina disminuye el clivado de PARP-1 en células y explantos placentarios. Células Swan-71 (A) y explantos de placentas humanas a término (B) se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) en medio DMEM-F12 0% SFB durante 48 horas en el caso de las células en cultivo y 24 horas en el caso de los explantos placentarios. Se evaluó por *Western blot* la presencia del fragmento clivado de PARP-1 (cPARP). # $p < 0,05$ y ### $p < 0,001$ con respecto al control con suero al 10% (SFB 10%) y * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ con respecto al control sin suero (-).

Leptina aumenta la relación Bcl-2/Bax

Las proteínas Bcl-2 y Bax representan marcadores de los efectos anti y proapoptóticos respectivamente. Decidimos estudiar si en condiciones de privación de suero, leptina es capaz de modular los niveles de dichas proteínas. Células Swan-71 y explantos placentarios fueron cultivados en ausencia de suero y tratados con concentraciones crecientes de leptina y por *Western blot* se evaluó la expresión de Bcl-2 y Bax. En la **Figura R12** se observa que el tratamiento con leptina no generó cambios en la expresión de Bax, pero que 100 ng/ml de leptina aumentaron significativamente la expresión de Bcl-2, incrementando entonces la relación Bcl-2/Bax.

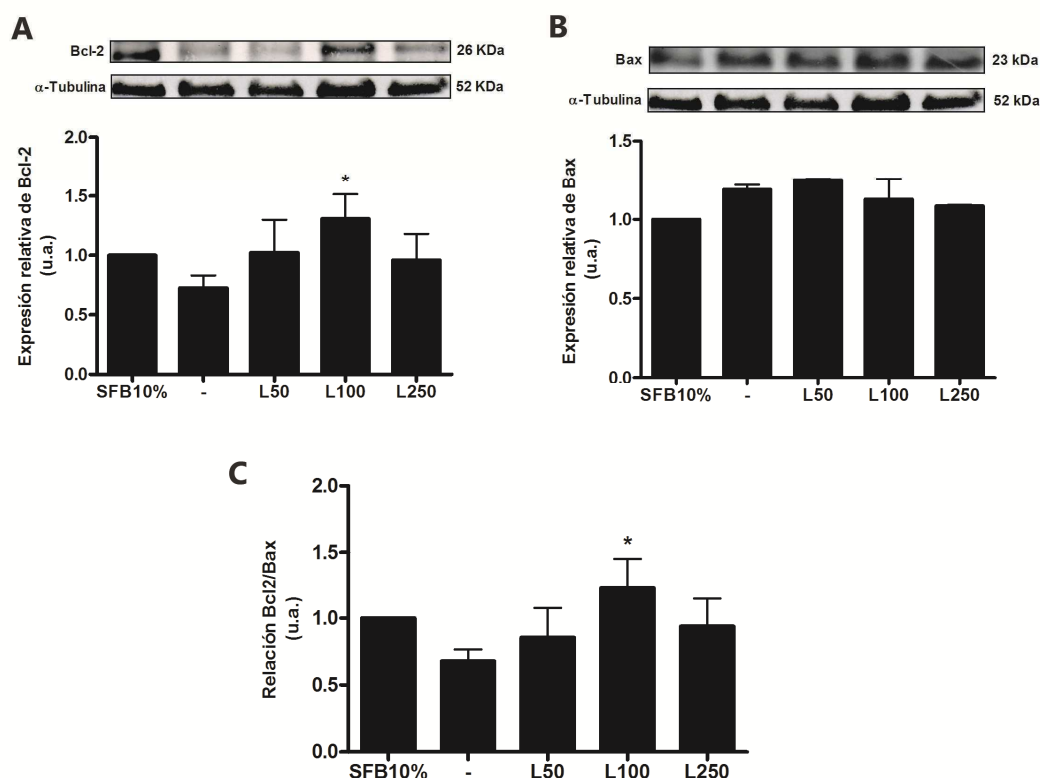


Figura R12. Leptina aumenta la relación Bcl-2/Bax en células placentarias. Células Swan-71 se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) durante 48 horas en medio DMEM-F12 0% SFB. Se evaluó por *Western blot* la expresión de Bcl-2 (**A**) y Bax (**B**). En **C** se muestra graficada la relación Bcl-2/Bax. Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. * $p < 0,05$ con respecto al control sin suero (-).

Sin embargo explantos placentarios tratados con leptina, además de evidenciar un aumento en la expresión de Bcl-2, también muestran una disminución en la expresión de Bax, contribuyendo ambas acciones al incremento de la relación Bcl-2/Bax (**Figura R13**).

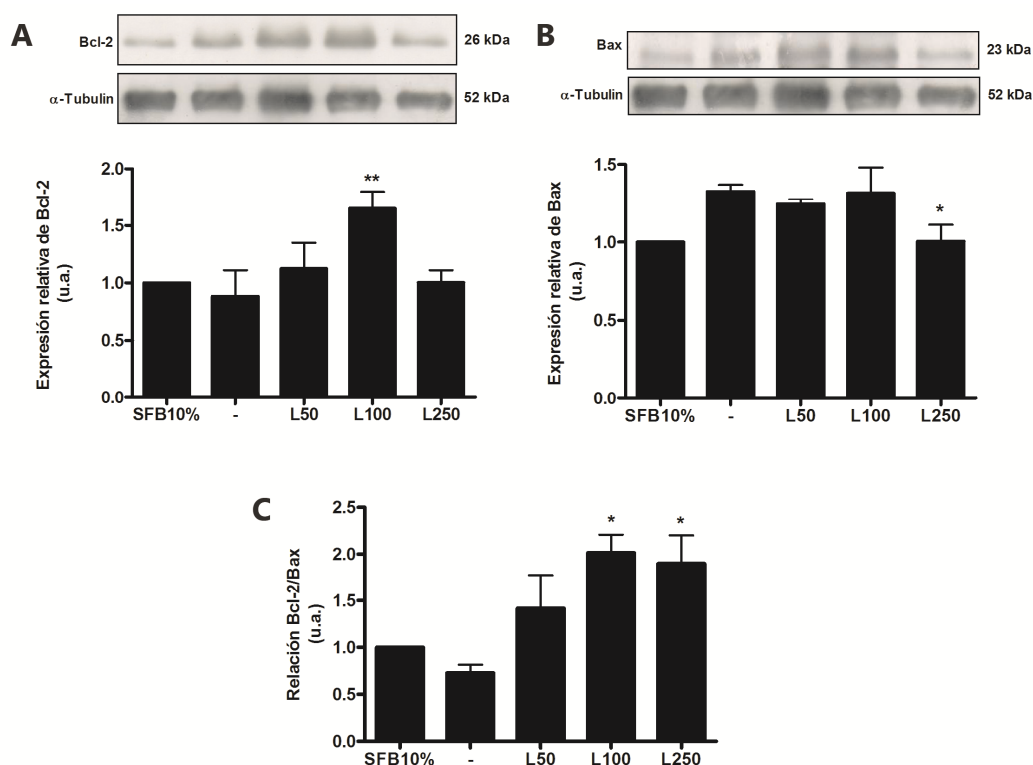


Figura R13. Leptina aumenta la relación Bcl-2/Bax en explantos placentarios. Explantos placentarios humanos a término se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) en medio DMEM-F12 0% SFB durante 24 hs. Se evaluó por *Western blot* la expresión de Bcl-2 (**A**) y Bax (**B**). En **C** se muestra graficada la relación Bcl-2/Bax obtenida. Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control sin suero (-).

Leptina inhibe la activación de Bid

Para completar el análisis de una posible regulación de miembros de la familia de Bcl-2 por leptina, decidimos estudiar la expresión de Bid. Como se mencionó anteriormente, Bid también está implicada en la regulación de la permeabilidad mitocondrial. Estímulos apoptóticos generan el clivado de Bid en t-Bid (Bid trunca) y la activan. Utilizando un anticuerpo que nos permite la detección de t-Bid, estudiamos un posible efecto de leptina en la activación de este intermediario proapoptótico. En la **Figura R14** se puede observar que tanto en células Swan-71 como en explantos placentarios, la ausencia de suero generó un aumento en el clivado de Bid. En células Swan-71, 100 y 250 ng/ml de leptina fueron capaces de disminuir significativamente la activación de Bid, mientras que en explantos placentarios se requirió de la dosis

máxima para lograr dicho efecto. De esta manera, encontramos que el tratamiento con leptina disminuye la activación de Bid generada por la privación de suero en células placentarias.

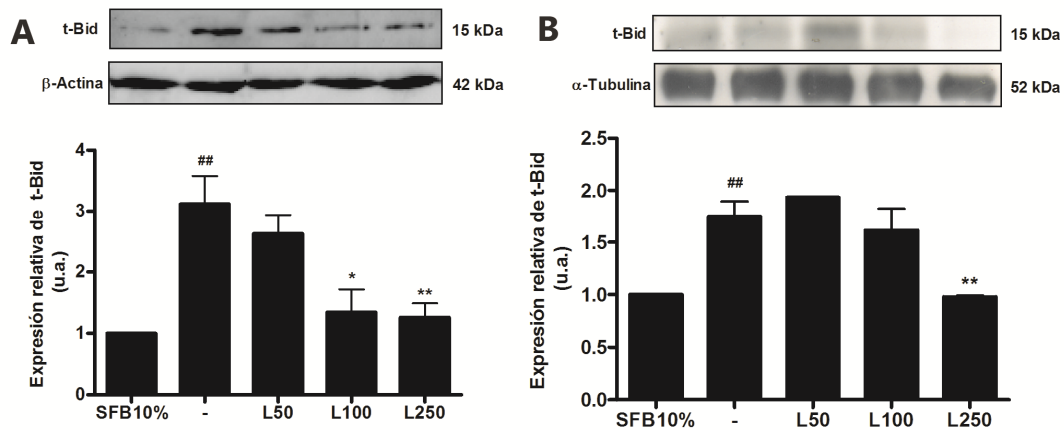


Figura R14. Leptina disminuye la activación de Bid en células placentarias. Células Swan-71 (**A**) y explantos de placenta humana a término (**B**) se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) en medio DMEM-F12 0% SFB durante 48 horas en el caso de las células en cultivo y durante 24 horas en el caso de los explantos placentarios. Se evaluó por *Western blot* la presencia del fragmento clivado de Bid (t-Bid). Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ con respecto al control con suero al 10% (SFB 10%) y * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control sin suero (-).

CAPÍTULO II

“La acción antiapoptótica de leptina involucra la regulación del eje de p53”

La apoptosis es considerada como una muerte natural fisiológica que resulta en la eliminación de células no deseadas o dañadas (Jordán 2003). Particularmente durante la gestación, el proceso apoptótico está involucrado en diversos aspectos del desarrollo placentario como los son el crecimiento, el recambio celular y el parto (Heazell y Crocker 2008). Por otra parte, p53 es la principal proteína reguladora de la división celular ya que está implicada tanto en el arresto del ciclo celular como en la muerte celular (Sohr y Engeland 2011).

En este sentido, en el capítulo I de esta Tesis evidenciamos que leptina promueve la supervivencia de células trofoblásticas, favoreciendo la proliferación y disminuyendo la apoptosis. Basándonos en los resultados obtenidos en el capítulo anterior y en el papel que posee p53 en el mantenimiento del balance entre la proliferación y la muerte celular, nos propusimos en este capítulo estudiar si el efecto antiapoptótico de leptina involucra la regulación del eje de acción de p53.

II.1: Caracterización del efecto de leptina sobre la actividad y expresión de p53

Leptina inhibe la actividad de p53 en células Swan-71

En primer lugar decidimos estudiar la actividad de p53 en presencia de leptina. Para ello, células Swan-71 fueron transfectadas transitoriamente con un vector que posee el gen reportero de luciferasa bajo las órdenes de un promotor mínimo que contiene elementos de respuesta para p53 (denominado pGL3-p53). Como control positivo se realizaron cotransfecciones con un plásmido que permite la sobreexpresión de p53 (denominado SN3).

En la **Figura R15** se observa que la ausencia de suero aumentó en aproximadamente un 50% la actividad de p53. El tratamiento con leptina redujo de manera dosis dependiente la actividad de p53, alcanzando un 80% de inhibición en presencia de la dosis máxima de leptina. En células donde se sobreexpresó p53 se observa que la actividad relativa de luciferasa se cuadruplicó con respecto al control, lo que nos permitió validar el sistema.

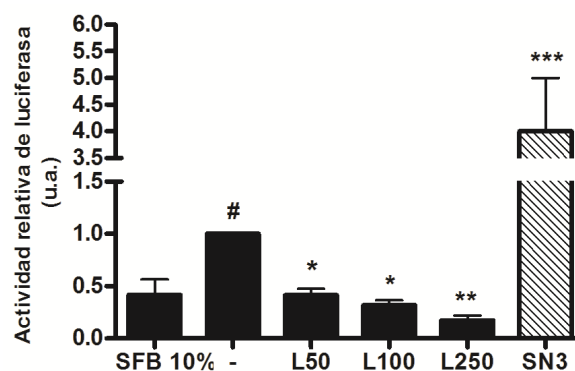


Figura R15. Leptina disminuye la actividad de p53 en células placentarias. Se estudió el efecto del tratamiento con leptina en células Swan-71 transfectadas con un vector conteniendo un promotor mínimo con elementos de respuesta para p53 (pGL3-p53). Se realizaron los ensayos cultivando las células con medio DMEM-F12 0% SFB. Se trataron las células con 50, 100 y 250 ng/ml de leptina (L) durante 48 horas. A su vez, se cotransfectaron las células con vector que permite la sobreexpresión de p53 (SN3). Los valores representados fueron relativizados con los valores de actividad de β -galactosidasa obtenidos en el mismo ensayo. Se muestra el promedio de los resultados obtenidos en tres ensayos de transfección independientes. # $p < 0,05$ con respecto al control con suero al 10% (SFB 10%) y * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ con respecto al control sin suero (-).

Leptina disminuye los niveles proteicos de p53 en células Swan-71

Teniendo como antecedente el efecto inhibitorio de leptina sobre la actividad de p53, decidimos evaluar si el cambio en dicha actividad estaba mediado por una modulación de su expresión. Mediante ensayos de *Western blot* evaluamos la expresión de p53. Hallamos que la ausencia de suero aumentó en aproximadamente un 50% los niveles de p53, mientras que el tratamiento con leptina impidió de manera dosis dependiente dicho aumento, alcanzando valores menores a los observados en el control con 10% de suero (**Figura R16**).

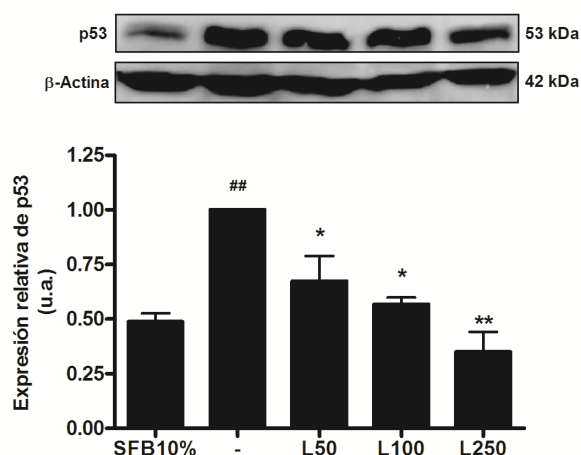


Figura R16. Leptina disminuye la expresión de p53 en células placentarias en cultivo. Células Swan-71 se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) en medio DMEM-F12 0% SFB durante 48 horas. Se evaluó por *Western blot* la expresión de p53. Se muestra en el gráfico la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. ## $p < 0,01$ con respecto al control con suero al 10% (SFB 10%) y * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control sin suero (-).

Leptina disminuye los niveles de ARNm y proteicos de p53 en explantos placentarios

Habiendo encontrado que leptina disminuye la actividad y la expresión proteica de p53 en células Swan-71, nos planteamos analizar un posible efecto de leptina sobre la expresión de p53 en explantos placentarios. Analizamos mediante ensayos de *real time* RT-PCR los niveles de expresión del ARNm de p53. Como puede observarse en la **Figura R17 A**, explantos cultivados sin suero presentaron valores aumentados de p53 comparando con el control con suero. El tratamiento con leptina generó una

disminución en los niveles de p53, lográndose un efecto estadísticamente significativo con 250 ng/ml de leptina.

Al analizar la acción de leptina sobre los niveles proteicos de p53 encontramos un efecto similar al descrito para células Swan-71: la ausencia de suero aumentó los niveles de p53, mientras que leptina revirtió dicho efecto, alcanzándose con la dosis máxima valores comparables a los obtenidos para el control con 10% de suero (**Figura 17 B**).

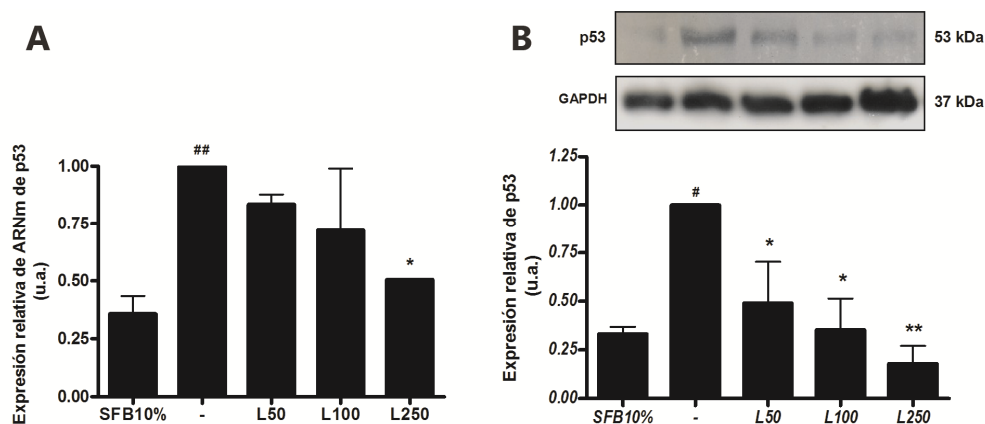


Figura R17. Leptina disminuye la expresión de p53 en explantos placentarios. Explantos de placenta humana a término se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) en medio DMEM-F12 0% SFB durante 24 horas. Se evaluó por *Western blot* la expresión a nivel proteico (**A**) y por *real time* RT-PCR el efecto sobre los niveles de ARNm de p53 (**B**). Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. ## $p < 0,01$ con respecto al control con suero al 10% (SFB 10%) y * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control sin suero (-).

En resumen, podemos afirmar que leptina modula negativamente los niveles de p53 en explantos placentarios, disminuyendo de manera dosis dependiente su expresión tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico.

II.2: Mecanismos de acción de leptina involucrados en la inhibición de p53

Leptina disminuye la fosforilación de p53 en serina 46

Posteriormente decidimos evaluar si la regulación que ejerce leptina sobre p53 conlleva algún cambio en su estado de fosforilación. La fosforilación de p53 en su serina 46 (p53 pS46) está relacionada con su actividad proapoptótica (Dai y Gu 2010) y es por este motivo que decidimos evaluar un posible efecto de leptina sobre los niveles de p53 pS46. Se trataron células Swan-71 con las dosis habituales de leptina y por *Western blot* se evaluó la fosforilación de p53 en su serina 46. Observamos que la ausencia de suero generó un aumento en p53 pS46 y que el agregado de leptina exógena, independientemente de la dosis utilizada, disminuye la fosforilación de p53 en aproximadamente un 50%, alcanzando valores menores a los observados en el control con suero. En cambio, en explantos placentarios, se observó una disminución dosis dependiente donde sólo la concentración mayor de leptina generó una reducción significativa de los valores de p53 pS46 (**Figura R18**).

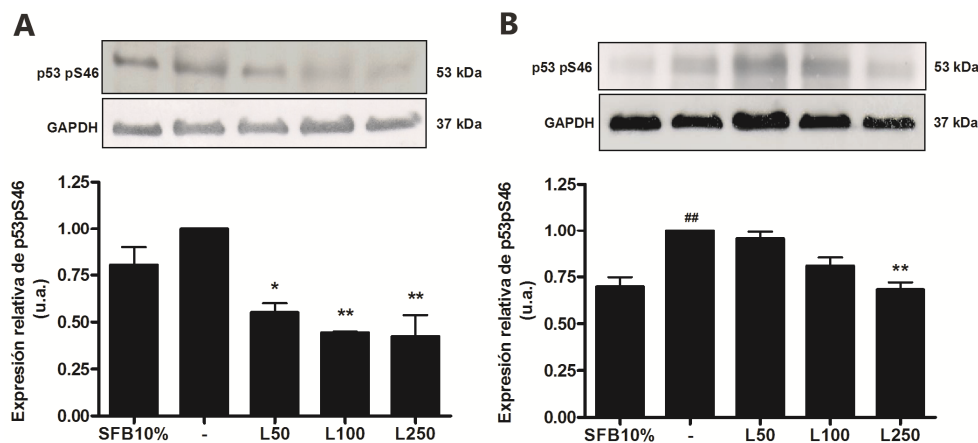


Figura R18. Leptina disminuye los niveles de fosforilación de p53 en serina 46. Células Swan-71 (**A**) y explantos de placenta humana a término (**B**) se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) en medio DMEM-F12 0% SFB, durante 24 horas en el caso de las células en cultivo y durante 8 horas en el caso de los explantos placentarios. Se evaluó por *Western blot* la fosforilación de p53 en serina 46. Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control sin suero (-).

Leptina aumenta la expresión de Mdm-2 en células placentarias

En este punto nos interesó evaluar si el efecto de leptina sobre los niveles de p53 también involucraba la regulación de su degradación, por esta razón decidimos evaluar la expresión de Mdm-2. En la **Figura R19** se muestran los resultados obtenidos en células Swan-71 tratadas con dosis crecientes de leptina. Se observa que la ausencia de suero no modificó la expresión de Mdm-2 y que el tratamiento con dosis crecientes de leptina aumentó los niveles de ARNm y proteicos de Mdm-2.

En base a lo previamente descrito en células Swan-71, decidimos evaluar también la expresión de Mdm-2 en explantos placentarios tratados con leptina. En este caso tampoco evidenciamos un efecto de la ausencia de suero sobre los niveles de Mdm-2 y hallamos que sólo la dosis de 100 ng/ml de leptina fue capaz de generar un aumento en la expresión de Mdm-2 a nivel de ARNm. Sin embargo, cuando evaluamos mediante *Western blot* los niveles de expresión proteicos de Mdm-2, encontramos que tanto 100 como 250 ng/ml de leptina fueron capaces de aumentar los niveles de Mdm-2 (**Figura R20**).

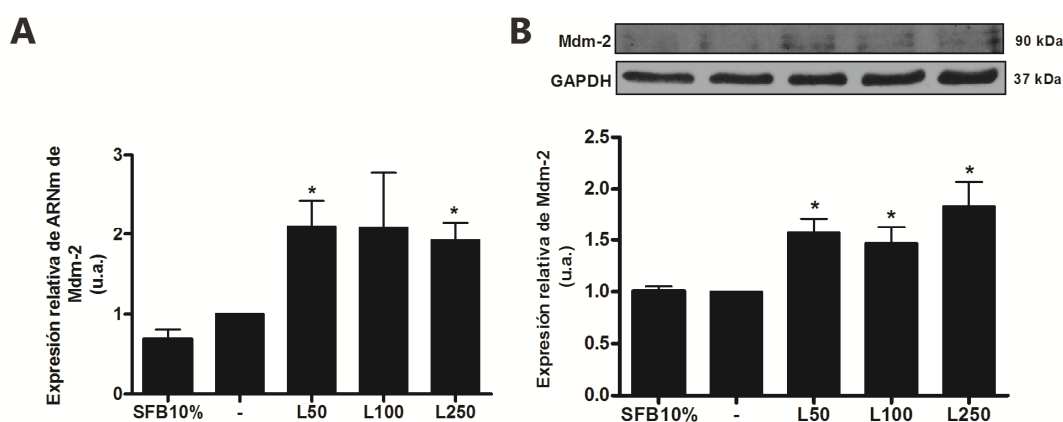


Figura R19. Leptina aumenta la expresión de Mdm-2 en células placentarias en cultivo. Células Swan-71 se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) en medio DMEM-F12 0% SFB durante 48 horas. Se evaluó por *real time* RT-PCR el efecto sobre los niveles de ARNm de Mdm-2 (**A**) y por *Western blot* la expresión de Mdm-2 a nivel proteico (**B**). Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control sin suero (-).

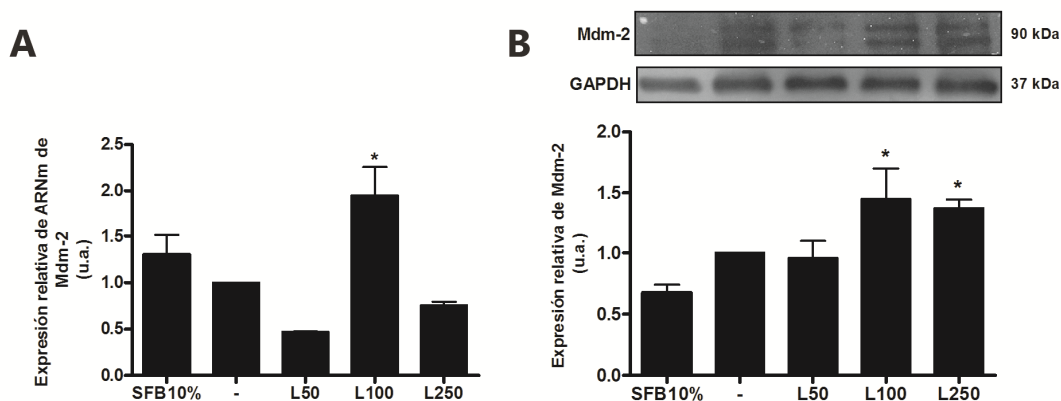


Figura R20. Leptina aumenta la expresión de Mdm-2 en explantos placentarios. Explantos de placenta humana a término se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) en medio DMEM-F12 0% SFB durante 24 horas. Se evaluó por *real time* RT-PCR el efecto sobre los niveles de ARNm de Mdm-2 (**A**) y por *Western blot* la expresión de Mdm-2 a nivel proteico (**B**). Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. * $p < 0,05$ con respecto al control sin suero (-).

Leptina reduce la vida media de p53 en células Swan-71

Habiendo encontrado que leptina generó un aumento en los niveles de Mdm-2, decidimos estudiar su efecto sobre los valores de vida media ($t_{1/2}$) de p53. Para ello realizamos experimentos con cicloheximida (CHX), un inhibidor de la traducción. Mediante *Western blot* se evaluó la expresión de p53 a distintos tiempos en presencia de CHX con o sin leptina, se confeccionaron curvas de cantidad de proteína en función del tiempo y se estimaron los valores de vida media en cada caso. Se obtuvieron los siguientes valores de vida media: $t_{1/2}$ CHX= $24 \pm 0,51$ horas y $t_{1/2}$ CHX+L= $15 \pm 1,96$ horas, que demostraron que el tratamiento con 100 ng/ml disminuye la vida media de p53 ($p < 0,1$). En la **Figura R21** se observan las regresiones lineales obtenidas y las bandas representativas para cada uno de los tratamientos.

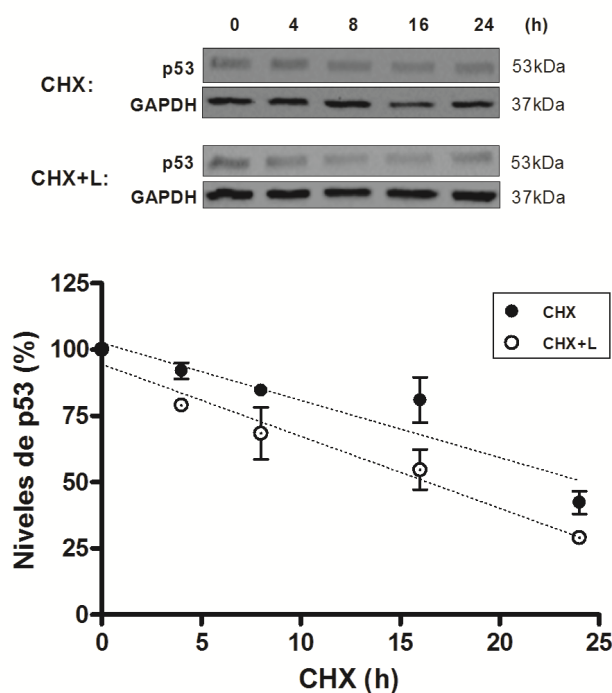


Figura R21. Leptina disminuye los valores de vida media de p53 en células placentarias en cultivo. Células Swan-71 se trataron con 100 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida (CHX) en ausencia o presencia de 100 ng/ml de leptina (L) en medio DMEM-F12 0% SFB durante 4, 8, 16 y 24 horas respectivamente. Por *Western blot* se evaluó la expresión de p53 en cada caso. Los valores de expresión obtenidos se relativizaron al tiempo inicial (tiempo 0) y se calculó el porcentaje de p53. Se obtuvieron los gráficos de porcentaje de p53 en función del tiempo, los mismos se linealizaron y de la pendiente de dichas rectas se calculó el valor de vida media ($t_{1/2}$). Arriba se muestran bandas representativas para las células control (CHX) y las tratadas con leptina (CHX+L).

II.3: Análisis de algunas de las vías de señalización involucradas en la regulación del eje de p53 por leptina

Las vías de señalización de MAPK y PI3K están involucradas en el efecto inhibitorio de leptina sobre los niveles de p53 en células placentarias

Para completar el estudio del efecto inhibitorio de leptina sobre la expresión de p53 se decidió evaluar la posible participación de las vías de señalización de MAPK y PI3K.

Estudio de la vía de señalización MAPK

Como primera estrategia, se realizaron experimentos utilizando el inhibidor farmacológico PD. Células Swan-71 y explantos placentarios se trataron con 50 μ M del inhibidor PD y luego de 30 minutos de incubación se agregó la dosis correspondiente de leptina. Como se observa en la **Figura R22**, leptina impidió el aumento en la expresión de p53 generado por la ausencia de suero, sin embargo el pretratamiento con el inhibidor farmacológico PD anuló dicho efecto, tanto en células Swan-71 como en explantos placentarios.

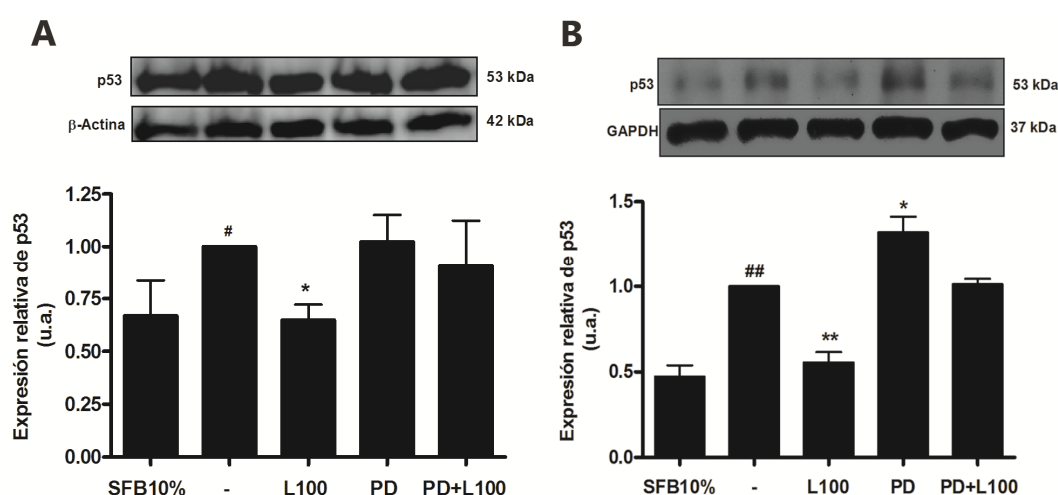


Figura R22. LA vía de MAPK estaría involucrada en el efecto inhibitorio de leptina sobre los niveles de p53. Células Swan-71 (**A**) y explantos placentarios (**B**) se cultivaron en medio DMEM-F12 0% SFB. Se realizó el pretratamiento con 50 μ M de PD98059 (PD) durante media hora y se agregó 100 ng/ml de leptina (L). Dicho tratamiento se realizó durante 48 horas en el caso de las células y durante 24 horas en el caso de los explantos placentarios. Se muestra en el gráfico la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ con respecto al control con suero al 10% (SFB 10%) y * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control sin suero (-).

Para confirmar el efecto observado, se optó por una segunda estrategia donde se realizaron transfecciones transitorias en células Swan-71 con vectores conteniendo mutantes dominantes negativas para distintos intermediarios de la vía de señalización. Se utilizó un vector que codifica para la mutante dominante negativa de la MAPKK MEK (denominada MEK kd) y otro para la mutante dominante negativa de la MAPK ERK (denominada MAPK kd). Como control negativo las células se transfectaron con un

vector vacío (VV). Mediante ensayos de *Western blot* observamos que en las células control la ausencia de suero aumentó los niveles de p53 y que dicho aumento fue contrarrestado cuando las células se trataron con 100 ng/ml de leptina. En los casos donde se sobreexpresaron las mutantes dominante negativas para MEK o ERK, no se observó efecto el efecto inhibitorio de leptina sobre los niveles de p53 (**Figura R23**). Se evaluó también el estado de fosforilación de ERK para comprobar que la sobreexpresión de las mutantes dominantes negativas inhibe eficazmente a la vía de señalización. Cuando las células se transfectaron con MEK kd o MAPK kd, se observó la disminución esperada en p-ERK (**inserto Figura R23**).

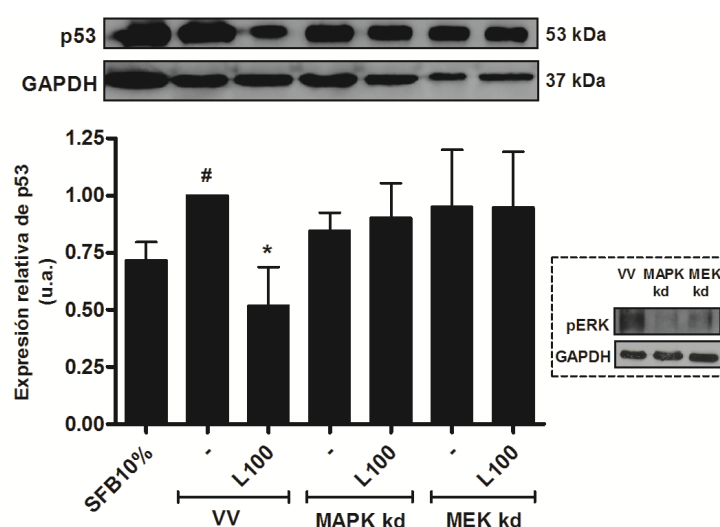


Figura R23. La vía de MAPK estaría involucrada en el efecto inhibitorio de leptina sobre los niveles de p53. Células Swan-71 se transfectaron con vectores de expresión para mutantes dominantes negativas para MAPK (MAPK kd) y MEK (MEK kd). Como control se utilizaron células transfectadas con un vector vacío (VV). Se trataron con 100 ng/ml de leptina (L100) durante 48 horas en medio DMEM-F12 0% SFB y por *Western blot* se evaluó la expresión de p53. En el inserto se muestra el control de la inhibición de la fosforilación de ERK en cada caso. Se muestra en el gráfico la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. # $p < 0,05$ con respecto al control con suero al 10% (SFB 10%) y * $p < 0,05$ con respecto al control sin suero (-).

Los resultados obtenidos con el uso del inhibidor farmacológico, sumado a lo evidenciado con la sobreexpresión de las mutantes dominantes negativas, nos indicarían que la vía de señalización de MAPK estaría mediando el efecto de leptina sobre los niveles de p53.

Estudio de la vía de señalización PI3K/Akt

Para estudiar la participación de esta vía en el efecto de leptina sobre p53 utilizamos el inhibidor farmacológico LY294002. De la misma manera que en el punto descrito anteriormente, células Swan-71 y explantos placentarios fueron tratados con LY durante 30 minutos, luego se estimularon con 100 ng/ml de leptina y mediante ensayos de *Western blot* se estudió la expresión de p53. En la **Figura R24**, se observa que leptina disminuyó la expresión de p53 y el pretratamiento con LY impidió dicho efecto, tanto en células Swan-71 como en explantos placentarios.

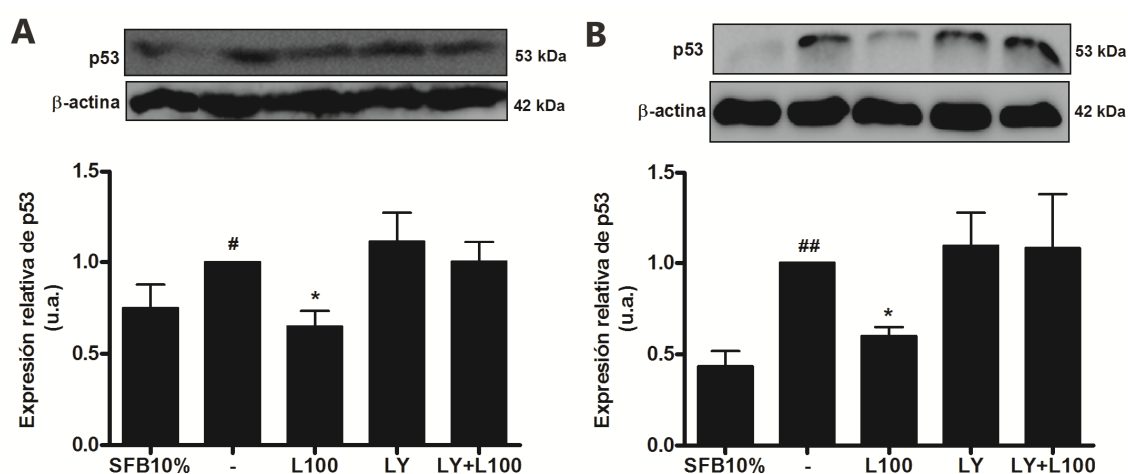


Figura R24. LA vía de PI3K/Akt estaría involucrada en el efecto inhibitorio de leptina sobre los niveles de p53. Células Swan-71 (A) y explantos placentarios (B) se cultivaron en medio DMEM-F12 0% SFB. Se realizó el pretratamiento con 10 μ M de LY294002 (LY) durante media hora se realizó el tratamiento con 100 ng/ml de leptina (L100) durante 48 horas en el caso de las células y durante 24 horas en el caso de los explantos placentarios. Se muestra en el gráfico la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ con respecto al control con suero al 10% (SFB 10%) y * $p < 0,05$ con respecto al control sin suero (-).

Para estudiar la participación de la vía de PI3K en el efecto de leptina sobre p53 utilizamos la estrategia de la sobreexpresión de mutantes dominantes negativas de un intermediario de la vía. En la **Figura R25** se muestran los resultados obtenidos en células Swan-71 transfectadas transitoriamente con un vector de expresión para la mutante dominante negativa de Akt (denominada Akt kd) o el vector vacío (VV). En células transfectadas con el vector vacío, observamos que la ausencia de suero aumentó los niveles de p53 y dicho aumento fue contrarrestado por el tratamiento

con 100 ng/ml de leptina. La sobreexpresión de la isoforma dominante negativa de Akt, impidió la acción inhibitoria de leptina sobre p53. Para confirmar la sobreexpresión de Akt kd evidenciamos por *Western blot* la disminución de su fosforilación (inserto **Figura R25**).

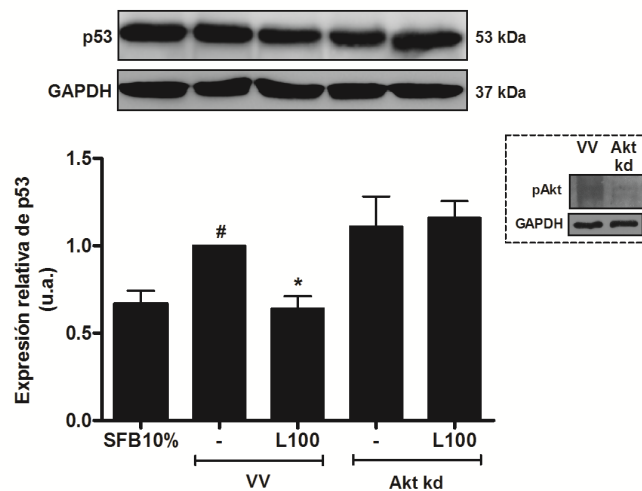


Figura R25. LA vía de PI3K/Akt estaría involucrada en el efecto inhibitorio de leptina sobre los niveles de p53. Células Swan-71 se transfectaron con un vector de expresión para una mutante dominante negativa para Akt (Akt kd). Las células control se transfectaron con un vector vacío (VV). Se trataron con 100 ng/ml de leptina (L100) en medio DMEM-F12 0% SFB durante 48 horas y por *Western blot* se evaluó la expresión de p53. En el inserto se muestra el control de la inhibición de la fosforilación de Akt (pAkt). Se muestra en el gráfico la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. # $p < 0,05$ con respecto al control con suero al 10% (SFB 10%) y * $p < 0,05$ con respecto al control sin suero (-).

Los resultados obtenidos mediante el uso del inhibidor farmacológico y las transfecciones transitorias sobreexpresando la mutante dominante negativa de Akt, nos indicarían la posible participación de la vía de PI3K/Akt en el efecto inhibitorio de leptina sobre los niveles de p53.

Estudio de las vías de MAPK y PI3K sobre el efecto de leptina sobre la fosforilación de p53 en serina 46

Como describimos anteriormente, nuestros resultados sugieren que leptina estaría ejerciendo su efecto inhibitorio sobre los niveles de p53 involucrando a las vías de señalización de MAPK y PI3K. Nos resultó de interés entonces estudiar si dichas vías de señalización también están comprometidas en el efecto de leptina sobre la fosforilación de p53 en serina 46.

Empleamos como estrategia el uso de los inhibidores farmacológicos para cada vía. Se evaluó el efecto del tratamiento con los inhibidores PD y LY sobre la fosforilación de p53 en serina 46 en células Swan-71 y en explantos placentarios (Figura R26).

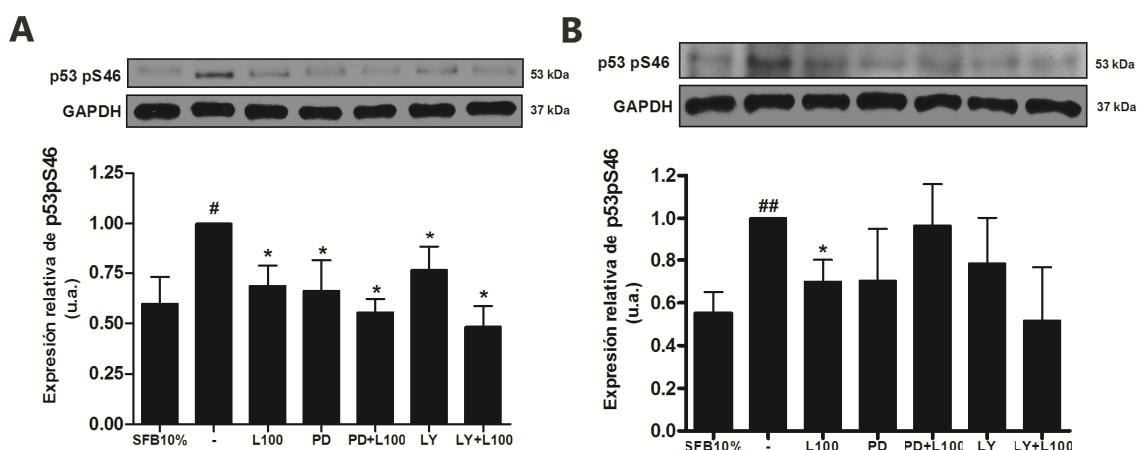


Figura R26. Las vías de señalización de MAPK y PI3K/Akt estarían involucradas en el efecto inhibitorio de leptina sobre los niveles de p53pS46. Células Swan-71 (**A**) y explantos placentarios (**B**) se cultivaron en medio DMEM-F12 0% SFB. Se realizaron los pretratamientos con 50μM de PD98059 (PD) o 10 μM de LY294002 (LY) y transcurrida media hora se agregaron 100 ng/ml de leptina (L100) durante 48 horas en el caso de células Swan-71 y durante 24 horas en el caso de los explantos placentarios. Se muestra en el gráfico la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. # p<0,05 y ## p<0,01 con respecto al control con suero al 10% (SFB 10%) y *p<0,05 con respecto al control sin suero (-).

Observamos que el tratamiento con leptina disminuye los niveles de p53p46 tanto en células Swan-71 como en explantos placentarios. En células Swan-71 el tratamiento con los inhibidores solamente genera una baja en los niveles de pS46p53, hecho que dificulta el análisis (Figura R26 A). Seguramente las vías MAPK y PI3K estén

involucradas en la fosforilación de p53p46 al deprivar el medio de cultivo de SFB. En explantos placentarios encontramos que el tratamiento con los inhibidores suprimiría la acción de leptina sobre la fosforilación en serina 46 de p53 (**Figura R26 B**), sin embargo aunque los resultados obtenidos no dan diferencias significativas con el control 0% SFB, la dispersión de datos es alta lo que requeriría confirmación por otra estrategia diferente.

CAPÍTULO III

“Leptina posee un efecto protector frente a distintas condiciones de estrés celular”

En el capítulo I estudiamos la capacidad de leptina de proteger a las células trofoblásticas de la apoptosis generada en condiciones de privación de suero. A continuación, en el capítulo II, demostramos que en dichas condiciones leptina es capaz de modular tanto la expresión como la actividad de p53. En base a estos resultados nos resultó de gran interés estudiar si bajo otras condiciones de estrés leptina posee también un efecto antiapoptótico.

El daño al ADN por radiación UV es un estímulo apoptótico que genera un cambio en el balance entre distintas proteínas pro y antiapoptóticas. En respuesta al daño, el factor de transcripción p53 es fosforilado por las quinasas ATM y ATR, hecho que impide su interacción con Mdm-2 y por lo tanto se estabiliza. p53 estabilizado promueve la transcripción de diversos genes y de esta manera promueve el proceso de apoptosis (Cuddihy y Bristow 2004). En este contexto nos planteamos estudiar si leptina es capaz de ejercer algún tipo de regulación sobre la proteína p53 y sus genes blanco en condiciones de daño al ADN por radiación UV.

Por otra parte, se conoce que el estrés generado por calor durante la gestación produce una gran variedad de malformaciones en el feto, tanto en humanos como en animales de laboratorio. La hipertermia aumenta los niveles plasmáticos de prostaglandinas tanto en la madre como en el feto, la actividad uterina y la apoptosis en órganos primordiales del feto (Edwards et al. 1997, Edwards 1998). Existen diversos estudios sobre el efecto del aumento de la temperatura en órganos y funciones fetales, pero pocos han estudiado cómo el aumento de la temperatura influye sobre la placenta. En consecuencia, consideramos también de sumo interés estudiar un posible efecto de leptina en la apoptosis inducida por hipertermia en explantos placentarios humanos.

En último lugar evaluamos la alteración del pH de los medios de cultivo. El equilibrio ácido-base de la sangre es de gran importancia para el funcionamiento del

organismo, ya que una desviación en los niveles óptimos de pH puede inducir mal funcionamiento de procesos metabólicos, enzimáticos y de formación de proteínas. Todos los procesos fisiológicos de nuestro organismo están influidos por el pH de nuestro medio interno, es por esta razón que las variaciones del equilibrio ácido-base deben estar finamente reguladas. El pH del medio interno es 7,4 y nos referimos a una situación patológica cuando el pH asciende a 7,8 o disminuye por debajo de 6,9 (Guyton et al. 2006). En ciertas patologías asociadas al embarazo, como por ejemplo la PE, la RCIU y la DG, puede verse alterado el pH del medio interno y esa modificación puede alterar funciones fetales, maternas y también placentarias. En este último contexto, decidimos estudiar el efecto de la disminución del pH sobre el proceso de apoptosis en explantos placentarios y la acción de leptina bajo dichas condiciones.

III.1: Efecto de leptina sobre la apoptosis inducida por radiación ultravioleta

Efecto de la radiación UV sobre la expresión de p53

Nuestro primer objetivo fue definir la dosis de luz ultravioleta (UV) a utilizar en los experimentos. Células Swan-71 se trataron con dosis crecientes de luz UV equivalentes a 1, 2 y 4 mJ/cm². Como describimos en Materiales y Métodos, nos basamos en la inducción de los niveles de p53. En los siguientes experimentos utilizamos una dosis de UV de 2 mJ/cm² (**Figura R27**).

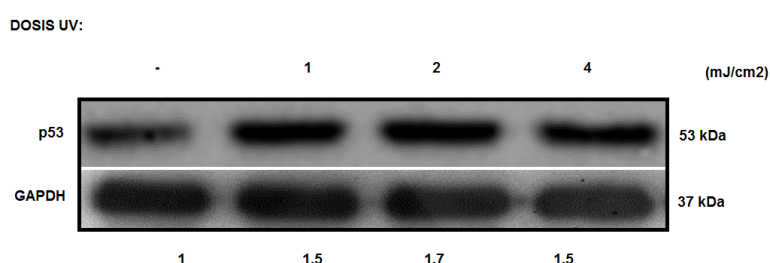


Figura R27. Puesta a punto de la dosis a utilizar de radiación UV. Células Swan-71 se irradiaron durante 4, 8 y 16 segundos, los que equivalen a una dosis de 1, 2 y 4 mJ/cm² respectivamente. Se incubaron con DMEM-F12 1% SFB durante 5 horas, luego se cosecharon las células y se realizaron lisados proteicos. Mediante *Western blot* se evaluó la expresión de p53. Los valores indicados debajo de las bandas representativas indican la expresión relativa de p53.

Leptina disminuye la activación de caspasa-3

Como mencionamos anteriormente, distintas vías apoptóticas convergen en la activación de caspasa-3, por esta razón evaluamos la activación de dicha proteína efectora (**Figura R28**).

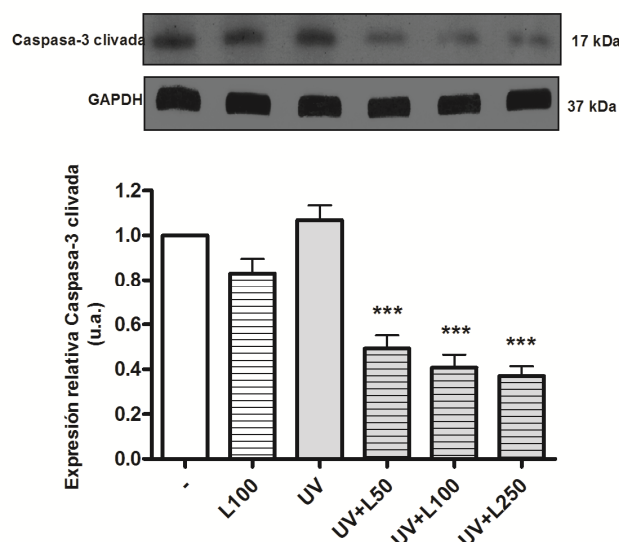


Figura R28. Leptina disminuye la activación de caspasa-3 en células trofoblásticas sometidas a radiación UV. Células Swan-71 se sometieron a $2\text{mJ}/\text{cm}^2$ de radiación UV y se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 5 horas. Se utilizaron como control células no irradiadas (-) y células no irradiadas tratadas con 100 ng/ml de leptina. Se evaluó por *Western blot* la presencia del fragmento clivado de caspasa-3. Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. *** $p < 0,001$ con respecto al control UV.

En células control (no irradiadas) leptina no afectó la aparición del fragmento clivado de caspasa-3, por lo que podemos inferir que en estas condiciones no afecta su activación. Si bien luego del tratamiento con UV tampoco se observaron cambios en la activación de caspasa-3 a las 5 horas, la adición de leptina produjo una disminución significativa de la activación de dicha caspasa.

Por otro lado estudiamos la activación de PARP-1 y encontramos que en células control el fragmento clivado de PARP (cPARP) disminuyó por el tratamiento con leptina. Mientras que, en células irradiadas, encontramos que el cPARP tendió a aumentar y ese aumento fue fuertemente contrarrestado por el tratamiento con leptina, llegando a niveles un 50% menores (**Figura R29**).

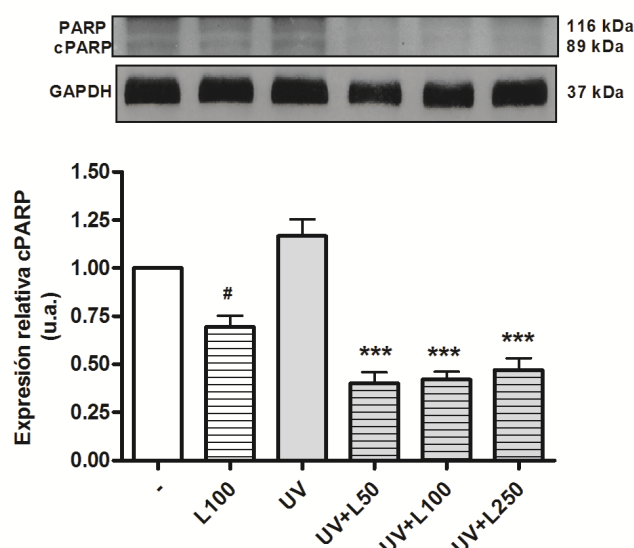


Figura R29. Leptina disminuye el clivado de PARP-1 en células trofoblásticas sometidas a radiación UV. Células Swan-71 se sometieron a $2\text{mJ}/\text{cm}^2$ de radiación UV y se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 5 horas. Se utilizaron como control células no irradiadas (-) y células no irradiadas tratadas con 100 ng/ml de leptina. Se evaluó por *Western blot* la presencia del fragmento clivado de PARP-1 (cPARP). Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. # $p < 0,05$ con respecto al control sin irradiar (-); *** $p < 0,001$ con respecto al control UV.

Leptina inhibe la activación de JNK

La quinasa N-terminal de c-Jun (JNK) fue descrita como la primera quinasa activada por luz ultravioleta, considerándose JNK fosforilada (pJNK) como un marcador de daño mediado por UV (Davis 1998, Song y Lee 2007), por esta razón decidimos evaluar los niveles de pJNK en células Swan-71 irradiadas.

En la **Figura R30** se puede observar que el tratamiento con leptina disminuyó la fosforilación de JNK tanto en células control, como en células irradiadas, observándose que dosis menores de leptina generaron un efecto mayor de disminución sobre los niveles de pJNK.

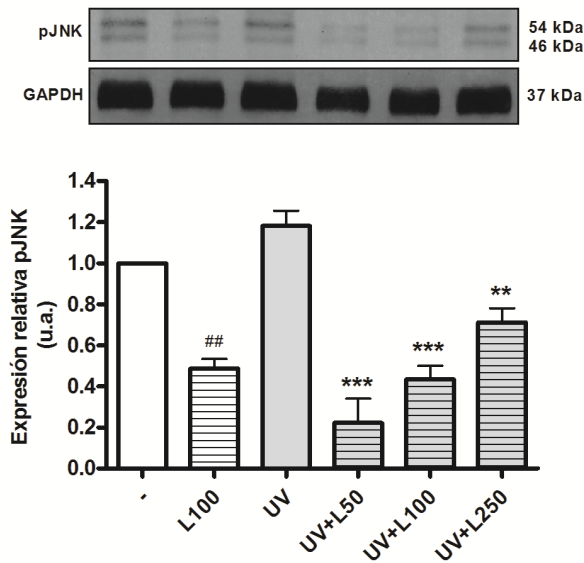


Figura R30. Leptina disminuye la fosforilación de JNK en células trofoblásticas. Células Swan-71 se sometieron a $2\text{mJ}/\text{cm}^2$ de radiación UV. Luego se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 5 horas. Se utilizaron como control células no irradiadas (-) y células no irradiadas tratadas con 100 ng/ml de leptina. Se evaluó por *Western blot* la fosforilación de JNK (pJNK). Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. ## $p < 0,01$ con respecto al control sin irradiar (-) y ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ con respecto al control UV.

Leptina disminuye la expresión de p53 y su fosforilación en serina 46 y aumenta la expresión de Mdm-2

En el modelo de inducción de apoptosis por radiación UV, nos basamos en lograr un aumento en los valores de p53. Nos interesó entonces evaluar si dicho aumento puede ser contrarrestado por el tratamiento con leptina. En la **Figura R31** se observa que en células control los niveles de p53 no se modificaron por el tratamiento con 100 ng/ml de leptina. Por otra parte, la radiación UV aumentó los niveles de p53 y dicho aumento se contrarrestó por el tratamiento con leptina de manera dosis dependiente.

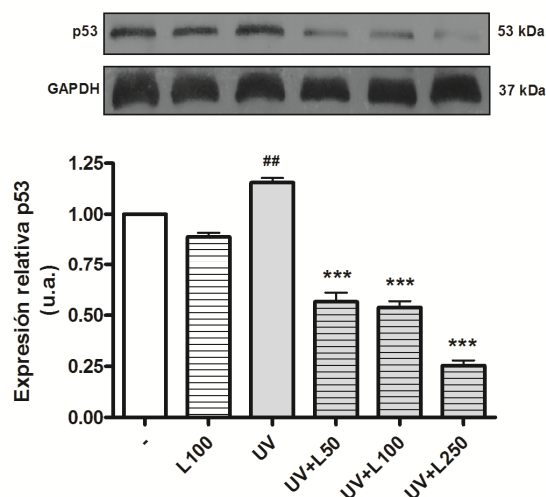


Figura R31. Leptina disminuye la expresión de p53 en células trofoblásticas sometidas a radiación UV. Células Swan-71 se sometieron a $2\text{mJ}/\text{cm}^2$ de radiación UV. Luego se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 5 horas. Se utilizaron como control células no irradiadas (-) y células no irradiadas tratadas con 100 ng/ml de leptina. Se evaluó por *Western blot* la expresión de p53. Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. ## $p < 0,01$ con respecto al control sin irradiar (-) y *** $p < 0,001$ con respecto al control UV.

Con el fin de estudiar la señalización de p53 hacia el camino apoptótico, se evaluó su nivel de fosforilación en serina 46. En la **Figura R32** se observa que en células no irradiadas el tratamiento con leptina no generó cambios en los niveles de p53 pS46, mientras que en células irradiadas los valores de fosforilación en serina 46 disminuyeron significativamente.

Por último evaluamos el efecto de leptina sobre la expresión de Mdm-2. La **Figura R33** muestra que en células control el tratamiento con 100 ng/ml de leptina generó un aumento en la expresión de Mdm-2. A su vez, los niveles de Mdm-2 se incrementaron en mayor medida como resultado de la irradiación con luz UV. Por otra parte, en células irradiadas y tratadas con 50 ng/ml de leptina los valores de Mdm-2 disminuyeron pero dosis mayores de leptina no generaron cambios en su expresión.

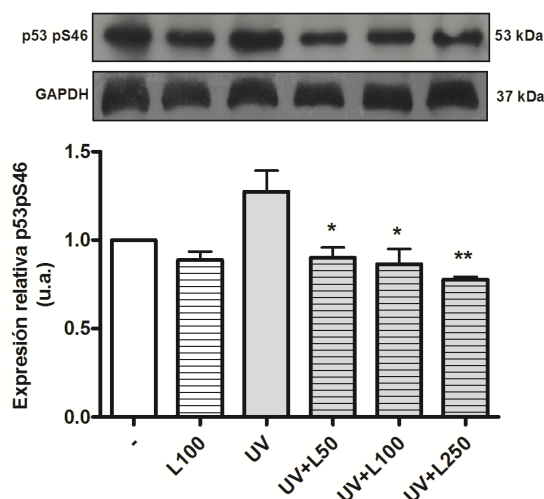


Figura R32. Leptina disminuye la fosforilación de p53 en serina 46 en células trofoblásticas sometidas a radiación UV. Células Swan-71 se sometieron a $2\text{mJ}/\text{cm}^2$ de radiación UV. Luego se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 5 horas. Se utilizaron como control células no irradiadas (-) y células no irradiadas tratadas con 100 ng/ml de leptina. Se evaluó por *Western blot* los niveles de p53pS46. Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ con respecto al control UV.

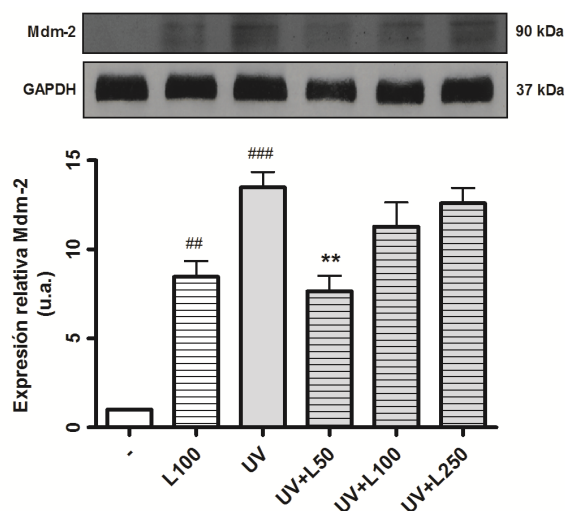


Figura R33. Leptina modifica la expresión de Mdm-2 en células trofoblásticas sometidas a radiación UV. Células Swan-71 se sometieron a $2\text{mJ}/\text{cm}^2$ de radiación UV. Luego se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 5 horas. Se utilizaron como control células no irradiadas (-) y células no irradiadas tratadas con 100 ng/ml de leptina. Se evaluó por *Western blot* la expresión de Mdm-2. Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. ## $p<0,01$ y ### $p<0,001$ con respecto al control sin irradiar (-) y ** $p<0,01$ con respecto al control UV.

Leptina disminuye la expresión de mediadores proapoptóticos mitocondriales

En el punto anterior evidenciamos que en células irradiadas con luz UV leptina generó una disminución en la expresión de p53, nos planteamos estudiar los niveles de expresión del intermediario proapoptótico Bax cuya transcripción es inducida por p53. También evaluamos si el tratamiento con leptina es capaz de modular la activación de Bid (**Figura R34**).

Mediante ensayos de *Western blot* encontramos que en células control leptina no generó cambios en la expresión de Bax. Por otra parte, la radiación UV generó un aumento en la expresión de Bax y dicho aumento se contrarrestó por el tratamiento con bajas concentraciones de leptina (**Figura R34 A**). Se observó un efecto similar cuando se estudió la activación de Bid mediante la evaluación de los niveles de su fragmento clivado. En este sentido encontramos que en células control leptina no generó cambios en la activación de Bid. Sin embargo, en células irradiadas los valores de t-Bid aumentaron y dicho aumento se vio impedido por el agregado de leptina. En este caso también se observó una disminución del efecto de leptina cuando se utilizó la dosis máxima de 250 ng/ml de leptina (**Figura R34 B**).

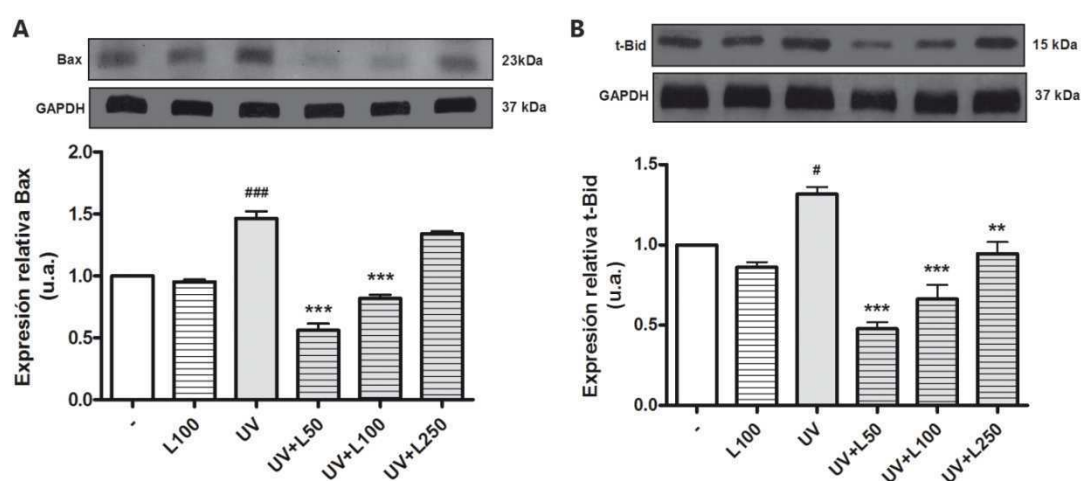


Figura R34. Leptina disminuye la expresión de Bax y la activación de Bid en células trofoblásticas sometidas a radiación UV. Células Swan-71 se sometieron a 2mJ/cm² de radiación UV. Luego se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 5 horas. Se utilizaron como control células no irradiadas (-) y células no irradiadas tratadas con 100 ng/ml de leptina. Se evaluó por *Western blot* la expresión de Bax (**A**) y la aparición de t-Bid (**B**). Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. # p<0,05 y ### p<0,001 con respecto al control sin irradiar (-) y ***p<0,001 con respecto al control UV.

III.2: Efecto de leptina sobre la apoptosis inducida por alteraciones en las condiciones de cultivo

III.2.1: Apoptosis inducida por hipertermia

Temperaturas elevadas aumentan la apoptosis en explantos placentarios

En primer lugar decidimos evaluar la apoptosis en explantos placentarios sometidos a temperaturas elevadas determinando la activación de caspasa-3. Como control los explantos fueron cultivados a 37°C y en dicha condición hallamos que el tratamiento con leptina no generó cambios. Cuando los explantos placentarios fueron incubados a 40 y 42 °C, los valores de activación de caspasa-3 se triplicaron con respecto al control a 37°C. En dichas condiciones 100 ng/ml de leptina fueron capaces de disminuir significativamente la activación de caspasa-3, observándose un efecto aún mayor cuando los explantos fueron cultivados a 42°C (**Figura 35**).

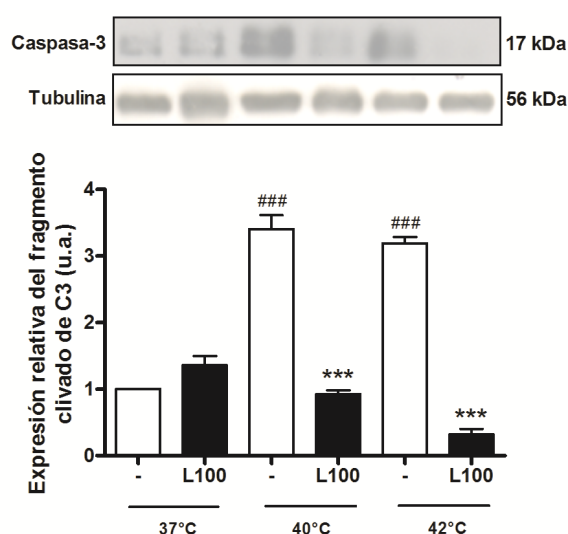


Figura R35. Leptina disminuye la activación de caspasa-3 generada por estrés por calor en explantos placentarios. Explantos de placenta humana a término se cultivaron a 37, 40 o 42 °C y se trataron con 100 ng/ml de leptina (L100) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 3 horas. Se evaluó por *Western blot* la presencia del fragmento clivado de caspasa-3. Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. ### $p < 0,001$ con respecto a los explantos cultivados a 37°C y *** $p < 0,001$ con respecto al control sin leptina (-).

Efecto del estrés por calor sobre los niveles de p53 y la fosforilación de su serina 46

Evaluamos el efecto de la hipertermia durante 3 horas sobre la expresión del factor de transcripción p53. Estudiamos por *Western blot* la expresión de p53 y no distinguimos cambios en su expresión como consecuencia de las temperaturas elevadas. Sin embargo, el tratamiento con leptina generó una disminución en la expresión de p53 cuando los explantos fueron incubados a 42°C (**Figura R36**).

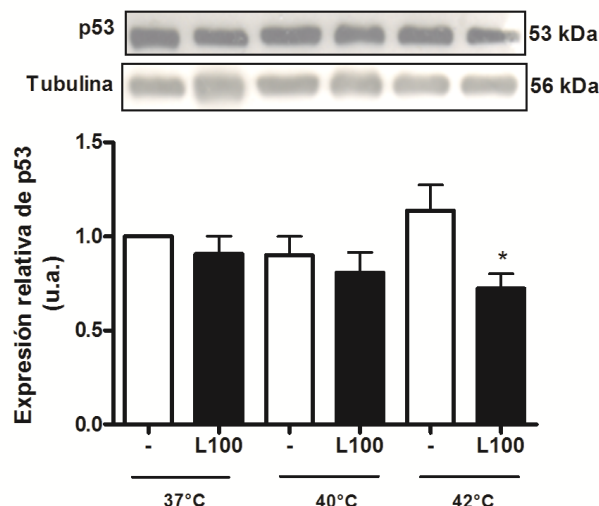


Figura R36. Leptina disminuye la expresión de p53 en explantos placentarios cultivados a 42°C. Explantos de placenta humana a término se cultivaron a 37, 40 o 42 °C y se trataron con 100 ng/ml de leptina (L100) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 3 horas. Se evaluó por *Western blot* la expresión de p53. Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. * $p < 0,05$ con respecto al control sin leptina (-).

Luego, decidimos estudiar la fosforilación de p53 en serina 46. A 37°C no se observaron cambios mediados por el tratamiento con leptina. Contrariamente, el cultivo de los explantos a temperaturas elevadas se asoció con un aumento en los niveles de fosforilación de p53, obteniéndose a 42°C el mayor grado de fosforilación en este residuo. En condiciones de altas temperaturas, el tratamiento con 100 ng/ml de leptina impidió dicho aumento, observándose valores de fosforilación en serina 46 comparables con los niveles basales obtenidos en el control a 37°C (**Figura R37**).

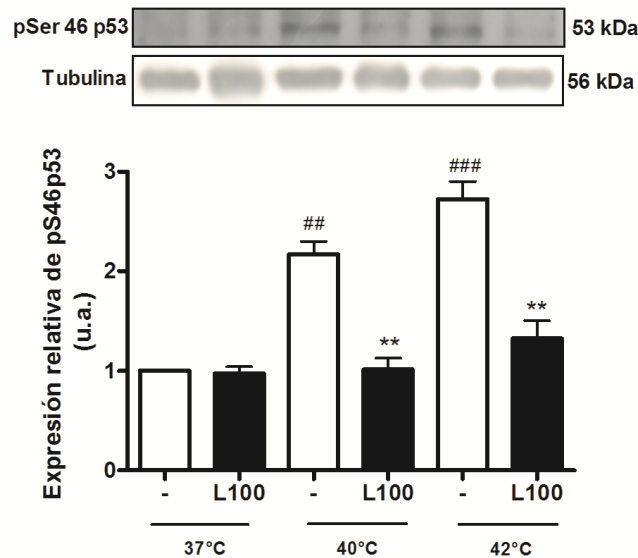


Figura R37. Leptina disminuye la fosforilación de p53 generada por estrés por calor en explantos placentarios. Explantos de placenta humana a término se cultivaron a 37, 40 o 42 °C y se trataron con 100 ng/ml de leptina (L100) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 3 horas. Se evaluó por *Western blot* la presencia del p53 pS46. Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. ## $p < 0,01$ y ### $p < 0,001$ con respecto a los explantos cultivados a 37°C y ** $p < 0,01$ con respecto al control sin leptina (-).

Leptina revierte el efecto de la hipertermia sobre la relación Bcl-2/Bax

Decidimos estudiar mediante *Western blot* la expresión de Bcl-2 y Bax. En la **Figura R38** se observa que el estrés por calor durante 3 horas generó una disminución de la relación Bcl-2/Bax, consistente con el aumento de los niveles de apoptosis generados por el incremento de la temperatura. Por otra parte, el tratamiento con leptina aumentó la relación Bcl-2/Bax en condiciones de hipertermia evidenciándose un efecto mayor en los explantos placentarios incubados a 40°C.

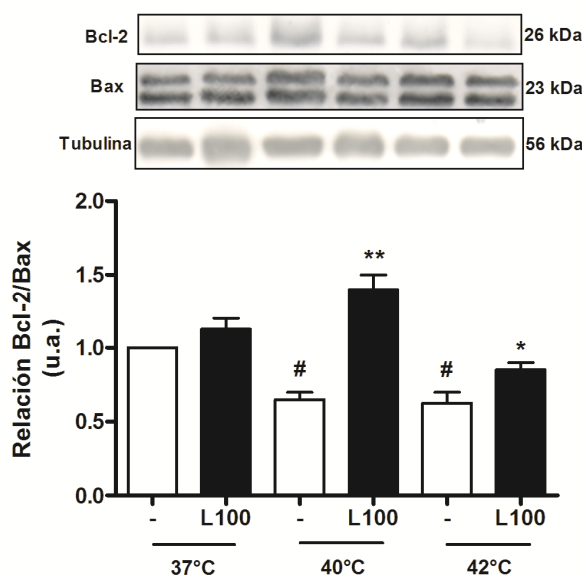


Figura R38. Leptina restituye la relación Bcl-2/Bax en explantos placentarios sometidos a altas temperaturas. Explantos de placenta humana a término se cultivaron a 37, 40 o 42 °C y se trataron con 100 ng/ml de leptina (L100) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 3 horas. Se evaluaron por *Western blot* las expresiones de Bcl-2 y Bax, se las relativizó a los correspondientes controles de carga y se calculó la relación Bcl-2/Bax. Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. #p<0,05 y ##p<0,01 con respecto a los explantos cultivados a 37°C y *p<0,05 y **p<0,01 con respecto al control sin leptina.

III.2.2: Apoptosis inducida por la disminución del pH extracelular

Leptina disminuye la activación de caspasa-3 generada por la disminución del pH extracelular

Para comenzar decidimos evaluar la inducción de apoptosis en explantos placentarios cultivados a pH 6,8. Para tal fin, analizamos la aparición del fragmento clivado de caspasa-3 y encontramos que al pH fisiológico de 7,4 el tratamiento con leptina no modificó la activación de caspasa-3. Sin embargo, cuando los explantos fueron cultivados a pH6,8 la activación de caspasa-3 aumentó cinco veces con respecto al control. En este caso, el tratamiento con leptina inhibió la activación de caspasa-3, alcanzando valores similares a los medidos a pH 7,4. Podemos afirmar entonces que la

disminución del pH es capaz de desencadenar un aumento en la apoptosis de las células placentarias, en este caso determinada por la activación de caspasa-3, y el agregado de leptina previene la muerte celular (**Figura R39**).

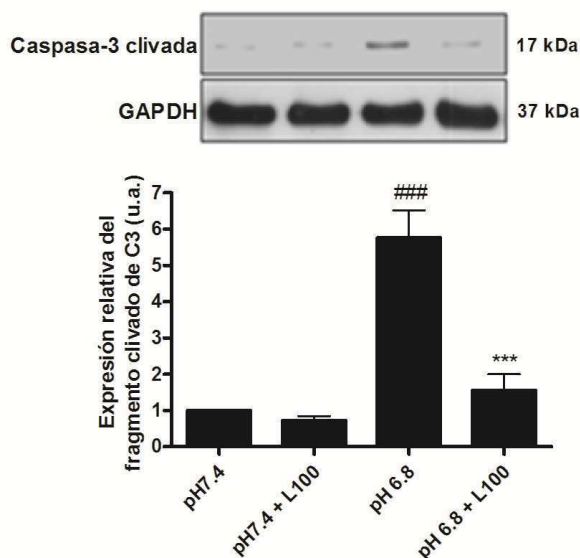


Figura R39. Leptina disminuye la activación de caspasa-3 inducida por disminución del pH de cultivo en explantos placentarios. Explantos de placenta humana a término se cultivaron en distintas condiciones de pH: 7,4 (pH control) y 6,8 y se trataron con 100 ng/ml de leptina (L100) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 3 horas. Se evaluó por *Western blot* la presencia del fragmento clivado de caspasa-3. Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. ##p<0,01 con respecto al pH control y ***p<0,001 con respecto al control sin leptina al respectivo pH.

Para confirmar el aumento en la activación de caspasa-3 generado por la disminución del pH, decidimos evaluar la presencia de cPARP (**Figura R40**).

En este caso encontramos que leptina disminuyó la aparición del fragmento clivado de PARP en explantos cultivados a pH control. Análogamente a los resultados obtenidos para caspasa-3, la disminución del pH de cultivo generó un aumento en cPARP y el agregado de 100 ng/ml de leptina impidió dicho incremento.

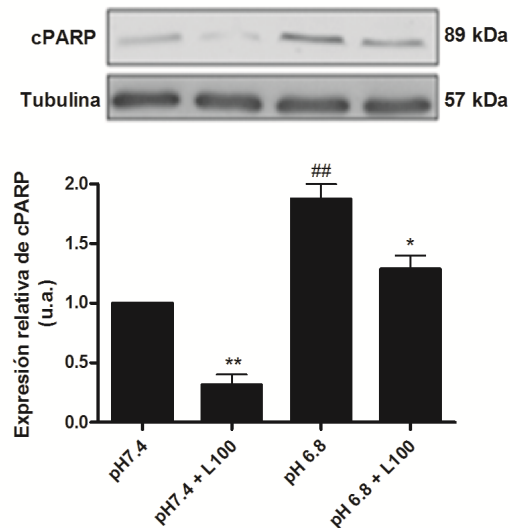


Figura R40. Leptina disminuye el clivado de PARP-1. Explantos de placenta humana a término se cultivaron en distintas condiciones de pH: 7,4 (pH control) y 6,8 y se trataron con 100 ng/ml de leptina (L100) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 3 horas. Se evaluó por *Western blot* la aparición del fragmento clivado de PARP (cPARP). Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. ## $p < 0,01$ con respecto a los explantos cultivados a pH control y * $p < 0,05$ y * $p < 0,01$ con respecto al control sin leptina al respectivo pH.

Leptina contrarresta el aumento en la expresión y actividad proapoptótica de p53 generado en condición de acidosis

Comprobada la inducción de apoptosis por disminución del pH, nos preguntamos si estas condiciones de cultivo afectan la expresión de p53. En la **Figura R41** se observa que a pH 7,4 leptina disminuyó la expresión de p53. Por otra parte, a pH 6,8 los niveles de p53 se duplicaron y leptina contrarrestó dicho aumento. A continuación evaluamos los niveles de fosforilación de p53 en serina 46 y evidenciamos el mismo patrón descripto para su expresión: el agregado de leptina disminuyó la proporción de p53 fosforilada a pH 7,4 y, a su vez, la disminución del pH generó un aumento en la fosforilación de p53, el cual fue contrarrestado por el tratamiento con leptina.

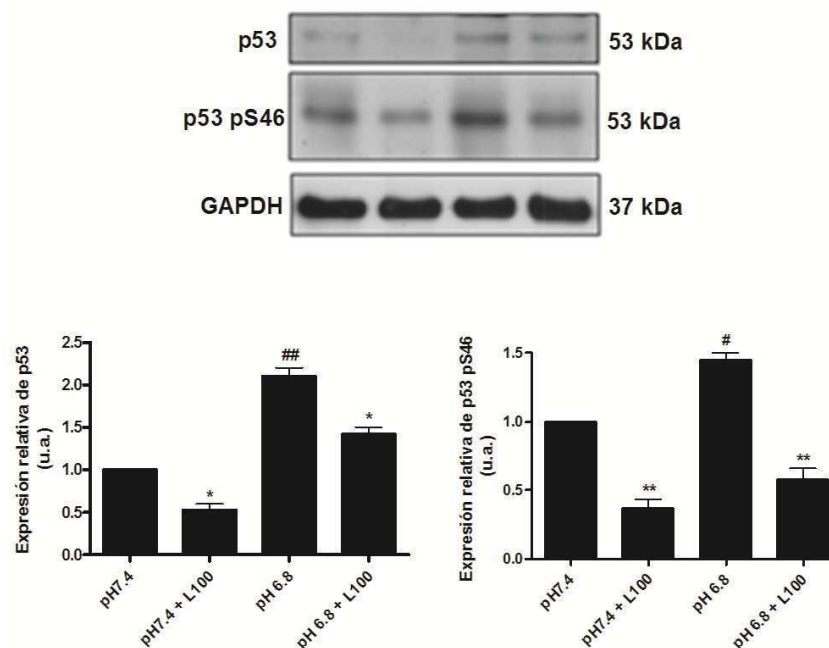


Figura R41. Leptina disminuye la expresión y fosforilación de p53. Explantos de placenta humana a término se cultivaron en distintas condiciones de pH: 7,4 (pH control) y 6,8 y se trataron con 100 ng/ml de leptina (L100) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 20 horas para evaluar por *Western blot* la expresión de p53 y durante 8 horas para evaluar su fosforilación en serina 46 (p53pS46). Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. #p<0,05 y ##p<0,01 con respecto a los explantos cultivados a pH control y *p<0,05 y **p<0,01 con respecto al control sin leptina al respectivo pH.

A continuación quisimos evaluar si la disminución de la expresión y la activación de p53 por leptina podían estar relacionadas con un aumento de su degradación y para dicho fin decidimos evaluar la expresión de Mdm-2. Hallamos que una disminución del pH se asoció con un aumento en la expresión de Mdm-2 y que en dicha condición leptina aumentó más aún la expresión de Mdm-2 (**Figura R42**).

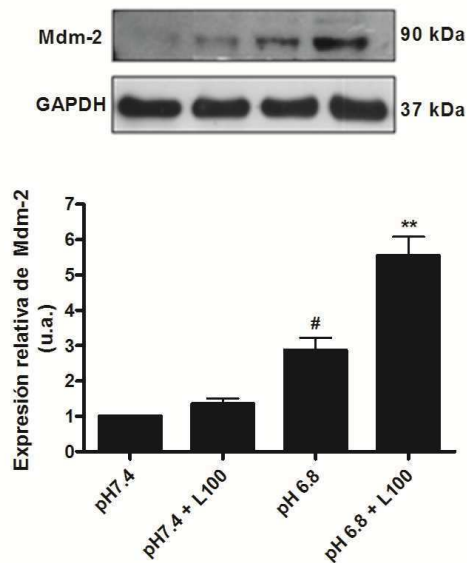


Figura R42. Leptina aumenta la expresión de Mdm-2 en explantos placentarios. Explantos de placenta humana a término se cultivaron en distintas condiciones de pH: 7,4 (pH control) y 6,8 y se trataron con 100 ng/ml de leptina (L100) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 20 horas. Se evaluó por *Western blot* la expresión de Mdm-2. Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. # $p < 0,05$ con respecto a los explantos cultivados a pH control y ** $p < 0,01$ con respecto al control sin leptina al respectivo pH.

Leptina modifica el balance de mediadores mitocondriales apoptóticos alterado por la disminución del pH

Quisimos evaluar qué sucede en las distintas condiciones de pH con el balance de mediadores pro y antiapoptóticos mitocondriales. Comenzamos estudiando los niveles de expresión de Bax y encontramos que a pH 7,4 leptina redujo dichos niveles. Por otro lado, la disminución del pH no modificó la expresión de Bax, pero se continúa observando el efecto inhibitorio de leptina. De la misma manera evaluamos la expresión de Bcl-2 y encontramos que no se ve afectada ni por la modificación del pH ni por el tratamiento con leptina. En la **Figura R43** se grafica y se puede observar que el tratamiento con leptina disminuyó la relación Bax/Bcl-2 como consecuencia de su efecto inhibitorio sobre Bax.

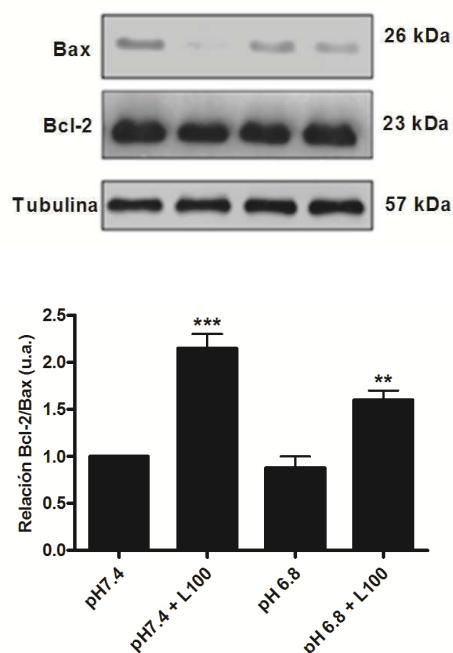


Figura R43. Leptina disminuye la expresión de Bax en explantos placentarios. Explantos de placenta humana a término se cultivaron en distintas condiciones de pH: 7,4 (pH control) y 6,8 y se trataron con 100 ng/ml de leptina (L100) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 20 horas. Se evaluó por *Western blot* la expresión de Bax y Bcl-2 y se graficó su relación. Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. **p<0,01 y ***p<0,01 con respecto al control sin leptina al respectivo pH.

Luego estudiamos el clivado de Bid. En este caso hallamos que en condiciones de pH fisiológico la abundancia del fragmento clivado de Bid no se vio afectada por el tratamiento con leptina. Sin embargo, la alteración del pH generó un marcado aumento de los niveles de t-Bid y dicho incremento fue inhibido por el tratamiento con leptina (**Figura R44**).

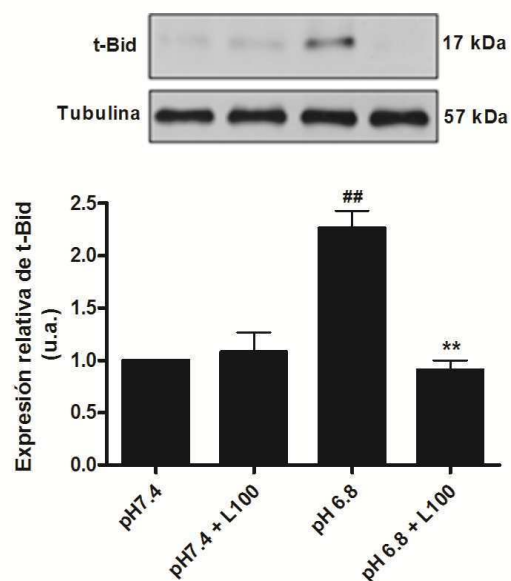


Figura R44. Leptina disminuye la activación de Bid inducida por una disminución del pH de cultivo en explantos placentarios. Explantos de placenta humana a término se cultivaron en distintas condiciones de pH: 7,4 (pH control) y 6,8 y se trataron con 100 ng/ml de leptina (L100) en medio DMEM-F12 1% SFB durante 20 horas. Se evaluó por *Western blot* la expresión de t-Bid. Se muestra en los gráficos la cuantificación de las bandas obtenidas en tres ensayos independientes. ## $p < 0,01$ con respecto al pH control y ** $p < 0,01$ con respecto al control sin leptina al respectivo pH.

De los resultados precedentes, se puede concluir que la disminución del pH alteró el balance de mediadores proapoptóticos mitocondriales, ya que generó un aumento en la expresión Bax y en la activación de Bid, siendo leptina capaz de impedir estas modificaciones.

CAPÍTULO IV

“Leptina favorece la migración e invasión de células placentarias”

Durante la placentación los trofoblastos penetran el endometrio hasta el estroma e invaden los vasos maternos. Los procesos de migración e invasión trofoblástica son críticos para el éxito de la implantación y la placentación y es por esta razón que son procesos altamente regulados (Gude et al. 2004). Por consiguiente, distintas patologías asociadas al embarazo tienen como causa una invasión excesiva o deficiente (Bischof y Campana 1996).

En este contexto, este último capítulo se centra en el estudio de leptina como una posible citoquina promotora de la invasión trofoblástica. Para responder dicho interrogante evaluamos la acción de leptina sobre la migración e invasión de células Swan-71, así como también estudiamos su efecto sobre la expresión de diversas proteínas involucradas en los procesos de migración e invasión celular.

IV.1: Estudio del efecto de la leptina sobre los procesos de migración e invasión trofoblástica

Leptina favorece la migración de células trofoblásticas involucrando a la vía de MAPK

Quisimos estudiar si leptina era capaz de modular la capacidad migratoria de las células placentarias. Para dicho fin, realizamos ensayos de cierre de herida y encontramos que 100 ng/ml de leptina promueven la migración celular ya que aumentan en un 23% el porcentaje de cierre de la herida (**Figura R45**).

Luego, nos interesó determinar si las vías de señalización de MAPK (ERK 1/2) o PI3K estaban involucradas en el efecto de leptina sobre la migración de células Swan-71. Para ello, previamente al agregado de 100 ng/ml de leptina, las células fueron tratadas con inhibidores farmacológicos para las vías mencionadas. Cuando se realizó el pretratamiento con PD98059, leptina no incrementó la capacidad migratoria de células Swan-71; desprendiéndose de este resultado que la vía de MAPK sería necesaria para la acción de leptina. Contrariamente, en células pretratadas con LY294002 se observó que leptina sostuvo su efecto sobre la migración, lo que indica que la vía de PI3K no estaría involucrada en dicho efecto. En este último caso, el porcentaje de cierre de herida se vio disminuido, indicando la participación de esta vía en el proceso de migración propiamente dicho (**Figura R45**).

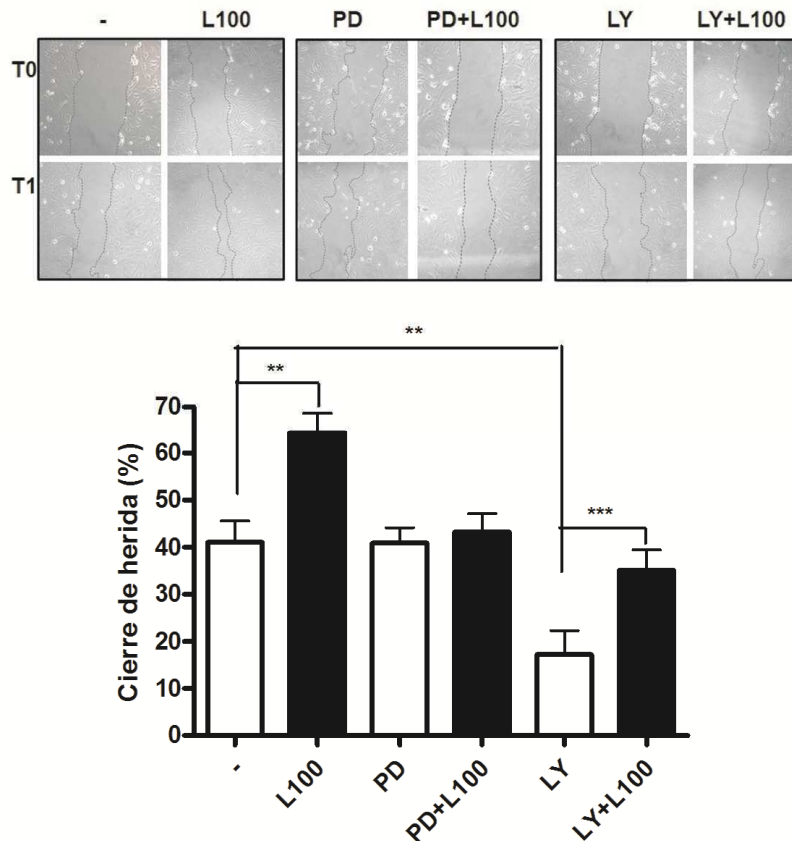


Figura R45. Leptina promueve la migración de células Swan-71 comprometiendo a la vía de señalización de MAPK. Se evaluó la migración de células Swan-71 mediante el ensayo de cierre de herida. Las células se pretrataron con los inhibidores farmacológicos correspondientes (PD98059 50 μ M, PD o LY294002 10 μ M, LY) durante 30 minutos, luego se agregaron 100 ng/ml de leptina (L100) y fue dicho momento el considerado como tiempo inicial (T_0). Para poder realizar el análisis correspondiente se tomaron fotografías al inicio y al final del tratamiento ($T_1 = 8$ hs). En el panel superior se muestran fotografías representativas para cada tratamiento. El gráfico muestra el porcentaje de cierre de herida obtenido en cada caso. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Leptina promueve la invasión de células trofoblásticas

Nos resultó de gran interés estudiar si leptina, además de la migración celular, era capaz también de promover la invasión. Para ello, se realizaron ensayos en cámaras transwell con matrigel y encontramos que 100 ng/ml de leptina incrementaron el porcentaje de células capaces de invadir a través del matrigel. El análisis de los resultados muestra que el tratamiento con 100 ng/ml de leptina aumentó en un 60% la invasión relativa al control (**Figura R46**).

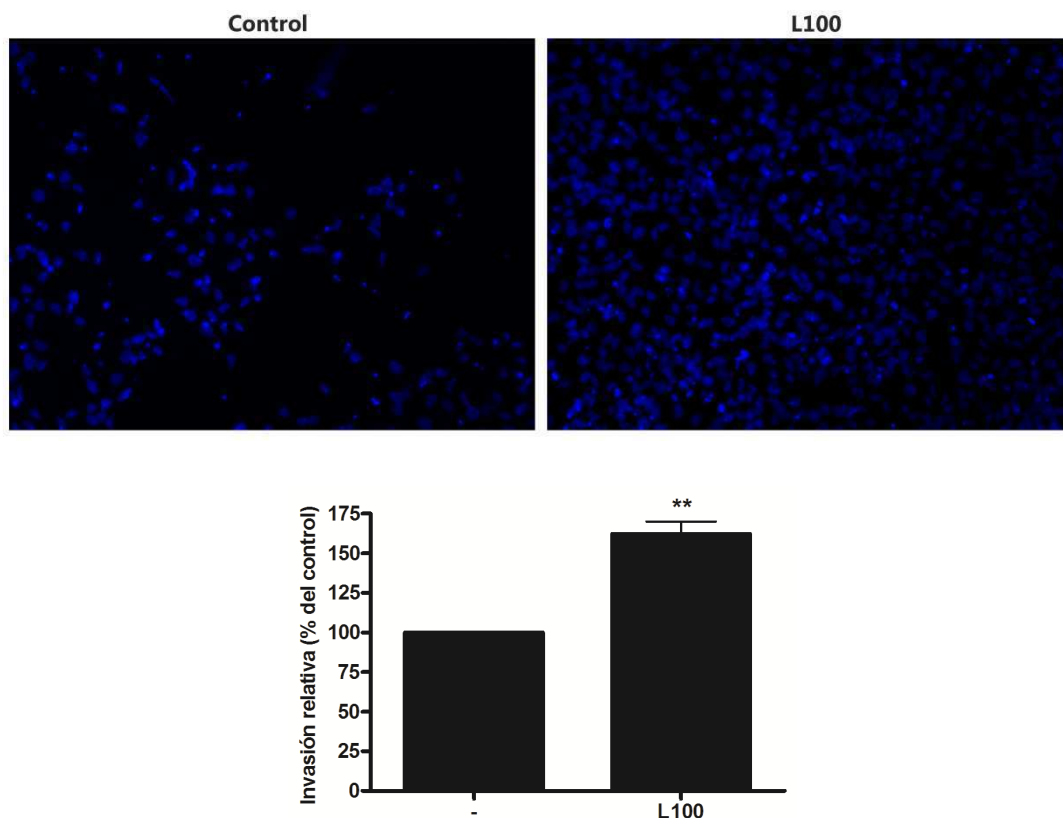


Figura R46. Leptina promueve la invasión de células Swan-71. Células Swan-71 se sembraron en la parte superior del inserto en medio DMEM-F12 1% SFB y se incubaron durante 40 horas con 100ng/ml de leptina (L100). Finalizado el tratamiento se removieron las membranas de los insertos, se realizó una tinción con DAPI y se montaron sobre un portaobjetos. Utilizando un microscopio de epifluorescencia se tomaron imágenes de 4 campos aleatorios y se estimó la cantidad de células que invadieron en cada caso con respecto al control (-). En la parte superior se muestran imágenes representativas para cada tratamiento. Los ensayos se realizaron por triplicado. ** $p < 0,01$ con respecto al control (-).

IV.2: Mecanismos moleculares involucrados en la acción de leptina sobre el proceso de invasión trofoblástica

Leptina regula la expresión y actividad de metaloproteasas

En la sección anterior describimos un efecto estimulador de leptina sobre los procesos de migración e invasión celular. En este punto deseamos ahondar en dichos efectos, por lo que nos propusimos estudiar un posible efecto de leptina sobre MMP-2

y MMP-9, metaloproteasas que se expresan en el trofoblasto humano (Staun-Ram et al. 2004). En primer lugar investigamos si leptina era capaz de modular la expresión a nivel de ARNm de MMP-2. Mediante ensayos de *real time* RT-PCR hallamos que leptina induce de manera dosis dependiente la expresión de MMP-2 (**Figura R47 A**). Dicho resultado nos impulsó a evaluar si leptina era capaz también de regular la actividad de MMP-2. Mediante ensayos de zimografía estudiamos la actividad de MMP-2 en presencia de dosis crecientes de leptina. A partir del análisis de las bandas de degradación se estimó la actividad de MMP-2, observándose un efecto regulatorio positivo de leptina, independientemente de la dosis utilizada (**Figura R47 B**).

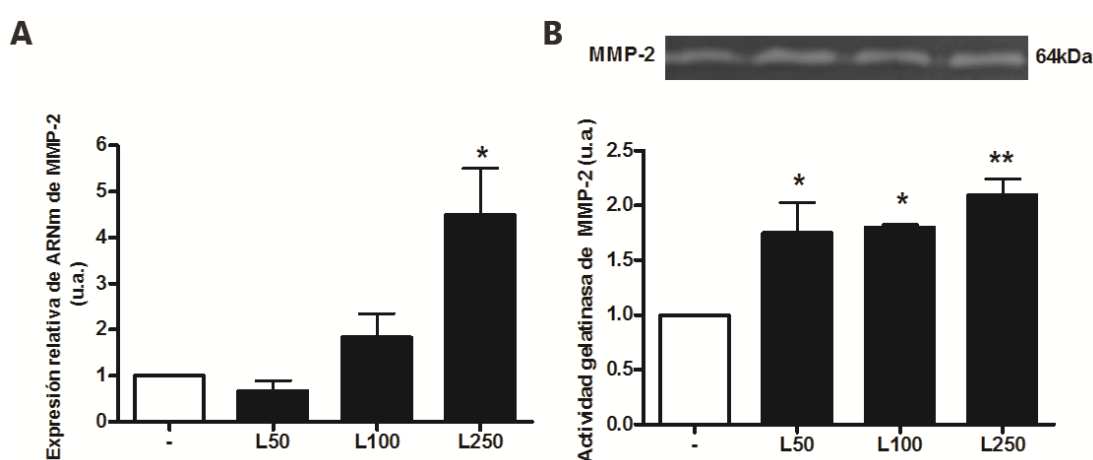


Figura R47. Leptina aumenta la expresión y actividad de MMP-2. **A)** Células Swan-71 se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) durante 48 horas en medio DMEM-F12 1% SFB, se extrajo el ARN total, se realizó una retrotranscripción para obtener el ADN copia y mediante *real time* RT-PCR se evaluó la expresión de MMP-2. **B)** Células Swan-71 se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) durante 48 horas y mediante zimografía se evaluó la actividad gelatinasa de MMP-2. Los ensayos se realizaron por triplicado. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control (-).

Luego, también mediante zimografías, evaluamos la acción de leptina sobre la actividad de MMP-9. De forma similar al efecto ejercido sobre MMP-2, leptina estimularía la actividad de MMP-9 ya que hallamos que aumentó la degradación de gelatina en la zona de migración de MMP-9 (**Figura R48**).

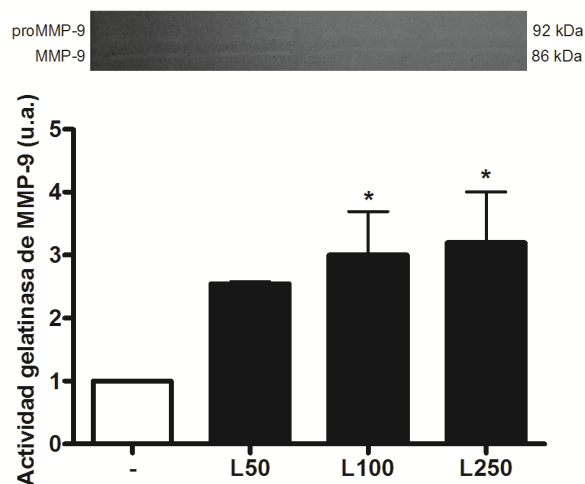


Figura R48. Leptina aumenta la actividad de MMP-9. Células Swan-71 se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) durante 48 hs y mediante zimografía se evaluó la actividad gelatinasa de MMP-9. Los ensayos se realizaron por duplicado. * $p < 0,05$ con respecto al control (-).

Leptina disminuye los niveles de E-cadherina

Durante los procesos de migración e invasión celular es necesario que las células pierdan las uniones adherentes que las vinculan. Muchas macromoléculas de membrana participan de estas uniones, siendo una de las principales proteínas las cadherinas (Staun-Ram y Shalev 2005). En particular, la E-cadherina es considerada como una molécula supresora de invasividad. Evaluamos si la expresión de E-cadherina se modifica como consecuencia del tratamiento con leptina. Para dicho fin, células Swan -71 fueron tratadas con dosis crecientes de leptina y mediante ensayos de *real time* RT-PCR y *Western blot* se estudió la expresión de E-cadherina. En la **Figura R49 A** se observa que leptina disminuyó la presencia del ARNm de E-cadherina. A su vez, en la **Figura R49 B** se observa que leptina disminuyó de manera dosis dependiente los niveles proteicos de E-cadherina.

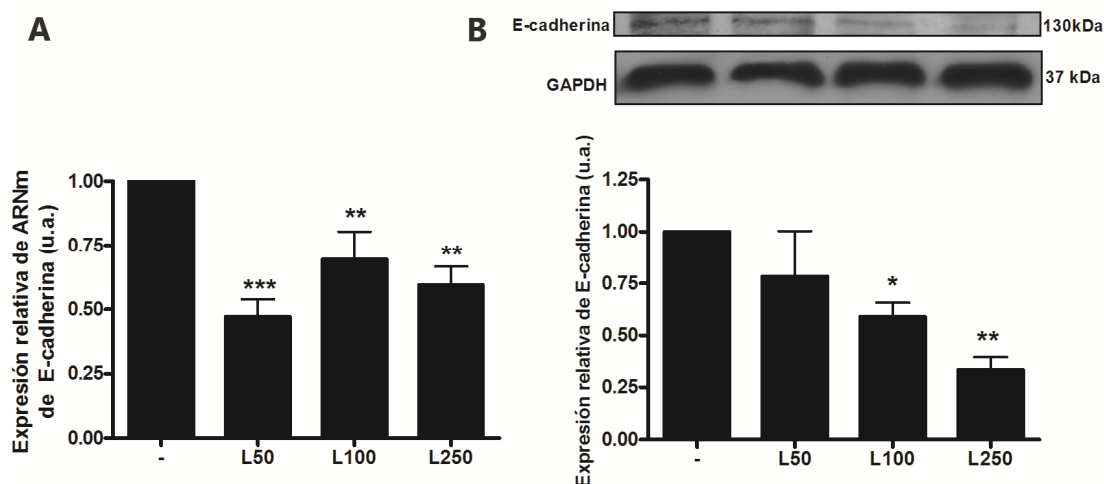


Figura R49. Leptina disminuye los niveles de E-cadherina. Células Swan-71 se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) durante 48 horas en medio DMEM-F12 1% SFB, se extrajo el ARN total, se realizó una retrotranscripción para obtener el ADN copia y mediante *real time* RT-PCR se evaluó la expresión de E-cadherina (**A**) o se realizaron extractos proteicos para evaluar los niveles de E-cadherina mediante *Western blot* (**B**). Los ensayos se realizaron por triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,01$ con respecto al control (-).

El efecto de leptina sobre E-cadherina es reversible e involucra la actividad de metaloproteasas

Luego de confirmar un efecto regulatorio negativo de leptina sobre la expresión de E-cadherina, nos propusimos ahondar en la caracterización de dicho efecto. En primer lugar nos interesó saber si el efecto de leptina era reversible. Para tal fin, se estimularon células Swan-71 con dosis crecientes de leptina durante 48 horas. Luego las células se cultivaron en medio fresco sin leptina durante 24 horas más y como control se utilizaron células estimuladas con leptina durante las últimas 24 horas.

Mediante ensayos de *real time* PCR observamos que los niveles de E-cadherina no se modificaron con respecto a las células control cuando se eliminó la leptina del medio de cultivo durante las últimas horas de tratamiento. En células que durante las últimas 24 horas se estimularon con leptina, sí se observó una disminución de los niveles de ARNm de E-cadherina. De esta manera, podemos afirmar que el efecto inhibitorio de leptina sobre los niveles de ARNm de E-cadherina es reversible (**Figura R50 A**). Al analizar la reversibilidad del efecto de leptina sobre los niveles proteicos de

E-cadherina obtuvimos el mismo resultado que para los niveles de ARNm (**Figura R50 B**).

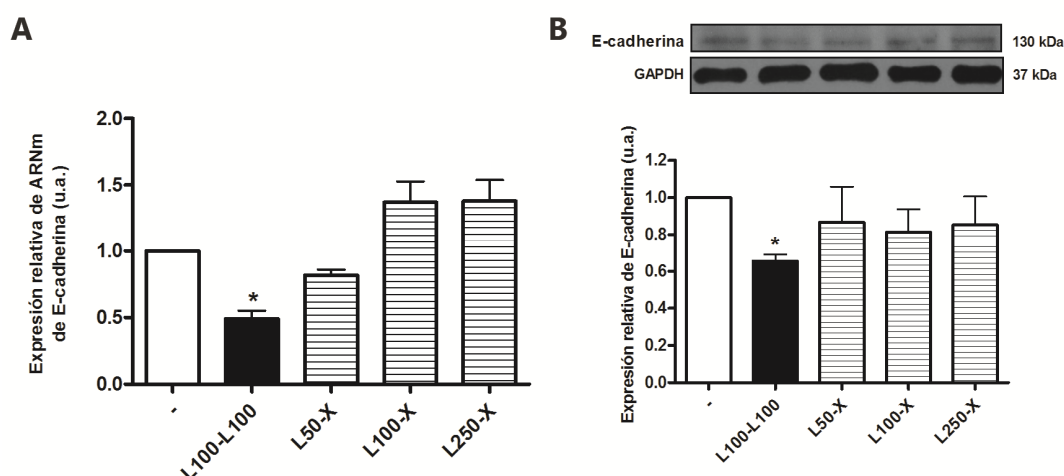


Figura R50. El efecto de leptina sobre los niveles de E-cadherina es reversible. Células Swan-71 se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) durante 48 horas en medio DMEM-F12 1% SFB, luego se reemplazó el medio y se cultivaron las células durante 24 horas más en ausencia (X) o en presencia de leptina (L100). **A)** Finalizado el tratamiento se extrajo el ARN total, se realizó una retrotranscripción para obtener el ADN copia y mediante *real time* RT-PCR se evaluó la expresión de E-cadherina. **B)** Finalizado el tratamiento se realizaron extractos proteicos para evaluar los niveles de E-cadherina mediante *Western blot*. En ambos casos se utilizaron como control cultivos estimulados con L100 durante las últimas 24 horas. Los ensayos se realizaron por triplicado. * $p < 0,05$ con respecto al control (-).

Basándonos en nuestro resultado previo que indica que leptina era capaz de modular la expresión de MMPs, quisimos investigar si la actividad de dichas proteasas está involucrada en la disminución de los niveles de E-cadherina producto del tratamiento con leptina. Para ello, se pretrataron células Swan-71 con el inhibidor GM6001 a una concentración de 25 μ M en la cual se inhiben las MMPs solubles. Encontramos que en células tratadas con GM6001 no se observa un efecto regulatorio de leptina sobre la expresión proteica de E-cadherina, lo que indicaría que la actividad de MMPs solubles es necesaria para el efecto de leptina sobre E-cadherina (**Figura R51**).

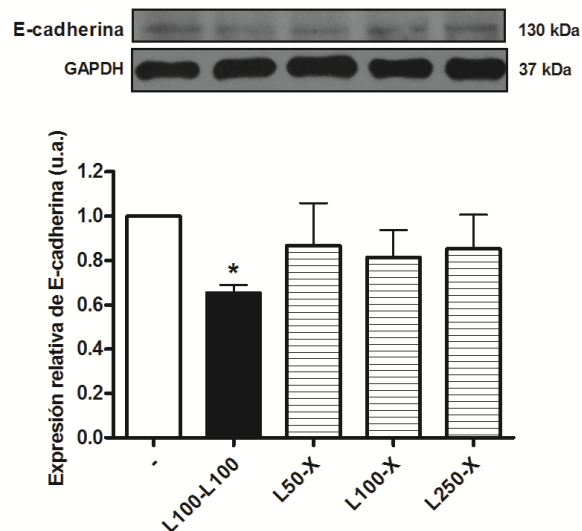


Figura R51. La actividad de MMPs estaría involucrada en el efecto de leptina sobre los niveles de E-cadherina. Células Swan-71 se trataron con el inhibidor farmacológico GM6001 (25 μ M) durante una hora, luego se agregaron dosis crecientes de leptina (L, 100 y 250 ng/ml) y se cultivaron las células durante 48 horas en medio DMEM-F12 1% SFB. Finalizado el tratamiento se realizaron extractos proteicos para evaluar los niveles de E-cadherina mediante *Western blot*. Las células control fueron tratadas con DMSO, que fue el vehículo utilizado para disolver el inhibidor GM6001. Los ensayos se realizaron por triplicado. * $p < 0,05$ con respecto al control (DMSO).

Leptina aumenta la expresión proteica de Integrina $\beta 1$

Las Integrinas son macromoléculas proteicas que interactúan con distintos componentes de la MEC y permiten la formación de focos de adhesión durante la migración celular. Durante el proceso de implantación embrionaria, los patrones de integrinas presentes en los CTB se van modificando, viéndose aumentadas las integrinas que contienen a la subunidad $\beta 1$ (Damsky et al. 1994, Pacheco 1999). En este contexto decidimos evaluar si leptina modificaba, ya sea a nivel de ARNm y/o proteico, los niveles de Integrina $\beta 1$. Para dicho fin se evaluó la presencia de Integrina $\beta 1$ mediante ensayos de *real time* RT-PCR y *Western blot*. En la **Figura R52 A** se puede observar que los niveles de ARNm de Integrina $\beta 1$ no se modificaron como consecuencia del tratamiento con leptina. Sin embargo, en la **Figura R52 B** se muestra que el tratamiento con dosis crecientes de leptina aumentó los niveles proteicos de

Integrina $\beta 1$ y que 50 ng/ml de leptina fueron suficientes para obtener el efecto máximo.

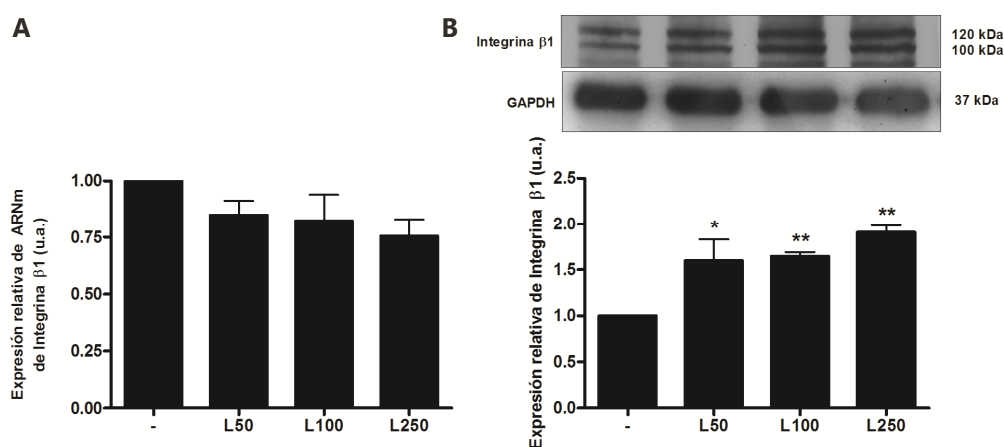


Figura R52. Leptina aumenta los niveles proteicos de Integrina $\beta 1$. Células Swan-71 se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) durante 48 horas en medio DMEM-F12 1% SFB, se extrajo el ARN total, se realizó una retrotranscripción para obtener el ADN copia y mediante *real time* RT-PCR se evaluó la expresión de Integrina $\beta 1$ (**A**) o se realizaron extractos proteicos para evaluar los niveles de Integrina $\beta 1$ mediante *Western blot* (**B**) Los ensayos se realizaron por triplicado. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control (-).

La reversión e implicancia de la actividad de MMPs en el efecto de leptina sobre Integrina $\beta 1$ depende de la dosis de leptina utilizada

Quisimos caracterizar el efecto de leptina sobre la expresión de Integrina $\beta 1$ y evaluamos la reversibilidad del efecto y la implicancia de la actividad de MMPs. Cuando analizamos la reversión del efecto no encontramos cambios a nivel de la expresión génica de Integrina $\beta 1$. Sin embargo el efecto generado por 50 y 100 ng/ml de leptina sobre los niveles proteicos de Integrina $\beta 1$ fue reversible, ya que al eliminar la leptina del medio de cultivo los niveles Integrina $\beta 1$ permanecieron constantes. No obstante, en células tratadas con 250 ng/ml de leptina se incrementó la expresión de Integrina $\beta 1$; hecho que nos podría indicar que la dosis máxima de leptina generaría un efecto más prolongado que no se revierte cuando se cultivan las células durante 24 horas en ausencia de leptina (**Figura R53**).

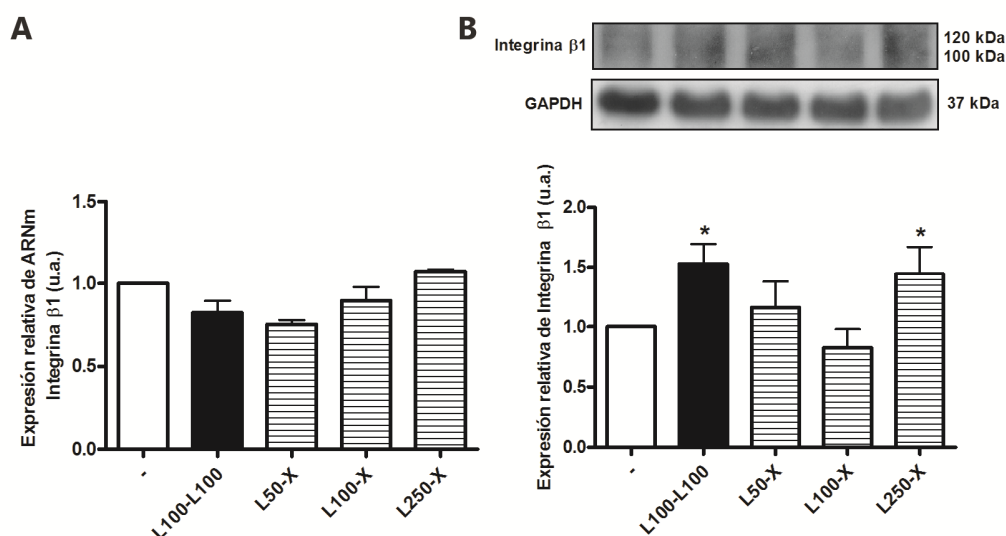


Figura R53. Reversión del efecto de leptina sobre los niveles de Integrina $\beta 1$. Células Swan-71 se trataron con dosis crecientes de leptina (L, 50, 100 y 250 ng/ml) durante 48 horas en medio DMEM-F12 1% SFB, luego se reemplazó el medio y se cultivaron las células durante 24 horas más en ausencia (X) o en presencia de leptina (L100). **A)** Finalizado el tratamiento se extrajo el ARN total, se realizó una retrotranscripción para obtener el ADN copia y mediante *real time* RT-PCR se evaluó la expresión de Integrina $\beta 1$. **B)** Finalizado el tratamiento se realizaron extractos proteicos para evaluar los niveles de Integrina $\beta 1$ mediante *Western blot*. En ambos casos se utilizaron como control cultivos estimulados con L100 durante las últimas 24 horas. * $p < 0,05$ con respecto al control (-).

Para finalizar, evaluamos los niveles de Integrina $\beta 1$ en células tratadas con el inhibidor de MMPS GM6001. En este caso no observamos cambios con respecto al control cuando se utilizaron las dosis de 50 y 100 ng/ml de leptina, lo que indicaría que el efecto de dichas dosis de leptina no estaría mediado por la actividad de metaloproteasas. Sin embargo, encontramos diferencias en el efecto de 250 ng/ml de leptina, que sí involucraría la actividad de MMPs (**Figura R54**).

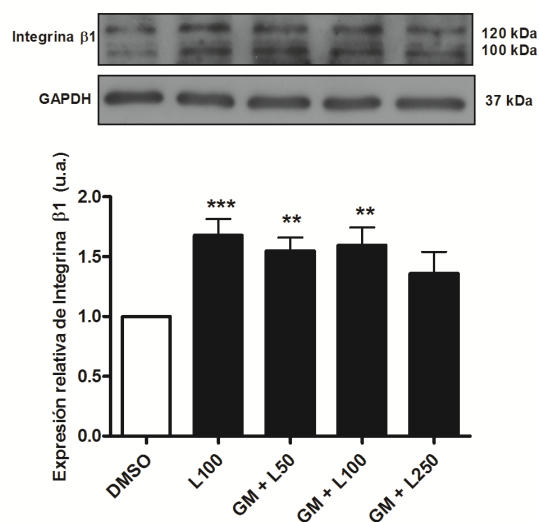


Figura R54. Implicancia de la actividad de metaloproteasas en el efecto de leptina sobre los niveles de Integrina $\beta 1$. Células Swan-71 se trataron con el inhibidor farmacológico GM6001 (25 μ M) durante una hora, luego se agregaron dosis crecientes de leptina (L, 100 y 250 ng/ml) y se cultivaron las células durante 48 horas en medio DMEM-F12 1% SFB. Finalizado el tratamiento se realizaron extractos proteicos para evaluar los niveles de Integrina $\beta 1$ mediante *Western blot*. Las células control fueron tratadas con DMSO, que fue el vehículo utilizado para disolver el inhibidor GM6001. Los ensayos se realizaron por triplicado. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ con respecto al control (DMSO).

DISCUSIÓN

Leptina promueve la supervivencia de células placentarias

Originalmente se describió a la leptina como una hormona relacionada con la regulación del gasto energético y el apetito. Sin embargo, luego se encontró que no sólo se produce en el tejido adiposo, sino también en muchos otros tejidos y entre ellos se encuentra la placenta, órgano que a pesar de que se haya completado su desarrollo continúa atravesando distintos estadios de proliferación y apoptosis relacionados con el crecimiento, el recambio celular y el parto (Genbacev y Miller 2000, Heazell y Crocker 2008, Tessier et al. 2013).

Diversos aspectos del rol de leptina en la reproducción y durante el embarazo han sido estudiados en distintos modelos experimentales, aunque poco se conoce sobre la capacidad de leptina de regular la supervivencia en placenta humana. Trabajos de nuestro grupo de investigación demostraron que leptina promueve la proliferación como la supervivencia de células JEG-3, situándola como una hormona capaz de regular la homeostasis de células placentarias (Magarinos et al. 2007, Perez-Perez et al. 2008, Perez-Perez et al. 2010). Basándonos en estos antecedentes en el capítulo I de esta Tesis nos propusimos evaluar la acción de leptina sobre los procesos de proliferación y apoptosis de células Swan-71 y explantos de placenta humana a término.

Comenzamos estudiando la proliferación de células Swan-71 y encontramos que 100 ng/ml de leptina promueven la proliferación celular a través de la vía de MAPK (ERK 1/2). En base a este resultado evaluamos la acción de leptina sobre distintas proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular. Estudiamos la expresión de ciclina D1, involucrada en la transición de G1, y de Ki-67, proteína comúnmente utilizada como marcador de proliferación celular, y hallamos que leptina aumenta la expresión de ambas proteínas.

Luego, decidimos evaluar la acción de leptina sobre los niveles de p21, una proteína que influencia el balance entre la proliferación y la muerte celular. Investigamos el efecto de leptina sobre p21 mediante distintos abordajes experimentales y encontramos que leptina incrementa tanto su actividad promotora como su expresión a nivel de ARNm y proteico. Los resultados obtenidos concuerdan

con reportes que demuestran la capacidad de p21 de promover la proliferación y de proteger a la célula de la apoptosis mediada por p53 (Warfel y El-Deiry 2013).

De esta manera demostramos que leptina promueve la proliferación de células Swan-71, coincidente con otros trabajos donde se ha demostrado que leptina induce la proliferación de células endoteliales en cultivo (Misztal-Dethloff et al. 2004), de linfocitos T (Martin-Romero et al. 2000) y de progenitores hematopoyéticos y osteoblastos (Gainsford et al. 1996). Otros reportes señalan que leptina induce la proliferación de células hepáticas *in vitro* a través de la vía de PI3K/Akt (Santos-Alvarez et al. 1999) y de células humanas mononucleares periféricas de sangre a través de la activación de la vía de MAPK (ERK 1/2) (Lang et al. 2004).

A continuación evaluamos la acción de leptina sobre la apoptosis de células Swan-71 y explantos placentarios. Elegimos como primera estrategia para inducir apoptosis la privación de suero, que consiste en un modelo ampliamente utilizado. Decidimos iniciar nuestro estudio evaluando etapas tardías del proceso de apoptosis caracterizadas por la activación de ciertas caspasas que tienen como sustrato desde proteínas involucradas en las distintas vías de apoptosis hasta la degradación del propio ADN (Salazar 2009). Estudiamos el patrón de fragmentación del ADN en explantos placentarios y hallamos que la ausencia de suero aumenta la fragmentación del ADN, mientras que el tratamiento con leptina revierte dicho fenómeno. De modo similar, encontramos que la activación de caspasa-3 aumenta en ausencia de suero, mientras que disminuye como consecuencia del tratamiento con leptina. Nos preguntamos luego si la leptina endógena también podría estar regulando los niveles de caspasa-3 y para responder dicho interrogante utilizamos la línea celular BeWo que, contrariamente a la línea Swan-71, expresa leptina. El tratamiento de células BeWo con un oligonucleótido antisentido para leptina pareciera generar un aumento en la aparición del fragmento clivado de caspasa-3, sugiriendo que la leptina endógena también inhibiría la actividad de dicha caspasa. Nuestros resultados son respaldados por trabajos que han evaluado el rol de leptina sobre la expresión y activación de caspasa-3 en distintos órganos y modelos experimentales. Recientemente se ha reportado que en roedores el tratamiento con leptina genera una inhibición de la expresión caspasa-3 en células epiteliales de alveolos pulmonares (Chen et al. 2015),

en el músculo liso de las vías aéreas (Liu et al. 2012), en cardiomiocitos (McGaffin et al. 2009, Yu et al. 2014) y en neuronas, donde leptina actúa tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico (Yan et al. 2011). En muestras de miometrio extraído de mujeres luego del parto se encontró que el tratamiento con leptina disminuye los niveles de caspasa-3 clivada (Wendremaire et al. 2011) y en la línea celular humana de adenocarcinoma ovárico OVCAR3, leptina inhibe la activación y la expresión de caspasa-3 a través de STAT3 (Ptak et al. 2013). Más aún, en ratones deficientes para leptina se encontró que los ovarios tienen una mayor expresión de caspasa-3 (Serke et al. 2012) y que una disminución de la expresión de la leptina endógena en células HepG2 se correlaciona con un aumento en la actividad de dicha caspasa (Al-Suhaimi 2014), lo que concuerda con los resultados obtenidos en células BeWo. La mayoría de los estudios coinciden en una acción inhibitoria de leptina sobre caspasa-3, sin embargo es escasa la bibliografía referida al efecto antiapoptótico de leptina en placenta, lo que aumentaría la relevancia de nuestros resultados.

Para reforzar los resultados obtenidos para la activación de caspasa-3 analizamos el clivaje de PARP-1, miembro de una gran familia de polimerasas implicadas en la reparación del ADN que es escindido por caspasa-3 y otras proteasas durante la apoptosis (Morales et al. 2014). Análogamente a lo descrito para caspasa-3, encontramos tanto en células Swan-71 como en explantos placentarios, un aumento en el clivado de PARP-1 en ausencia de suero, que disminuyó por el tratamiento con leptina. Los hallazgos mencionados nos permitieron corroborar que la ausencia de los nutrientes del suero es una condición capaz de aumentar la apoptosis y que dicho efecto disminuye como consecuencia del tratamiento con leptina.

Luego de comprobar la viabilidad del modelo propuesto y con la intención de profundizar los antecedentes ya mencionados de nuestro grupo de investigación, decidimos centrar nuestro estudio en la fase de iniciación de la apoptosis analizando la vía de señalización intrínseca. Esta vía se relaciona con cambios en la membrana mitocondrial que conllevan a la liberación del citocromo c y a la posterior formación del apoptosoma, que activa a caspasa-3 e inicia la vía efectora de apoptosis (Martínez 2009). Decidimos evaluar la acción de leptina sobre la expresión de intermediarios anti

y proapoptóticos que ejercen su acción a nivel mitocondrial, como lo son Bcl-2, Bax y Bid (Brady y Attardi 2010).

Bcl-2 y Bax son algunos de los miembros más representativos de la familia de proteínas Bcl-2 y, a su vez, se caracterizan por poseer actividades opuestas: Bax promueve la liberación del citocromo c, mientras que Bcl-2 interactúa con Bax e inhibe su acción (Gewies 2003). Es por esta razón que el análisis de la relación Bcl-2/Bax es clave para estimar la susceptibilidad a apoptosis por la vía intrínseca. Encontramos que el tratamiento con leptina incrementa la relación Bcl-2/Bax y que este aumento se debe principalmente a la regulación de Bcl-2. Tanto en células Swan-71 como en explantos placentarios la dosis media de leptina aumenta los niveles de Bcl-2. Por otra parte, el tratamiento con leptina no modificó la expresión de Bax en células Swan-71, mientras que observamos un aumento de Bax en explantos placentarios tratados con 250 ng/ml de leptina. Asimismo no evidenciamos cambios en la expresión de Bcl-2 y Bax asociados a la privación de suero, lo que podría indicarnos que no es una condición suficiente para generar un efecto sobre dichos intermediarios. En este punto queremos destacar los resultados coincidentes del grupo de Sirotkin, que al estudiar el efecto del tratamiento con leptina, IGF-1 y FSH sobre la apoptosis y proliferación de células de la granulosa en condiciones de privación de suero, no detectó cambios en la expresión de Bax.

Distintos grupos de investigación han evidenciado una regulación por parte de leptina sobre la expresión de Bcl-2 y Bax en diversos modelos experimentales que es compatible con nuestros hallazgos (Bruno et al. 2005, Brown y Dunmore 2007, Liu et al. 2012, Bilbao et al. 2015, Chen et al. 2015), más aún en trofoblastos aislados y sometidos a hipoxia, se encontró que la disminución de la presión de oxígeno genera un aumento en los niveles de leptina que se asocian a una disminución tanto en los niveles de Bax como de la activación de caspasa-3 (Nüsken et al. 2015).

Bid, otro de los miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2 que fue descubierto por su capacidad de unirse tanto a Bcl-2 como a Bax, puede ser clivado y activado por distintas proteasas y una vez activo migra a la mitocondria e induce la permeabilización de la membrana externa (Billen et al. 2008). Nos interesó entonces

evaluar el efecto de leptina sobre la activación de Bid y encontramos que la ausencia de suero genera un aumento en su activación y que el tratamiento con leptina la reduce de manera dosis dependiente. Un efecto similar fue descrito por Bruno y colaboradores en neutrófilos (Bruno et al. 2005).

La bibliografía ofrece numerosos trabajos que han centrado su estudio en la acción de leptina sobre el proceso de apoptosis. No obstante, el número de trabajos que estudian el rol de leptina en procesos fisiológicos es escaso y abundan los trabajos realizados en células tumorales ya que son de fácil acceso y debido a que estudios epidemiológicos han situado a la obesidad como un factor de riesgo importante para muchos tipos de cáncer (Bianchini et al. 2002, Calle y Kaaks 2004, Ptak et al. 2013, Yuan et al. 2013, Xiong et al. 2014, Zhou et al. 2015). Es interesante mencionar el trabajo de Serke y colaboradores, quienes encontraron que los ovarios de ratones deficientes para leptina presentan alterada la esteroideogénesis y aumentada la apoptosis, sugiriendo un rol protector de leptina (Serke et al. 2012). A su vez, otros grupos de investigación han demostrado que en roedores leptina disminuye los niveles de apoptosis en hepatocitos, timocitos y cardiomiocitos (Qamar et al. 2006, da Silva et al. 2013, Yu et al. 2014) y promueve la supervivencia de linfocitos T y linfocitos B (Fernández-Riejos et al. 2008, Lam et al. 2010). También se ha reforzado la importancia de leptina en el desarrollo pulmonar fetal hallando que leptina aumenta la sobrevivencia de células alveolares (Chen et al. 2015). Estudios en bovinos demostraron que leptina regula la expresión de Bax y disminuye la apoptosis en blastocistos generados in vitro (Boelhauve et al. 2005) y en humanos se ha descrito que leptina inhibe la apoptosis en células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (Wang et al. 2014) y regula el crecimiento de células de la próstata promoviendo tanto la proliferación como la apoptosis (Leze et al. 2012).

En resumen, los resultados descritos hasta el momento nos permiten demostrar la capacidad de leptina de promover la supervivencia de células placentarias a través de la regulación de proteínas involucradas tanto en la proliferación como en la muerte celular.

El mecanismo antiapoptótico de leptina involucra la vía de señalización de p53

Continuamos la caracterización del efecto antiapoptótico de leptina estudiando a p53, una de las proteínas más relevantes en la regulación del ciclo celular y la apoptosis que frente a condiciones de daño o injuria se estabiliza y se activa (Heazell et al. 2011, Sohr y Engeland 2011). En primer lugar evaluamos la actividad de p53 mediante ensayos de transfecciones transitorias en células Swan-71 y hallamos que leptina genera una disminución de su actividad transcripcional de manera dosis dependiente. Luego estudiamos la expresión de p53 a nivel de ARNm y proteico, y encontramos que leptina regula negativamente la expresión de p53 provocando su disminución de manera dosis dependiente, mostrando patrones muy similares en las células Swan-71 y en los explantos placentarios. Son escasos los trabajos que evalúan un posible efecto regulatorio de leptina sobre los niveles de p53. En células de cáncer de mama leptina incrementa los niveles de ciclina D1 mientras disminuye los de p53 y p21 (Chen et al. 2006) y en células de hepatocarcinoma humano se encontró que una disminución de la expresión de leptina como consecuencia del tratamiento con vitamina K3 se correlaciona con un aumento en la expresión de p53 (Al-Suhaimi 2014). La inyección de leptina recombinante en ratas genera un hipertrofia en células de la granulosa, disminuye la apoptosis folicular y genera un aumento en la expresión de Bcl-2, pero no se observan cambios en la expresión de p53 ni de Mdm-2 (Almog et al. 2001). No obstante, está reportado que leptina aumenta los niveles de expresión de p53 en células de la granulosa porcinas (Sirotkin et al. 2012). Como puede advertirse, la bibliografía no ofrece una tendencia establecida sobre el efecto de leptina sobre la proteína supresora de tumores p53, dependiendo los resultados del modelo estudiado. Sin embargo, creemos que nuestros resultados son contundentes y nos permiten sugerir que leptina posee un efecto inhibitorio sobre p53 en células placentarias.

A continuación quisimos ahondar en el mecanismo involucrado en la acción de leptina y analizamos la fosforilación de p53 en serina 46, necesaria para la inducción de genes proapoptóticos (Mayo et al. 2005, Dai y Gu 2010). Hallamos que los niveles de fosforilación de p53 en serina 46 tienden a aumentar en ausencia de suero, efecto coherente con la inducción de apoptosis, mientras que disminuyen como consecuencia

del tratamiento con leptina. En células Swan-71 leptina redujo a la fosforilación de p53 y no observamos diferencias en el efecto según la dosis, sin embargo en explantos placentarios la inhibición fue dosis dependiente. No hay reportados en la bibliografía trabajos que estudien la influencia del tratamiento de leptina sobre la fosforilación de p53 en serina 46 y es por esta razón que planteamos la importancia de extender el estudio de la inhibición de p53 por leptina, no sólo en células placentarias sino también en otros modelos experimentales.

Con el fin de continuar avanzando en el estudio sobre la regulación de p53 por leptina, decidimos investigar si dicha hormona es capaz de modificar la expresión de Mdm-2, principal proteína reguladora de p53 (Prives y Hall 1999, Wade et al. 2013, Eischen y Lozano 2014). Mdm-2 es una ubiquitina ligasa que media la degradación de p53 vía proteasoma. La expresión de Mdm-2 no resultó afectada por la ausencia de suero, sin embargo, encontramos que leptina estaría regulando positivamente su expresión. En células Swan-71 leptina aumentó la expresión de Mdm-2, tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico, sin observarse diferencias según las dosis utilizadas. No obstante, en explantos placentarios sólo la dosis de 100 ng/ml de leptina aumentó significativamente el ARNm de Mdm-2, mientras que 100 y 250 ng/ml de leptina aumentaron su expresión proteica. Podría pensarse que leptina no sólo incrementa la expresión de Mdm-2, sino que también aumenta su estabilidad, ya que 250ng/ml de leptina no estarían induciendo a Mdm-2 a nivel transcripcional pero si generando un aumento en su abundancia proteica. La realización de experimentos con inhibidores selectivos de la transcripción y traducción, sumados a inhibidores de proteasoma podrían ser útiles para resolver esta cuestión.

Es realmente escasa la bibliografía disponible sobre una posible relación entre leptina y Mdm-2. En roedores se encontró que leptina disminuye la apoptosis folicular aumentando la relación Bcl-2/Bax, pero no se encuentra correlación entre el tratamiento con leptina y la expresión de Mdm-2 (Almog et al. 2001). En un segundo trabajo realizado en células de cáncer de colon, se estimulan a las células con leptina y se analiza mediante *microarrays* el cambio en la expresión de distintos genes relacionados con la proliferación celular y apoptosis, encontrando que leptina regula negativamente los niveles de Mdm-2 (Fenton et al. 2008). Dado que p53 regula

positivamente la expresión de Mdm-2, nuestros resultados nos llevan a pensar que leptina regularía a Mdm-2 de forma independiente de p53. Sp1, NFAT y ER α son otras proteínas involucradas en la regulación de la transcripción de Mdm-2. Los estrógenos mediante la acción de ER α aumentan la afinidad de unión de Sp1 al gen de Mdm-2, provocando un aumento de su expresión (Zhao et al. 2014). Además se ha reportado que leptina aumenta la expresión de ER α en células de próstata (Habib et al. 2015), su localización nuclear de ER α en ovario (Choi et al. 2011) y la relación ER α /ER β en células MCF-7 (Valle et al. 2011). Por otro lado, antecedentes previos de nuestro grupo de investigación demostraron que el 17 β -estradiol aumenta la expresión de leptina placentaria y que este efecto podría estar mediado por el ER α (Gambino et al. 2010, Gambino et al. 2012). Pensamos entonces que ER α podría ser un posible mediador de los efectos de leptina sobre Mdm-2. Aun así, creemos que el aumento de la expresión de Mdm-2 por leptina es un hecho de gran relevancia que podría explicar los efectos observados de leptina sobre p53.

Dado que demostramos que leptina regula la expresión de Mdm-2, optamos por continuar estudiando la estabilidad de p53 analizando su vida media en presencia de leptina. El control de la estabilidad de las proteínas es fundamental para la regulación del crecimiento, supervivencia, desarrollo y diferenciación celular. La vida media de las proteínas puede ser de unos pocos minutos o de hasta días (Zhou 2004). Particularmente, la vida media de p53 es muy variable y depende del tipo celular y de las mutaciones que presente, habiéndose reportado una vida media de veinte minutos para p53 *wild type* (Soussi 2000). Mediante experimentos con cicloheximida demostramos que la vida media de p53 disminuye en presencia de leptina, extendiendo así la caracterización del efecto del tratamiento con leptina sobre p53.

Todas las isoformas de membrana del receptor de leptina poseen dominios de unión para JAK2 y a través de ésta proteína se puede producir la activación de proteínas STAT, de la vía de MAPK (ERK 1/2) a través de SHP-2 o de la vía de PI3K mediante la unión a IRS (Münzberg y Morrison 2015). Factores de crecimiento y mitógenos activan la vía de señalización de ERK 1/2, induciendo la proliferación y el crecimiento celular y se ha descrito que esta vía está activa en citotrofoblastos de primer trimestre y promueve la diferenciación trofoblástica en placenta humana (Kita

et al. 2003, Daoud et al. 2005). La vía de PI3K también regula el crecimiento, la supervivencia y la migración celular, principalmente mediante la acción de Akt, que puede actuar tanto sobre Mdm-2 como sobre p53 (Manning y Cantley 2007). Con relación a las cascadas de señalización involucradas en el efecto antiapoptótico de leptina, se ha reportado en distintos modelos la participación de las vías de MAPK (ERK 1/2) y PI3K (McGaffin et al. 2009, Liu et al. 2012, Yu et al. 2014). Trabajos previos de nuestro grupo de investigación demostraron que leptina activa las vías de ERK 1/2 y PI3K/Akt en células placentarias (Perez-Perez et al. 2008, Perez-Perez et al. 2010, Maymo et al. 2012).

Con la intención de evaluar las vías de señalización involucradas en la regulación de p53 por leptina utilizamos dos estrategias: por un lado la utilización de inhibidores farmacológicos y por el otro la realización de transfecciones con isoformas dominantes negativas de distintos mediadores de las vías analizadas. Encontramos que la regulación de p53 por leptina estaría mediada no sólo por la vía de ERK 1/2 sino también por la de PI3K/Akt, tanto en células Swan-71 como en explantos placentarios. Cuando analizamos las vías de señalización involucradas en el efecto de leptina sobre la fosforilación de p53 en serina 46, encontramos que ambas vías de señalización estarían involucradas.

Mecanismos antiapoptóticos de leptina frente a distintas situaciones de injuria

Leptina posee un efecto protector frente a radiación ultravioleta

La apoptosis inducida por radiación ultravioleta es un evento complejo que involucra distintas vías: la activación de p53, la activación de los receptores de muerte celular directamente por radiación UV o por la liberación autocrina de ligandos de muerte y la liberación de citocromo c de la mitocondria (Pustišek y Šitum 2011). El arresto de la replicación, la reparación del daño y la apoptosis son eventos que se

desencadenan para que la célula pueda recuperarse de los daños generados y es en este punto donde p53 posee un rol crítico (Latonen y Laiho 2005). Basándonos en nuestros hallazgos descriptos anteriormente y en la carencia de antecedentes que describieran una correlación entre leptina y p53 fue que consideramos de gran importancia continuar ampliando nuestro estudio y analizar si bajo otras condiciones de estrés leptina también es capaz de regular los niveles y la actividad de p53. Fue entonces cuando decidimos estudiar la acción de leptina en células sometidas a radiación ultravioleta, ya que está establecido como un estímulo capaz de activar a p53.

Para comenzar evaluamos la activación de caspasa-3 y encontramos que en las células control no irradiadas el agregado de leptina exógena no modifica la activación de dicha proteasa. Por otro parte, la radiación UV no generó cambios significativos en la activación de caspasa-3, sin embargo leptina generó una notable disminución en su activación, efecto que se comprobó luego mediante el análisis del clivado de PARP-1. El patrón encontrado podría deberse a que leptina actúa en condiciones de estrés para las células.

En segundo lugar estudiamos el efecto de leptina sobre la expresión y regulación postraducciona de p53. Encontramos que la radiación UV aumenta la expresión de p53 y leptina contrarresta dicho efecto. Del mismo modo evaluamos si el tratamiento con leptina modifica la fosforilación de p53 en serina 46 y encontramos que el tratamiento con UV no modificó significativamente la fosforilación de p53, pero el tratamiento con leptina generó una disminución de los niveles de fosforilación en serina 46. Los resultados obtenidos para p53 y su fosforilación coinciden con los hallazgos obtenidos para caspasa-3 y PARP-1, ya que se evidenció un efecto significativo de leptina a pesar de que el tratamiento con UV por sí mismo no altera la expresión o fosforilación de las proteínas analizadas.

Distintos trabajos de investigación han descripto que la radiación UV promueve la fosforilación de p53 en su serina 20, aumentando la inducción de p21 y Mdm-2 (Jabbur et al. 2000). Estudios utilizando la mutante p53Asp20, con una mutación en la posición 20 que imita la isoforma constitutivamente fosforilada, sugieren que la

fosforilación en dicha posición disminuye la interacción con Mdm-2, aumentando su estabilidad (Jabbur et al. 2001). Para profundizar nuestro estudio, decidimos analizar la expresión de Mdm-2 y encontramos que leptina aumenta su expresión en células no irradiadas, sugiriendo que un tratamiento corto con leptina es suficiente para evidenciar el efecto que describimos en la sección anterior. En células irradiadas aumentó más aún la expresión de Mdm-2 y pensamos que este efecto podría deberse a un aumento en la actividad transcripcional de p53. A su vez la dosis mínima de leptina disminuyó la expresión de Mdm-2 mientras que dosis mayores no generaron cambios. Distintos autores han reportado que la luz UV también induce la expresión del ARNm de Mdm-2 de manera independiente de p53 (Perry et al. 1993, Dong et al. 2003) y es posible que leptina no sea capaz de regular esta vía alternativa. Experimentos que permitan estudiar la interacción entre p53 y Mdm-2 aportarían datos para la comprensión de la regulación de leptina bajo esta condición de estrés celular.

En último lugar evaluamos la expresión de los intermediarios proapoptóticos Bax y Bid. En células control no irradiadas, el tratamiento con leptina no modificó sus expresiones. En cambio, en células irradiadas la expresión de ambos intermediarios aumentó con respecto a las células control y el tratamiento con leptina impidió dicho aumento. Wu y colaboradores han reportado que durante el proceso de apoptosis desencadenado por radiación UV puede inhibirse la activación de Bid y de todas formas Bax se transloca a la membrana mitocondrial promoviendo la liberación del citocromo c (Wu et al. 2007). Scoltock y colaboradores encontraron que la inhibición de la activación de Bid en células Jurkat no genera una fuerte protección contra la radiación UV (Scoltock y Cidlowski 2004). Nuestros resultados muestran que en células trofoblásticas la activación de Bid aumenta con la radiación UV y que leptina posee un efecto protector, aportando evidencias no sólo para dilucidar la acción antiapoptótica de leptina sino también la respuesta de las células trofoblásticas al daño por radiación UV.

Someter las células trofoblásticas a radiación ultravioleta nos permitió profundizar nuestro estudio sobre la capacidad de leptina de regular la expresión de p53. En este contexto, nuestros hallazgos son complementarios a los resultados

obtenidos por Katiyar y colaboradores, quienes reportaron que ratones deficientes para leptina sometidos a radiación UVB son más susceptibles a la radiación, sugiriendo que leptina tiene una función protectora frente a la radiación (Katiyar y Meeran 2007).

Leptina preserva a las células trofoblásticas frente a temperaturas elevadas

Edwards planteó al estado de hipertermia materno como posible teratógeno en humanos (Graham Jr 2005). Los episodios de hipertermia pueden ser comunes durante el embarazo y el daño que pueden provocar en el feto es dependiente de la temperatura alcanzada, la duración y el estado de desarrollo del embrión (Andersen et al. 2002, Edwards 2006). La muerte celular, la alteración vascular y el infarto placentario son posibles consecuencias de la hipertermia que pueden desencadenar retraso del crecimiento, malformaciones o hasta la muerte del feto (Edwards et al. 2003). A su vez, estudios realizados en blastocitos de ratón demostraron que el estrés por calor disminuye el número de células del trofoectodermo y afecta la diferenciación trofoblástica (Choi et al. 2015). En bovinos se encontró que el estrés por calor durante la gestación compromete el desarrollo de la placenta, lo que puede resultar en una disminución del aporte de oxígeno hacia el feto, desnutrición y por consiguiente retardo del crecimiento, pudiendo también prolongarse el efecto en el desarrollo postnatal (Tao y Dahl 2013).

En este contexto nos resultó atractivo estudiar los efectos del aumento de la temperatura sobre la apoptosis de células trofoblásticas y evaluar si leptina posee un efecto protector frente a este tipo de injuria. Para ello examinamos el efecto de temperaturas mayores a la fisiológica que nos permitieran imitar un estado de hipertermia materna. En primer lugar, comprobamos que las temperaturas elegidas desencadenan apoptosis en células placentarias, encontrando que el aumento de la temperatura genera un incremento en la activación de caspasa-3 que se revierte en presencia de leptina.

Una vez comprobado que las temperaturas elegidas eran capaces de desencadenar apoptosis en los explantos placentarios, continuamos evaluando la expresión de p53 y su fosforilación en serina 46. Elevar la temperatura de cultivo no generó cambios en la expresión de p53, sin embargo produjo un marcado aumento en los niveles de su fosforilación, siendo leptina capaz de inhibir dicho efecto. En último lugar evaluamos la expresión de Bcl-2 y Bax y encontramos que el incremento de la temperatura genera una disminución en la relación Bcl-2/Bax, coherente con un aumento en la apoptosis. En este caso, leptina incrementó dicha relación disminuyendo entonces la susceptibilidad de las células a la muerte celular. Los resultados obtenidos nos indicarían que la hipertermia no modifica la expresión de p53, pero si es capaz de aumentar su actividad ya que advertimos un aumento en su fosforilación en serina 46. Hallamos entonces que leptina regula negativamente la actividad de p53 en condiciones de estrés por calor, coincidente con lo descrito para el estrés generado por falta de suero o radiación UV en las secciones anteriores.

En base a nuestros resultados y para poder analizar el rol de la leptina endógena nos interesó saber si existían reportes que relacionaran un aumento en la temperatura con cambios en la expresión de leptina. Estudios en bovinos demostraron que los niveles de leptina sérica no se modifican en respuesta al estrés por calor (Min et al. 2015), sin embargo en ratones se encontró que la hipertermia aumenta tanto la secreción de leptina, como la expresión de su receptor en tejido adiposo, en músculo y en hígado (Morera et al. 2012). No hay trabajos que hayan investigado si el estrés por calor modifica los niveles de leptina placentaria y es por esta razón que creemos que sería muy interesante en un futuro evaluar si la hipertermia modifica su expresión y/o a la de sus receptores en placenta humana. La bibliografía tampoco ofrece información que relacione el estrés por calor con la generación de apoptosis en células placentarias, pero si hay disponible información sobre otros modelos de estudio. Por ejemplo en células HUVEC se ha evidenciado que el aumento de la temperatura genera un aumento en la fragmentación del ADN, activa a las caspasas-9 y -3 y a PARP-1, aumenta la expresión de Bcl-xl y la liberación de citocromo c (Gu et al. 2014, Li et al. 2014).

Por otra parte vuelve a resultar interesante para nuestro análisis uno de los reportes de Sirotkin, quien sometió a estrés por calor a células de la granulosa y evaluó el efecto de distintas hormonas, entre ellas la leptina. Sin embargo, Sirotkin encontró que la temperatura elevada genera una disminución tanto en la apoptosis como en la proliferación celular, encontrando que a 41,5°C disminuye la expresión de caspasa-3 y no se modifica la expresión de Bax, mientras que el tratamiento con leptina aumenta la expresión de ambas proteínas (Sirotkin 2010). Los mencionados son resultados opuestos a los que evidenciamos en este trabajo y creemos que seguramente sea debido a un efecto relacionado con la función ovárica en particular. En este sentido, consideramos que nuestro trabajo representa un valioso antecedente para ahondar el estudio del estrés térmico en células placentarias, su relación con la apoptosis y el rol de leptina, cuyo estudio puede ser de gran utilidad para avanzar en el conocimiento de posibles situaciones perjudiciales durante la gestación.

Leptina disminuye la apoptosis generada en condiciones de acidosis

La acidosis implica una concentración alta del ion hidrógeno en los tejidos y la acidemia, definida como la concentración de iones hidrógeno en la sangre, es un buen indicador de acidosis tisular. En adultos la acidemia se define con un pH sanguíneo menor a 7,36, no obstante durante el trabajo de parto el feto puede llegar a experimentar valores de pH de hasta 7. Durante la gestación la acidosis puede originarse por causas maternas, placentarias o fetales (Bobrow y Soothill 1999). En el embarazo es esencial que la placenta mantenga el equilibrio ácido-base en un rango acotado de pH para así poder minimizar los efectos adversos sobre el crecimiento y el desarrollo fetal. Esto se logra mediante la eliminación de ácidos producto del metabolismo del feto y la placenta a través de la circulación materna (Ali et al. 2014). En este contexto decidimos estudiar la acción de leptina en la muerte de células placentarias generada por una posible disminución del pH tanto tisular como

sanguíneo. Para dicho fin utilizamos como estrategia la disminución del pH del medio de cultivo a 6,8 de manera de simular una condición de acidemia.

Del mismo modo que para los modelos anteriores comenzamos estudiando los marcadores de apoptosis tardíos y encontramos que a pH 6,8 aumenta tanto la activación de caspasa-3 como el clivado de PARP-1, lo que nos indica que dicho pH induciría la muerte celular. Nuestros resultados demuestran que el agregado de leptina exógena disminuye la activación de caspasa-3 así como también la aparición del fragmento clivado de PARP-1.

Una vez que comprobamos que la condición de acidosis utilizada era capaz de inducir apoptosis, nos centramos en el estudio de p53. Encontramos que la disminución del pH trae aparejado un aumento tanto en la expresión como en la fosforilación de p53 en serina 46 y que leptina es capaz de revertir dicho efecto. Además hallamos que a pH 6,8 se incrementa la expresión de Mdm-2 y en dicha condición leptina genera un aumento aún mayor en su expresión.

Al analizar intermediarios característicos de la vía intrínseca, encontramos que la disminución del pH no altera la expresión de Bax ni la de Bcl-2 y leptina independientemente del pH disminuye la expresión de Bax generando así un aumento de la relación Bcl-2/Bax. Por otra parte, la activación de Bid aumentó como consecuencia de la disminución del pH y leptina revirtió dicho efecto. Los resultados mencionados nos permiten corroborar el efecto antiapoptótico propuesto para leptina.

Se ha demostrado que la PE severa puede predisponer al feto a una hipoxia aguda, que habitualmente precede a la acidosis, resultando en condiciones desfavorables para el correcto desarrollo del feto (Yang y Wang 1995). A su vez los niveles de leptina están desregulados en mujeres con PE (Michael et al. 2004, Grisaru-Granovsky et al. 2008). Podría sugerirse entonces que el aumento de la expresión de leptina placentaria en PE puede ser un mecanismo compensador, capaz de resguardar a las células trofoblásticas de condiciones adversas. Haber encontrado que leptina es capaz de proteger de la injuria producida por la alteración del pH del medio extracelular es una nueva evidencia a favor de su relevancia en la fisiología placentaria.

El uso de modelos sencillos nos permitió ahondar en el estudio de la acción antiapoptótica de leptina y trasladar su acción a nuevos escenarios que son de gran utilidad para estudiar el alcance de leptina como una citoquina placentaria capaz de preservar a las células placentarias frente a condiciones de estrés.

Leptina promueve la migración e invasión de células placentarias

El éxito del embarazo depende del desarrollo de la circulación materno-fetal que se logra gracias a la invasión de las células trofoblásticas en el endometrio materno. La invasión adecuada del trofoblasto es de suma importancia para la salud materna y para el desarrollo y crecimiento del feto, se inicia inmediatamente después de la implantación e involucra una serie de eventos moleculares bien controlados que, sin embargo, no se comprenden en su totalidad (Zhu et al. 2012, Knöfler y Pollheimer 2013). Como se mencionó anteriormente, leptina posee diversas funciones reproductivas entre las que se encuentran la regulación del transporte de nutrientes y la angiogénesis de la placenta, la mitogénesis de los trofoblastos y la inmunomodulación, eventos cruciales para el correcto desarrollo del feto y la placenta (Tessier et al. 2013).

Los procesos de migración e invasión trofoblásticos son críticos durante la implantación y placentación. Las células trofoblásticas y los tumores malignos utilizan los mismos mediadores para facilitar la invasión y es por esta razón que los trofoblastos han sido denominados como células “pseudomalignas”. Sin embargo, a pesar de poder compartir mediadores, la regulación del proceso de invasión en estos dos modelos es bien distinta: la invasión trofoblástica está finamente regulada temporal y espacialmente y no se produce más allá del miometrio, mientras que la invasión tumoral es descontrolada y no respeta los límites del tejido (Zhu et al. 2012). Abundantes trabajos de investigación han situado a la leptina como una hormona capaz de promover la migración e invasión de células tumorales (Horiguchi et al. 2006, Stefanou et al. 2010, Yan et al. 2012, Yoon et al. 2014, Fan et al. 2015, Kato et al. 2015). De manera similar se ha investigado la relación entre la leptina y el proceso de invasión trofoblástica durante la placentación (Castellucci et al. 2000, Liu et al. 2009,

Wang et al. 2014, Jo et al. 2015), encontrando que en este modelo leptina favorece la invasión. Consideramos importante ahondar en el estudio de los mecanismos que subyacen a esta acción de la leptina aprovechando que contamos con una línea trofoblástica de primer trimestre que representa un modelo valioso para el estudio de los procesos implicados en los primeros estadios de la gestación, en la cual no hay estudios sobre la acción de leptina. En este contexto nos planteamos como objetivo examinar el efecto de leptina sobre los procesos de migración e invasión trofoblástica en células Swan-71 y avanzar en el estudio de los mecanismos moleculares implicados en dicha acción.

Para comenzar evaluamos el efecto del tratamiento con leptina sobre la capacidad de migración celular. Mediante la realización de ensayos de cierre de herida encontramos que 100 ng/ml de leptina son capaces de promover la migración. Luego, mediante el uso de inhibidores farmacológicos, evaluamos la participación de las vías de PI3K/Akt y MAPK (ERK1/2). Hallamos que la inhibición de la vía de señalización de PI3K disminuye el porcentaje de cierre de la herida, coherente con la ya establecida participación de esta vía en la migración celular (Manning y Cantley 2007). El agregado de leptina exógena incrementó el porcentaje de migración, aún en presencia del inhibidor farmacológico de la vía de PI3K, lo que sugiere que la vía de PI3K no estaría involucrada. La inhibición de la vía de MAPK no modificó la capacidad de migración de las células control pero sí impidió la acción de leptina, indicando que la señalización por MEK/ERK 1/2 estaría involucrada en la regulación de la migración por leptina. Trabajos previos demostraron que ERK no se expresa en sinciotrofoblasto, pero sí en citotrofoblastos donde puede activarse entre las semanas 1 y 12 de gestación. Sin embargo, en los CTBev se detecta ERK y su forma activa durante toda la gestación, sugiriendo la activación de MAPK como un intermediario de la invasión trofoblástica (Fitzgerald et al. 2005). Nuestro hallazgo indica que leptina favorece la migración de células Swan-71 a través de la vía de ERK 1/2, sumando una nueva evidencia para proponer a la activación de esta vía como mediadora de la invasión trofoblástica.

También decidimos investigar si leptina es capaz de regular la capacidad de invasión. Realizamos ensayos en cámaras *transwell* con matrigel y encontramos que el agregado de 100 ng/ml de leptina generó un marcado incremento del número de

células capaces de invadir. Distintos grupos reportaron que 500 ng/ml de leptina durante 48 horas promueven la migración e invasión de células BeWo (Liu et al. 2009, Jo et al. 2015) y además Wang y colaboradores reportaron que leptina promueve la invasión de células HTR8 de manera dosis dependiente, obteniendo la máxima respuesta con 100 ng/ml de leptina a las 36 horas de tratamiento (Wang et al. 2014). En una de sus revisiones, Herrid discute la importancia de la elección de la concentración de leptina ya que en muchos trabajos se utilizan dosis supra fisiológicas que pueden generar resultados contradictorios que dificultan la determinación del rol de leptina en procesos biológicos (Herrid et al. 2014). En el trabajo citado llegan a evaluar el efecto de 500 ng/ml de leptina y obtienen a dicha dosis un efecto máximo. Sin embargo, Wang y colaboradores evaluaron el efecto de 100 ng/ml de leptina, la misma dosis utilizada en nuestro trabajo. Si bien se desconoce la concentración de leptina a la que están sometidos los trofoblastos durante la gestación, decidimos utilizar la menor dosis efectiva de leptina.

En la diferenciación de CTB a CTBev los trofoblastos experimentan un cambio de fenotipo, perdiendo sus características proliferativas para aumentar su capacidad invasiva. Estos cambios se relacionan con un aumento en la producción de citoquinas, proteasas y moléculas de adhesión que permiten al CTBev migrar e invadir el útero materno (Wallace et al. 2012). Las metaloproteasas y sus reguladores controlan muchos aspectos de la función reproductiva, incluyendo el desarrollo folicular, la ovulación, la menstruación, la implantación y el parto. La regulación de la actividad de las metaloproteasas en la interfase materno-fetal es crítica para el éxito de la implantación y la placentación. Las células trofoblásticas producen constitutivamente metaloproteasas y es por esta razón que se las considera invasivas por naturaleza. Está bien caracterizada la expresión de MMP-2 y -9 en CTBev, donde se sabe que aumenta durante las semanas 6 y 8 de gestación, sugiriendo que estas proteínas regulan la invasión trofoblástica (Zhu et al. 2012).

En células Swan-71 se ha reportado la expresión de MMP-2 y -9 (Fraccaroli et al. 2011, Furmento et al. 2014) y debido al papel fundamental de dichas metaloproteasas durante la placentación decidimos investigar si leptina posee algún efecto regulatorio sobre las mismas. Mediante ensayos de *real time* RT-PCR

encontramos que leptina estimula de manera dosis dependiente la expresión de MMP-2 y por medio de zimografías hallamos que leptina también incrementa su actividad. Evaluamos luego la actividad de MMP-9 y en este caso pudimos detectar tanto a la proteasa activa como a su precursor y en ambos casos parecería observarse una regulación positiva por parte de leptina. Diversos trabajos estudiaron una posible regulación de las metaloproteasas por leptina en células trofoblásticas: en células BeWo leptina disminuye la expresión de TIMP1 sin modificar la actividad de MMP-9 (Jo et al. 2015), en células HTR8 se encontró que leptina aumenta la expresión de MMP-14 (Wang et al. 2014), en células JEG-3 hallaron que IL-1 aumenta la actividad de MMP-2 y -9 y que dicho aumento estaría mediado por leptina (Fontana et al. 2010) y en CTBev leptina aumenta de manera dosis dependiente la secreción de MMP-2 y -9 (Castellucci et al. 2000). Nuestros hallazgos nos permiten comenzar a dilucidar uno de los posibles mecanismos por el cual leptina promueve la invasión de células Swan-71.

En los CTBev se produce un cambio en la expresión de las moléculas de adhesión, posibilitando la invasión y el reemplazo de las células endoteliales de las arterias espirales uterinas. Este cambio de expresión se caracteriza por un aumento de las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$, PE-CAM1, VCAM-1 y una disminución de E-cadherina y conexina-40 (Wallace et al. 2012). La E-cadherina es un mediador clave para la adhesión entre células en tejidos epiteliales y su pérdida se asocia con el debilitamiento de la adhesión entre células, fenómeno que constituye un paso crucial en el proceso de TEM, donde las células adquieren un fenotipo invasivo. Este proceso suele asociarse con células tumorales, aunque también es necesaria durante la embriogénesis, el desarrollo de órganos y para la reparación de heridas (Canel et al. 2013). Más aún, en la placenta, la diferenciación de CTB a CTBev está mediada por una TEM (DaSilva-Arnold et al. 2015).

La modulación de los niveles de E-cadherina es crítica durante el proceso de invasión, por esta razón nos resultó interesante investigar si leptina modula su expresión en células Swan-71. Mediante experimentos de *real time* RT-PCR y *Western blot* encontramos que leptina reduce la expresión de E-cadherina, por lo tanto estaría promoviendo la disminución de la adhesión entre las células y la adquisición de un fenotipo invasivo. En distintas patologías asociadas al embarazo se ha encontrado una

expresión aberrante de E-cadherina en los trofoblastos (Shu et al. 2013, Duzyj et al. 2015), sugiriendo la importancia de la regulación de esta molécula para el correcto desarrollo placentario. En este sentido la correlación que evidenciamos entre leptina y E-cadherina podría ser útil para ayudar con el diagnóstico temprano de patologías asociadas al embarazo. Jo y colaboradores encontraron que leptina disminuye los niveles de ARNm de E-cadherina en células BeWo tratadas con leptina (Jo et al. 2015), hallazgo que respalda nuestros resultados.

Dado que encontramos que leptina disminuye los niveles de E-cadherina y que esta es una proteína fundamental en la TEM nos interesó investigar si los efectos de leptina aportarían a la TEM trofoblástica. Se conoce que la TEM suele ser un proceso irreversible y basándonos en este antecedente decidimos evaluar si el efecto de leptina es reversible. Para ello las células se trataron con leptina durante 24 horas, se cambió el medio y se cultivaron 24 horas más en ausencia de leptina. Al evaluar la expresión de E-cadherina, encontramos que remover la leptina del medio genera el restablecimiento de los niveles de E-cadherina, indicando que el efecto sería reversible. A raíz de estos resultados planteamos que sería muy interesante evaluar si el efecto de leptina sobre la expresión de E-cadherina es también reversible en líneas celulares derivadas de coriocarcinoma o en cultivos primarios de trofoblastos provenientes de placentas patológicas. Encontrar una respuesta a dicho interrogante contribuiría con el avance sobre el conocimiento de las causas de patologías asociadas a un aumento o disminución de la capacidad de invasión de los trofoblastos.

Durante la adquisición del fenotipo invasivo los trofoblastos experimentan un cambio en la expresión de integrinas, donde se observa un incremento en la expresión de $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 4$ y $\alpha v\beta 3$ (Damsky et al. 1994, Wallace et al. 2012), siendo la expresión de Integrina $\beta 1$ uno de los principales inductores de la TEM (Yeh et al. 2012). Quisimos entonces averiguar si leptina podía también modular la expresión de Integrina $\beta 1$ y hallamos que aumenta su expresión a nivel proteico, sin modificar los niveles de ARNm. Este efecto sugiere que leptina sería capaz de regular la invasividad de células Swan-71 favoreciendo la TEM. Para continuar, analizamos la posible reversión de este efecto y encontramos que el efecto de leptina sobre Integrina $\beta 1$ se revierte en los casos que las células se trataron durante el primer día con las dosis

menores de leptina. Sin embargo, cuando las células se trataron con la dosis máxima de leptina, el efecto perdura indicándonos que la acción generada por 250 ng/ml de leptina es capaz de sostenerse al menos durante 24 horas adicionales. En este sentido sería interesante evaluar si el efecto continúa siendo irreversible si se cultivan las células en ausencia de leptina durante un tiempo más prolongado.

Existen evidencias que indican que la proteólisis de E-cadherina genera fragmentos capaces de promover el crecimiento, la supervivencia y la motilidad celular. La escisión del dominio extracelular de E-cadherina puede ser catalizada por distintas proteasas, incluyendo MMP-3, MMP-7, MMP-9 y MT1-MMP, y genera un fragmento soluble (sE-cad) que actúa como molécula de señalización autocrina y paracrina que favorece la motilidad y la invasión celular (David y Rajasekaran 2012). Basándonos en dicho antecedente investigamos si el aumento de la capacidad de invasión generado por leptina depende de la actividad de MMPs. Para responder a dicho interrogante realizamos experimentos utilizando el inhibidor de metaloproteasas GM6001. Encontramos que la actividad de metaloproteasas solubles mediaría la regulación de E-cadherina por leptina ya que se pierde el efecto de leptina en presencia del inhibidor. Sin embargo el efecto de 50 y 100 ng/ml de leptina sobre Integrina $\beta 1$ no se perdió a pesar de la presencia del inhibidor, indicando que en este caso la actividad de metaloproteasas no estaría involucrada. El tratamiento con 250 ng/ml de leptina aumentó los niveles de Integrina $\beta 1$, sin embargo nuestros resultados indicarían que en este caso el efecto es irreversible y dependiente de metaloproteasas.

Mediante técnicas de biología celular evaluamos la acción de leptina sobre la migración e invasión de células Swan-71, encontrando que leptina favorece ambos procesos. Luego, ahondamos en el estudio de los mecanismos moleculares involucrados y hallamos que leptina es capaz de modular tanto la expresión como actividad de MMPs y alterar el equilibrio de proteínas de membrana plasmática involucradas con la interacción con componentes de la MEC y la adhesión entre células. A su vez, los resultados obtenidos nos ayudan a establecer un posible orden temporal a los eventos desencadenados por leptina. Creemos que en primer lugar leptina podría estar estimulando la expresión y actividad de MMPs que median el efecto de supresión sobre E-cadherina. Paralelamente leptina inhibiría la inducción de

E-cadherina e incrementaría los niveles de Integrina $\beta 1$ de manera independiente a su acción sobre MMPs. De esta manera logramos esclarecer parte de los mecanismos involucrados en la regulación de la invasión trofoblástica por leptina, sin embargo estamos seguros que nuestros resultados representan sólo una aproximación y que todavía restan aclarar muchos mecanismos en los cuales participa la leptina.

CONCLUSIONES

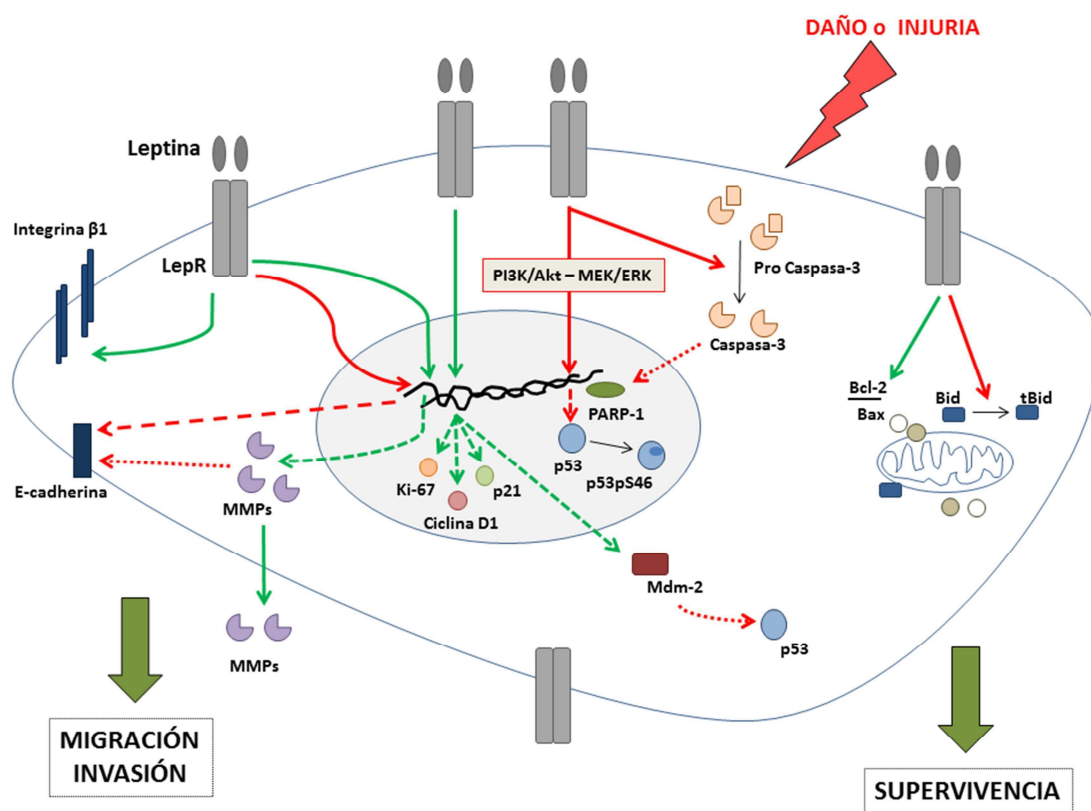
Leptina es una hormona conocida por estar involucrada en la regulación de la ingesta de alimentos y del balance energético del organismo. A su vez, es el factor más estudiado para poder explicar la asociación entre la obesidad y la infertilidad y se ha encontrado que su acción es necesaria para el inicio de la pubertad (Mantzoros et al. 2000). Leptina y la isoforma larga de su receptor se expresan en el endometrio sugiriendo un efecto autocrino y paracrino y, de esta manera, un papel durante la implantación (Kitawaki et al. 2000, Dos Santos et al. 2012). Asimismo, aunque el embrión comienza a producir leptina en el estadio de blastocisto, se ha evidenciado la presencia del ARNm del receptor de leptina en todos los estadios del desarrollo embrionario; reforzando la hipótesis de la participación de leptina en el diálogo embrión-endometrio durante el período preimplantatorio (Cervero et al. 2004). La placenta humana también sintetiza leptina desde las primeras etapas de la gestación, advirtiéndose que leptina no sólo participaría de la regulación del proceso implantacional, sino también sería necesaria para la función placentaria permitiendo así el mantenimiento del desarrollo fetal y del embarazo. En este contexto consideramos que profundizar el estudio del mecanismo de acción de leptina en células placentarias contribuiría a una mejor comprensión del diálogo materno-fetal generado durante la gestación.

Con la finalidad de estudiar los efectos desencadenados por leptina en células placentarias se utilizó la línea celular citotrofoblástica Swan-71, modelo útil para evaluar la acción de leptina sobre los procesos de migración e invasión por ser una línea celular de primer trimestre. A su vez, se utilizaron también explantos de placenta humana a término para estudiar las acciones de leptina sobre la supervivencia, permitiéndonos evaluar su acción en un contexto más fisiológico.

En primer lugar encontramos que leptina estimularía la proliferación de células Swan-71. Evaluamos luego la acción de leptina sobre la supervivencia ante distintas condiciones de injuria y encontramos que en todos los casos leptina se caracterizó por poseer un rol protector de la apoptosis celular involucrando la vía de p53. Estudiamos luego los procesos de migración e invasión celular y encontramos que leptina estimula ambos procesos y a su vez genera un fenotipo de carácter invasivo ya que aumentó la actividad y expresión de metaloproteasas, incrementó los niveles de Integrina $\beta 1$ y

disminuyó la expresión de E-cadherina. Por otro lado, demostramos que muchas de las acciones biológicas de leptina están mediadas por las vías de señalización de MEK/ERK 1/2 o PI3K/Akt.

Globalmente, los resultados obtenidos durante la realización de esta Tesis nos permitieron profundizar el estudio de la acción de leptina en células trofoblásticas y reforzar la hipótesis de la importancia de su participación en procesos claves para el desarrollo de un embarazo exitoso.



Mecanismos involucrados en la acción de leptina en células placentarias

BIBLIOGRAFÍA

Ahima, R. S. (2005). "Central actions of adipocyte hormones." Trends in Endocrinology & Metabolism **16**(7): 307-313.

Ahima, R. S. and J. S. Flier (2000). "Leptin." Annu Rev Physiol **62**: 413-437.

Akira, S. (1999). "Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice." Stem Cells **17**(3): 138-146.

Al-Badri, M. R., M. S. Zantout and S. T. Azar (2015). "The role of adipokines in gestational diabetes mellitus." Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism: 2042018815577039.

Al-Suhaimi, E. (2014). "Molecular mechanisms of leptin and pro-apoptotic signals induced by menadione in HepG2 cells." Saudi journal of biological sciences **21**(6): 582-588.

Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter (2002). Molecular biology of the cell. Garland Science.

Alfer, J., F. Müller-Schöttle, I. Classen-Linke, U. von Rango, L. Happel, K. Beier-Hellwig, W. Rath and H. M. Beier (2000). "The endometrium as a novel target for leptin: differences in fertility and subfertility." Molecular Human Reproduction **6**(7): 595-601.

Ali, T. Y., F. B. Pipkin and R. N. Khan (2014). "The Effect of pH and Ion Channel Modulators on Human Placental Arteries." PloS one **9**(12): e114405.

Almog, B., R. Gold, K. Tajima, A. Dantes, K. Salim, M. Rubinstein, D. Barkan, R. Homburg, J. Lessing and N. Nevo (2001). "Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats." Molecular and cellular endocrinology **183**(1): 179-191.

Allison, M. B. and M. G. Myers (2014). "20 YEARS OF LEPTIN: Connecting leptin signaling to biological function." Journal of Endocrinology **223**(1): T25-T35.

Andersen, A.-M. N., P. Vastrup, J. Wohlfahrt, P. K. Andersen, J. Olsen and M. Melbye (2002). "Fever in pregnancy and risk of fetal death: a cohort study." The Lancet **360**(9345): 1552-1556.

Artwohl, M., M. Roden, T. Hölzenbein, A. Freudenthaler, W. Waldhäusl and S. Baumgartner-Parzer (2002). "SHORT COMMUNICATION Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells." International journal of obesity **26**: 577-580.

Ashworth, C. J., N. Hoggard, L. Thomas, J. G. Mercer, J. M. Wallace and R. G. Lea (2000). "Placental leptin." Rev Reprod **5**(1): 18-24.

Aydin, H. I., A. Eser, I. Kaygusuz, S. Yildirim, T. Celik, S. Gunduz and S. Kalman (2015). "Adipokine, adropin and endothelin-1 levels in intrauterine growth restricted neonates and their mothers." Journal of perinatal medicine.

Bajoria, R., S. R. Sooranna, B. S. Ward and R. Chatterjee (2002). "Prospective function of placental leptin at maternal-fetal interface." Placenta **23**(2-3): 103-115.

Barr, V. A., K. Lane and S. I. Taylor (1999). "Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms." J Biol Chem **274**(30): 21416-21424.

Barrientos, G., A. Toro, P. Moschansky, M. Cohen, M. G. Garcia, M. Rose, B. Maskin, V. Sanchez-Margalet, S. M. Blois and C. L. Varone (2015). "Leptin promotes HLA-G expression on placental trophoblasts via the MEK/Erk and PI3K signaling pathways." Placenta.

Bianchini, F., R. Kaaks and H. Vainio (2002). "Overweight, obesity, and cancer risk." The lancet oncology **3**(9): 565-574.

Bifulco, G., A. Trencia, M. Caruso, G. Tommaselli, C. Miele, C. Di Carlo, F. Beguinot and C. Nappi (2003). "Leptin induces mitogenic effect on human choriocarcinoma cell line (JAR) via MAP kinase activation in a glucose-dependent fashion." Placenta **24**(4): 385-391.

- Bilbao, M. G., M. P. Di Yorio, R. A. Galarza, C. L. Varone and A. G. Faletti (2015). "Regulation of the ovarian oxidative status by leptin during the ovulatory process in rats." Reproduction **149**(4): 357-366.
- Billen, L., A. Shamas-Din and D. Andrews (2008). "Bid: a Bax-like BH3 protein." Oncogene **27**: S93-S104.
- Bischof, P. and A. Campana (1996). "A model for implantation of the human blastocyst and early placentation." Human Reproduction Update **2**(3): 262-270.
- Bischof, P. and A. Campana (2000). "Molecular mediators of implantation." Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **14**(5): 801-814.
- Bischof, P., L. Haenggeli and A. Campana (1995). "Effect of leukemia inhibitory factor on human cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway." American Journal of Reproductive Immunology **34**(4): 225-230.
- Bischof, P., M. Martelli, A. Campana, Y. Itoh, Y. Ogata and H. Nagase (1995). "Importance of matrix metalloproteinases in human trophoblast invasion." Early pregnancy: biology and medicine: The official journal of the Society for the Investigation of Early Pregnancy **1**(4): 263-269.
- Blagosklonny, M. V. and A. B. Pardee (2002). "The restriction point of the cell cycle." Cell cycle **1**(2): 102-109.
- Bobrow, C. S. and P. W. Soothill (1999). "Causes and consequences of fetal acidosis." Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition **80**(3): F246-F249.
- Boelhauve, M., F. Sinowatz, E. Wolf and F. F. Paula-Lopes (2005). "Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts." Biology of reproduction **73**(4): 737-744.
- Bouloumie, A., H. C. Drexler, M. Lafontan and R. Busse (1998). "Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis." Circ Res **83**(10): 1059-1066.

Boute, N., V. Zilberfarb, L. Camoin, S. Bonnafe, Y. Le Marchand-Brustel and T. Issad (2004). "The formation of an intrachain disulfide bond in the leptin protein is necessary for efficient leptin secretion." Biochimie **86**(6): 351-356.

Bowen, J., L. Chamley, M. Mitchell and J. Keelan (2002). "Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women." Placenta **23**(4): 239-256.

Bradford, M. M. (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.

Brady, C. A. and L. D. Attardi (2010). "p53 at a glance." Journal of cell science **123**(15): 2527-2532.

Bremnes, R. M., R. Veve, F. R. Hirsch and W. A. Franklin (2002). "The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis." Lung cancer **36**(2): 115-124.

Brown, J. E. and S. J. Dunmore (2007). "Leptin decreases apoptosis and alters BCL-2: Bax ratio in clonal rodent pancreatic beta-cells." Diabetes/metabolism research and reviews **23**(6): 497-502.

Brown, L., S. Boswell, L. Raj and S. W. Lee (2007). "Transcriptional targets of p53 that regulate cellular proliferation." Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression **17**(1).

Bruno, A., S. Conus, I. Schmid and H.-U. Simon (2005). "Apoptotic pathways are inhibited by leptin receptor activation in neutrophils." The Journal of Immunology **174**(12): 8090-8096.

Burton, G. and A. Watson (1997). "The structure of the human placenta: implications for initiating and defending against virus infections." Reviews in medical virology **7**(4): 219.

Calle, E. E. and R. Kaaks (2004). "Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms." Nature Reviews Cancer **4**(8): 579-591.

Canel, M., A. Serrels, M. C. Frame and V. G. Brunton (2013). "E-cadherin–integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis." Journal of cell science **126**(2): 393-401.

Carlson, B. (2005). "Embriología humana y biología del desarrollo." Embriología Humana y Biología del Desarrollo-84-8174-785-8-76, 83.

Casabiell, X., V. Pineiro, F. Vega, L. F. De La Cruz, C. Dieguez and F. F. Casanueva (2001). "Leptin, reproduction and sex steroids." Pituitary **4**(1-2): 93-99.

Castellucci, M., R. De Matteis, A. Meisser, R. Canello, V. Monsurro, D. Islami, R. Sarzani, D. Marzioni, S. Cinti and P. Bischof (2000). "Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion." Molecular Human Reproduction **6**(10): 951-958.

Castellucci, M., R. De Matteis, A. Meisser, R. Canello, V. Monsurro, D. Islami, R. Sarzani, D. Marzioni, S. Cinti and P. Bischof (2000). "Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion." Mol Hum Reprod **6**(10): 951-958.

Cauzac, M., D. Czuba, J. Girard and S. Hauguel-de Mouzon (2003). "Transduction of leptin growth signals in placental cells is independent of JAK-STAT activation." Placenta **24**(4): 378-384.

Cervar-Zivkovic, M., C. Hu, A. Barton, Y. Sadovsky, G. Desoye, U. Lang and D. Nelson (2007). "Endothelin-1 attenuates apoptosis in cultured trophoblasts from term human placentas." Reproductive Sciences **14**(5): 430-439.

Cervero, A., J. A. Horcajadas, J. Martín, A. Pellicer and C. Simon (2004). "The leptin system during human endometrial receptivity and preimplantation development." J Clin Endocrinol Metab **89**(5): 2442-2451.

Cohen, M., A. Meisser and P. Bischof (2006). "Metalloproteinases and human placental invasiveness." Placenta **27**(8): 783-793.

Considine, R. V. and J. F. Caro (1997). "Leptin and the regulation of body weight." The international journal of biochemistry & cell biology **29**(11): 1255-1272.

Conus, S., A. Bruno and H.-U. Simon (2005). "Leptin is an eosinophil survival factor." Journal of allergy and clinical immunology **116**(6): 1228-1234.

Córdova, A. T. (2008). "Cadherina-Cadherina: mecanismo de adhesión."

Coronato, S., G. Laguens and V. Di Girolamo (2012). "Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral." Med (Buenos Aires) **72**: 495-502.

Cuddihy, A. R. and R. G. Bristow (2004). "The p53 protein family and radiation sensitivity: Yes or no?" Cancer and Metastasis Reviews **23**(3-4): 237-257.

Curtis H, B. N., Schnek A, Flores G., Ed. (2000). Biología.

Challier, J., M. Galtier, T. Bintein, A. Cortez, J. Lepercq and S. Hauguel-de Mouzon (2003). "Placental leptin receptor isoforms in normal and pathological pregnancies." Placenta **24**(1): 92-99.

Chardonens, D., P. Cameo, M. L. Aubert, F. P. Pralong, D. Islami, A. Campana, R. C. Gaillard and P. Bischof (1999). "Modulation of human cytotrophoblastic leptin secretion by interleukin-1alpha and 17beta-oestradiol and its effect on HCG secretion." Mol Hum Reprod **5**(11): 1077-1082.

Chen, B., M. S. Longtine, Y. Sadovsky and D. M. Nelson (2010). "Hypoxia downregulates p53 but induces apoptosis and enhances expression of BAD in cultures of human syncytiotrophoblasts." American Journal of Physiology-Cell Physiology **299**(5): C968-C976.

Chen, C., Y.-C. Chang, C.-L. Liu, K.-J. Chang and C. Guo (2006). "Leptin-induced growth of human ZR-75-1 breast cancer cells is associated with up-regulation of cyclin D1 and c-Myc and down-regulation of tumor suppressor p53 and p21WAF1/CIP1." Breast cancer research and treatment **98**(2): 121-132.

Chen, H., Z. W. Liang, Z. H. Wang, J. P. Zhang, B. Hu, X. B. Xing and W. B. Cai (2015). "Akt Activation and Inhibition of Cytochrome c Release: Mechanistic Insights Into Leptin-Promoted Survival of Type II Alveolar Epithelial Cells." Journal of cellular biochemistry.

Chen, L., Z. Han, H. Zhou, L. Zou and P. Zou (2010). "Inhibition of HLA-G expression via RNAi abolishes resistance of extravillous trophoblast cell line TEV-1 to NK lysis." Placenta **31**(6): 519-527.

Chiu, P., Y. Ngan, U. Khoo and A. Cheung (2001). "Apoptotic activity in gestational trophoblastic disease correlates with clinical outcome: assessment by the caspase-related M30 CytoDeath antibody." Histopathology **38**(3): 243-249.

Choi, I., A. Dasari, N.-H. Kim and K. H. Campbell (2015). "Effects of prolonged exposure of mouse embryos to elevated temperatures on embryonic developmental competence." Reproductive BioMedicine Online.

Choi, J.-H., K.-T. Lee and P. C. Leung (2011). "Estrogen receptor alpha pathway is involved in leptin-induced ovarian cancer cell growth." Carcinogenesis **32**(4): 589-596.

da Silva, S. V., C. Salama, M. Renovato-Martins, E. Helal-Neto, M. Citelli, W. Savino and C. Barja-Fidalgo (2013). "Increased leptin response and inhibition of apoptosis in thymocytes of young rats offspring from protein deprived dams during lactation."

Dai, C. and W. Gu (2010). "p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis." Trends in molecular medicine **16**(11): 528-536.

Damsky, C. H., C. Librach, K.-H. Lim, M. L. Fitzgerald, M. T. McMaster, M. Janatpour, Y. Zhou, S. K. Logan and S. J. Fisher (1994). "Integrin switching regulates normal trophoblast invasion." Development **120**(12): 3657-3666.

Daoud, G., M. Amyot, É. Rassart, A. Masse, L. Simoneau and J. Lafond (2005). "ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta." The Journal of physiology **566**(2): 409-423.

DaSilva-Arnold, S., J. L. James, A. Al-Khan, S. Zamudio and N. P. Illsley (2015). "Differentiation of first trimester cytotrophoblast to extravillous trophoblast involves an epithelial–mesenchymal transition." Placenta **36**(12): 1412-1418.

David, J. M. and A. K. Rajasekaran (2012). "Dishonorable discharge: the oncogenic roles of cleaved E-cadherin fragments." Cancer research **72**(12): 2917-2923.

Davis, R. (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. Biochemical Society symposium.

Dehay, C. and H. Kennedy (2007). "Cell-cycle control and cortical development." Nature Reviews Neuroscience **8**(6): 438-450.

del Mónaco, S. M., G. Marino, Y. Assef and B. A. Kotsias (2008). "Preeclampsia, migración celular y canales iónicos." Medicina (Buenos Aires) **68**(5): 405-410.

Dey, S. (2006). "Implantation." Knobil and Neill's Physiology of Reproduction-Elsevier **3rd edition**.

Dey, S., H. Lim, S. K. Das, J. Reese, B. Paria, T. Daikoku and H. Wang (2004). "Molecular cues to implantation." Endocrine reviews **25**(3): 341-373.

Di Yorio, M. P., M. G. Bilbao, A. M. Biagini-Majorel and A. G. Faletti (2013). "Ovarian signalling pathways regulated by leptin during the ovulatory process." Reproduction **146**(6): 647-658.

Donato Jr, J., R. Frazão and C. F. Elias (2010). "The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin." Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia **54**(7): 591-602.

Dong, Y. B., H. L. Yang, M. J. Elliott and K. M. McMasters (2003). "Increased mdm-2 expression in a p53-independent manner blocks UV-induced cell cycle arrest and apoptosis in human osteosarcoma cells." Tumor biology **24**(3): 130-139.

Dos Santos, E., F. Duval, F. Vialard and M.-N. Dieudonné (2015). "The roles of leptin and adiponectin at the fetal-maternal interface in humans." Hormone molecular biology and clinical investigation.

Dos Santos, E., V. Serazin, C. Morvan, A. Torre, R. Wainer, P. de Mazancourt and M.-N. Dieudonné (2012). "Adiponectin and leptin systems in human endometrium during window of implantation." Fertility and sterility **97**(3): 771-778. e771.

dos Santos, P. B., J. S. Zanetti, A. Ribeiro-Silva and E. I. Beltrão (2012). "Beta 1 integrin predicts survival in breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study." Diagnostic pathology **7**(1): 104.

Duzyj, C., I. A. Buhimschi, H. Motawea, C. Laky, G. Cozzini, G. Zhao, E. F. Funai and C. Buhimschi (2015). "The invasive phenotype of placenta accreta extravillous trophoblasts associates with loss of E-cadherin." Placenta **36**(6): 645-651.

Edwards, M. (1998). "Apoptosis, the heat shock response, hyperthermia, birth defects, disease and cancer. Where are the common links?" Cell stress & chaperones **3**(4): 213.

Edwards, M., R. Saunders and K. Shiota (2003). "Effects of heat on embryos and fetuses." International journal of hyperthermia **19**(3): 295-324.

Edwards, M., D. Walsh and Z. Li (1997). "Hyperthermia, teratogenesis and the heat shock response in mammalian embryos in culture." The International journal of developmental biology **41**(2): 345-358.

Edwards, M. J. (2006). "Review: Hyperthermia and fever during pregnancy." Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology **76**(7): 507-516.

Eischen, C. M. and G. Lozano (2014). "The Mdm network and its regulation of p53 activities: a rheostat of cancer risk." Hum Mutat **35**(6): 728-737.

Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicologic pathology **35**(4): 495-516.

Fan, Y., Y. Gan, Y. Shen, X. Cai, Y. Song, F. Zhao, M. Yao, J. Gu and H. Tu (2015). "Leptin signaling enhances cell invasion and promotes the metastasis of human pancreatic cancer via increasing MMP-13 production." Oncotarget **6**(18): 16120.

Farr, O. M., M. A. Tsoukas and C. S. Mantzoros (2015). "Leptin and the brain: Influences on brain development, cognitive functioning and psychiatric disorders." Metabolism **64**(1): 114-130.

Fenton, J. I., J. A. Lavigne, S. N. Perkins, H. Liu, G. V. Chandramouli, J. H. Shih, N. G. Hord and S. D. Hursting (2008). "Microarray analysis reveals that leptin induces autocrine/paracrine cascades to promote survival and proliferation of colon epithelial cells in an Apc genotype-dependent fashion." Molecular carcinogenesis **47**(1): 9-21.

Fernández-Riejos, P., R. Goberna and V. Sánchez-Margalet (2008). "Leptin promotes cell survival and activates Jurkat T lymphocytes by stimulation of mitogen-activated protein kinase." Clinical & Experimental Immunology **151**(3): 505-518.

Ferretti, C., L. Bruni, V. Dangles-Marie, A. Pecking and D. Bellet (2007). "Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts." Human reproduction update **13**(2): 121-141.

Filicori, M., A. T. Fazleabas, I. Huhtaniemi, P. Licht, V. Rao Ch, J. Tesarik and M. Zygmut (2005). "Novel concepts of human chorionic gonadotropin: reproductive system interactions and potential in the management of infertility." Fertil Steril **84**(2): 275-284.

Fitzgerald, J., S. Busch, T. Wengenmayer, K. Foerster, T. de la Motte, T. Poehlmann and U. Markert (2005). "Signal transduction in trophoblast invasion."

Fontana, V. A., M. Sanchez, E. Cebal and J. C. Calvo (2010). "Interleukin-1 β regulates metalloproteinase activity and leptin secretion in a cytotrophoblast model." Biocell **34**(1): 37-43.

Forbes, K. and M. Westwood (2010). "Maternal growth factor regulation of human placental development and fetal growth." Journal of Endocrinology **207**(1): 1-16.

Fowden, A., A. Forhead, P. Coan and G. Burton (2008). "The placenta and intrauterine programming." Journal of neuroendocrinology **20**(4): 439-450.

Fraccaroli, L., E. Grasso, E. Zeitler, E. Lombardi, S. Gogorza, J. J. Etchepareborda, C. Nagle, M. Cortelezzi, C. P. Leirós and R. Ramhorst (2011). "Modulation of maternal LIF

producers T cells by trophoblast and paternal antigens." American Journal of Reproductive Immunology **65**(2): 133-145.

Fragoso, L. R., E. H. Baltasar and J. A. R. Esparza (2004). "El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer." Biotecnología aplicada **21**(2): 60-69.

Fruhbeck, G. (2006). "Intracellular signalling pathways activated by leptin." Biochem J **393**(Pt 1): 7-20.

Frühbeck, G., S. Jebb and A. Prentice (1998). "Leptin: physiology and pathophysiology." Clinical physiology **18**(5): 399-419.

Furmento, V., J. Marino, V. Blank and L. Roguin (2014). "The granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) upregulates metalloproteinase-2 and VEGF through PI3K/Akt and Erk1/2 activation in human trophoblast Swan 71 cells." Placenta **35**(11): 937-946.

Gainsford, T., T. A. Willson, D. Metcalf, E. Handman, C. McFarlane, A. Ng, N. A. Nicola, W. S. Alexander and D. J. Hilton (1996). "Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14564-14568.

Gambino, Y. P., J. L. Maymo, A. Perez-Perez, J. L. Duenas, V. Sanchez-Margalet, J. C. Calvo and C. L. Varone (2010). "17Beta-Estradiol Enhances Leptin Expression in Human Placental Cells Through Genomic and Nongenomic Actions." Biol Reprod.

Gambino, Y. P., A. Perez Perez, J. L. Duenas, J. C. Calvo, V. Sanchez-Margalet and C. L. Varone (2012). "Regulation of leptin expression by 17beta-estradiol in human placental cells involves membrane associated estrogen receptor alpha." Biochim Biophys Acta **1823**(4): 900-910.

Genbacev, O. and R. Miller (2000). "Post-implantation differentiation and proliferation of cytotrophoblast cells: in vitro models—a review." Placenta **21**: S45-S49.

Gewies, A. (2003). "Introduction to apoptosis." ApoReview **1002**: 1-6.

Goldenberg, D., J. L. Santos, M. I. Hodgson and V. A. Cortés (2014). "Nuevas proyecciones fisiológicas, patológicas y terapéuticas de la leptina." Revista médica de Chile **142**(6): 738-747.

Goldman-Wohl, D. and S. Yagel (2002). "Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia." Molecular and cellular endocrinology **187**(1): 233-238.

Gonzalez, R. R., P. Caballero-Campo, M. Jasper, A. Mercader, L. Devoto, A. Pellicer and C. Simon (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**(12): 4883-4888.

Graham Jr, J. M. (2005). "Marshall J. Edwards: discoverer of maternal hyperthermia as a human teratogen." Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology **73**(11): 857-864.

Grisaru-Granovsky, S., A. Samueloff and D. Elstein (2008). "The role of leptin in fetal growth: a short review from conception to delivery." European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology **136**(2): 146-150.

Gu, Z., H. Wang, L. Li, Y. Liu, X. Deng, S. Huo, F. Yuan, Z. Liu, H. Tong and L. Su (2014). "Heat stress induces apoptosis through transcription-independent p53-mediated mitochondrial pathways in human umbilical vein endothelial cell." Scientific reports **4**.

Gude, N. M., C. T. Roberts, B. Kalionis and R. G. King (2004). "Growth and function of the normal human placenta." Thrombosis research **114**(5): 397-407.

Guyton, A. C., J. E. Hall and A. C. Guyton (2006). Tratado de fisiología médica, Elsevier Brasil.

Habib, C. N., A. M. Al-Abd, M. F. Tolba, A. E. Khalifa, A. Khedr, H. A. Mosli and A. B. Abdel-Naim (2015). "Leptin influences estrogen metabolism and accelerates prostate cell proliferation." Life sciences **121**: 10-15.

Harper, J. W., S. J. Elledge, K. Keyomarsi, B. Dynlacht, L.-H. Tsai, P. Zhang, S. Dobrowolski, C. Bai, L. Connell-Crowley and E. Swindell (1995). "Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21." Molecular biology of the cell **6**(4): 387-400.

Heazell, A. E. and I. P. Crocker (2008). "Live and let die - regulation of villous trophoblast apoptosis in normal and abnormal pregnancies." Placenta **29**(9): 772-783.

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

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

Hegyi, K., K. Fulop, K. Kovacs, S. Toth and A. Falus (2004). "Leptin-induced signal transduction pathways." Cell Biol Int **28**(3): 159-169.

Henson, M. C. and V. D. Castracane (2000). "Leptin in pregnancy." Biol Reprod **63**(5): 1219-1228.

Henson, M. C. and V. D. Castracane (2006). "Leptin in pregnancy: an update." Biol Reprod **74**(2): 218-229.

Herrid, M., S. Palanisamy, U. A. Ciller, R. Fan, P. Moens, N. A. Smart and J. R. McFarlane (2014). "An updated view of leptin on implantation and pregnancy: a review." Physiol Res **63**: 543-557.

Hofmann, G., R. T. Scott JR, P. A. Bergh and L. A. Deligdisch (1991). "Immunohistochemical Localization of Epidermal Growth Factor in Human Endometrium, Decidua, and Placenta*." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **73**(4): 882-887.

Hoggard, N., P. Haggarty, L. Thomas and R. G. Lea (2001). "Leptin expression in placental and fetal tissues: does leptin have a functional role?" Biochem Soc Trans **29**(Pt 2): 57-63.

Holness, M. J., M. J. Munns and M. C. Sugden (1999). "Current concepts concerning the role of leptin in reproductive function." Mol Cell Endocrinol **157**(1-2): 11-20.

Horiguchi, A., M. Sumitomo, J. Asakuma, T. Asano, R. Zheng, T. Asano, D. M. Nanus and M. Hayakawa (2006). "Increased serum leptin levels and over expression of leptin receptors are associated with the invasion and progression of renal cell carcinoma." The Journal of urology **176**(4): 1631-1635.

Houseknecht, K. L., C. A. Baile, R. L. Matteri and M. E. Spurlock (1998). "The biology of leptin: a review." J Anim Sci **76**(5): 1405-1420.

Huppertz, B. (2004). "Apoptosis in the trophoblast—role of apoptosis in placental morphogenesis." Journal of the Society for Gynecologic Investigation **11**(6): 353-362.

Huppertz, B., M. Kadyrov and J. C. Kingdom (2006). "Apoptosis and its role in the trophoblast." American journal of obstetrics and gynecology **195**(1): 29-39.

Hutter, H., A. Hammer, G. Dohr and J. S. Hunt (1998). "HLA expression at the maternal-fetal interface." Journal of Immunology Research **6**(3-4): 197-204.

Imagawa, K., Y. Numata, G. Katsuura, I. Sakaguchi, A. Morita, S. Kikuoka, Y. Matumoto, T. Tsuji, M. Tamaki and K. Sasakura (1998). "Structure-function studies of human leptin." Journal of Biological Chemistry **273**(52): 35245-35249.

Isaka, K., S. Usuda, H. Ito, Y. Sagawa, H. Nakamura, H. Nishi, Y. Suzuki, Y. Li and M. Takayama (2003). "Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts." Placenta **24**(1): 53-64.

Islami, D., P. Bischof and D. Chardonens (2003). "Possible interactions between leptin, gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-I and II) and human chorionic gonadotrophin (hCG)." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **110**(2): 169-175.

Jabbur, J. R., P. Huang and W. Zhang (2000). "DNA damage-induced phosphorylation of p53 at serine 20 correlates with p21 and Mdm-2 induction in vivo." Oncogene **19**(54): 6203-6208.

Jabbur, J. R., P. Huang and W. Zhang (2001). "Enhancement of the antiproliferative function of p53 by phosphorylation at serine 20: an inference from site-directed mutagenesis studies." International journal of molecular medicine **7**(2): 163-168.

Jaitovich, A. and G. Jaim Etcheverry (2004). "Moléculas de adhesión: su papel en la fisiopatología cardiovascular." Medicina (Buenos Aires) **64**(5): 455-462.

Jo, Y. S., G. S. R. Lee, S. Y. Nam and S. J. Kim (2015). "Progesterone Inhibits Leptin-Induced Invasiveness of BeWo Cells." International journal of medical sciences **12**(10): 773.

Jones, R. L., J. K. Findlay, P. G. Farnworth, D. M. Robertson, E. Wallace and L. A. Salamonsen (2006). "Activin A and inhibin A differentially regulate human uterine matrix metalloproteinases: potential interactions during decidualization and trophoblast invasion." Endocrinology **147**(2): 724-732.

Joo, J.-K., B.-S. Joo, S.-C. Kim, J.-R. Choi, S.-H. Park and K.-S. Lee (2010). "Role of leptin in improvement of oocyte quality by regulation of ovarian angiogenesis." Animal reproduction science **119**(3): 329-334.

Jordán, J. (2003). "Apoptosis: muerte celular programada." Offarm **22**(6): 100-106.

Kale, A., F. Söylemez and A. Ensari (2001). "Expressions of proliferation markers (Ki-67, proliferating cell nuclear antigen, and silver-staining nucleolar organizer regions) and of p53 tumor protein in gestational trophoblastic disease." American journal of obstetrics and gynecology **184**(4): 567-574.

Katiyar, S. K. and S. M. Meeran (2007). "Obesity increases the risk of UV radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF- κ B signaling." Free Radical Biology and Medicine **42**(2): 299-310.

Kato, J.-y. (1999). "Induction of S phase by G1 regulatory factors." Front Biosci **4**: D787-D792.

Kato, S., L. Abarzua-Catalan, C. Trigo, A. Delpiano, C. Sanhueza, K. García, C. Ibañez, K. Hormazábal, D. Diaz and J. Brañes (2015). "Leptin stimulates migration and invasion

and maintains cancer stem-like properties in ovarian cancer cells: an explanation for poor outcomes in obese women." Oncotarget **6**(25): 21100-21119.

Kaufmann, P., S. Black and B. Huppertz (2003). "Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia." Biology of reproduction **69**(1): 1-7.

Kawamura, K., N. Sato, J. Fukuda, H. Kodama, J. Kumagai, H. Tanikawa, M. Murata and T. Tanaka (2003). "The role of leptin during the development of mouse preimplantation embryos." Mol Cell Endocrinol **202**(1-2): 185-189.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." British journal of cancer **26**(4): 239.

Kishida, Y., M. Hirao, N. Tamai, A. Nampei, T. Fujimoto, T. Nakase, N. Shimizu, H. Yoshikawa and A. Myoui (2005). "Leptin regulates chondrocyte differentiation and matrix maturation during endochondral ossification." Bone **37**(5): 607-621.

Kita, N., J. Mitsushita, S. Ohira, Y. Takagi, T. Ashida, M. Kanai, T. Nikaido and I. Konishi (2003). "Expression and activation of MAP kinases, ERK1/2, in the human villous trophoblasts." Placenta **24**(2): 164-172.

Kitawaki, J., H. Koshiba, H. Ishihara, I. Kusuki, K. Tsukamoto and H. Honjo (2000). "Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **85**(5): 1946-1950.

Klein, S., S. W. Coppack, V. Mohamed-Ali and M. Landt (1996). "Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans." Diabetes **45**(7): 984-987.

Knöfler, M. and J. Pollheimer (2013). "Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling." Front Genet **4**: 190.

Korkmaz, C., M. Sakinci, S. N. Akyol, E. T. Korgun and C. Ozoğul (2013). "Location of proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in human first trimester and term

placenta." Analytical and quantitative cytopathology and histopathology **35**(6): 335-343.

Kyriakakou, M., A. Malamitsi-Puchner, H. Militsi, T. Boutsikou, A. Margeli, D. Hassiakos, C. Kanaka-Gantenbein, I. Papassotiriou and G. Mastorakos (2008). "Leptin and adiponectin concentrations in intrauterine growth restricted and appropriate for gestational age fetuses, neonates, and their mothers." European Journal of Endocrinology **158**(3): 343-348.

Lam, Q. L. K., S. Wang, O. K. H. Ko, P. W. Kincade and L. Lu (2010). "Leptin signaling maintains B-cell homeostasis via induction of Bcl-2 and Cyclin D1." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(31): 13812-13817.

Lammert, A., W. Kiess, A. Bottner, A. Glasow and J. Kratzsch (2001). "Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood." Biochem Biophys Res Commun **283**(4): 982-988.

Landt, M., G. M. Lawson, J. M. Helgeson, V. G. Davila-Roman, J. H. Ladenson, A. S. Jaffe and R. C. Hickner (1997). "Prolonged exercise decreases serum leptin concentrations." Metabolism **46**(10): 1109-1112.

Lang, T., K. Ikejima, M. Yoshikawa, N. Enomoto, K. Iijima, T. Kitamura, Y. Takei and N. Sato (2004). "Leptin facilitates proliferation of hepatic stellate cells through up-regulation of platelet-derived growth factor receptor." Biochem Biophys Res Commun **323**(3): 1091-1095.

Latonen, L. and M. Laiho (2005). "Cellular UV damage responses—functions of tumor suppressor p53." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer **1755**(2): 71-89.

Laughlin, G., A. Morales and S. Yen (1997). "Serum Leptin Levels in Women with Polycystic Ovary Syndrome: The Role of Insulin Resistance/Hyperinsulinemia 1." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **82**(6): 1692-1696.

Leze, E., J. L. Alves-Pereira, S. Colli, F. S. Cavalcante, F. José Sampaio and C. da Fonte Ramos (2012). "Leptin Regulates Proliferation and Apoptosis in Human Prostate." The Scientific World Journal **2012**.

Li, L., H. Tan, Z. Gu, Z. Liu, Y. Geng, Y. Liu, H. Tong, Y. Tang, J. Qiu and L. Su (2014). "Heat Stress Induces Apoptosis through a Ca²⁺-Mediated Mitochondrial Apoptotic Pathway in Human Umbilical Vein Endothelial Cells." PloS one **9**(12): e111083.

Li, R.-H. and L.-Z. Zhuang (1997). "The effects of growth factors on human normal placental cytotrophoblast cell proliferation." Human Reproduction **12**(4): 830-834.

Librach, C. L., Z. Werb, M. L. Fitzgerald, K. Chiu, N. M. Corwin, R. A. Esteves, D. Grobelny, R. Galaray, C. H. Damsky and S. J. Fisher (1991). "92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts." The Journal of cell biology **113**(2): 437-449.

Lin, Q., S. L. Poon, J. Chen, L. Cheng, B. HoYuen and P. Leung (2009). "Leptin interferes with 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling to inhibit steroidogenesis in human granulosa cells." Reprod Biol Endocrinol **7**(115.2009).

Linnemann, K., A. Malek, H. Schneider and C. Fusch (2001). "Physiological and pathological regulation of feto/placento/maternal leptin expression." Biochem Soc Trans **29**(Pt 2): 86-90.

Liu, H., Y. Wu, F. Qiao and X. Gong (2009). "Effect of leptin on cytotrophoblast proliferation and invasion." Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences] **29**: 631-636.

Liu, W., S. Zhu, Y. Chen, X. Wu, W. Ni, Y. Chen and L. Zhao (2012). "[The effects of leptin on apoptosis of airway smooth muscle cells via the PI3K/Akt signaling pathway]." Zhonghua jie he he hu xi za zhi= Zhonghua jiehe he huxi zazhi= Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases **35**(12): 915-918.

Liu, X., W. Gu and X. Li (2013). "HLA-G regulates the invasive properties of JEG-3 choriocarcinoma cells by controlling STAT3 activation." Placenta **34**(11): 1044-1052.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.

Lunghi, L., M. E. Ferretti, S. Medici, C. Biondi and F. Vesce (2007). "Control of human trophoblast function." Reprod Biol Endocrinol **5**(6): b44.

Lyall, F. (2003). "Development of the utero-placental circulation: The role of carbon monoxide and nitric oxide in trophoblast invasion and spiral artery transformation." Microscopy research and technique **60**(4): 402-411.

Llusiá, J. B. (1992). La placenta. Fisiología y patología, Ediciones Díaz De Santos.

Magarinos, M. P., V. Sanchez-Margalet, M. Kotler, J. C. Calvo and C. L. Varone (2007). "Leptin promotes cell proliferation and survival of trophoblastic cells." Biol Reprod **76**(2): 203-210.

Mandruzzato, G., A. Antsaklis, F. Botet, F. A. Chervenak, F. Figueras, A. Grunebaum, B. Puerto, D. Skupski and M. Stanojevic (2008). "Intrauterine restriction (IUGR)." Journal of perinatal medicine **36**(4): 277-281.

Manning, B. D. and L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." Cell **129**(7): 1261-1274.

Mantzoros, C. S., D. W. Cramer, R. F. Liberman and R. L. Barbieri (2000). "Predictive value of serum and follicular fluid leptin concentrations during assisted reproductive cycles in normal women and in women with the polycystic ovarian syndrome." Human Reproduction **15**(3): 539-544.

Margetic, S., C. Gazzola, G. G. Pegg and R. A. Hill (2002). "Leptin: a review of its peripheral actions and interactions." Int J Obes Relat Metab Disord **26**(11): 1407-1433.

Martin-Romero, C., J. Santos-Alvarez, R. Goberna and V. Sanchez-Margalet (2000). "Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes." Cell Immunol **199**(1): 15-24.

Martínez, S. (2009). "Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud." Colombiana de Biotecnología **2**: 152-166.

Maruna, P., R. Gurlich and R. Frasko (2001). "[Leptin--a new acute phase reactant]." Vnitr Lek **47**(7): 478-483.

Masuzaki, H., Y. Ogawa, N. Sagawa, K. Hosoda, T. Matsumoto, H. Mise, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, I. Tanaka, T. Mori and K. Nakao (1997). "Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans." Nat Med **3**(9): 1029-1033.

Maymo, J. L., A. Perez Perez, B. Maskin, J. L. Duenas, J. C. Calvo, V. Sanchez Margalet and C. L. Varone (2012). "The alternative Epac/cAMP pathway and the MAPK pathway mediate hCG induction of leptin in placental cells." PLoS One **7**(10): e46216.

Mayo, L. D., Y. R. Seo, M. W. Jackson, M. L. Smith, J. R. Guzman, C. K. Korgaonkar and D. B. Donner (2005). "Phosphorylation of human p53 at serine 46 determines promoter selection and whether apoptosis is attenuated or amplified." Journal of Biological Chemistry **280**(28): 25953-25959.

McCormick, J., G. S. J. Whitley, P. Le Bouteiller and J. E. Cartwright (2009). "Soluble HLA-G regulates motility and invasion of the trophoblast-derived cell line SGHPL-4." Human reproduction **24**(6): 1339-1345.

McGaffin, K. R., B. Zou, C. F. McTiernan and C. P. O'Donnell (2009). "Leptin attenuates cardiac apoptosis after chronic ischemic injury." Cardiovascular research.

McMaster, M. T., C. L. Librach, Y. Zhou, K.-H. Lim, M. J. Janatpour, R. DeMars, S. Kovats, C. Damsky and S. J. Fisher (1995). "Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts." The Journal of Immunology **154**(8): 3771-3778.

Meißner, U., R. Spranger, M. Lehner, I. Allabauer, W. Rascher and J. Dötsch (2005). "Hypoxia-induced leptin production in human trophoblasts does not protect from apoptosis." European journal of endocrinology **153**(3): 455-461.

Meyer, C., D. Robson, N. Rackovsky, V. Nadkarni and J. Gerich (1997). "Role of the kidney in human leptin metabolism." American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism **273**(5): E903-E907.

Michael, A., Z. Mary, O. Christine and M. Christos (2004). "Increased leptin levels in preeclampsia: associations with BMI, estrogen and SHBG levels." HORMONES-ATHENS-3: 46-52.

Min, L., J.-b. Cheng, B.-l. Shi, H.-j. Yang, N. Zheng and J.-q. Wang (2015). "Effects of heat stress on serum insulin, adipokines, AMP-activated protein kinase, and heat shock signal molecules in dairy cows." Journal of Zhejiang University. Science. B **16**(6): 541.

Mise, H., N. Sagawa, T. Matsumoto, S. Yura, H. Nanno, H. Itoh, T. Mori, H. Masuzaki, K. Hosoda and Y. Ogawa (1998). "Augmented Placental Production of Leptin in Preeclampsia: Possible Involvement of Placental Hypoxia 1." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **83**(9): 3225-3229.

Misztal-Dethloff, B., H. Stepien and J. Komorowski (2004). "Effect of leptin on proliferative activity and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from cultured endothelial cells HECa10 in vitro." Endocr Regul **38**(4): 161-166.

Morales, J., L. Li, F. J. Fattah, Y. Dong, E. A. Bey, M. Patel, J. Gao and D. A. Boothman (2014). "Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases." Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression **24**(1).

Morera, P., L. Basiricò, K. Hosoda and U. Bernabucci (2012). "Chronic heat stress up-regulates leptin and adiponectin secretion and expression and improves leptin, adiponectin and insulin sensitivity in mice." Journal of molecular endocrinology **48**(2): 129-138.

Münzberg, H. and C. D. Morrison (2015). "Structure, production and signaling of leptin." Metabolism **64**(1): 13-23.

Mutter, W. P. and S. A. Karumanchi (2008). "Molecular mechanisms of preeclampsia." Microvascular research **75**(1): 1-8.

Najib, S. and V. Sanchez-Margalet (2002). "Human leptin promotes survival of human circulating blood monocytes prone to apoptosis by activation of p42/44 MAPK pathway." Cell Immunol **220**(2): 143-149.

Nun  ez, G., M. A. Benedict, Y. Hu and N. Inohara (1998). "Caspases: the proteases of the apoptotic pathway." Oncogene **17**: 3237-3245.

N  sken, E., Y. Herrmann, M. Wohlfarth, T. Goecke, S. Appel, H. Schneider, J. D  tsch and K. N  sken (2015). "Strong hypoxia reduces leptin synthesis in purified primary human trophoblasts." Placenta **36**(4): 427-432.

Ogunwobi, O., G. Mutungi and I. L. Beales (2006). "Leptin stimulates proliferation and inhibits apoptosis in Barrett's esophageal adenocarcinoma cells by cyclooxygenase-2-dependent, prostaglandin-E2-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor and c-Jun NH2-terminal kinase activation." Endocrinology **147**(9): 4505-4516.

Olsson, A., C. Manzl, A. Strasser and A. Villunger (2007). "How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression?" Cell Death & Differentiation **14**(9): 1561-1575.

Pacheco, J. (1999). "Inmunolog  a de la implantación." Revista Ginecol Obstet.(Per  ) **45**(1): 14-22.

Park, H.-K. and R. S. Ahima (2014). "Leptin signaling." F1000prime reports **6**.

Perez-Perez, A., Y. Gambino, J. Maymo, R. Goberna, F. Fabiani, C. Varone and V. Sanchez-Margalet (2010). "MAPK and PI3K activities are required for leptin stimulation of protein synthesis in human trophoblastic cells." Biochem Biophys Res Commun **396**(4): 956-960.

Perez-Perez, A., J. Maymo, J. L. Duenas, R. Goberna, J. C. Calvo, C. Varone and V. Sanchez-Margalet (2008). "Leptin prevents apoptosis of trophoblastic cells by activation of MAPK pathway." Arch Biochem Biophys **477**(2): 390-395.

Perez-Perez, A., J. Maymo, Y. Gambino, J. L. Duenas, R. Goberna, C. Varone and V. Sanchez-Margalet (2009). "Leptin stimulates protein synthesis-activating translation machinery in human trophoblastic cells." Biol Reprod **81**(5): 826-832.

Perez-Perez, A., J. Maymo, Y. Gambino, P. Guadix, J. L. Duenas, C. Varone and V. Sanchez-Margalet (2013). "Insulin enhances leptin expression in human trophoblastic cells." Biol Reprod **89**(1): 20.

Perez-Perez, A., F. Sanchez-Jimenez, J. Maymo, J. L. Duenas, C. Varone and V. Sanchez-Margalet (2015). "Role of leptin in female reproduction." Clin Chem Lab Med **53**(1): 15-28.

Perry, M. E., J. Piette, J. A. Zawadzki, D. Harvey and A. J. Levine (1993). "The mdm-2 gene is induced in response to UV light in a p53-dependent manner." Proceedings of the National Academy of Sciences **90**(24): 11623-11627.

Pietras, E. M., M. R. Warr and E. Passequé (2011). "Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells." The Journal of cell biology **195**(5): 709-720.

Pinzón, M. L., L. E. Díaz, B. L. Ortiz, A. Umaña, S. C. de Rodríguez and M. S. de Gómez (2009). "La activación de la vía de señalización pi3k/akt por el factor de crecimiento similar a la insulina tipo ii estimula la expresión del marn de la metaloproteinas 9 en células de coriocarcinoma." Revista Colombiana de Química **38**(3): 341-362.

Prives, C. and P. A. Hall (1999). "The p53 pathway." J Pathol **187**(1): 112-126.

Ptak, A., A. Rak-Mardyła and E. L. Gregoraszczuk (2013). "Cooperation of bisphenol A and leptin in inhibition of caspase-3 expression and activity in OVCAR-3 ovarian cancer cells." Toxicology in Vitro **27**(6): 1937-1943.

Pustišek, N. and M. Šitum (2011). "UV-radiation, apoptosis and skin." Collegium antropologicum **35**(2): 339-341.

Qamar, A., S. Z. Sheikh, A. Masud, M. N. Jhandier, I. B. Inayat, W. Hakim and W. Z. Mehal (2006). "In vitro and in vivo protection of stellate cells from apoptosis by leptin." Digestive diseases and sciences **51**(10): 1697-1705.

Reed, J. C. (2006). "Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities." Cell Death Differ **13**(8): 1378-1386.

Reitman, M. L., S. Bi, B. Marcus-Samuels and O. Gavrilova (2001). "Leptin and its role in pregnancy and fetal development--an overview." Biochem Soc Trans **29**(Pt 2): 68-72.

Reynolds, L. P. and D. A. Redmer (2001). "Angiogenesis in the placenta." Biology of reproduction **64**(4): 1033-1040.

Richter, K. S. (2008). "The importance of growth factors for preimplantation embryo development and in-vitro culture." Current Opinion in Obstetrics and Gynecology **20**(3): 292-304.

Roa, I., C. Smok and R. Prieto (2012). "Placenta: Anatomía e Histología Comparada." International Journal of Morphology **30**(4): 1490-1496.

Rodríguez-Cortés, Y. and H. Mendieta-Zerón (2014). "La placenta como órgano endocrino compartido y su acción en el embarazo normoevolutivo." Medicina e Investigación **2**(1): 28-34.

Rouet-Benzineb, P., T. Aparicio, S. Guilmeau, C. Pouzet, V. Descatoire, M. Buyse and A. Bado (2004). "Leptin counteracts sodium butyrate-induced apoptosis in human colon cancer HT-29 cells via NF- κ B signaling." Journal of Biological Chemistry **279**(16): 16495-16502.

Rumer, K. K., M. D. Post, R. S. Larivee, M. Zink, J. Uyenishi, A. Kramer, D. Teoh, K. Bogart and V. D. Winn (2012). "Siglec-6 is expressed in gestational trophoblastic disease and affects proliferation, apoptosis and invasion." Endocrine-related cancer **19**(6): 827-840.

Salazar, M. M. (2009). "Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud." Revista Colombiana de Biotecnología **11**(2): 152-166.

- Salinas-Sánchez, A., J. Giménez-Bachs, L. Serrano-Oviedo, S. N. Cha and R. Sánchez-Prieto (2012). "Papel de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) en el carcinoma de células renales esporádico." Actas Urológicas Españolas **36**(2): 99-103.
- Salleh, N. and N. Giribabu (2014). "Leukemia Inhibitory Factor: Roles in Embryo Implantation and in Nonhormonal Contraception." The Scientific World Journal **2014**.
- Santos-Alvarez, J., R. Goberna and V. Sanchez-Margalet (1999). "Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes." Cell Immunol **194**(1): 6-11.
- Savage, D. and S. O Rahilly (2002). "Leptin: a novel therapeutic role in lipodystrophy." Journal of Clinical Investigation **109**(10): 1285-1286.
- Saxena, N. K., M. A. Titus, X. Ding, J. Floyd, S. Srinivasan, S. V. Sitaraman and F. A. Anania (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**(13): 1612-1614.
- Scoltock, A. B. and J. A. Cidlowski (2004). "Activation of intrinsic and extrinsic pathways in apoptotic signaling during UV-C-induced death of Jurkat cells: the role of caspase inhibition." Experimental cell research **297**(1): 212-223.
- Serke, H., M. Nowicki, J. Kosacka, T. Schröder, N. Klöting, M. Blüher, S. Kallendrusch and K. Spaniel-Borowski (2012). "Leptin-deficient (ob/ob) mouse ovaries show fatty degeneration, enhanced apoptosis and decreased expression of steroidogenic acute regulatory enzyme." International journal of obesity **36**(8): 1047-1053.
- Shang, W., M. Shu, M. Liu, A. Wang, L. Lv, Y. Zhao, M. Li and L. Yan (2013). "Elevated expressions of p53, CDKN1A, and Bax in placental villi from patients with recurrent spontaneous abortion." Eur Rev Med Pharmacol Sci **17**(24): 3376-3380.
- Sharkey, A., A. King, D. Clark, T. Burrows, P. Jokhi, D. Charnock-Jones, Y. Loke and S. Smith (1999). "Localization of leukemia inhibitory factor and its receptor in human placenta throughout pregnancy." Biology of reproduction **60**(2): 355-364.

Sharp, A. N., A. E. Heazell, D. Baczyk, C. E. Dunk, H. A. Lacey, C. J. Jones, J. E. Perkins, P. N. Baker and I. P. Crocker (2014). "Preeclampsia is associated with alterations in the p53-pathway in villous trophoblast."

Shu, H., H. Chen, B. Yang, Z. Chang, M. Xiong and W. Chen (2013). "Aberrant expression of E-cadherin and integrin β -1 in trophoblasts is associated with malignant gestational trophoblastic diseases." International Journal of Gynecological Cancer **23**(4): 749-754.

Sirotkin, A., A. Benčo, A. Tandlmajerova and D. Vašíček (2012). "Involvement of transcription factor p53 and leptin in control of porcine ovarian granulosa cell functions." Cell proliferation **45**(1): 9-14.

Sirotkin, A. and R. Grossmann (2007). "Leptin directly controls proliferation, apoptosis and secretory activity of cultured chicken ovarian cells." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **148**(2): 422-429.

Sirotkin, A. V. (2010). "Effect of two types of stress (heat shock/high temperature and malnutrition/serum deprivation) on porcine ovarian cell functions and their response to hormones." The Journal of experimental biology **213**(12): 2125-2130.

Smeenk, L., S. J. Van Heeringen, M. Koeppel, B. Gilbert, E. Janssen-Megens, H. G. Stunnenberg and M. Lohrum (2011). "Role of p53 serine 46 in p53 target gene regulation." PloS one **6**(3): e17574.

Sohr, S. and K. Engeland (2011). "The tumor suppressor p53 induces expression of the pregnancy-supporting human chorionic gonadotropin (hCG) CGB7 gene." Cell Cycle **10**(21): 3758-3767.

Solier, C., M. Aguerre-Girr, F. Lenfant, A. Campan, A. Berrebi, V. Rebmann, H. Grosse-Wilde and P. L. Bouteiller (2002). "Secretion of pro-apoptotic intron 4-retaining soluble HLA-G1 by human villous trophoblast." European journal of immunology **32**(12): 3576-3586.

Song, J. J. and Y. J. Lee (2007). "Differential activation of the JNK signal pathway by UV irradiation and glucose deprivation." Cellular signalling **19**(3): 563-572.

Soussi, T. (2000). "The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation." Annals of the New York Academy of Sciences **910**(1): 121-139.

Spicer, L. J. and C. C. Francisco (1997). "The Adipose Obese Gene Product, Leptin: Evidence of a Direct Inhibitory Role in Ovarian Function 1." Endocrinology **138**(8): 3374-3379.

Staun-Ram, E., S. Goldman, D. Gabarin and E. Shalev (2004). "Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and-9) in human trophoblast invasion." Reprod Biol Endocrinol **2**(1): 59.

Staun-Ram, E. and E. Shalev (2005). "Human trophoblast function during the implantation process." Reprod Biol Endocrinol **3**: 56.

Staun-Ram, E. and E. Shalev (2005). "Human trophoblast function during the implantation process." Reproductive Biology and Endocrinology **3**(1): 56.

Stefanou, N., V. Papanikolaou, Y. Furukawa, Y. Nakamura and A. Tsezou (2010). "Leptin as a critical regulator of hepatocellular carcinoma development through modulation of human telomerase reverse transcriptase." BMC cancer **10**(1): 442.

Stewart, C. L., P. Kaspar, L. J. Brunet, H. Bhatt, I. Gadi, F. Köntgen and S. J. Abbondanzo (1992). "Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor." Nature **359**(6390): 76-79.

Straszewski-Chavez, S. L., V. M. Abrahams, A. B. Alvero, P. B. Aldo, Y. Ma, S. Guller, R. Romero and G. Mor (2009). "The isolation and characterization of a novel telomerase immortalized first trimester trophoblast cell line, Swan 71." Placenta **30**(11): 939-948.

Sweeney, G. (2002). "Leptin signalling." Cell Signal **14**(8): 655-663.

Tao, S. and G. Dahl (2013). "Invited review: heat stress effects during late gestation on dry cows and their calves." Journal of dairy science **96**(7): 4079-4093.

Tessier, D., Z. Ferraro and A. Gruslin (2013). "Role of leptin in pregnancy: consequences of maternal obesity." Placenta **34**(3): 205-211.

Tessier, D. R., Z. M. Ferraro and A. Gruslin (2013). "Role of leptin in pregnancy: consequences of maternal obesity." Placenta **34**(3): 205-211.

Thijssen, J. H. (2005). "Progesterone receptors in the human uterus and their possible role in parturition." The Journal of steroid biochemistry and molecular biology **97**(5): 397-400.

Torres, L. E. S. and F. D. Vargas (2012). "Apoptosis: el fenómeno y su determinación." Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias **41**(1).

Tu, H., W. Pan, L. Feucht and A. J. Kastin (2007). "Convergent trafficking pattern of leptin after endocytosis mediated by ObRa–ObRd." Journal of cellular physiology **212**(1): 215-222.

Tuckey, R. C. (2005). "Progesterone synthesis by the human placenta." Placenta **26**(4): 273-281.

Ural, S. H. and J. T. Repke (2008). "Gestational diabetes mellitus." Reviews in Obstetrics and Gynecology **1**(3): 129.

Valle, A., J. Sastre-Serra, J. Oliver and P. Roca (2011). "Chronic leptin treatment sensitizes MCF-7 breast cancer cells to estrogen." Cellular Physiology and Biochemistry **28**(5): 823-832.

Velez, A. and M. Howard (2015). "Tumor-suppressor genes, cell cycle regulatory checkpoints, and the skin." North American Journal of Medical Sciences **7**(5): 176.

Villasmil, E. R., C. B. Pérez and J. S. Bolívar (2014). "Invasión trofoblástica en el embarazo normal (I): Placentación inicial." Avances en Biomedicina **3**(2): 7.

Villasmil, E. R., C. B. Pérez and J. S. Bolívar (2014). "Invasión trofoblástica en el embarazo normal (II): Placentación profunda." Avances en Biomedicina **3**(2): 8.

Vitiello, D. and P. Patrizio (2007). "Implantation and early embryonic development: implications for pregnancy." Semin Perinatol **31**(4): 204-207.

Wade, M., Y. C. Li and G. M. Wahl (2013). "MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy." Nat Rev Cancer **13**(2): 83-96.

Wallace, A. E., R. Fraser and J. E. Cartwright (2012). "Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership." Human reproduction update: dms015.

Wang, H., H. Cheng, Q. Shao, Z. Dong, Q. Xie, L. Zhao, Q. Wang, B. Kong and X. Qu (2014). "Leptin-promoted human extravillous trophoblast invasion is MMP14 dependent and requires the cross talk between Notch1 and PI3K/Akt signaling." Biology of reproduction **90**(4): 78.

Wang, H., H. Cheng, Q. Shao, Z. Dong, Q. Xie, L. Zhao, Q. Wang, B. Kong and X. Qu (2014). "Leptin-promoted human extravillous trophoblast invasion is MMP14 dependent and requires the cross talk between Notch1 and PI3K/Akt signaling." Biol Reprod **90**(4): 78.

Wang, L., X. Hu, W. Zhu, Z. Jiang, Y. Zhou, P. Chen and J. Wang (2014). "Increased leptin by hypoxic-preconditioning promotes autophagy of mesenchymal stem cells and protects them from apoptosis." Science China Life Sciences **57**(2): 171-180.

Warfel, N. A. and W. S. El-Deiry (2013). "p21WAF1 and tumourigenesis: 20 years after." Current opinion in oncology **25**(1): 52-58.

Wauters, M., R. V. Considine and L. F. Van Gaal (2000). "Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator." European journal of endocrinology **143**(3): 293-311.

Wendremaire, M., M. Bardou, C. Peyronel, T. Hadi, P. Sagot, J. J. Morrison and F. Lirussi (2011). "Effects of leptin on lipopolysaccharide-induced myometrial apoptosis in an in vitro human model of chorioamnionitis." American journal of obstetrics and gynecology **205**(4): 363. e361-363. e369.

Wu, Y., D. Xing, W. R. Chen and X. Wang (2007). "Bid is not required for Bax translocation during UV-induced apoptosis." Cellular signalling **19**(12): 2468-2478.

Xiong, Y., J. Zhang, M. Liu, M. An, L. Lei and W. Guo (2014). "Human leptin protein activates the growth of HepG2 cells by inhibiting PERK-mediated ER stress and apoptosis." Molecular medicine reports **10**(3): 1649-1655.

Yamauchi, H., K.-i. Katayama, M. Ueno, X. J. He, T. Mikami, K. Uetsuka, K. Doi and H. Nakayama (2007). "Essential role of p53 in trophoblastic apoptosis induced in the developing rodent placenta by treatment with a DNA-damaging agent." Apoptosis **12**(10): 1743-1754.

Yan, D., D. Avtanski, N. K. Saxena and D. Sharma (2012). "Leptin-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells requires β -catenin activation via Akt/GSK3-and MTA1/Wnt1 protein-dependent pathways." Journal of Biological Chemistry **287**(11): 8598-8612.

Yan, G., Y. Si, J. Zhang, Z. Deng and H. Xue (2011). "[The role of Leptin on neuron apoptosis in mice with cerebral ischemia/reperfusion injury]." Zhongguo wei zhong bing ji jiu yi xue= Chinese critical care medicine= Zhongguo weizhongbing jijiuyixue **23**(6): 345-348.

Yang, J.-M. and K.-G. Wang (1995). "Relationship between acute fetal distress and maternal-placental-fetal circulations in severe preeclampsia." Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica **74**(6): 419-424.

Yeh, Y.-C., H.-H. Lin and M.-J. Tang (2012). "A tale of two collagen receptors, integrin β 1 and discoidin domain receptor 1, in epithelial cell differentiation." American Journal of Physiology-Cell Physiology **303**(12): C1207-C1217.

Yoon, K.-W., S.-Y. Park, J.-Y. Kim, S.-M. Lee, C. H. Park, S.-B. Cho, W.-S. Lee, Y.-E. Joo, J. H. Lee and H. S. Kim (2014). "Leptin-induced adhesion and invasion in colorectal cancer cell lines." Oncology reports **31**(6): 2493-2498.

Yoon, S. J., K. Y. Cha and K. A. Lee (2005). "Leptin receptors are down-regulated in uterine implantation sites compared to interimplantation sites." Mol Cell Endocrinol **232**(1-2): 27-35.

- Yu, L., Y. Zhao, S. Xu, C. Jin, M. Wang and G. Fu (2014). "Leptin confers protection against TNF- α -induced apoptosis in rat cardiomyocytes." Biochemical and biophysical research communications **455**(1): 126-132.
- Yu, W. H., M. Kimura, A. Walczewska, S. Karanth and S. M. McCann (1997). "Role of leptin in hypothalamic-pituitary function." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(3): 1023-1028.
- Yuan, Y., J. Zhang, L. Cai, C. Ding, X. Wang, H. Chen, X. Wang, J. Yan and J. Lu (2013). "Leptin induces cell proliferation and reduces cell apoptosis by activating c-myc in cervical cancer." Oncology reports **29**(6): 2291-2296.
- Zhang, F., M. B. Basinski, J. M. Beals, S. L. Briggs, L. M. Churgay, D. K. Clawson, R. D. DiMarchi, T. C. Furman, J. E. Hale and H. M. Hsiung (1997). "Crystal structure of the obese protein leptin-E100."
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-432.
- Zhao, Y., H. Yu and W. Hu (2014). "The regulation of MDM2 oncogene and its impact on human cancers." Acta biochimica et biophysica Sinica **46**(3): 180-189.
- Zhou, P. (2004). Determining protein half-lives. Signal Transduction Protocols, Springer: 67-77.
- Zhou, X., H. Li, Y. Chai and Z. Liu (2015). "Leptin Inhibits the Apoptosis of Endometrial Carcinoma Cells Through Activation of the Nuclear Factor κ B-inducing Kinase/I κ B Kinase Pathway." International Journal of Gynecological Cancer **25**(5): 770-778.
- Zhu, J.-Y., Z.-J. Pang and Y.-h. Yu (2012). "Regulation of trophoblast invasion: the role of matrix metalloproteinases." Reviews in obstetrics and gynecology **5**(3-4): e137.
- Zúñiga Cerón, L. F., S. I. Freyre Bernal, C. A. Navia Amézquita and J. S. Saavedra Torres (2008). "Adhesión celular: el ensamblaje de la vía al cáncer." Morfología; Vol. 6, núm. 2 (2014) 2011-9860.