



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

Mecanismos involucrados en la inducción de leptina por estradiol en células placentarias

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

LIC. SCHANTON MALENA

Directora: Dra. Cecilia L. Varone

Consejero de estudio: Dr. Juan Carlos Calvo

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología Molecular Placentaria. Departamento de Química Biológica. IQUIBICEN-CONICET.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires.

MARZO 2018

Fecha de defensa: 21 de marzo 2018

RESUMEN

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES INVOLUCRADOS EN LA INDUCCIÓN DE LEPTINA POR ESTRADIOL EN CÉLULAS DE PLACENTA HUMANA.

La leptina presenta un papel importante en la reproducción, principalmente se ha sugerido que presenta funciones importantes en la placenta durante la gestación, donde se detectó su expresión y la de sus receptores. En mujeres embarazadas el nivel de leptina en suero aumenta en comparación a las no embarazadas, principalmente durante el segundo y tercer trimestre; aún antes de que se incremente el tejido adiposo.

Originalmente la leptina, proteína de 16 kDa codificada por el gen *LEP*, fue descrita como una molécula producida por el tejido adiposo involucrada en la regulación del metabolismo al nivel central.

La leptina placentaria podría tener efectos sobre el crecimiento, la angiogénesis y la inmunomodulación afectando tanto funciones maternas como fetales.

En este trabajo, se analizó el efecto del 17 β -estradiol (E₂) y las vías de señalización y factores de transcripción involucrados, sobre la expresión de la leptina en la placenta humana utilizando dos modelos experimentales, la línea celular BeWo, derivada de coriocarcinoma, y explantos de placentas normales humanas a término.

Al analizar la importancia del factor de transcripción Sp1 sobre la regulación de la expresión de leptina mediada por estradiol, pudimos demostrar que la sobreexpresión de este factor incrementa la expresión de leptina determinada por Western blot. Más aún la sobreexpresión de un vector de expresión para Sp1 incrementa tanto la actividad basal del promotor de leptina como la inducida por E₂. Específicamente aumenta la actividad de la región del promotor de leptina comprendida entre -1951 y -1887pb que contiene al “enhancer” placentario de leptina (PLE). Estos resultados fueron confirmados al utilizar un inhibidor de Sp1, el ácido betulínico. En estos experimentos se pierde el efecto inductor de Sp1 sobre la expresión de leptina placentaria. La acción ejercida por este factor de transcripción sobre la expresión de leptina es dependiente de ER α ya que en las células que expresan un siRNA contra este receptor la sobreexpresión de Sp1 no

tiene efecto alguno sobre la expresión de leptina. Además al utilizar un vector reportero que contiene el sitio *halfERE* mutado, la acción de Sp1 parecería anularse. Por otro lado al utilizar un vector que presenta el promotor de leptina con el sitio de unión para Sp1 mutado, la sobreexpresión de ER α no es capaz de inducir la expresión de leptina. Estos resultados sugieren que es necesario que se encuentre intacto el sitio de Sp1 para que se pueda evidenciar el efecto de ER α sobre la expresión de leptina placentaria.

Además se evaluó la posible interacción de ER α y Sp1 por inmunoprecipitación. Se demostró que hay interacción entre ambas proteínas, ya que al inmunoprecipitar ER α , se puede evidenciar la presencia de Sp1 en el inmunoprecipitado, y al inmunoprecipitar Sp1 se puede observar ER α en el inmunoprecipitado. Lo que sugiere que habría un efecto cooperativo entre ambos factores en la inducción de la expresión de la leptina placentaria.

El antagonista estrogénico, ICI 182,780 no generó inhibición alguna sobre el efecto del Sp1 sobre la expresión de leptina placentaria, lo que sugeriría que la inducción de Sp1 sobre la expresión de leptina no estaría siendo afectada por el inhibidor ICI 182,780.

Encontramos también que la expresión basal e inducida por E₂ se ve disminuida con el tratamiento con el inhibidor del factor NF κ B, sulfasalazina, sugiriendo la participación de los dímeros del NF κ B en los efectos regulatorios de dicho esteroide. A través de transfecciones transitorias hemos observado que la sobreexpresión de la subunidad p65 (Rel-A) aumenta la actividad transcripcional basal del promotor de leptina y por otro lado la sobreexpresión de Rel-A en las células BeWo-Sh2, que poseen los niveles de ER α disminuidos por la estrategia de siRNA, produce una marcada disminución de la actividad basal del promotor de leptina, sugiriendo que el efecto de la sobreexpresión de p65 sobre el nivel basal de actividad del reportero sería dependiente de la expresión de ER α ya que al disminuir los niveles de este receptor el efecto de p65 se suprime. Por otro lado la sobreexpresión de p65 no estaría afectando la expresión de leptina mediada por E₂ en presencia o ausencia de ER α .

Se ha evaluado también la presencia y localización de ER α y la subunidad p65 en las células BeWo, por ensayo de inmunofluorescencia y su posible interacción por coinmunoprecipitación. Hemos encontrado que ambas proteínas se encuentran

localizadas en el citoplasma y cuando son sobreexpresadas migran al núcleo. Por otro lado determinamos que en las células BeWo estos dos factores de transcripción estarían interactuando, ya que al inmunoprecipitar ER α , se pudo observar p65 en el inmunoprecipitado. Lo que sugiere que existiría un efecto cooperativo entre el ER α y el NF κ B.

Hemos observado que el incremento de la expresión de leptina por estradiol en células BeWo depende de la integridad de la vía de señalización mediada por PKA, debido a que tratando a las células con inhibidores de ésta vía, H89 y SQ22536 se produce una disminución de su efecto. También observamos que la sobreexpresión de mutantes dominantes negativas para el factor de transcripción CREB anulan el efecto de estradiol sobre la expresión de leptina placentaria. Por otro lado la sobreexpresión de CBP, produce una estimulación del efecto inductor de estradiol, mientras que la sobreexpresión con HDAC, una deacetilasa de histonas, genera el efecto contrario. El tratamiento con tricostatina A (TSA), un inhibidor de la actividad acetiltransferasa, contrarresta el efecto de HDAC-1. Esto indicaría que la regulación de la expresión de leptina por estradiol sería un proceso multifactorial que involucraría la activación de la vía de señalización de PKA y la modificación de la acetilación de histonas.

Los resultados obtenidos contribuyen a mejorar la comprensión de la expresión de leptina en la placenta humana así como las vías de señalización y factores de transcripción que actúan en la acción del E₂ sobre la expresión de la misma.

Palabras claves: Leptina, estradiol, placenta, Sp1, NF κ B, vía de señalización de PKA, acetilación de histonas.

ABSTRACT

TRANSCRIPTION AND SIGNAL TRANSDUCTION FACTORS INVOLVED IN ESTRADIOL INDUCTION OF LEPTIN EXPRESSION IN HUMAN PLACENTAL CELLS

Leptin plays an important role in reproduction, mainly, it has been suggested to have functions in the placenta during gestation, where leptin and leptin receptors expression were detected. In pregnant women the level of serum leptin increases compared to non-pregnant women, mainly during second and third trimesters, even before the adipose tissue is increased.

Originally leptin, a 16,000 MW protein product of the LEP gen, was described as an adipocyte-derived signaling molecule for the central control of metabolism.

Leptin may have effects on growth, angiogenesis and immunomodulation affecting both maternal and fetal functions.

In the present work, we analyzed the mechanism of action of 17 β -estradiol (E₂) on the expression of leptin in the human placenta. In particular the signaling pathways and transcription factors involved were studied using two experimental models, the BeWo cells line, derived from choriocarcinoma, and placental explants from normal human placenta at term.

From an *in silico* analysis of the leptin promoter potential binding sites for transcription factor CREB, NF κ B and Sp1, were determined as well as estrogen responsive elements (ERE and *half*ERE).

When analysing the importance of the transcription factor Sp1 on estradiol mediated leptin expression, we could demonstrate that the overexpression of this factor increases leptin expression determined by Western Blot

Moreover the overexpression of Sp1 increases basal and estradiol induced leptin expression. Specifically, Sp1 activity increases leptin promoter transcription when a construction containing the promoter region between -1951 and -1887 bp containing the placental leptin enhancer was used. These results were confirmed using a Sp1 inhibitor, the butilinic acid. In these experiments the Sp1 inductive effect on leptin expression was lost.

We have determined that the overexpression of Sp1 and ER α has a synergistic effect on leptin expression. We also observed that Sp1 transcription factor inductive effect on leptin expression is abolished in BeWo-Sh2 cells, expressing a siRNA against ER α . Moreover, the ER α inducing effect on leptin expression is lost when a construct containing a mutated Sp1 binding site is used. Suggesting that it is necessary an intact Sp1 site in order to evidence ER α effect on placental leptin expression. On the other side, when using a reporter vector containing a mutated *half ERE* site, Sp1 inductive effect on leptin expression was abolished. These results together indicate that there would be a joint action between the transcription factor Sp1 and ER α that would regulate the expression of placental leptin.

In addition, the possible interaction of ER α and Sp1 was evaluated by immunoprecipitation. It was demonstrated that there is an interaction between both proteins, as in the immunoprecipitate of ER α , Sp1 can be revealed and *viceversa*. These results suggest that there would be a cooperative effect between both factors in inducing the expression of placental leptin.

However, the estrogenic antagonist, ICI 182,780 did not generate any inhibition on Sp1 effect on leptin placental expression, which would suggest that Sp1 effect on leptin induction is ICI 182,780 insensitive.

Studying the influence of the transcription factor NF κ B on leptin expression, we find that basal and induced leptin expression is diminished by sulfasalazine treatment, an inhibitor of the I κ B. These results suggest the participation of NF κ B dimers in the regulatory effects of this steroid.

Through transient transfection analysis we have observed that the overexpression of p65 subunit (Rel-A) increases basal transcriptional activity of leptin promoter. On the other hand the overexpression of p65 subunit in BeWo-Sh2 cells that have diminished ER α levels by siRNA strategy, produces a significant decrease both in basal leptin promoter activity. These results suggest that the effect of p65 overexpression is ER α dependent as it is suppressed when ER α is downregulated.

The overexpression of p65 would not be affecting estradiol leptin induction neither in the presence or the absence of ER α .

The presence and subcellular localization of ER α and p65 subunit have been evaluated in BeWo cells by immunofluorescence assay. Their possible interaction

was assessed by coimmunoprecipitation. We have found that both proteins are located in the cytoplasm and when they are overexpressed, they migrate to the nucleus. On the other hand they probably interact forming a complex as p65 could be revealed in ER α immunoprecipitate. These results suggest that there would be a cooperative effect between ER α and NF κ B.

It was evidenced that estradiol effect on placental leptin expression is dependent on PKA signal transduction pathway integrity. We observed that treatment with the pharmacological inhibitors H89 and SQ22536 diminished estradiol leptin induction. We determined that the overexpression of dominant negative CREB mutants also diminished estradiol effect on placental leptin induction.

On the other hand, the overexpression of CBP produces a stimulation of estradiol inducing effect, whereas the overexpression with HDAC-1, a histone deacetylase, generates the opposite effect. Also the treatment with tricostatin A (TSA), a deacetylase inhibitor, counteracts the effect of HDAC-1. These results indicate that estradiol leptin expression regulation would be a multifactorial process that would involve the activation of the cAMP signaling pathway and possibly the modification of histone acetylation.

The results obtained contribute to increase the understanding of the mechanisms of leptin expression regulation in human placenta as well as the signaling pathway and transcription factors that act on estradiol leptin expression regulation.

Parte de los resultados que se incluyen en la siguiente Tesis fueron publicados en:

- Sp1 transcription factor is a modulator of estradiol leptin induction in placental cells. Malena Schanton; Julieta Maymó; Antonio Pérez-Pérez; Yésica Gambino; Bernardo Maskin; José Luis Dueñas, Víctor Sánchez-Margalet and Cecilia Varone. (2017) Placenta 57: 152-162
- Involvement of leptin in the molecular physiology of the placenta. Malena Schanton; Julieta Maymó; Antonio Pérez-Pérez; Víctor Sánchez-Margalet and Cecilia Varone. (2018) Reproduction Jan;155(1):R1-R12

ABREVIATURAS

AB: ácido betulínico

ADN: ácido desoxirribonucleico

AFI: solución de bloqueo de inmunofluorescencia

ARN: ácido ribonucleico

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

AP-1: proteína activadora 1

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

AZA: agente demetilante 5'-2'dexicitidina

BSA: seroalbúmina bovina

CBP: proteína de unión a CREB

Chip: inmunoprecipitación de la cromatina

CRE: elemento de respuesta a AMPc

CREB: proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc

CRH: hormona liberadora de corticotrofina

COX: cicloxigenasa

DMEM: Dulbecco modified Eagle medium (medio de crecimiento celular)

DGM: diabetes mellitus gestacional

DMSO: dimetilsulfóxido

E₂: 17-βestradiol

ERE: elemento de respuesta a estrógenos

ERK: quinasa regulada por señalización extracelular

ERs: receptor de estrógenos

ESCs: células endometriales estromales

ETGs: enfermedades trofoblásticas gestacionales

EVT: citotrofoblasto extravelloso

FSH: hormona folículo estimulante

GR: receptor de glucocorticoide

GRE: elemento de respuesta a glucocorticoides

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofina

hCG: gonadotrofina coriónica humana

HATs: histonas acetilasas

HDACs: histonas deacetilasas

hLP: lactógeno placentaria humana

IGFBP-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1

LEP: leptina

LEP-R: receptor de leptina

LH: hormona luteinizante

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos

ME: matriz extracelular

MCI: macizo celular interno

MIF: factor inhibidor de la migración de macrófagos

MMPs: metaloproteinasas

NF-IL6: factor nuclear interleuquina 6

NFκB: factor nuclear kappa B

O.N. : over night

P₄: progesterona

PE: preeclampsia

PI3K: fosfoinositol-3-kinasa

PKA: proteína-kinasa A

PKI: dominante negativa de la subunidad regulatoria de PKA

PLE: enhancer de leptina placentaria

PRL: prolactina

qRT-PCR: RT-PCR cuantitativa

SFB: suero fetal bobino

Sp1: proteína estimulante 1

TAFs: factores asociados a TBP

TBP: proteína de unión TATA

TIMPs: inhibidor tisular de metaloproteinasas

TSA: tricostatina A

u.a: unidades arbitrarias

VEGF: factores de crecimiento vascular endotelial

AGRADECIMIENTOS

Tengo tanto por agradecer que tendría que hacer un anexo, por lo que voy a tratar de ser breve sin olvidarme de nadie. Estos cinco años fueron largos pero llenos de buenos momentos y buenas personas que se incorporaron en mi vida.

En primer lugar voy a agradecer a la Facultad de Ciencias Exactas y a la Universidad de Buenos Aires por haberme dado lugar para realizar el Doctorado, junto con el departamento y el IQUIBICEN que me brindó el equipamiento y todo lo necesario durante todo este tiempo. Quiero agradecer a CONICET que me otorgó la beca que hizo posible que pueda solventar mi trabajo doctoral, como también al financiamiento recibido por la UBA, la Agencia y Fundación Florencio Fiorini que permitieron realizar este doctorado.

También quiero agradecer a mi grupo de trabajo que hizo gran diferencia estos años en la BIG CITY, no es lo mismo venir de lejos y no poder adaptarte con el grupo de trabajo, yo tuve la suerte de tener éste, MI GRUPO de trabajo, que son lo mejor y hoy los puedo llamar AMIGOS.

Ceci, GRACIAS, por ser esa jefa que está cuando se la necesita en todos los sentidos, tanto en los científicos como en los personales, a veces más que una jefa. Siempre comprensiva y optimista levantándose el ánimo para que no me “desamine”.

Juli, mi Maymo, qué puedo decir, qué no aprendí de la Doc, qué no sigo aprendiendo de la Doc, GRACIAS, por estar ahí todos los días, disputas a responder mis una y mil preguntas inseguras, enseñándome tanto, también aprendí a quererte como amiga.

Rodri, el hombre del grupo, siempre dispuesto a ayudarme en lo que necesitara, siempre al rescate, el caballero del grupo GRACIAS por aguantarnos, por divertirnos y por ser tan buena persona.

Ayelita, aprendí tanto de vos, primero a pensar científicamente creo, si es que realmente aprendí, me pasaste esa forma de analizar las cosas de armar los experimentos que me faltaba experiencia, GRACIAS, y también te agradezco por estar ahí para escucharme.

Pauli, agradezco haber tenido el placer de conocer a una personita tan buena y sensible como vos, que me hizo reír a carcajadas, GRACIAS por compartir tu alegría conmigo, y por dejarme llegar a conocerte tan bien para considerarte una amiga.

Del labo de enfrente también tengo que agradecer al grupo divino de personas que llegué a conocer. **Mel**, qué puedo decir una persona excepcional, pura sin maldad alguna, graciosa como ella sola, tan querible, te agradezco por ser como sos y por estar siempre, la ciencia me ha dado varios amigos entre ellos vos sos uno de ellos. **Vani**, qué decir de Vanuchi, que está siempre enfrente, que siempre que necesité estuvo para escucharme y darme un consejo, sea o no científico, para ponerme el hombro o para ayudarme con un cuenta, así que GRACIAS por estar cuando te necesité. Y **JC**, es la persona más buena que conozco y con una tranquilidad que transmite a los demás. GRACIAS por ser más que un consejero de estudio un consejero en general de la vida.

Gracias **Berni** por las placentas, que sin ellas no podría llegar a ningún lado.

Gracias **Alejandra** y **Fernanda**, por su ayuda en la última etapa con las inmuno y las IP, son unas genias, siempre dispuestas y con buena voluntad, por enseñarme todo lo que aprendí.

También tengo que agradecer al grupo maravilloso de Sevilla, donde he podido ir a trabajar y realizar parte de mi doctorado. GRACIAS **Antonio**, o Tony, por ser el eslabón indispensable, sin tu presencia no hubiera podido hacer mucho, me enseñaste gran parte de lo que se del laboratorio de allá. Siempre con una sonrisa, sin quejarte y siempre preguntando cuando vamos a volver, gracias otra vez. **Ketama**, otra persona que sin dudar deja todo para ayudarte, un placer compartir mesada contigo kety, GRACIAS, por hacer que sea todo más fácil. **Victor**, GRACIAS por permitirme ir a formar parte de tu laboratorio por unos meses, por aconsejarme y por ayudarme en todo momento. **Tere**, GRACIAS por estar dispuesta a ayudarme, y por tu hospitalidad. **ROCIO** y **FLORI**, gracias por su amistad y su tiempo compartido conmigo, hicieron que mi estancia allá sea mucho más divertida.

A mis amigas de toda la vida, Pau, Maca, Gri, Car, Cielo, Na, Noe, Nalia, Andre y Bel, les digo GRACIAS, por haber estado siempre, en cada momento de crisis o de alegría, por eso y mucho más. Las quiero, ahora si se terminó.

A mi **mamá** y a mi **papá**, les quiero agradecer primero que nada por darme las herramientas para poder volar, para poder hacer mi propio camino, y estar hoy acá, donde estoy. Sin ellos no podría haber hecho nada de lo que hice. GRACIAS, por ser los mejores papás del mundo, por educarme como me educaron, porque gracias a eso hoy logre esta meta. Los amo. Papá te extraño.

Y **Joa**, que puedo decir, tengo que decirte GRACIAS, por cuidarme y mimarme más de lo que es humanamente posible, por estar siempre a mi lado por más mal humor que tenga. GRACIAS por acompañarme en esta aventura de cinco años que me embarqué, por estar siempre incondicionalmente, y por quererme con mis locuras, como yo te quiero a vos. Te elijo hoy y siempre, porque junto somos felices. Te amo.

A mis papás

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	5
ABREVIATURAS	9
AGRADECIMIENTOS	11
INTRODUCCIÓN	18
Implantación y placentación	19
Pre implantación	19
Implantación	20
Placentación.....	24
La Placenta	27
Estructura y función de la placenta	27
Mediadores de Implantación y Crecimiento Embrionario	29
Leptina	32
Receptores de leptina	36
Funciones de la leptina en reproducción	38
Funciones de la leptina en el Embarazo	39
Leptina en embarazos patológicos	41
Regulación de la expresión génica de leptina en placenta	42
- Elementos regulatorios en el promotor	42
- Estradiol en la regulación de la expresión de leptina placentaria	45
- Expresión de leptina mediada por hCG	46
- Expresión de leptina regulada por AMPc	47
- Regulación de la expresión de leptina mediada por insulina, hipoxia y glucocorticoides	48
Estrógenos: 17 β -estradiol	49
Receptores de estrógenos.....	50
Mecanismos de Acción	51
Funciones de los estrógenos durante el embarazo	54
Funciones	54
Interacción con otros factores de transcripción	56
- SP1	56
- CREB	58
- NF κ B	59
HIPÓTESIS	60
OBJETIVOS	61
MATERIALES Y MÉTODOS	62
Modelos Experimentales.....	62
Explantos Placentarios.....	62
Línea Celular BeWo	62
Protocolos Experimentales.....	63
CULTIVO CELULAR.....	63
1.1 Congelado de células	63
1.2 Tratamientos.....	63
EXPLANTOS PLACENTARIOS.....	64
WESTERN BLOT.....	64

2.1 Extractos proteicos de líneas celulares	64
2.2 Preparación de las muestras para Western Blot de explantos placentarios	65
2.3 Determinación de la concentración de proteínas	65
2.4 Geles desnaturizantes de proteínas	66
2.5 Transferencia e incubación con los anticuerpos	66
TRANSFECCIONES TRANSITORIAS.....	67
3.1 Bacterias competentes.....	67
3.2 Transformación plasmídica.....	67
3.3 Minipreparación de plásmidos	68
3.4 Midipreparación de plásmidos	69
3.5 Transfección transitoria.....	69
3.6 Determinación de la actividad de luciferasa	70
3.7 Determinación de la actividad de β -galactosidasa	70
3.8 Plásmidos Utilizados	70
PCR en TIEMPO REAL.....	72
4.1 Preparación de muestra para qRT-PCR	72
4.2 Retrotranscripción: Síntesis de ADNc.....	72
4.3 PCR cuantitativa (qPCR)	73
INMUNOFLUORESCENCIA.....	74
INMUNOPRECIPITACIÓN.....	75
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	75
RESULTADOS	76
Capítulo 1	77
Estudio de los factores de transcripción involucrados en la regulación ejercida por el estradiol sobre la expresión de leptina en células placentarias	77
Acción del factor de transcripción Sp1 en la expresión de leptina placentaria ..	78
El factor de transcripción Sp1 aumenta la expresión de leptina en células placentarias	78
El efecto inductor del E ₂ sobre leptina es dependiente del factor de transcripción Sp1.....	83
La inducción de la expresión de leptina por Sp1 es insensible al antiestrógeno ICI 182 780	88
El efecto de los factores de transcripción ER α y Sp1 en la inducción de la expresión de la leptina placentaria mediada por E ₂	90
Capítulo 2	98
Estudio del factor de transcripción NF κ B en la regulación ejercida por el estradiol sobre la expresión de leptina en células placentarias.....	98
Participación del factor NF κ B en la expresión de leptina placentaria	99
La inhibición del NF κ B anula el efecto del E ₂	99
Efecto de la sobreexpresión de p65 sobre la expresión de leptina placentaria mediada por E ₂	101
Capítulo 3	110
Efecto de la vía de transducción de señales de PKA sobre la expresión de leptina dependiente de E ₂	110
La vía de señalización de PKA media el efecto del E ₂ sobre la expresión de leptina placentaria	111

Efectos de CREB en la expresión de leptina placentaria inducida por E ₂	115
La acetilación y la deacetilación median el efecto del E ₂ en la expresión de leptina	118
DISCUSIÓN	127
El factor de transcripción Sp1 aumenta la expresión de leptina placentaria	130
Modulación del factor de transcripción NFκB sobre el efecto del E ₂ en la expresión de leptina placentaria.....	136
La vía de señalización mediada por PKA modula la expresión de leptina dependiente de E ₂	140
CONCLUSIÓN.....	145
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148

INTRODUCCIÓN

Implantación y placentación

Pre implantación

La reproducción permite la formación de nuevos individuos, asegurando así la continuidad de la especie. De esta manera se pasan de una generación a la otra, las características heredables, ancestrales y recientes de los progenitores.

La fecundación se produce cuando se fusiona un espermatozoide y un óvulo. En los humanos la fecundación es interna, se produce dentro del tracto genital femenino [1]. Normalmente ocurre en la trompa de falopio dentro de las 24 o 48 horas luego de la ovulación femenina, y es la etapa inicial del desarrollo del óvulo fertilizado o cigoto envuelto por la zona pelúcida [2].

Las divisiones que ocurren después de la fecundación se denominan divisiones de segmentación, éstas transcurren de forma exponencial, 4, 8, 16 células de manera que al final se forma una aglomeración de células del mismo tipo (blastómeros), esta estructura es denominada mórula. Estas divisiones de segmentación ocurren durante la migración del embrión a lo largo de la trompa uterina (**Figura I1**). Aún el embrión se encuentra dentro de la zona pelúcida, que actúa de protección [3].

Posteriormente tiene lugar la primera etapa de diferenciación celular generándose el blastocisto. Los elementos centrales de blastocisto constituyen la masa celular interna y la capa circundante de células trofoblásticas. La masa celular interna formará principalmente los tejidos internos del embrión y las células trofoblásticas que luego formarán la placenta [4].

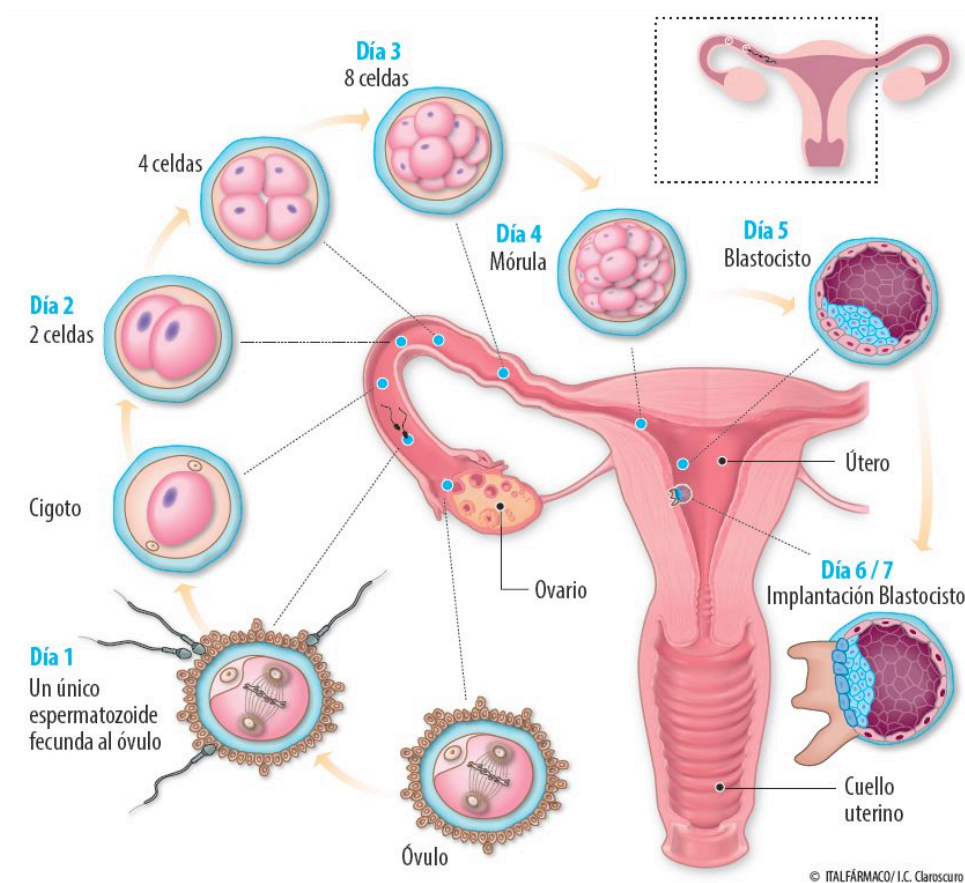


Figura 11: Etapas tempranas hasta la formación del blastocisto. Luego de la fecundación en las trompa de Falopio, el embrión sufre varias divisiones mitóticas hasta que se forma la mórula. En el camino que transcurre hasta el lumen uterino, el embrión se convierte en blastocisto.

Implantación

La implantación del embrión humano es el proceso por el cual el embrión se ancla al endometrio. Requiere de un “diálogo” entre dos organismos con diferentes dotación inmunológica y genética: el embrión y la madre. Puede ocurrir entre los 6 y los 10 días después de la ovulación [1].

Ocurre a partir de la decidualización del epitelio del útero y la penetración de su membrana basal mediante la acción de enzimas proteolíticas, como las metaloproteinasas, entre otros mecanismos.

La implantación siempre sucede del lado del blastocisto en el que se encuentra el embrión, el embrioblasto. Esto sucede en un momento específico, denominado la

“ventana de implantación”, que tendría lugar entre los 20 y 24 días del ciclo menstrual, dependiendo de la presencia no solo, de cambios bioquímicos y morfológicos que son generados en la pared uterina, por señales del embrión y el trofoblasto, sino también de la presencia de estrógenos y progesterona [5].

El endometrio sufre un proceso llamado deciduización para que se pueda llevar a cabo la implantación. Luego de la penetración en la mucosa uterina las células trofoblásticas pierden su membrana plasmática y forman un sincitio, que con un ritmo acelerado se extiende por la mucosa e invade todo el tejido contiguo. Este crecimiento rápido, generalizado, progresivo e infiltrante del trofoblasto no solo remodela el estroma de la mucosa uterina sino también los vasos sanguíneos maternos, teniendo semejanza con la proliferación de un tumor, pero se diferencia de éste por el estricto control espacial y temporal de la invasión[3].

En los humanos, la deciduización comienza en la fase secretoria del ciclo menstrual de la mujer. Durante el embarazo este proceso continúa, formando la placenta [5].

La implantación se puede dividir en tres etapas, la aposición, la adhesión y la penetración (**Figura I2**). La aposición, es la etapa donde las células del trofoblasto se colocan cerca del epitelio luminal. Esta etapa se encuentra seguida de la adhesión, donde se genera una unión del trofoblasto con el epitelio luminal lo suficientemente fuerte. Por último la etapa es la penetración que involucra la invasión de trofoblasto en el epitelio luminal [6] .

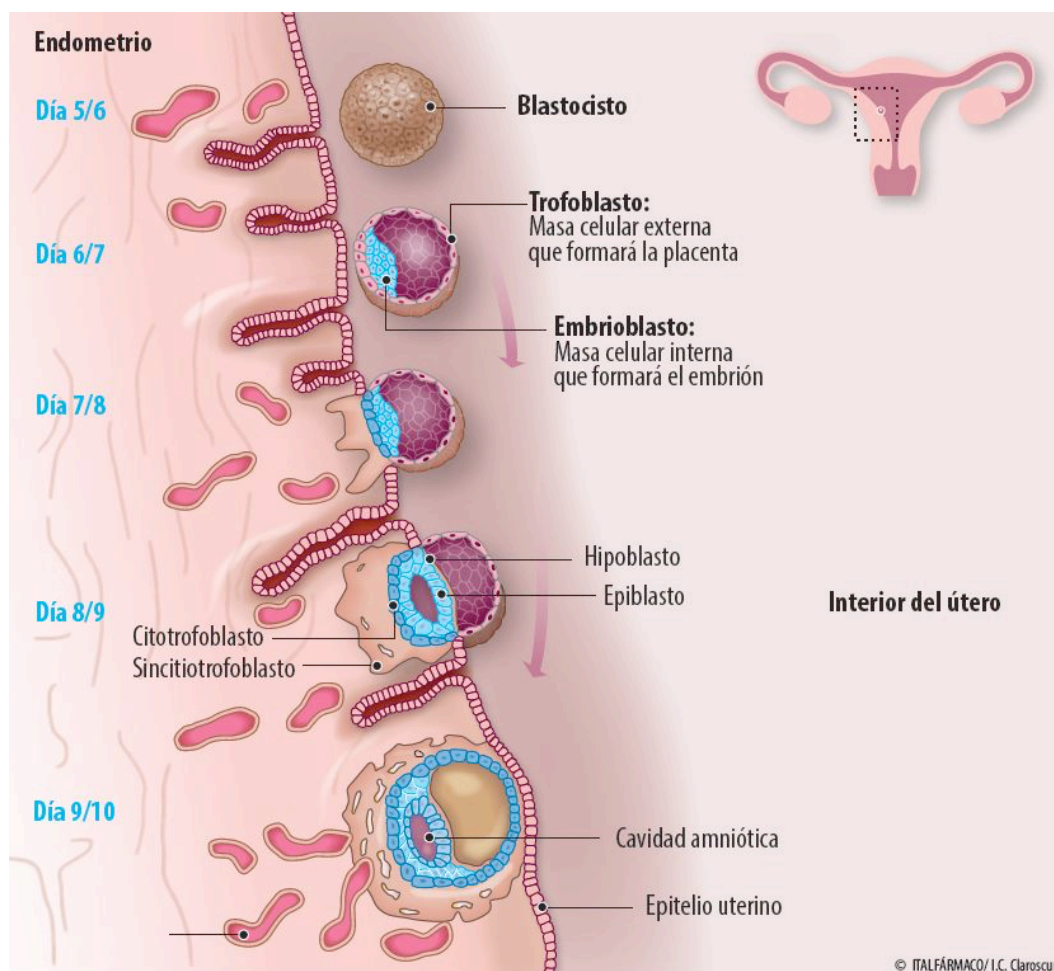


Figura I2: Estadios del proceso de implantación de un blastocisto humano.

Luego del contacto con el epitelio uterino, el trofoblasto forma un sincitio sin límites celulares que invade la mucosa del útero. Además remodela los vasos sanguíneos maternos desarrollando lagunas en las que fluye la sangre materna de la que el trofoblasto, ahora llamado sincitiotrofoblasto, puede extraer sustancias nutritivas y oxígeno. La parte más interna del trofoblasto no forma un sincitio sino que conserva su estructura y se denomina citotrofoblasto, el cual es un tejido el cual presenta un crecimiento acelerado debido a sus divisiones rápidas y sucesivas, que en la periferia forman nuevos sincitios [3] **(Figura I3)**.

Por otro lado se diferencia el citotrofoblasto intersticial o vellosos que invade el tejido uterino, anclando la placenta al útero, mientras que el citotrofoblasto endovascular o extraveloso migra hacia la arterias espirales, desplazando y

reemplazando la línea celular endotelial, generando vasos de baja resistencia y alta capacidad que brindan un flujo sanguíneo para la placenta durante todo el embarazo [7].

La diferenciación del trofoblasto en estas dos líneas celulares mayores continúa durante todo el embarazo. El sincitiotrofoblasto y las vellosidades coriónicas son las responsables del intercambio de nutrientes y gases como también de la mayoría de las hormonas y factores de crecimiento producidos por la placenta [7].

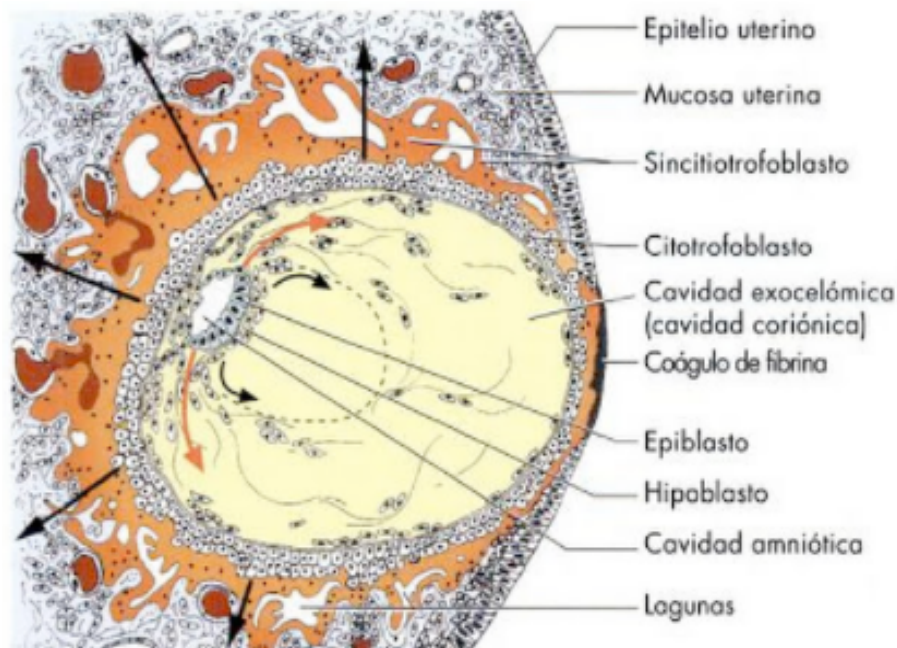


Figura 13: Proceso de desarrollo después de la implantación del blastocisto. Etapa lacunar. El hipoblasto comienza a formar el saco vitelino (flechas negras cortas). Desde el epiblasto y el hipoblasto proliferan células que se convierten en el mesénquima extraembrionario de la cavidad coriónica (flechas rojas). Diferenciación mayor del trofoblasto El sincitiotrofoblasto, originado por diferenciación del citotrofoblasto (flechas negras largas) [3].

Al finalizar la etapa de la implantación en el útero, se da inicio a la formación de las membranas extraembrionarias: el saco vitelino, que tiene como función la de nutrir al embrión hasta que se establezca la circulación materno-fetal y el amnios, que es una membrana que forma la cavidad amniótica, en la que está suspendido el embrión. Contiene de 0,6 a 1 litro de líquido amniótico, que baña al embrión,

permitiendo sus movimientos y otorgando protección a golpes y vibraciones. Por otro lado se forma el corion, que es una pared provista de numerosas vellosidades que se insertan en la mucosa uterina para el intercambio de materiales entre la madre y el embrión [8] (**Figura 4**).

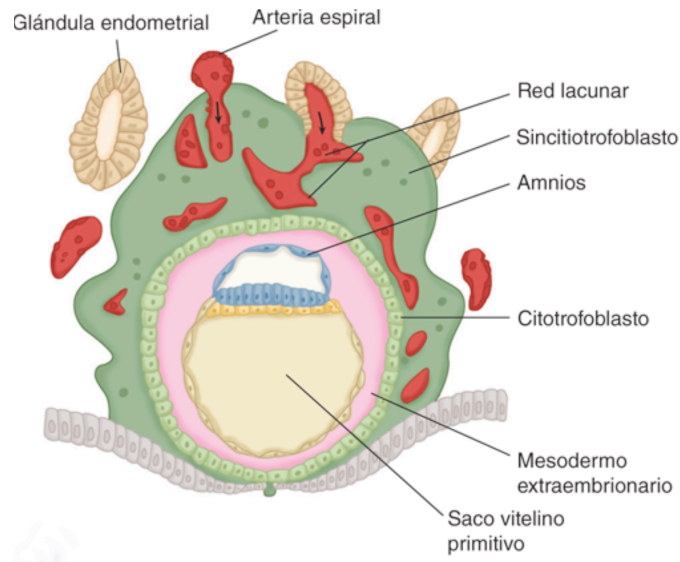


Figura 14: Embrión humano incluido dentro del endometrio. Se observa el sincitiotrofoblasto gran cantidad de lagunas llenas de sangre materna. Modificado de [9].

La implantación del embrión es el proceso crítico en el desarrollo del embarazo, se considera que en el 75% de los embarazos fallidos la causa es un defecto en la implantación (**Figura 15**).

Placentación

La placentación es un proceso posterior a la implantación. Es el establecimiento del órgano de nutrición más específico del feto. La placenta es bipartita, integrada por una parte fetal que apoya en el corion y por otra materna, integrada por la mucosa uterina. Constituye una unidad funcional denominada Placenta, con funciones orgánicas vitales: digestión, asimilación, respiración, circulación, regulatoria, depuración y eliminación de detritus [10].

Una vez finalizada la implantación, el trofoblasto original se ha diferenciado en dos capas: el citotrofoblasto vellosito interno y el sincitiotrofoblasto externo [11], las

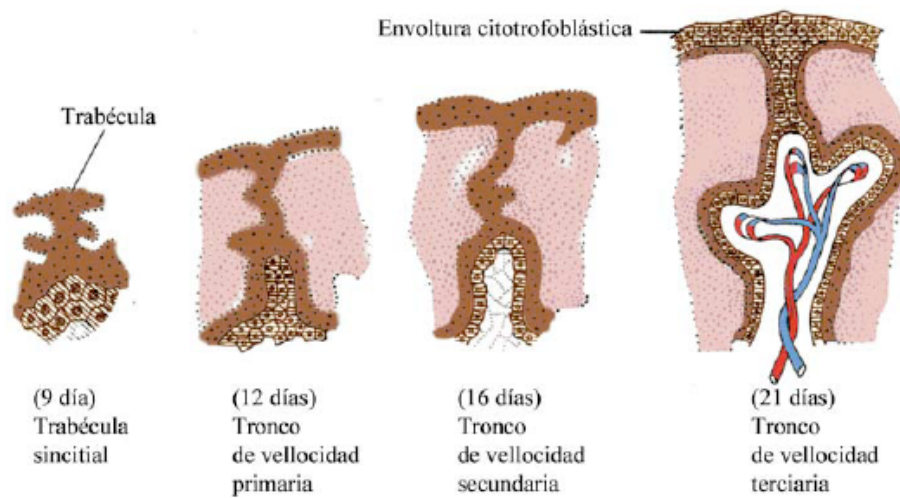
células citotrofoblásticas comienzan a generar proyecciones hasta generar las denominadas vellosidades primarias [3]. Las lagunas con contenido de sangre materna proveniente de los vasos erosionados pronto se fusionan en un espacio comunicado, el espacio intervelloso, en el cual se extienden las vellosidades [3].

Poco después de la formación de las vellosidades primarias, éstas se expanden, dando lugar a las vellosidades secundarias, dentro de las cuales, aparece una zona central mesenquimal. Las vellosidades están rodeadas por una capa de células citotrofoblásticas, y por fuera se encuentra el sincitiotrofoblasto [11].

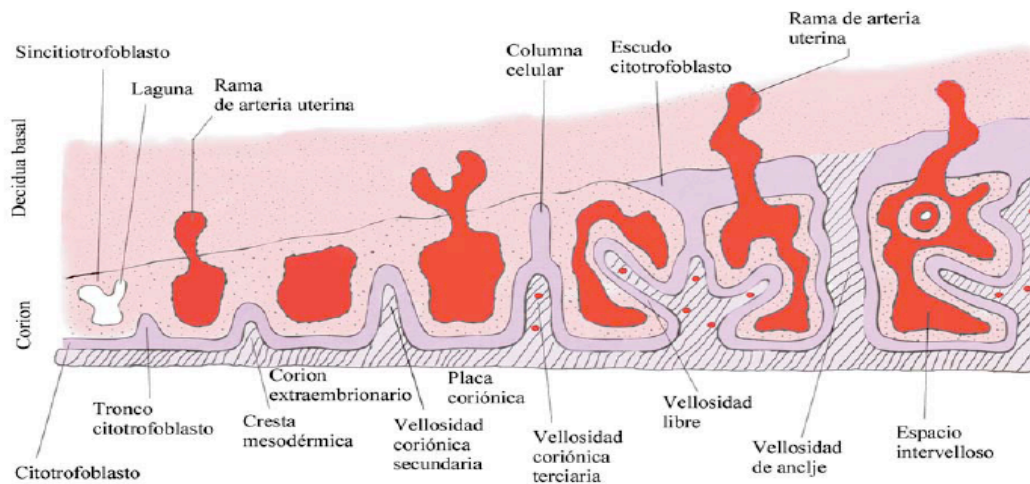
Al final de la tercera semana de gestación, aparecen las vellosidades terciarias, que no son otras que las vellosidades secundarias que se expanden aún más y son atravesadas por vasos sanguíneos fetales [11] **(Figura I5A)**. Estas columnas citotrofoblásticas se expanden distalmente, atravesando la capa sincitiotrofoblástica.

Se denominan vellosidades de anclaje a estas extensiones citotrofoblásticas, debido a que son el punto de unión entre el embrión y el tejido materno. También podemos encontrar vellosidades flotantes que son las porciones que quedan sin fijar, que se mueven libremente en la sangre materna [11].

A.



B.



C.

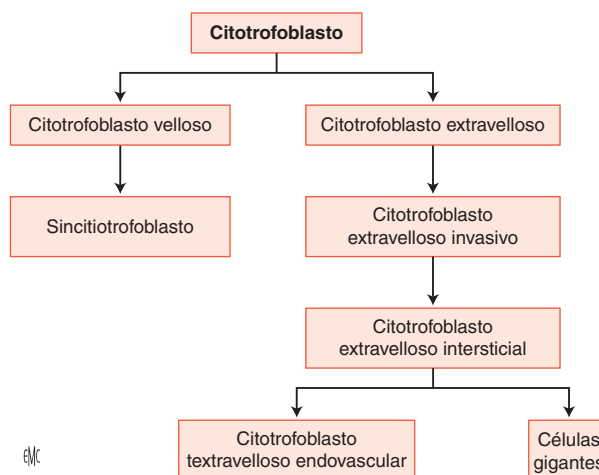


Figura 15: A-B Formación de vellosidades coriónicas. Acumulación de células citotroblásticas hasta una vellosidad de anclaje. *Embriología Clínica*, Keith L. MOORE. 9ª edición. **C.** Representación de las vías de diferenciación del citotroblasto (CT). *Ginecología-Obstetricia. La Placenta*. 2006 EMC. E. Lecarpentier et.al.

Posteriormente, comienza un crecimiento vellositario sostenido. Desde las vellosidades principales o troncales, surgen brotes laterales, los que a su vez se ramifican de un modo tal que a su vez forman grandes arborizaciones vellositarias que parten de la placa coriónica y se extienden a los espacios intervelloso. Los tabiques formados principalmente por tejido materno, subdividen el espacio intervelloso en compartimientos para los “cotiledones”. Así es como se forma la placenta [3].

La Placenta

Estructura y función de la placenta

La placenta madura posea entre 15-20 arborizaciones vellositarias o cotiledones, que se introducen en compartimientos de tipo cavitario. Éstos se encuentran separados en forma incompleta por tabiques que no alcanzan la placa coriónica [3] **(Figura I6)**.

La placenta humana es una placenta de tipo hemocorial, ya que el corion penetra en el endometrio y está en contacto directo con los vasos sanguíneos maternos. Posee forma de disco, de unos 3 cm de grosor, 20 cm de diámetro y 500g de peso aproximadamente. Tiene dos superficies, una 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 I7)**.

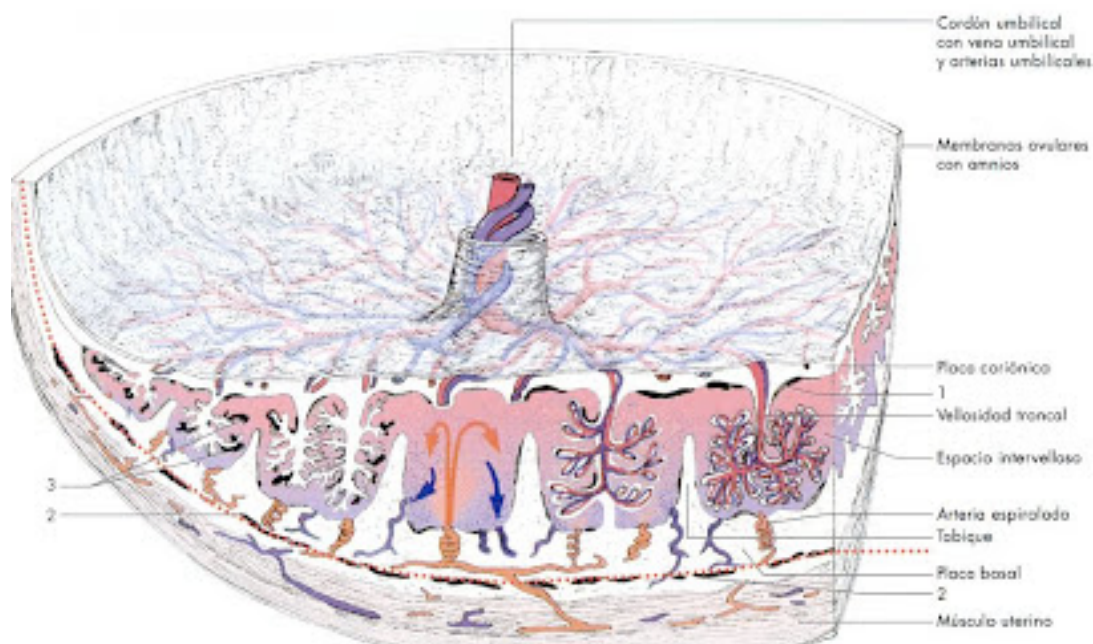


Figura 16: Esquema de la placenta madura [3].

Desde el principio la placenta realiza todas las funciones necesarias para un organismo: nutrición, intercambio de gases, circulación, excreción y secreción de hormonas. También tiene la función de permitir la implantación del embrión evitando su rechazo por el sistema inmune materno [12].

En la segunda mitad de la gestación el feto mismo se van haciendo cargo paulatinamente de algunas de las funciones. El feto, la madre y la placenta funcionan como una unidad funcional superior [3].

Hacia el final del embarazo, cuando la placenta está madura, la cubierta epitelial de las vellosidades se adelgaza. El poder regenerativo del citotrofoblasto se agota paulatinamente y de este modo el revestimiento de las vellosidades solo está compuesto por una sola capa delgada de sincitiotrofoblasto [3].

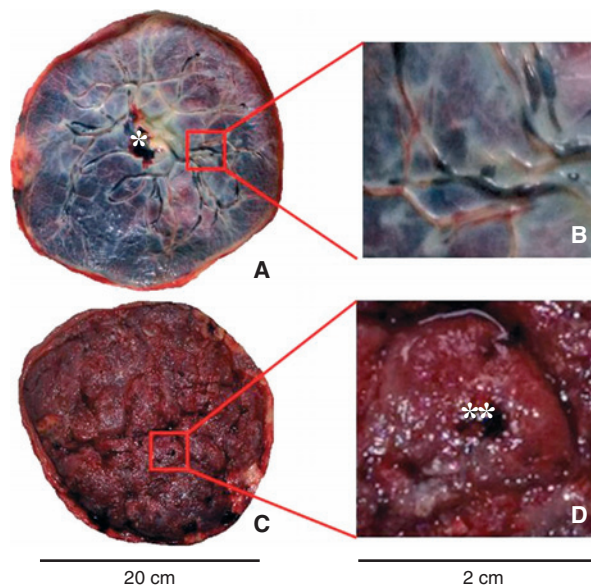


Figura 17: Placenta humana a término. Cara fetal: placa coriónica (inserción del cordón, asterisco). A. Vasos fetales en la placa coriónica. B. Cara materna: placa basal. C. Cotiledón (orificio de entrada de una arteria helicoidal, asteriscos.) *Ginecología-Obstetricia. La Placenta. 2006 EMC. E. Lecarpentier y colaboradores.*

Mediadores de Implantación y Crecimiento Embrionario

La invasión que ocurre en el proceso de implantación se debe a un proceso bioquímico activo. Múltiples señales sincronizan el desarrollo del blastocisto y la preparación del útero. De los muchos aspectos del proceso de sincronización, el papel de las hormonas esteroideas es el mejor estudiado. La implantación requiere un aumento de la secreción de 17β -estradiol que estimula la proliferación y diferenciación de las células epiteliales uterinas. Por otro lado la producción continua de progesterona por el cuerpo lúteo estimula la proliferación y diferenciación de las células estromales [13].

En este proceso de invasión se ven implicados: metaloproteinasas (MMPs), moléculas de adhesión, proteínas de la matriz extracelular, factores de crecimiento, factores proinflamatorios, citoquinas y hormonas [14] **(Figura 19)**.

Las moléculas de adhesión, que están mediando la adhesión selectiva, son las cadherinas, las integrinas y las selectinas. La más estudiada es la cadherina E, la cual se expresa tempranamente en el desarrollo humano, y estaría involucrada en la

compactación blastomérica y en la adhesión de las células del trofoectodermo al epitelio de la decidua [15].

Las selectinas y las integrinas son menos estudiadas, pero no menos importantes en este proceso. Por un lado las integrinas tienen un papel importante en el anclaje de las vellosidades coriónicas, y las integrinas $\alpha V\beta 3$ y $\alpha 4\beta 1$ son consideradas marcadores de receptividad en el útero [16].

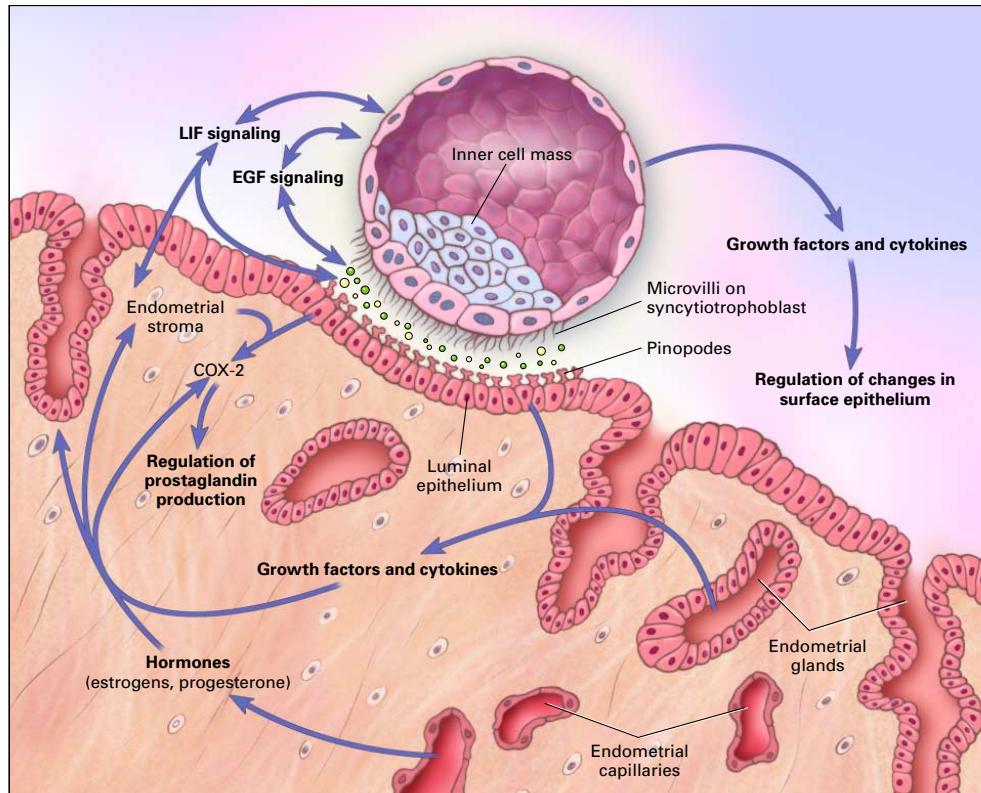


Figure 18: Interacciones que ocurren durante la aposición y adhesión del blastocisto humano en el útero receptivo.

Diferentes mediadores se hallan involucrados en la interacción materno-fetal temprana, dentro de los principales ejemplos podemos encontrar a COX-2: ciclooxigenasa-2, EGF: factor de crecimiento epidermal, LIF: factor inhibidor de leucemia, prostaglandinas, hormonas, factores de crecimiento y citoquinas [13].

Por otro lado las L-selectinas se expresan en la superficie del blastocisto una vez desprendido de la zona pelúcida, jugando un rol importante durante la implantación, ya que da una de las primeras señales para el anclaje del blastocisto [17].

La degradación de la matriz extracelular ocurre gracias a las metaloproteinasas (MMPs), su actividad se encuentra inhibida por inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs). El comportamiento invasivo de los citotrofoblastos se debe a la capacidad de secretar las MMPs mientras que los TIMPs inhiben su invasividad [14, 16].

La implantación requiere de la biosíntesis de prostaglandinas y factores proinflamatorios. La ciclooxigenasa (COX), enzima limitante de la biosíntesis de prostaglandinas, puede existir en sus dos isoformas: la constitutiva (COX-1) y la inducible (COX-2). En el endometrio, COX-1 es la responsable de la disminución de la progesterona y del 17β -estradiol. Por otro lado la COX-2 que no es afectada por la producción de hormonas esteroideas, está restringida a la zona de implantación y es dependiente de la presencia del blastocisto [13].

Para completar el crecimiento y el desarrollo del embrión se requiere de distintas hormonas, dentro de las cuales están la gonadotropina coriónica humana (hCG), la progesterona, los estrógenos y la leptina.

La hCG, es una glicoproteína heterodimérica, producida por la placenta, principalmente por el sincitiotrofoblasto y algunos citotrofoblastos, sus funciones principales son antigonadotrófica, inhibiendo la producción de LH y FSH, impidiendo la ovulación, y esteroideogénica, estimulando la producción de progesterona en el cuerpo lúteo y posteriormente en el trofoblasto [16]. La progesterona es una hormona esteroidea cuya acción esta mediada por la unión al receptor de la progesterona, que actúa como factor de transcripción regulando la expresión génica [18].

Luego de la fecundación y la implantación, la progesterona es secretada, por el cuerpo lúteo, en respuesta al estímulo de la hCG producida por los sincitiotrofoblastos. Esta secreción de progesterona evita la menstruación y genera un ambiente apropiado para el desarrollo del embrión.

Entre la 6ta y la 8va semana de gestación la producción de progesterona lútea decae y la placenta se convierte en la fuente principal de la hormona [19].

Los estrógenos son hormonas esteroideas, que en una mujer no embarazadas, son producidas por el ovario principalmente. Pero en las mujeres embarazadas, en la semana séptima de gestación, la mayoría de los estrógenos maternos, como el E_2 , estrona y estriol, son producidos por la placenta [20].

Las citoquinas tienen diferentes roles durante el embarazo, están involucradas en la implantación, el crecimiento placentario, el desarrollo embrionario así como también en el mantenimiento del embarazo. Algunas citoquinas participan en la tolerancia materno-fetal durante la implantación. El interferón gamma ($\text{IFN}\gamma$) induciría la producción del HLA-G, suprimiendo las células inmunes de la madre [21]. Sin embargo, el factor de necrosis tumoral α ($\text{TNF}\alpha$), por su parte, induce la inhibición de la activación del complemento y aumenta la expresión de FasL en los trofoblastos [22]. La interleuquina 6 (IL-6) afecta la proliferación de algunas líneas celulares trofoblásticas y aumenta la actividad de MMP-2 y MMP-9, mientras que el $\text{TNF}\alpha$ aumenta la actividad de MMP-9 y reduce la de MMP-2, así como también la de los TIMPs [21, 22]. Por otra parte, la IL-1 está presente en la interface materno-fetal y aumenta la secreción de PGE2, LIF y de la subunidad $\beta 3$ de las integrinas, y también estimula la actividad de MMP-9 en trofoblastos y su expresión en células del estroma, induciendo la invasión [16]. Además, las citoquinas son factores importantes para la evolución de la placenta madura, ya que están implicadas en la apoptosis placentaria. Tanto en el trofoblasto extraveloso como en el que forma parte de las vellosidades, la apoptosis permite el recambio celular; de modo que aquellas células no funcionales son eliminadas de la placenta sin provocar una reacción inflamatoria [23].

Se ha determinado que las citoquinas también participan en la regulación de la producción de hormonas placentarias. Así, la producción de hCG es estimulada por la IL-1, el $\text{TNF}\alpha$, el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y la IL-6 e inhibida por $\text{TGF}\beta 1$. Las citoquinas IL-1 β y $\text{TNF}\alpha$ al igual que el medio condicionado de macrófagos, estimulan la producción de estrógenos, sin embargo su efecto sobre la producción de progesterona aún es controversial [21].

Mazuzaki y colaboradores describieron la producción de una nueva hormona placentaria: la LEPTINA [24].

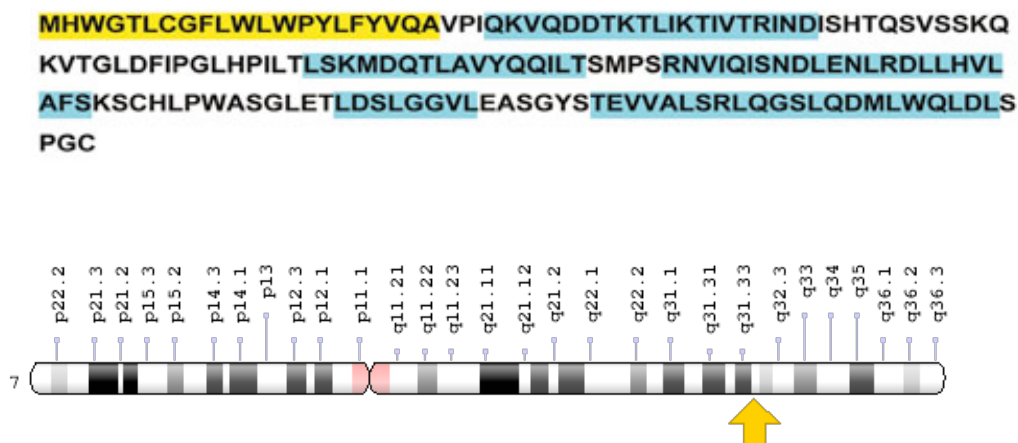
Leptina

La leptina fue descrita y clonada en 1944 por Zhang y colaboradores [25], es una hormona polipeptídica no glicosilada de 16kDa de 167 aminoácidos sintetizada principalmente por los adipocitos (**Figura I9A**) [26].

Su función principal es la modulación del gasto de la ingesta, [27] así como también actúa como sensor de las reservas y del balance energético del organismo. Los niveles séricos de ésta proteína se encuentran aumentados horas después de la ingesta en roedores y luego de una sobre-alimentación en humanos, mientras que en ambas especies los niveles séricos disminuyen horas después de haber iniciado el ayuno [28].

Es codificada por el gen de *LEP* (conocido anteriormente como *OB*) [29], en el humano. Este gen se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7 (7q31) (**Figura I12 B**) y está constituido por tres exones y dos intrones. La región codificante está presente en los exones 2 y 3, a partir de ellos se transcribe un ARNm del cual se traduce el precursor de la leptina [30].

A.



B.

Figura I9: **A.** La leptina humana está constituida por 167 aminoácidos, de los cuales los primeros 21 (destacados en amarillo) forman el péptido señal, el cual determina el procesamiento de esta hormona y su posterior secreción a la circulación. La estructura secundaria de la leptina es similar al citoquinas de cadena larga helicoidal y consta de 4 hélices alfa (aminoácidos destacados en celeste) [26]. **B.** Cromosoma 7 humano y ubicación de gen *LEP* (Flecha amarilla).

Se ha reportado que la leptina circula libre en plasma o unida a proteínas [31], normalmente se une a la isoforma soluble de los receptores [32]. Los niveles de

leptina aumentan durante la noche, los niveles circulantes diurnos son opuesto a los reportados del cortisol en humanos [33]. Se ha visto que con la edad la producción de leptina en sangre va disminuyendo, esta disminución es mayor en mujeres que en hombres, y es independiente de los cambios endocrinológicos [33].

Su estructura terciaria es similar a la citoquinas de cadena larga helicoidal, tales como el factor inhibidor de la leucemia y la interleuquina 6 (IL6) [26] (**Figura I10**). La estructura tridimensional del precursor de leptina consiste en cuatro alfa hélices antiparalelas, unidas dos de ellas por uniones cruzadas largas y un *loop* corto [34].

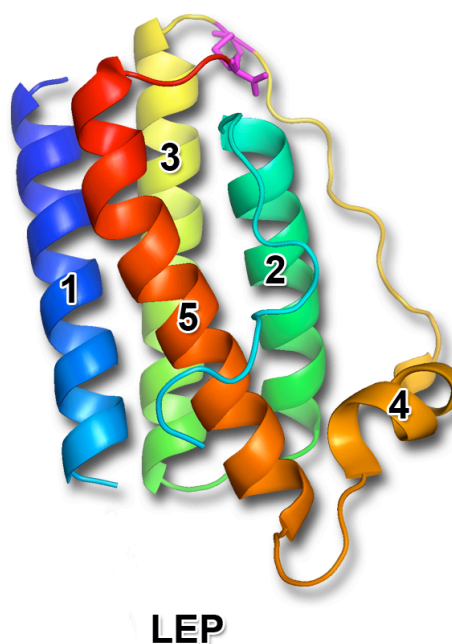


Figura I10: Modelo tridimensional de la leptina, presenta cuatro alfa hélices y un puente disulfuro entre las cisteínas 96 y 146, necesario para su actividad biológica.

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 [35]. 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 [36].

El puente disulfuro 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 [119]. La formación de un puente

disulfuro entre las cisteínas 117 y 167 es necesario para el plegamiento correcto de esta proteína y su posterior secreción [37].

Hoy en día se la considera una hormona multifuncional en los humanos, donde la expresión del gen de leptina se ha detectado en tejido adiposo, en mucosa gástrica, células del epitelio mamario, testículo, ovario y en la placenta [38]. La leptina ejerce efectos pleiotrópicos tales como el de modular la termogénesis, la angiogénesis la hematopoyesis, la ontogénesis, la condrogénesis, las funciones neuroendócrinas, las inmunes, como así también la presión arterial [39].

Se ha evidenciado que la leptina aumenta la proliferación tanto de la línea celular BeWo, JEG-3 y Swan-71 de una manera dosis dependiente. Luego del tratamiento con leptina, la ciclina D1, unas de las proteínas principales del ciclo celular, se encuentra aumentada y las células muestran un desplazamiento hacia la fase G2/M [40].

Sin embargo la leptina también ha sido implicada en funciones reproductivas, incluyendo la regulación del ciclo menstrual, la maduración del oocito, la implantación, el desarrollo del embrión y la lactancia [29, 41, 42].

La leptina también presenta función energética, dado que es una hormona secretada principalmente por las células adiposas con función de limitar la ingesta y de aumentar el gasto de energía y de ésta manera debe mantener el balance energético del organismo. Mediante la interacción con receptores específicos del sistema nervioso central a nivel del hipotálamo [43]. Lesiones tempranas en el hipotálamo generalmente producen obesidad severa [44].

Se encuentra bien establecido que la leptina actúa a varios niveles del eje hipotálamo hipofisario gonadal (HPG), donde están involucradas diferentes vías bioquímicas **Figura I11**. El efecto de la leptina en la función reproductiva al parecer está determinado por diferentes umbrales dependiendo del sitio de actividad. Es posible que la leptina presente un efecto dual en la reproducción y que el sitio de acción dependa en el nivel circulante en sangre [45].

La leptina también presenta funciones en la reproducción que serán discutidas más adelante en el texto.

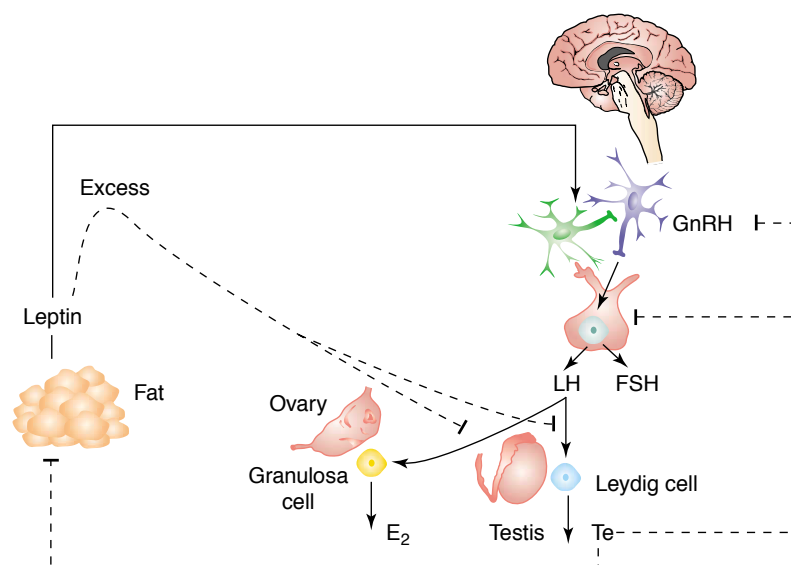


Figura I11: El tejido adiposo y la leptina son moduladores sistémicos del eje Hipotálamo pituitario gonadal (HPG). La leptina actúa a diferentes niveles del eje reproductivo, provocando diferentes efectos en la reproducción dependiendo de su concentración en sangre. El sistema de transporte de leptina a través de la barrera hematoencefálica previene que lleguen niveles altos de leptina a los receptores hipotalámicos, donde la leptina ejerce una acción estimulante de la hormona liberadora de gonadotropina y a su vez de la secreción de gonadotropina [45].

Receptores de leptina

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 [36].

En el ratón se han descrito distintas isoformas del LEPR que se generan por splicing alternativo, una isoforma larga (LepR_B), cuatro isoformas cortas (LepR_A, LepR_C, LepR_D, y LepR_F) y una isoforma soluble (LepR_E) [135]. Las mismas comparten un dominio extracelular de 800 aminoácidos y un dominio transmembrana de 34 aminoácidos (excepto la isoforma soluble LEPR_E), mientras que el dominio intracelular es variable y característico de cada isoforma [46]. En humanos se han descrito las mismas isoforma (**Figura I12**) que en el ratón. Las

isoformas transmembrana tendrían similar afinidad por la leptina, con un $K_d = 0,3$ nM, de modo que en condiciones fisiológicas, donde la concentración de leptina en suero es de 0,4 - 0,6 nM, la mitad de los receptores estarían ocupados por ligando [47].

Debido a 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 debajo de la vía de transducción de señales [48].

La isoforma larga posee las secuencias consenso para la señalización vía JAK/STAT, mientras que las formas cortas tienen distinta capacidad de señalización mediante la vía de las MAPKs [29]. El receptor soluble de leptina sería la principal proteína sérica que interactúa con la leptina circulante [49].

Específicamente en humanos, la isoforma $LEPR_L$ fue inmunolocalizada en las células citotrofoblásticas, en el epitelio luminal y en células estromales de la decidua materna. También se ha detectado el receptor de leptina en oocitos humanos y en embriones aún no implantados [50].

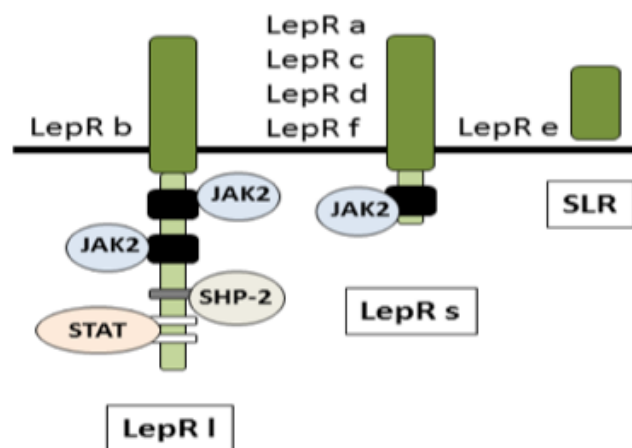


Figura I12: Isoformas del receptor de leptina humano. Las isoformas presentan el mismo dominio extracelular, capaz de unirse a la leptina. Existen seis isoformas del receptor, las cuales comparten un dominio transmembrana y los primeros 29 aminoácidos que tienen un sitio de unión para la quinasa JAK2. Una de las isoformas es larga (LepRb), 4 son cortas (LepRa, c, d, f) y una soluble (LepRe). La isoforma

(LepRb) contiene un sitio adicional para la unión de STAT (BOX3). Adaptado de Munzberg 2015.

Tanto LepRl como LepRs se expresan en la placenta humana [51], y la acción de la leptina sobre sus receptores en células de este órgano activa las vías de señalización de MAPK y PI3K [52].

Las isoformas de membranas presentan el dominio box 1, necesario para la unión a la quinasa Janus (JAK), principalmente LepRb la cual 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 fosforilar a JAK2. La fosforilación en Y985 activa la cascada de SHP-2 y MAPK, la fosforilación en Y1077 activa la señalización por STATS (que median las funciones en reproducción de leptina) y la fosforilación en Y1138 activa la señalización por STAT3 (el principal mediador de las funciones neuroendócrinas de leptina). Luego JAK2, la proteína de interacción, media la interacción con la proteína IRS (el receptor substrato de insulina) que funciona como adaptador de PI3K [53].

Funciones de la leptina en reproducción

La primera evidencia en relación al rol de la leptina en la reproducción provino de los ratones ob/ob y db/db, los cuales no producen leptina no funcional y su receptor truncado respectivamente, y están caracterizados por ser obesos e infértiles. Aunque el tratamiento con leptina exógena restaura la fertilidad en los ratones ob/ob, la restricción de la alimentación por sí sola no es efectiva para corregir ese fenotipo. Este hecho sugiere que la obesidad no es la única causa de la infertilidad de los animales y que la leptina sería necesaria para el normal funcionamiento reproductivo [54].

La leptina, como se mencionó antes, controla el eje hipotálamo hipofisario gonadal a distintos niveles, estimulando la síntesis y liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante LH [55]. En humanos, el nivel de leptina se correlaciona con los de LH, FSH, E₂ y testosterona, lo que podría significar que éste podría ser un factor

permisivo para la iniciación de la pubertad [56].

Estudios en el humano han demostrado el rol de la leptina durante el proceso de la pubertad. Está bien establecido que la restricción del alimento retrasa la pubertad, mientras que la realimentación elimina este retraso [57, 58]. Asimismo, los modelos humanos y murinos que presentan deficiencia de leptina y fallan en entrar en la pubertad que son tratados con leptina, son capaces de establecer un patrón secretor pulsátil de gonadotrofinas que es característico de una pubertad temprana [59]. También se ha reportado un aumento en los niveles de leptina en suero durante los años precursores al desarrollo puberal que llegan a su máximo nivel cerca del momento de la pubertad. En las mujeres, el nivel de la leptina sigue aumentando, mientras que en los hombres tiende a disminuir [60].

Los órganos reproductivos también son influenciados por la leptina. Diversos estudios han demostrado que leptina es capaz de causar tanto efectos estimulatorios [61-63] como inhibitorios [64, 65] sobre las funciones del ovario. Se ha identificado la expresión del LepR, en varios tejidos periféricos (ovario, testículos y glándula adrenal), lo que sugiere que la leptina podría tener un efecto directo en los blancos endocrinos río abajo del eje reproductivo [66, 67]. También se le atribuye un rol importante a la leptina en el desarrollo del oocito, la ovulación y la expresión de VEGF en el ovario [25, 68].

La leptina juega un papel importante en la regulación de la fertilidad, es más la ausencia de leptina, causada por mutaciones en el gen o el receptor de leptina (LepR), se ha asociado a infertilidad tanto en humanos como en roedores [69] [70].

Por otro lado se ha evidenciado que el receptor de leptina se expresa en la decidua materna y que el endometrio materno uterino es blanco para la acción de leptina, por este motivo se propone que la leptina es importante en la señalización de la implantación del embrión en mamíferos [71].

Funciones de la leptina en el Embarazo

La leptina y su receptor se han localizado en distintas células y tejidos involucrados en el proceso de la gestación.

La leptina y sus receptores también han sido detectados en líneas celulares de coriocarcinoma humano como BeWo y JEG-3 [72], lo cual es consistente con la detección de un aumento en la leptina plasmática en pacientes con neoplasias trofoblásticas gestacionales, como la mola hidatiforme o el coriocarcinoma [73]. La placenta, tanto en ratas como en humanos, produce grandes cantidades de leptina. El tejido adiposo fetal produce leptina, los niveles en suero disminuyen después del parto, sugiriendo del aporte que genera la placenta y el feto en la síntesis de leptina [74]. 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 [29]. 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 proliferación trofoblástica y la inmunomodulación [75].

Se ha propuesto un rol importante para la leptina en la implantación. La implantación del embrión es el momento más crítico para lograr un embarazo exitoso. El blastocito se conecta estrechamente e invade la superficie del endometrio materno [76]. Como se mencionó antes, un gran número de mediadores se encuentran involucrados en esta etapa temprana de conexión materno-fetal, incluyendo hormonas, moléculas de adhesión, citoquinas, factores de crecimiento y lípidos entre otros [77]. Se ha reportado que el endometrio y los embriones preimplantados poseen ARNm de LEPR, lo que indica que son un blanco para la acción de la leptina [50].

En las células trofoblásticas, la síntesis y secreción de leptina como así también la expresión de su receptor, fueron ampliamente demostradas [24], sugiriendo que la leptina podría actuar como un modulador de la función endocrina de la placenta [78]. De este modo, se ha reportado que la leptina aumenta la expresión de metaloproteinasas en el citotrofoblasto, facilitando el proceso de implantación [79]. Asimismo, la leptina presenta un efecto fisiológico sobre el desarrollo de la placenta incluyendo angiogénesis, crecimiento y inmunomodulación [29]. Estudios previos han demostrado que la leptina aumenta la liberación de citoquinas proinflamatorias y prostaglandinas en explantos de placentas humanas, también estimula la producción de hormonas [51], y regula el crecimiento y desarrollo fetal [29]. Estas

evidencias involucran aún más a la leptina como un importante modulador de la función placentaria.

Sin embargo, los efectos de la leptina durante el embarazo y los factores que regulan su expresión en placenta no se conocen totalmente [52, 80].

Leptina en embarazos patológicos

Se han reportado diferentes patologías del embarazo relacionadas con a la desregulación de la función autocrina y paracrina de la leptina en la interfase materno-fetal [81].

La producción de leptina en la placenta está aumentada marcadamente en pacientes con preeclampsia (PE) [82] o en pacientes con diabetes mellitus (DMG) [83]. También se ha observado que la concentración de leptina en plasma se encuentra elevado en pacientes con enfermedades trofoblásticas gestacionales (ETGs), como la mola hidatiforme y el coriocarcinoma[84].

La PE se caracteriza por hipertensión arterial y proteinuria luego de la semana 20 de gestación, debido a una invasión trofoblástica y remodelación de las arterias espirales deficientes, lo que genera un menor flujo sanguíneo hacia la placenta, aumento del estrés oxidativo y disfunción endotelial [85]. Los niveles plasmáticos de leptina son mayores en mujeres que presentan PE, así como también la expresión del ARNm de leptina en placenta [86, 87], y de la forma soluble de su receptor [88]. Lo que indicaría una disfunción endotelial, al haber alteraciones a nivel de leptina y sus receptores que modificarían la angiogénesis y los eventos de remodelación de las arterias uterinas.

En el caso de DMG el incremento de leptina placentaria es de 3 a 5 veces superior a embarazos normales en particular durante el segundo y tercer trimestre del embarazo y es aún mayor en mujeres tratadas con insulina [83]. En comparación con la placenta de embarazos normales, en las mujeres que padecen DMG y diabetes mellitus tipo I se sobreexpresa la leptina y una de las isoformas cortas del receptor de leptina. También aumenta la concentración de receptores solubles de leptina, en el tercer trimestre del embarazo, lo que induce la resistencia a la leptina en la madre, siendo los niveles de leptina en embarazadas con DMG mayores que en diabetes mellitus tipo I [83, 89].

Teniendo en cuenta que la leptina promueve la invasividad, su expresión y la de sus receptores es alta en las ETGs. Diversos estudios demuestran que ocurre un aumento en la expresión de leptina y todas las isoformas de sus receptores en las ETGs [24, 90]. La mola hidatiforme, el coriocarcinoma y otros neoplasmas trofoblásticos son tumores productores de leptina, aunque no se sabe el rol que esta citoquina juega en la regulación de los mismos [91].

Otra patología relacionada con la desregulación de la expresión de leptina es la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), que se define por la disminución en la velocidad del crecimiento fetal, usualmente asociada a una mala nutrición del feto. Puede ser causada por distintos factores, tanto nutricionales, genéticos o por un impedimento en el desarrollo placentario [92]. La falla en la producción de la leptina podría estar ligada con la RCIU [93].

Regulación de la expresión génica de leptina en placenta

Las evidencias indican que la regulación de la expresión de leptina en placenta y en tejido adiposo difieren sustancialmente [29]. Hormonas y otros factores, como factores de transcripción, han sido involucrados en la activación de la transcripción de leptina en placenta. Ciertas hormonas fundamentales del embarazo, como la hCG y el 17β -estradiol, estimulan la síntesis de leptina en placenta [80, 94]. Así como también AMPc, glucocorticoides, insulina y el factor de respuesta a hipoxia HIF- 1α , son capaces de regular positivamente su síntesis [29, 90, 95, 96].

- Elementos regulatorios en el promotor

Se ha caracterizado el promotor del gen de leptina, a través de un análisis *in silico* de la secuencia promotora comparándola con la base de datos de elementos o secuencias consenso de unión al ADN para distintos factores de transcripción (**Figura I12**). A partir de la secuencia obtenida, se identificaron las posibles zonas de unión de distintos factores de transcripción que, de acuerdo la bibliografía, estarían involucrados en la regulación de la transcripción por 17β -estradiol en otros genes [97].

Se han identificado distintos sitios de unión para diferentes elementos regulatorios a lo largo del promotor de leptina, tales como C/EBP (CCAAT/ proteína de unión a

intensificador), AP-1 (proteína activadora-1), Sp1 (proteína estimuladora 1), NFκB (factor nuclear kappa B), CRE (elemento de respuesta a CREB), GRE (elemento de respuesta a glucocorticoides), receptores de estrógenos, entre otros, lo que sigue una regulación compleja de la expresión de la leptina a través de diferentes entrecruzamientos transcripcionales [25, 30, 98, 99]. Además, se localizó un intensificador o 'enhancer' específico de placenta llamado PLE (enhancer de leptina placentaria) localizado a 1.9-kb río arriba del gen de leptina [100] **(Figura I13)**. Este enhancer río arriba del gen de leptina humano, se encuentra activo en células de coriocarcinoma JEG-3 y JAR, pero no en células adiposas ni en células Hela. Está localizado en la región 5' del promotor comprendida entre -1951 pb y -1887pb [101].

El hecho de que el gen de la leptina humano presenta un enhancer placenta-específico indica que la regulación de la producción de leptina en trofoblasto es diferente que en los adipocitos.

Millar y colaboradores reportaron que se requieren solo 217pb de la secuencia en el extremo 5' para la transcripción basal específica de la leptina en tejido adiposo, así como para la estimulación por la unión de C/EBPα [90].

```

-2922 aagcttcttt aaggatggag aggccctagt ggaatgggga gattcttccg ggagaagcga
-2862 tggatgcaca gttgggcatc cccacagacg gactggaaag aaaaaaggcc tggaggaatc
-2802 aatgtgcaat gtatgtgtgt tccctgggtc aagggtggg aactttctct aaagggccag
-2742 gtagaaaaca ttttaggctt tctaagccaa ggcaaaattg aggatattac atgggtactt
-2682 atacaacaag aataaacaat ttacacaatt ttttgttgac agaattcaaa actttataga
-2622 cacagaaatg caaatttctt gtaattttcc cgtgagaact attcttcttt tgtttgttt
-2562 tgcgacaggg ttgcgctgat cctccgcct cagtctcct aagtgtgag atgttgcagg
-2502 aagtcaggga ccccgaaacag agagatcggc tggagccgtg gcagaggaac ataaattttg
-2442 aagatttcat tttaatatgg acacttatca gttcccaaat aatactttta taatttttta
-2382 tgctgtgtct tgcctttaatc tcttaatcct gttatcttca taagctaagg atgtacgtca
-2322 cctcaggacc actgtgataa ttgtgttaac tgtacagatt gattgcaaaa catgtggtt
-2262 tgaacaatat gaaatcagtg cacctgaaa aagagcagaa taacagcaat ttttagggaa
-2202 caagggaaga caactataag gtctgactgc ctgcggggtc gggcaaaggg agccatattt
-2142 ttcttcttgc agagagccta taaatagacc tgcaagtagg agagatattg ctaatttctt
-2082 ttgctagcat ggaatattaa tattaacacc ctgggaaagg aatgcattcc tggggggagg
-2022 tctataaatg gccgctctgg gaatgtctat cctacgcaac ggagataagg actgagatac
-1962 gccctggtct ctgcagtagc cctcaggctt actagggtgg tgaaaaactc cgccctggta
-1902 aatttgggt cagaccagtt ttctgtcttc gaacactgtt tctgtgtgtt taagatgttt
-1842 atcaagacaa tacgtgcacc gctgaacaca gaccttatc agtagttctc ctttttgccc
-1782 tttgaagcat gtgatctact ccctgtttta cacccttca ccttttgaaa cccttaataa
-1722 aaaacttgct ggtttgaggc tcaggtgggc atcacagtac taccgatatg tgatgtcacc
-1662 cccggcggcc cagctgtaaa attcctctct ttgtactctc tctctttatt tctcagccag
-1602 ctgacactta tggaaaatag aaagaacctc cgttgaaata ttgggggcag gttcccccaa
-1542 tatctggtgc ccaacgtggg atactgagat tacaagcatg agccactgca tctggcctt
-1482 tcttttgatt tttttttttt aaactttttt aaatgtagaa accattctta gcttttgggc
-1422 attaccaaac ccggcagtggt caggctcggg tcaccgacgt catttgcagt tccccgcttt
-1362 atgttatggg ttttgttttt ttttgttttt tttattgaga cagagtttca ctctgttgc
-1302 ccaggctgta gtgcaatggt ctgatcttgg ctcaactcaa cctccacttc ccaggttcaa
-1242 gccattctcc tgctcagcc tctcaagtag ctgggattac agacactcac caccacactc
-1182 ggctaatttt gtatttttag gtatttttag gtttcaccat gttggccaggt gttgtctcga
-1122 aatcctgacc tcagggtgac cacccacett ggcctcccaa agtgcctggga ttacaggctt
-1062 gagctaccac gcctggctgg gttggttctc aatggagtgg tttgtttttg gagctgctct
-1002 gcgcagtggt gaccagaata ggctggggtt cctagcccat tgctattcct taccagctgt
-942 ggattctaag gaaagtcatt taacctcgct ggaccttaga ttctcatcc ctgaagccca
-882 agggtaaaac aaaacaaaac aaaacaaaac aaaccaaccc atcatgtaaa gcgggggaact
-822 acaaacgata caggtgaaac atgcctacca caccactcac aggcctatgat gacaaaaacg
-762 tggctacatc tgggaccacc ccccaacccc cactttgtac gtaggaaata cggagttgag
-702 gatggagacc cacagtatgt ccagagtgtc cccaaaggcc acagtgcctg cctggagccc
-642 tccagagagc gtgcactccc tggggtgcca gccagagaca acttgcctg aggcttgaa
-582 ctcgattctc cgcgtgccag agaagggtg ggacttcaga acccccaacc ccgcaatctg
-522 ggtcggggag cctggcgcac tgcgggcgc tccctctaac cctgggcttc cctggcgctc
-462 agggccgtcg gggccgagtc ccgattcgct cccaccccga agccgcgcca ggaccaacga
-402 gggcgcagcc gtatgcccc gcccgcctcg cggagccctc cacagccacc cccgcctcga
-342 ccgcgccccg agcggctcga agcaccttcc caagggctg gtccttgcgc catagtcgcg
-282 ccggagcctc tggagggaca tcaaggattt ctgcctccta ccagccaccc ccaaattttt
-222 gggaggtacc caaggggtgc cgcgtggctc ctggcgcgcc gaggccctcc ctcgaggccc
-162 cgcgaggtgc aactgcggg cccagggcta gcagccgcc ggcacgtcgc tacctgagg
-102 ggcggggcgg gagctggcgc tagaaatgcg ccggggcctg cggggcagtt gcgcaggttg
-42 tgatcgggcc gctataagag gggcgggcag gcatggagcc ccgtaggaat cgcagcgcca
+18 acggttgcaa g

```

Figura 113: La secuencia del promotor de leptina (-2922 a +29) fue analizada con el programa MatInspector 7.7.3. Se seleccionaron los elementos hallados con puntaje de coincidencia máximo. Se realizó una subselección de los elementos vinculados con la acción del E₂. Los sitios en cuestión se encuentran en letra negra o cursiva en los casos en que se superponen las secuencias. **NFκB**: Factor Nuclear-kappa B, **SFRE**: Elemento de respuesta al factor esteroideogénico 1, **C/EBP**: CAAT/ proteína de unión a intensificador, **STAT**: Señal activadora y transductora de transcripción, **CRE**: Elemento de respuesta a AMPc, **ERE**: Elemento canónico palindrómico de respuesta a estrógenos, **PLE**: Elemento enhancer de leptina placentaria, **Sp1**: Proteína estimulante 1,

c/Jun/ATF2: Heterodímero c-Jun/factor activador de la transcripción 2. **half ERE** : sitio que contiene la mitad de la secuencia consenso de un elemento de respuesta a estrógenos.

- ***Estradiol en la regulación de la expresión de leptina placentaria***

Se ha reportado que la secreción de leptina se encuentra regulada por hormonas esteroideas [102], y se ha demostrado que el E₂ es un regulador de la expresión de leptina en el tejido adiposo y en la placenta. Sin embargo se sabe poco de la regulación de la expresión de leptina en la placenta [29].

Chardonens y colaboradores [103] observaron que el E₂ aumentaba la producción de leptina en células citotrofoblásticas humanas de placenta de primer trimestre.

Trabajos previos han demostrado que los estrógenos pueden activar al promotor LEP en las células JEG-3 de coriocarcinoma a través de ER α y sugirieron que la regulación de la biosíntesis de leptina podría depender de la existencia de ERs funcionales [104]. También se ha estudiado en los adipocitos la regulación de la expresión de leptina con la administración de E₂, y se determinó que se genera un incremento de la expresión del ARNm de leptina y de la secreción de la proteína [29]. En humanos se ha reportado que el E₂ potencia la producción de leptina en citotrofoblastos cultivados del primer trimestre [103]. Por otro lado la presencia de ERs en los trofoblastos sugiere que, como sucede en el tejido adiposo, la regulación de la expresión de la leptina placentaria sería un fenómeno mediado por ERs [29].

Al utilizarse concentraciones fisiológicas de E₂, se ha observado un aumento de la expresión de leptina en las células BeWo a nivel transcripcional, y al tratar con el antiestrogeno ICI 182,780, se produce el bloqueo de la inducción de la expresión de leptina, lo que sugiere un rol del estradiol en el control autocrino de la síntesis de leptina [94].

Sabiendo la importancia que presenta el estrógeno en la biosíntesis de la leptina, sin embargo el mecanismo por el cual el estrógeno media la expresión de leptina en la placenta humana aún no se ha definido.

Resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación apoyan la idea de la participación de ER α y E₂ en la inducción de la expresión de leptina y sugieren que la región del promotor que abarca desde -1951 hasta -1847 es suficiente para evidenciar dicha inducción. El análisis *in silico* de esta región del promotor de

leptina revela el sitio potencial *halfERE* de unión a ERs, el sitio de unión para el factor de transcripción Sp1 y el enhancer PLE, que se describió previamente [105].

Se ha demostrado que el E₂ aumenta la expresión de leptina en células placentarias, que involucra probablemente acciones genómicas y no genómicas, un *crosstalk* entre ERα y que requiere la activación de las vías de transducción de señales de MAPK y PI3K [94, 106]. Los efectos estimulatorios de E₂ sobre la expresión de leptina fueron bloqueados con PD98059 o con la sobreexpresión de la dominante negativa de MEK o MAPK, lo que sugiere la participación de esta vía en la inducción de la expresión de leptina mediada por E₂ [94, 106].

También se ha evidenciado que el E-BSA, un análogo del estrógeno impermeable a la membrana plasmática, cuyos efectos se inician a través de receptores de membrana [107], induce la expresión de leptina a través de la activación de múltiples vías de señalización que pueden regular la expresión del gen de leptina. El posible mecanismo de regulación de la expresión de leptina placentaria por E₂ es un proceso multifactorial, y podría depender en la presencia, concentración y localización de los ERs, factores de transcripción, proteínas co-regulatorias y señales de transducción, entre otros [108]. Además se ha observado en la células BeWo que el ERα se encuentra localizado principalmente en el núcleo y en la membrana plasmática pero también en la fracción citosólica [108]. Estos resultados, apoyan la idea de que el receptor de membrana se encuentre involucrado en los efectos rápidos del E₂, así como también que el receptor que media el efecto del E-BSA sería el ERα.

- *Expresión de leptina mediada por hCG*

Se ha demostrado, que la leptina presenta un efecto estimulatorio sobre la secreción del hCG al ser agregada a las células humanas de trofoblasto placentario a término y a células trofoblásticas de primer trimestre [51].

Por otro lado, hay una correlación entre las concentraciones de leptina y E₂ durante el ciclo menstrual y también entre hCG y leptina en el embarazo [109]. Probablemente entre las diferentes hormonas que secreta la placenta, hCG y leptina se encuentran involucradas en un circuito autocrino/paracrino de regulación de la función de la placenta, principalmente durante el primer trimestre del embarazo [80].

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que hCG aumenta la expresión de leptina actuando a nivel transcripcional. En las células BeWo se observa un aumento de la expresión de la leptina ejercido por la hCG, que es dosis y tiempo dependiente. También se determinó que para observar su efecto se requiere una región mínima del promotor de leptina de 218pb, donde se ha reportado la presencia de posibles sitios de unión a C/EBP y a Sp1 [80, 110]. El tratamiento con hCG actúa específicamente activando MEK y ERK1/2 en las células de placentarias, dependiendo la inducción de la expresión de leptina de la integridad de estas vías de señalización [80].

Si bien se sabe que la hCG es capaz de aumentar la síntesis de AMPc, el efecto estimulador de esta hormona sobre la expresión de leptina fue inhibido por el análogo permeable (Bu)₂AMPc. Esto podría deberse a que - como se ha reportado en otros modelos- este nucleótido disminuiría la expresión del receptor de hCG. [111, 112].

- *Expresión de leptina regulada por AMPc*

El AMPc es una de las moléculas de señalización más antiguas conocidas. El AMPc se genera a partir de ATP en una reacción catalizada por la adenilato ciclase (AC), que se localiza en la membrana plasmática [113]. El aumento intracelular del AMPc lleva a la activación de la proteína quinasa A (PKA), la cual fosforila diversos sustratos intracelulares, incluyendo a la proteína de unión a elemento de respuesta a AMPc (CREB) [114].

Se ha visto que el aumento intracelular del AMPc resulta en la disminución de la expresión del ARNm de leptina y de la secreción de leptina en adipocitos de ratas [115]. Sin embargo, estudios en placentas humanas han demostrado que el AMPc, aumenta la expresión de leptina a nivel de ARNm y de proteína [96]. Se ha observado que la secreción de leptina en células BeWo y en tejido placentario a término cultivado en monocapa, es incrementada por forskolina, un activador de la AC [73, 116]. El efecto estimulador del AMPc sobre la expresión de leptina se ha reportado en varias células no adiposas, como las células de glioma C6, las células tumorales pituitarias GH3 [117, 118], células tumorales mamarias MCF-7 [104], células gástricas MKN-74 [38], y en tejido placentario coriónico [116].

La PKA posee un rol central en la señalización de varias hormonas en la placenta, tales como la epinefrina, los prostanoides, y la hCG [119]. Más aún, existe un grupo grande de hormonas y factores de crecimiento, como el glucagon, TSH, EGF, PDGF, en los que el AMPc posee un papel importante como segundo mensajero [120]. Entre los sustratos intracelulares de PKA se encuentra CREB [114, 121]. CREB (proteína de unión al elemento CRE) es una proteína transcripcional regulada por AMPc, que se une a elementos consenso del ADN en los genes blanco que responden a AMPc. CREB es importante para la expresión de varios genes de respuesta a AMPc en diferentes tipos celulares y en respuesta a distintas señales [122].

Ha sido demostrado que el aumento en los niveles del AMPc estimula la expresión de leptina a través de la activación de la vía de señalización de PKA, la sobreexpresión de su subunidad catalítica aumenta la expresión de leptina, mientras que al tratar con inhibidores farmacológicos de esta vía se bloquean los efectos inductores del AMPc [96].

También estaría involucrada la vía de MAPK, el AMPc estimula la fosforilación de ERK1/2 y al inhibir farmacológicamente la vía se inhiben los efectos del AMPc y de PKA sobre la expresión de la leptina [96, 123].

Además MAPK inhibe la fosforilación de CREB por AMPc, por otro lado la inhibición de PKA resulta en un aumento de la fosforilación de ERK en la placenta, lo que sugiere que el aumento de la expresión de leptina que genera el AMPc, podría ser en parte independiente de la vía de PKA [96, 124].

**- Regulación de la expresión de leptina mediada por insulina,
hipoxia y glucocorticoides**

La síntesis de leptina en la placenta puede ser estimulada por la combinación de factores, como la hipoxia, la hiperinsulinemia, como por la producción de glucocorticoides, demostrando que la placenta es capaz regular la producción de leptina en determinadas condiciones fisiológicas [29, 125].

La insulina genera un aumento en la expresión de leptina placentaria, esta inducción involucra la activación de las vías de MAPK como de PI3K, y su mecanismo de acción es a través de un elemento de respuesta ubicado entre -1951 y -1546pb en el promotor de la leptina [126].

Se ha reportado que la insulina regula la expresión de leptina, tanto en adipocitos como en placenta. La administración de insulina *in vitro*, en los adipocitos, aumenta la síntesis de leptina a nivel del ARNm y a nivel proteico [127].

También se ha visto que el gen de la leptina se encuentra activamente regulado por la hipoxia a través de mecanismos que son comunes a otros genes inducibles por hipoxia [128]. La hipoxia media el aumento de la expresión de leptina a través del factor de respuesta a hipoxia, HIF-1 α [129]. La hipoxia induce la transcripción y la secreción de leptina en placenta, a través de las vías MAPK y PI3K, y actúa de modo sinérgico con la insulina, regulando la expresión de leptina placentaria a través de diferentes elementos regulatorios [125, 129]. Se ha descrito un elemento de respuesta a hipoxia que se encuentra localizado en el promotor de la leptina entre los -120 y lo -116pb [129].

Por otro lado los glucocorticoides también se encuentran involucrados en la regulación de la producción de la leptina, tanto en las células BeWo como en el tejido adiposo, estimulando su secreción y síntesis [29, 130]. El tratamiento con cortisol o dexametasona en embarazos ovinos, aumenta la concentración fetal de leptina, mientras que la adrenalectomía suprime la expresión de leptina [131], semejante a lo que sucede en los ratones que presentan una producción deficientes de glucocorticoides [132].

Se ha descrito que la producción de leptina por las células citotrofoblásticas de primer trimestre se encuentra regulada por las interleuquinas IL-1 α y IL-6 [102]. Es interesante destacar que la leptina y la IL-6 presentan similitudes estructurales en sus receptores y también comparten el modo de señalización [133, 134].

Así como el estrógeno y los corticoides se asocian al aumento de la síntesis de leptina, los andrógenos se consideran que generan una inhibición en la expresión de leptina [135].

Estrógenos: 17 β -estradiol

Los estrógenos son hormonas esteroideas que regulan el crecimiento, la diferenciación y el funcionamiento de una amplia gama de tejidos blanco en el cuerpo humano, principalmente el tracto reproductivo femenino y masculino [136]. Los estrógenos incluyen al estriol (E₃), una cantidad significativa de 17- β -estradiol (E₂) y estrona (E₁) [137]. El E₂ es el estrógeno más potente en el humano [97].

La concentración de estrógeno aumenta significativamente después de la novena semana de gestación, llegando a ser de 3 a 8 veces más elevada que en aquellas mujeres que no se encuentran embarazadas, y su producción principalmente es generada por la placenta [20]. La síntesis de andrógenos y estrógenos en la placenta depende de la dehidroepiandrosterona (DHEA) y la dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S), producidas por las glándulas adrenales maternas y fetales, ya que no es capaz de usar los precursores de los estrógenos, al no expresar la placenta el citocromo p450 17 α -hidroxilasa [138].

Receptores de estrógenos

Los estrógenos dependen de la presencia de dos miembros de la superfamilia de receptores nucleares, ER α y ER β , y también de un receptor de membrana acoplado a proteína G, GPR30 [97, 139].

Los receptores ER α y ER β son los más caracterizados, y son codificados por genes localizados en cromosomas distintos, el ER α es codificado por el gen *ESR1* localizado en el cromosoma 6q(25.1), mientras que el ER β es codificado por el gen *ESR2*, localizado en el cromosoma 14q(23-24) [140, 141].

Los ERs presentan dominios con funciones autónomas. En el extremo amino terminal se encuentran los dominios A y B, responsables de la interacción con otras proteínas y de la activación de la transcripción independiente de ligando (AF-1). Luego se encuentra en la región central el dominio C, que dirige la dimerización del receptor y la unión al ADN, y el dominio D, que funciona como una bisagra, participando en la dimerización. Cercano al extremo carboxiterminal se halla el dominio E, responsable del reconocimiento y la unión al ligando. Este dominio presenta un sitio activador de la transcripción dependiente de ligando (AF-2) y junto con el dominio D dan lugar al sitio de unión a proteínas chaperonas de shock térmico. Por último se encuentra el dominio F, modulador de la actividad transcripcional de los ERs (**Figura 14**) [142-144].

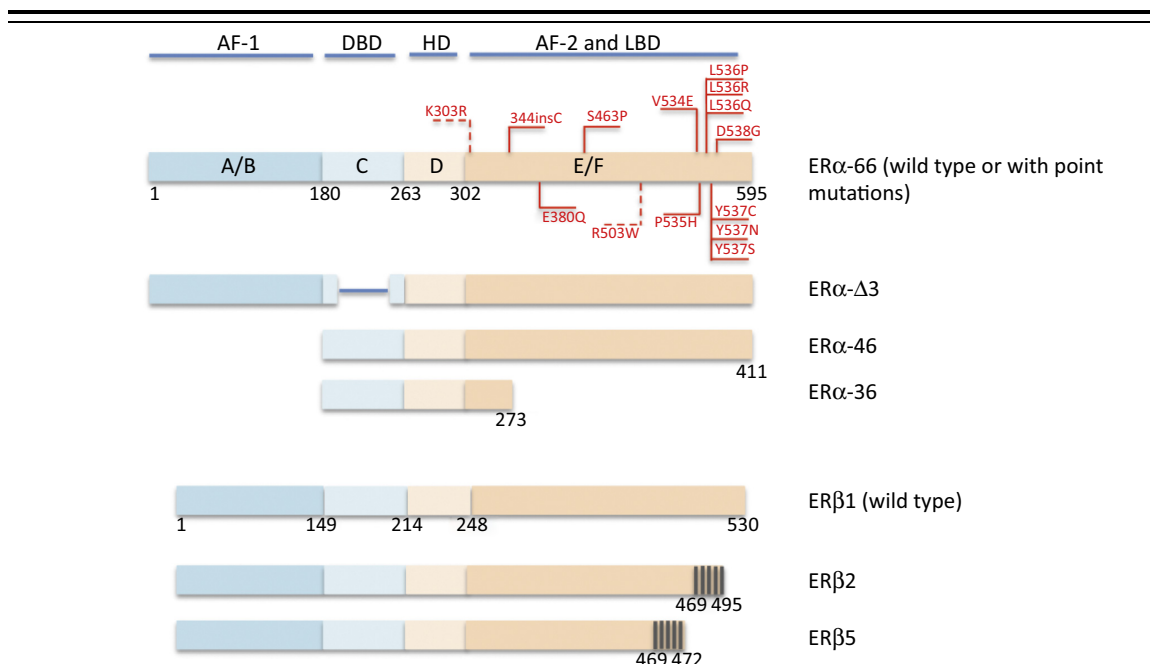


Figura I14: Isoformas de los receptores del estrógeno α y β . Se indica la cantidad de aminoácido que contiene cada isoforma. DBD: dominio de unión al ADN; LBD: dominio de unión al ligando; AF-1: dominio amino terminal [145].

Se sabe que el ER α está localizado predominantemente en mama, útero, cérvix, vagina, cerebro, hueso, corazón, placenta y muchos otros órganos blancos, por otro lado el ER β , presenta una expresión mas limitada y se detecta principalmente en ovario, próstata, testículos, placenta, bazo, hipotálamo, riñón, timo, tracto gastrointestinal y pulmón [136, 146].

El ER α es la principal isoforma del receptor que media los efectos de los estrógenos en el útero [147]. Una variante humana del ER α , llamada ER α 36, se clonó de placenta. Este ER α 36 no contiene los dominios de transactivación, AF-1 y AF-2, y posee intacto el dominio de unión al DNA, el ligando de unión truncado y el dominio parcial de dimerización [148].

Mecanismos de Acción

Los receptores de estrógenos pueden ejercer su acción a través de distintos mecanismos. Como factores de transcripción, los ERs pueden regular la expresión génica a través del mecanismo clásico, reclutando diferentes coactivadores y corepresores e interactuando con secuencias específicas de ADN conocidas como

ERE (elemento de respuesta a estrógenos). Sin embargo, los ERs también pueden regular la transcripción a través de elementos de respuesta alternativos, interactuando con otros factores de transcripción y modulando su actividad.

Por otro lado los ERs, pueden activar cascadas de señalización iniciadas en la membrana plasmática o en citoplasma (**Figura I15**) que pueden modular ciertos factores de transcripción. Los ERs pueden ser activados en ausencia de ligando, generalmente como parte de la activación de otro receptor, a través de modificaciones post-traduccionales generalmente [142].

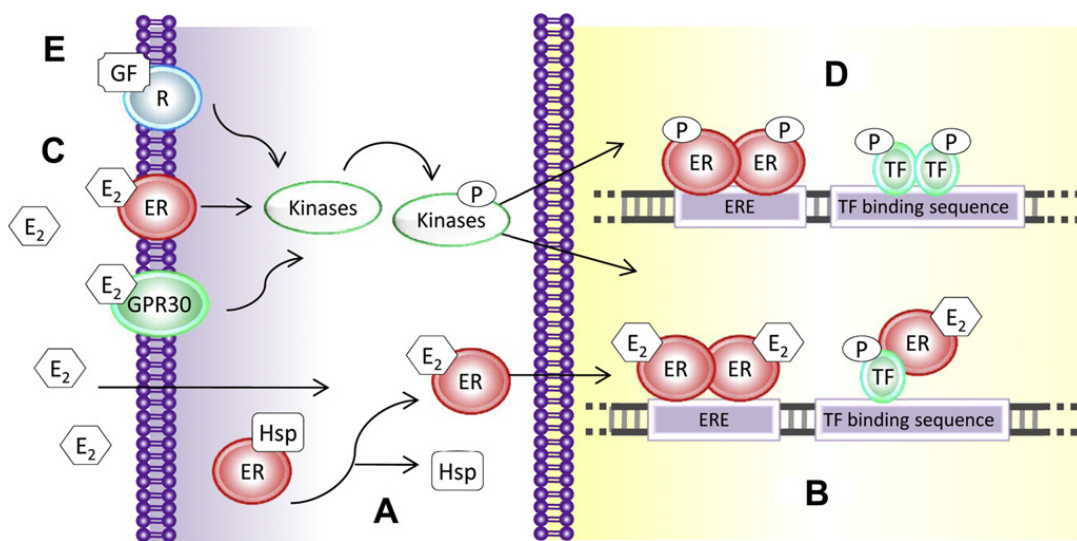


Figura I15: Mecanismos de acción de los ERs. **A.** El estrógeno (E_2) se une a los receptores de E_2 (ER) e induce a la disociación de las proteínas Hsp, la translocación al núcleo y la dimerización. **B.** En el complejo E_2 /ER se une directamente a la secuencia conocida como elemento de respuesta a E_2 (ERE) o interactúa con otros factores de transcripción (TF) en los promotores de los genes blanco. **C.** En la membrana, el E_2 interactúa con ER y con GPR30 activando vías de señalización, involucrando distintas quinasas. **D.** Esas vías regulan la expresión génica a través de la fosforilación (P) y activación de factores de transcripción. **E.** Distintos factores de crecimiento (GF) activan la cascadas de la proteína-quinasa, permitiendo la fosforilación y la activación de los receptores de estrógenos aún en ausencia de E_2 [108].

Cuando hablamos del mecanismo clásico, éste involucra la activación de los ERs a través de la unión del estrógeno a su receptor, luego de lo cual el receptor dimeriza

y se une a elementos de respuesta específicos, localizados en el promotor de los genes blanco [97].

La longitud y la secuencia nucleotídica del elemento ERE determina la afinidad de la interacción con los ERs y en consecuencia, el reclutamiento de otras proteínas [149]. Durante la transcripción las modificaciones post-traduccionales como la metilación y la acetilación del receptor promueven a la disociación del complejo, sin embargo la ubiquitinación de los ERs puede generar una nueva activación de estos receptores o inducir su degradación [150].

También podemos hablar de un mecanismo “no genómico” o “rápido”, donde la hormona ejerce su efecto segundos o minutos después del estímulo, siendo demasiado rápido como para estar mediado por la activación de ERs nucleares, por lo que se considera que la misma requeriría de la presencia de receptores de membrana plasmática [149]. Se ha demostrado que el E₂ activa rápidamente varias vías de transducción de señales, como las mediadas por proteínas-quinasa, por ejemplo la vía MAPK- incluyendo la activación de ERK, p38-MAPK y JNK- PI3K (fosfoinositol 3-quinasa), JAK/STAT (quinasa de la familia Janus/STAT), y las mediadas por fosfatasas, también estimula la activación de señales mediadas por nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc) y calcio, dependiendo del tipo celular [142, 143, 151]. Se ha evidenciado que ER α y ER β son capaces de mediar los efectos rápidos del E₂. Teniendo en cuenta que los ERs no poseen un dominio transmembrana, se han identificado tres posibles mecanismos que dirigirían a estas proteínas a la membrana plasmática: la asociación con otra proteína de membrana, la interacción con receptores de membrana y la modificación lipídica de los ERs [143].

La respuesta rápida a estrógenos puede depender de la presencia de receptores, del tipo de receptor y de las moléculas transductoras de señales y sus blancos de acción en los distintos tipos celulares [97].

En el caso de que el E₂ se uniera en la membrana plasmática a la proteína GPR30, los efectos del estrógeno estarían mediados por receptores de siete pasos transmembrana acoplados a proteína G (GPCRs) [139]. Pero actualmente, GPR30, presenta ciertas discrepancias en su mecanismo de activación, ya que responde a estrógenos con alta afinidad, pero también actúa como agonista con los inhibidores de los receptores clásicos de estrógenos, como ICI 182,780 y el 4-hidroxi-tamoxifeno en altas concentraciones [152, 153]. Falta mucho por responder sobre este receptor,

teniendo en cuenta que puede actuar en las acciones rápidas y crónicas de distintos agonistas e inhibidores, así como también falta dilucidar su posible participación en procesos fisiológicos normales y patológicos [154].

Funciones de los estrógenos durante el embarazo

En una mujer no embarazada, los ovarios son los responsables de la producción de la mayor parte de los estrógenos; en cambio, a partir de la séptima semana de gestación la mayor parte de los estrógenos de la circulación materna son producidos por la placenta. Durante el embarazo, la producción de E_2 aumenta 80 veces, desde 0,75nM en el pico preovulatorio hasta 60nM en el embarazo a término [155].

Funciones

Durante las primeras etapas de la gestación, el E_2 influye en varios aspectos del funcionamiento placentario y del desarrollo fetal, regulando la implantación, la diferenciación e invasividad de los trofoblastos, la remodelación de las arterias uterinas, la modulación del sistema inmune y la producción hormonal [108, 155].

Durante la implantación, la acción de la progesterona y los estrógenos sobre el útero regula la producción local de citoquinas, factores de crecimiento, factores de transcripción y prostaglandinas, promoviendo la receptividad uterina [156].

La progesterona y el E_2 son críticos para la regulación de la decidualización endometrial y luego una vez que ocurrió la fecundación, los estrógenos maternos son necesarios durante la implantación del blastocisto ya que se ha evidenciado que tanto el E_2 como el receptor $ER\alpha$ están involucrados en la liberación de la zona pelúcida, y la implantación temprana durante el establecimiento del embarazo [157, 158].

Los estrógenos presentan un rol central en la regulación de la diferenciación bioquímica, fisiológica y morfológica de las células trofoblásticas [159]. Se ha demostrado que el E_2 estimula morfológicamente la diferenciación de citotrofoblasto, a sincitiotrofoblasto tanto de la línea celular BeWo como en placentas humanas. Esta acción estimuladora específica del E_2 , se vio inhibida por el

antagonista del ER, ICI 182,780 [159, 160]. La diferenciación celular inducida por estradiol podría estar mediada a través de la actividad de TGF β 1 [161]. Esta diferenciación está acompañada por la pérdida de la expresión de ciclina A2 y E, así como también del aumento de la expresión del inhibidor p27, lo cual está relacionado con el cese de la proliferación celular en el trofoblasto humano [137].

Durante el primer trimestre de embarazo, en humanos y en primates, una población de citotrofoblasto extraveloso (EVT) migra e invade las arterias espiraladas del útero [162, 163]. Está demostrado que los estrógenos juegan un papel en la regulación de la invasión y la remodelación de las arterias uterinas por los EVT en la gestación del mandril. Los bajos niveles de E₂, durante la primera etapa de la gestación en los primates es requerida para permitir una progresión normal de la invasión vascular del trofoblasto, y el aumento de E₂ que surge en el segundo tercio del embarazo suprime dicha invasión [162].

Además se ha observado que los estrógenos tienen un rol importante en la estimulación del crecimiento vascular en la placenta de primates a partir de la regulación positiva de la expresión de VEGF en el embarazo. Asimismo, este efecto estimulador es específico de las células citotrofoblásticas y no de las células estromales vellosas internas [164].

Otra función que cumplen los estrógenos es regular el sistema inmune, ya que presenta efectos proinflamatorios o antiinflamatorios dependiendo de la concentración y/o del tejido [165]. Hay evidencias que demuestran que el estradiol es capaz de modular la liberación del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) en explantos de vellosidades coriónicas [166]. MIF es un modulador esencial en la respuesta inmune e inflamatoria, regulando la generación de metaloproteinasas de matriz extracelular, la producción del ácido araquidónico, óxido nítrico y diversas citoquinas [166].

Distintos estudios indican que los neutrófilos provenientes de mujeres embarazadas a término poseen una apoptosis retardada, lo que representa una neutrofilia fisiológica que puede ser inducida por E₂ y por progesterona. Estos resultados, sugerirían que estas dos hormonas estarían regulando el número y la función leucocitaria [167]. También hay evidencia que en concentraciones fisiológicas, los

estrógenos regularían la producción de Th1 y Th2, sin embargo en la última etapa del embarazo los estrógenos se comportarían como inmunosupresores de la respuesta Th1 y como inductores de Th2 [168]. Teniendo en cuenta que el balance entre estas poblaciones estaría regulando la invasión trofoblástica, la remodelación vascular uterina, y el control del sistema inmune y endócrino, permitiendo el crecimiento y desarrollo embrionario [169].

Se ha visto que los estrógenos también regulan funciones bioquímicas en las células trofoblásticas, tales como la producción de hormonas. En primates, el E₂ parece controlar la formación de progesterona placentaria [137]. En humanos, el E₂ induce el aumento diario de la producción de hCG en células de citotrofoblasto y también estimula la expresión de la hormona lactógeno placentaria humana (hPL) de manera dependiente de hCG [159].

También se ha demostrado que el E₂ reprime la expresión de la hormona liberadora de corticotrofina (CRH), a través de un mecanismo mediado por ER α , lo que genera un aumento de la concentración de CRH en el plasma materno e influencia la longitud de la gestación [160].

Interacción con otros factores de transcripción

Está reportado que los ERs pueden regular la expresión génica modulando la función de otros factores de transcripción mediante interacciones proteína-proteína [97].

Los receptores ER α y ER β pueden interactuar con factores como Sp1 (proteína estimulante 1), CREB (proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc), AP-1 (proteína activadora 1), NF κ B (factor nuclear κ B), RUNX1 (factor de transcripción 1 relacionado con Runt), p53 y STAT-5 (señal activadora y transductora de la transcripción 5), los cuales regulan la transcripción génica interactuando con sus propias secuencias regulatorias presentes en las regiones promotoras [142, 144, 150].

En este trabajo nos enfocamos particularmente en los siguientes factores:

- *SP1*

Sp1 es un factor de transcripción que se encuentra presente en todos los

tipos celulares de los mamíferos [170]. Originalmente fue descrito como un factor ubicuo de 778 aminoácidos que reconoce en el ADN secuencias ricas de GC. Su dominio de unión al ADN contiene tres dedos de zinc, mientras que su región amino terminal contiene dominios ricos en serina, treonina y glutamina, esenciales para la actividad transcripcional. El dominio carboxiterminal está involucrado en la interacción con otros factores de transcripción [171]. Sp1 es miembro de la familia de factores tipo Kruppel (Sp/KLF), que actualmente tiene un total de 26 miembros [172]. Se sabe que se encuentra involucrado en la regulación tejido específica, del ciclo celular y distintas vías de señalización de respuesta a genes [173].

Con el estudio del mapeo cromosómico se han identificado al menos 12000 sitios de unión para Sp1 en el genoma humano, asociados con genes en la mayoría de los procesos celulares [174]. Además su nivel de expresión se ha visto que varía en los distintos tipos celulares y según los distintos estadios del desarrollo del ratón [175]. También se ha determinado que es necesario para la activación transcripcional de Hsp 70.1, uno de los primeros genes en expresarse luego de la fertilización en los embriones de ratones [176], resaltando la importancia de Sp1 en el desarrollo.

Sp1 funciona a través del reclutamiento de la maquinaria basal de transcripción y de la interacción con la proteína de unión TATA (TBP) y múltiples factores asociados a TBP (TAFs) [173]. Por este motivo se puede decir que Sp1 regula la transcripción por la comunicación con la maquinaria de transcripción de la RNA polimerasa II.

El Sp1 también regula la expresión de los genes a partir de la modulación del estado de la cromatina. Se ha descubierto que interactúa con enzimas que modifican histonas, incluyendo la histona acetil transferasa p300. Por lo que la expresión de los genes puede ser aumentada tanto por el cambio de la cromatina en el promotor hacia una estructura mas permisiva o a través de la unión de un activador transcripcional como lo es el Sp1 [177].

Sp1 presenta una variedad de posibles interactores dependiendo del tipo de célula y la señal extracelular, los cuales regulan la transcripción dependiente de Sp1 [178, 179]. Uno de éstos es la proteína ER que se puede unir al Sp1 y activar la transcripción sinérgicamente. ER se une al Sp1 y aumenta la unión de Sp1 al DNA al elemento de respuesta a estrógeno independiente de estrógeno, pero la transactivación de este gen solo es aumentada en presencia de estrógeno [105].

Evidencia experimental indica que la interacción entre Sp1 y ER α regula la expresión de múltiples genes, algunos de los cuales están involucrados en la regulación del crecimiento celular y en el desarrollo del cáncer de mama [180].

En respuesta a la estimulación estrogénica ER α interactúa con Sp1 transactivando genes que contienen sitios de unión a Sp1 y sitios ERE (o half ERE), de modo que ambos factores interactúan con el ADN. Sin embargo, el ER α también puede activar la transcripción sin tomar contacto con el ADN, interactuando con el dominio carboxiterminal de Sp1, de modo que este último factor se une a secuencias ricas en GC [149, 180].

- **CREB**

Otros factores de transcripción a los cuales pueden asociarse los ERs son ATF-2/CREB (factor activante de la transcripción) [149].

CREB pertenece a la superfamilia bZIP de factores de transcripción, presenta un dominio carboxiterminal básico que media la unión con el ADN y un dominio con motivos cierre de leucina que facilita la dimerización, la cual le permite la interacción con elementos regulatorios denominados CRE (elemento de respuesta a AMPc). Los dominios restantes están involucrados en la interacción con coactivadores y con la maquinaria basal de la transcripción, regulando así la síntesis de ARNm [181]. Se ha demostrado que existe una interacción proteína-proteína entre ERs y CREB, la cual sería necesaria para la sinergia transcripcional que se observa entre las vías de señalización activadas por E₂ y las relacionadas con el AMPc. Dado que CREB puede aumentar la actividad transcripcional de genes que contienen elementos ERE pero no contienen elementos CRE, se piensa que CREB es reclutado como parte de un complejo de proteínas coactivadoras, donde CREB estabilizaría la interacción entre ER y CBP (proteína de unión a CREB) [182].

CBP es un coactivador promiscuo que modula la actividad de distintos factores de transcripción, aumentando la actividad del ER. Tanto *in vivo* como *in vitro*, la interacción ER/CBP puede darse aún en ausencia de ligando, dependiendo del estado de fosforilación del ER e involucrando a sus dominios A/B [183]. CBP funciona como un integrador que conecta factores de transcripción con la maquinaria basal de la transcripción [184]. Además, CBP es una histona

acetiltransferasa (HAT) que es capaz de acetilar a las cuatro histonas centrales [185, 186].

El nivel estable de acetilación de las histonas centrales es el resultado del balance entre la actividades opuestas de la HATs y de las histonas deacetilasas (HDACs) [187]. En general, el aumento de nivel de la acetilación de histonas (hiperacetilación) está asociado al aumento de la actividad transcripcional, por el otro lado la disminución del nivel de la acetilación (hipoacetilación) se encuentra asociada a la represión de la expresión génica [187-189]. La inhibición de las HDACs puede resultar en la hiperacetilación de las histonas, lo que genera una activación transcripcional de ciertos genes a través de la relajación de la conformación del ADN [190].

- *NFκB*

También hay que hacer referencia a la interacción que tiene lugar entre los ERs y el factor de transcripción NFκB. Es un dímero que puede estar formado por las subunidades p50, p65 (Rel A), p52, c-Rel y Rel B. La actividad transcripcional se atribuye a p65, c-Rel y Rel B, aunque en ciertas condiciones los homodímeros p50 son activos [191].

En la mayoría de las células, NFκB está presente en el citoplasma de modo inactivo, acomplexado con la proteína IκB. Como respuesta a un estímulo IκB se fosforila y se degrada, permitiendo la translocación de NFκB al núcleo, donde actúa como un factor de transcripción [191].

Se observó en la mayoría de los sistemas estudiados que los estrógenos y la vía de señalización del NFκB son mutuamente antagonistas. Por ejemplo, la regulación del promotor de IL-6 fue analizada en profundidad, y la activación inducida por NFκB de este gen, estaba siendo inhibida por los estrógenos [192].

Sin embargo nuevos estudios han demostrado que podría ocurrir un entrecruzamiento transcripcional positivo entre ER y el NFκB [193, 194]. En cada caso, el mecanismo utilizado para el entrecruzamiento positivo parecería involucrar la formación de complejos entre las familias de ER y NFκB en un sitio ERE [195].

Como se puede ver esta regulación ya sea positiva o negativa que ejerce el estrógeno sobre el NFκB, es dependiente del contexto del promotor.

HIPÓTESIS

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

- La leptina posee importancia fisiológica en la reproducción y embarazo.
- El estradiol, importante en el establecimiento y desarrollo embrionario induce la expresión de leptina a nivel transcripcional a través de efectos genómicos y no genómicos.
- El efecto de estradiol sobre la expresión de leptina involucra receptores $ER\alpha$ presentes en la membrana plasmática y la activación de distintas vías de transducción de señales.
- El receptor nuclear $ER\alpha$ puede modular la transcripción de genes interactuando con diferentes factores de transcripción

Por lo tanto planteamos que la expresión de leptina, como citoquina placentaria, es regulada por estradiol a través de la actividad transcripcional mediada por $ER\alpha$. Este receptor nuclear induce la expresión de leptina involucrando a los factores de transcripción Sp1 y NFkB. Además proponemos que distintas vías de señalización están involucradas en la inducción de la expresión de leptina por estradiol, entre ellas la vía de señalización dependiente de PKA.

OBJETIVOS

El dialogo materno-fetal, en el embarazo, es esencial para la implantación y requiere de interacciones a nivel molecular y celular en una forma espacial y temporal coordinada. En particular en éste trabajo de tesis nos abocamos al estudio de la regulación de la expresión de una citoquina, la leptina en la interfase materno-fetal y el estudio de las vías de transducción de señales utilizadas

Objetivo general:

- Estudiar la inducción ejercida por el E₂ sobre la expresión de leptina en células trofoblásticas humanas, analizando los factores de transcripción que modulan su acción y las vías de transducción de señales involucradas.

Objetivos particulares:

- Estudio de la participación del factor de transcripción Sp1 en la regulación ejercida por el estradiol sobre la expresión de leptina en células placentarias.
- Estudio de la participación del factor NFκB en la regulación ejercida por el estradiol sobre la expresión de leptina en células placentarias
- Efecto de la vía de transducción de señales dependiente de PKA en la regulación ejercida por el estradiol sobre la expresión de leptina en células placentarias

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelos Experimentales

Explantos Placentarios

Los explantos placentarios presentan distintos tipos celulares como los fibroblastos, miofibroblastos, músculo liso, células endoteliales, células sanguíneas y células de Hofbauer, particularmente nosotros nos enfocamos en el estudio de los trofoblastos los cuales presentan la arquitectura celular del tejido *in vivo* [196].

Se ha reportado la expresión y secreción de leptina así como también la actividad inductora de distintas vías de señalización en las células trofoblásticas de los explantos placentarios [52, 116].

El uso de las placentas está avalado por el comité de ética del Hospital Profesor A. Posadas y está aprobado con el consentimiento escrito de las pacientes.

Línea Celular BeWo

Es una línea citotrofoblástica que crece formando una monocapa y posee propiedades morfológicas y marcadores bioquímicos enzimáticos comunes con los trofoblastos normales. Deriva de coriocarcinoma humano. Preserva la capacidad de producir hormonas (HCG, progesterona, hLP, estrógenos) y la morfología de los citotrofoblastos que le dieron origen. Son incapaces de diferenciarse en sinciotrofoblastos de modo espontáneo, pero la sincitialización puede inducirse hormonalmente [197, 198].

Reportes previos muestran la capacidad de esta línea celular de expresar leptina y su receptor [72] como también así los receptores de estrógeno ER α y ER β [199].

Protocolos Experimentales

CULTIVO CELULAR

Se utilizó la línea celular BeWo, células trofoblásticas derivadas de coriocarcinoma. Los cultivos se manipularon en esterilidad dentro de una cámara de flujo laminar, dentro de botellas de 75 cm², a 37°C, y atmósfera de 5% CO₂.

El medio utilizado para mantener el cultivo fue DMEM-F12 (Gibco) suplementado con penicilina-estreptomicina 50 U/ml, glutamina 4 mM, piruvato 1mM (Invitrogen) y suero fetal bovino (SFB) 10% (Natocor).

Se tripsinizaron las células al llegar a un 80% de confluencia, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron con 5ml de PBS (NaCl 137mM, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄ 2mM, NaH₂PO₄ 10mM, pH7,4), y se trató con tripsina (Invitrogen) durante 5 minutos a 37 °C. Una vez despegadas las células, se agregó 10 ml de medio, y se resuspendió reiteradas veces, finalmente se realizó una dilución a partir de ésta solución, y posteriormente o se abre una nueva botella o se congela un stock.

1.1 Congelado de células

Para conservar el stock de la línea celular, se realiza el congelado de la misma luego de la tripsinización. Para ello, se adicionó 10ml de DMEM-F12 una vez terminado los 5 minutos de incubación con tripsina, se centrifugó 10 minutos a 900rpm. Al finalizar se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de SFB con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). La suspensión se alicuotó en crioviales, los cuales se enfriaron lentamente hasta llegar a una temperatura de -70 °C.

1.2 Tratamientos

Los tratamientos realizados en cada experimento se pueden encontrar detallados en la leyenda de las diferentes figuras. De manera amplia, las células BeWo fueron incubadas en medio DMEM/F12 1% o 0% SFB. En todos los experimentos se incluyó una muestra control que contiene el vehículo de las drogas.

- Los tratamientos aplicados al medio de cultivos fueron: 17β-estradiol (E₂, Sigma)

-
-
- ICI 182,780 (antiestrógeno, AstraZéneca)
 - SQ 22536 (Inhibidor de adenilato ciclasa, Sigma)
 - H89 (Inhibidor de proteína quinasa, Sigma)
 - Sulfasalazina (Inhibidor de NFκB, Sigma)
 - TSA (Tricostatina A, inhibidor de deacetilasas de histonas, Sigma)

EXPLANTOS PLACENTARIOS

Las placentas humanas a términos se obtuvieron de partos naturales o cesáreas y fueron almacenadas en PBS frío. Posteriormente se realizan lavados con PBS para la eliminación de exceso de sangre.

Los explantos se extrajeron de las vellosidades al azar, de la cara materna, decir de donde con pinzas y tijeras quirúrgicas.-Estos fueron elegidos al azar en zonas libres del infartos, calcificaciones o hematomas, de al menos aproximadamente 0,1g, luego se los colocar con en PBS para completar el lavado.

Los explanto se colocaron en placas de 24 pocillos, con un 1 ml de medio DMEM/F12 sin suero ni suplemento. Posteriormente se lo incubó 20 minutos en la estufa a 37 °C para aclimatar el tejido, posteriormente se realizó el tratamiento correspondiente, ya sea para analizar proteínas por Western Blot o para extraer ARN para el análisis por qRT-PCR.

WESTERN BLOT

2.1 Extractos proteicos de líneas celulares

Para obtener los extractos proteicos las células fueron crecidas en placas de 10cm con DMEM/F12 10% SFB hasta llegar a una confluencia de un 80%, luego se reemplazó el medio por DMEM/F12 1%SFB, y se colocó el tratamiento correspondiente.

Posteriormente se lavó con 2 ml de PBS y se despegaron las células de manera mecánica con un rastrillo de goma en 1 ml de PBS. Luego se centrifugó 5 minutos a 10000rpm y el pellet se resuspendió en 100μl de buffer de lisis (Tris 5mM pH 6,8, EDTA 20mM, SDS 0,1%, NP40 1%).

2.2 Preparación de las muestras para Western Blot de explantos placentarios

Los explantos fueron incubados durante 24hs para medir los niveles de leptina mediante Western blot, en cada figura se pueden ver las drogas adicionadas en cada experimento.

En todos los casos se usó un control negativo, y en los casos donde el tratamiento usara 17 β -estradiol o inhibidores éstos últimos fueron añadidos 30 minutos antes que la hormona.

Al finalizar las 24hs de incubación, se extrajeron los explantos y se los colocó en tubos nuevos y se les agregó 300 μ l de buffer de lisis (Tris ácido 0,2 M, Tris base 0,6 M, NaCl 0,6 M, CaCl₂ 0,4 M, MgCl₂ 0,2 M, 10% glicerol, 1% NP-40, PPI 0,02 mM, PMSF 5 μ M, NaVO₃ 1 μ M, Bestatina 1 μ M, Benzamidina 1 μ M).

Luego se colocaron 30 minutos a -20 °C, y al finalizar el tiempo se agitaron las muestras para a continuación centrifugarlas a 10000 rpm por 20 minutos, y se recuperó el sobrenadante para la determinación proteica.

La concentración de proteínas se determinó con el kit de reactivos BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Scientific), con 10 μ l de muestra.

El volumen de la 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 β -mercaptoetanol, 10% glicerol, EDTA 0,1 M, 0,1% azul de bromofenol).

2.3 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método colorimétrico BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Scientific). Se utilizaron 10 μ l de muestra, la lectura de absorbancia se realizó a 595nm. La concentración proteica de cada muestra se determinó realizando una curva de calibración con BSA (ThermoFisher).

El volumen de la 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, β -mercaptoetanol, 10% glicerol, EDTA 0,1 M, 0,1% azul de bromofenol).

2.4 Geles desnaturalizantes de proteínas

Las muestras fueron analizadas mediante la técnica SDS-PAGE. Se utilizaron geles de poliacrilamida a 12%. Se sembraron en cada calle igual cantidad de proteína de cada muestra, 50µg de proteína por calle. Siempre en cada experimento se sembró en una calle en paralelo a la muestra un marcador de peso molecular preteñido (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific). La electroforesis se realizó en buffer de corrida (Tris 250mM, glicina 1,92M) a 120 V durante aproximadamente 2 horas.

2.5 Transferencia e incubación con los anticuerpos

Al finalizar la migración electroforética se procedió a realizar la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosas no cargadas. (Hybond, Amersham Pharmacia) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para ello se utilizó buffer de transferencia (Tris 25mM, Glicina 192mM, 2% metanol) a 120 V durante 90 minutos en frío. Una vez finalizada la transferencia, se incubó la membrana O.N a 4°C en agitación, con el anticuerpo primario correspondiente diluido en 5% de leche descremada disuelta en PBS. Los anticuerpos primarios utilizados fueron:

- Anti-leptina humana (1:1000, Y-20, policlonal, conejo, Santa Cruz)
- Anti-phosphoCREB (1:1000, policlonal, conejo, Millipore)
- Anti-H3 (1:500, monoclonal, ratón, Santa Cruz)
- Anti-Sp1 (1:1000, monoclonal, conejo, Millipore)
- Anti-ERα (1:500, policlonal, conejo, Santa Cruz)
- Anti-p65 (1:100, monoclonal, ratón, Santa Cruz)
- Anti-GAPDH (1:2000, monoclonal, ratón, Santa Cruz)

Al finalizar la incubación, se realizaron 4 lavados de 5 minutos con PBS-Tween 0,05% y luego se incubó la membrana con el anticuerpo secundario diluido en 5% de leche descremada disuelta en PBS, a 4°C O.N. en agitación. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron:

- Anti-conejo (1:1000, cabra, Sigma, conjugado a HRP)
- Anti-ratón (1:1000, cabra, Sigma, conjugado a HRP)

Luego de la incubación con el anticuerpo secundario, se efectuaron 4 lavados de 5 minutos con PBS-Tween 0,05% y se reveló por quimioluminiscencia con 200µl del reactivo A más 200µl del reactivo B del ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

Los controles de carga se realizaron con el anticuerpo anti-GAPDH. Las bandas se visualizaron con el GBox, Syngene, y fueron cuantificadas con el software Image J y se relativizaron a la señal del control de carga correspondiente.

TRANSFECCIONES TRANSITORIAS

3.1 Bacterias competentes

Se tomó 100µl de cultivo *E. coli* DH5α, conservada a -70°C, se puso a incubar a 37°C O.N en 100ml de LB (10g de triptona, 5g extracto de levadura, 5g NaCl, pH7.4). Posteriormente, se sembraron 10ml del cultivo en 90ml de medio de LB y se agitó a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600nm (aproximadamente 2 horas). Se centrifugó a 4°C 5 minutos a 5000 rpm y se resuspendió el pellet en 5ml de CaCl₂ 50mM. Se colocó en hielo por 30 minutos y se volvió a centrifugar por dos minutos a 4°C, a 5000 rpm. Luego el pellet se resuspendió en 150µl de CaCl₂ conteniendo 15% de glicerol (Merck). Alícuotas de 100µl de estas bacterias competentes fueron almacenadas a -70°C.

3.2 Transformación plasmídica

Una alícuota de 100µl de bacterias competentes se incubaron con 100ng de ADN plasmídico, se las dejó en hielo durante 30 minutos y luego se las incubó durante 1 minuto 30 a 42°C. Se les agregó 1ml de LB y se incubó 30 minutos a 37°C. Al finalizar el tiempo se centrifugó y descartó el sobrenadante dejando una gota remanente, y se resuspendió el pellet en esa gota.

Las bacterias fueron plaqueadas en LB 3% agar conteniendo 100µg/ml de ampicilina (laboratorio Bagó), se las dejó O.N a 37°C para obtener colonias de bacterias transformadas. También se largaron placas controles con bacterias competentes sin transformar.

3.3 Minipreparación de plásmidos

Para verificar la presencia plasmídica en las bacterias, se realizó una minipreparación de ADN plasmídico.

Se escogieron al azar varias colonias previamente transformadas y se crecieron en 2 ml de LB con ampicilina (100µg/ml) O.N. en agitación a 37°C. Luego de cada cultivo se tomaron 500µl, que se conservó en glicerol 30% a -70°C para realizar posteriormente la Midiprep.

El resto del cultivo se centrifugó por 5 minutos a 5000 rpm y se resuspendió el pellet en 100µl de solución I (Tris HCl 25 mM, EDTA 10mM, pH8) y se adicionó RNasa (20µg/ml concentración final) más 200µl de solución II (NaOH 0,2 N, 1% SDS) y se mezcló todo por inversión y se dejó en hielo por 10 minutos. Luego se agregó 150µl de solución III (acetato de potasio 5M, pH5,2) fría, y se volvió a incubar en hielo por 10 minutos. Al finalizar la incubación se centrifugó 15 minutos a 10000rpm para precipitar el ADN genómico, y se transfirió el sobrenadante a un Eppendorf nuevo, midiendo el volumen recuperado. Se prosiguió con la purificación mediante dos extracciones con un volumen de fenol:cloroformo (1:1). Se mezcló por inversión y se centrifugo a 10000 rpm por 2 minutos para separar las fases. La fase acuosa se pasó a un Eppendorf nuevo, y se agregó dos volúmenes de etanol absoluto y se dejó reposar 30 minutos a -20°C. Para finalizar se centrifugó 20 minutos a 10000rpm, eliminando el sobrenadante, se dejó secar el pellet y se resuspendió en 20µl de agua destilada libre de nucleasas.

Para analizar la presencia de ADN plasmídico se corrieron las muestras en geles de agarosa 1% (Sigma). Se sembraron 10µl de cada preparación 4µl de buffer de siembra (azul bromofenol 0,25%, xilene cianol 0,25% y glicerol 30%) por pocillo. También se sembró 3µl del marcador de peso molecular y masa, fago λ digerido con EcoRI y Hind III (Promega).

La corrida electroforética se realizó a 100 Volts durante 40 minutos en buffer TAE 1% (Tris acético 0,04M, EDTA 1mM) y se reveló con bromuro de etidio 5µg/ml (Sigma). Las bandas obtenidas se observaron por fluorescencia frente al UV.

3.4 Midipreparación de plásmidos

Este protocolo se utilizó para la preparación de plásmidos a mayor escala y pureza, para ello se empleó el kit de Midipreparación plasmídica Wizard Plus (Promega). Se incubaron 200µl del cultivo E. Coli transformado con el plásmido a extraer en 200ml de LB conteniendo 100µg/ml de ampicilina, O.N. a 37°C en agitación. Luego el cultivo se centrifugó 15 minutos a 5000rpm a 4°C, y el pellet se resuspendió en 3ml de solución de resuspensión por inversión. Se agregaron 3ml de solución de lisis se mezcló nuevamente por inversión y se dejó en hielo durante 10 minutos. Posteriormente se agregaron 3ml de solución de neutralización y se centrifugó 20 minutos a 10000rpm. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo de 50ml en donde se mezcló con 10ml de resina proveniente del kit. Se volcó a una columna y se centrifugó 5 minutos a 5000rpm. Se agregaron 15ml de solución de lavado conteniendo etanol y se centrifugó 10 minutos a 5000rpm. Finalmente, se escindió la zona de la columna que contenía la resina, se colocó en un Eppendorf y se eluyó el ADN plasmídico con 300µl de agua destilada tibia. Se centrifugó 5 minutos a 10000rpm y el eluido se guardó a -20°C.

La cuantificación de los plásmidos se hizo por la lectura de su densidad óptica (OD) a 260 nm, considerando 1 unidad OD₂₆₀=50 µg/ml.

Se tomaron 2µl de la muestra y se midió absorbancia en el en el espectrofotómetro para microvolúmenes NanoDrop.

3.5 Transfección transitoria

Para realizar las transfecciones transitorias en las células BeWo se utilizó el reactivo PEI (Polyethylenimine, Polysciences, Inc) y 5µg de plásmido por cada condición. Las células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos durante 24 horas en medio DMEM/F12 10%SFB suplementado, hasta alcanzar un 70% de confluencia.

Se prepararon por separado una mezcla con los plásmidos y el medio de transfección, DMEM/F12 sin antibiótico ni suero, se dejó reposar por 5 minutos y luego se adicionó 15µl del reactivo PEI, y se dejó nuevamente 10 minutos incubando. Transcurrido este tiempo se eliminó el medio de los pocillos, y se adicionó 900µl de medio de transfección a cada uno, para luego agregar la mezcla correspondiente de plásmido y PEI, y alcanzar el volumen de 1 mililitro.

Se dejó incubando durante 5 horas a 37°C, con 5% de CO₂. Posteriormente se reemplazó la mezcla de la transfección por DMEM/F12 1% SFB y se realizaron los tratamientos correspondientes, dejando las células incubando durante 48hs a 37°C. Para la obtención de los extractos celulares de las transfecciones, se descartó el medio de cultivo de todos los pocillos, se realizaron dos lavados con PBS y se levantaron las células de manera mecánica con un rastrillo de goma en un ml de PBS. Luego se centrifugó 10 minutos a 10000rpm. Se resuspendió el pellet en 50µl de buffer de lisis (NaCl 137 mM, Tris-HCl 20mM, pH8, MgCl₂ 1 mM, 10% glicerol, 1% NP-40).

3.6 Determinación de la actividad de luciferasa

Para la determinación de la actividad de luciferasa se utilizó el sistema de Promega (Luciferase Assay System, Promega), para ello se mezcló 30µl de extracto celular con 30µl de solución de luciferina. La actividad enzimática fue medida en un luminómetro Bio Rad. Los valores se relativizaron a la actividad enzimática registrada de β-galactosidasa obtenida de cada muestra.

3.7 Determinación de la actividad de β-galactosidasa

Para la determinación de la actividad de la β-galactosidasa se utilizó 20µl del extracto celular y se le adicionó 150µl del buffer de Z (Na₂HPO₄, 60 mM, Na₂HPO₄ 40mM, KCl 10mM, MgSO₄ 1mM, 0,07% β-mercaptoetanol) conteniendo el sustrato ONPG 1mg/ml (Amresco). Se incubó a 37°C, en una placa de 96 pocillos hasta la aparición de la coloración amarilla. La reacción se interrumpió con 75µl de Na₂CO₃ 1M por pocillo. La medición de absorbancia se realizó en un lector de Elisa (Bio Rad) a 415 nm.

3.8 Plásmidos Utilizados

Se utilizaron construcciones reporteras derivadas del vector pGL3-basic (Promega) que contiene distintas regiones del promotor de gen de leptina rio arriba del gen reportero LUC, que codifica para la enzima luciferasa. Los plásmidos fueron gentilmente cedidos por la Dra. Oksana Gavrilova (NIH/NIDDK).

Teniendo en cuenta la región promotora que poseen estos dos plásmidos se los nombró de la siguiente manera:

- pL1951 (-1951 a +42pb)
- 1512 (vector vacío)

También se utilizaron otros dos plásmidos que poseen regiones intermedias del promotor de leptina clonadas en el vector de pPGL3-promoter (Promega), y un promotor mínimo viral regulando la transcripción del gen LUC denominados:

- pL1860 (presenta la región del promotor de la leptina de -1951 a -1847pb)
- pL1611 (vector vacío)
- pL1896 (presenta la región promotora de la leptina entre -1951 y -1887pb, y una mutación en el posible sitio de unión a Sp1)
- pL1895 (presenta la región promotora de la leptina entre -1946 y -1887, y una mutación en el posible sitio de unión a ER α)

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

Todos los plásmidos presentan un gen de resistencia a ampicilina para su previo clonado y amplificación.

También se utilizó un plásmido de expresión del receptor ER α de estrógeno, esta construcción fue cedida por la Dra. Adalí Pecci (FCEyN, UBA).

Por otra parte, se emplearon diferentes plásmidos que expresan la forma *wild type* o mutada de distintos factores de transcripción:

- psG5-HEGO: permite la expresión del receptor ER α de estrógeno.
- Rel A: permite la expresión de la proteína p65/Rel A, una subunidad del factor NF κ B, con función activadora de la transcripción. Fue cedido amablemente por la Dra. Adalí Pecci (FCEyN, UBA).
- pN3-Sp1: permite expresar la proteína Sp1 humana, bajo el promotor constitutivo CMV. Provisto amablemente por el Dr. Guntram Suske. (Institute of Molecular Biology and Tumor Research, Marburg, Germany) [200].
- CREB-K y CREB-M: el vector CREB-K permite expresar una proteína CREB mutante dominante negativa que es capaz de dimerizar pero no interactúa con la secuencia CRE, y por otro lado CRE-M codifica una proteína mutante dominante negativa que posee una sustitución de la serina 133 por alanina, inhabilitándose su sitio principal de fosforilación. Ambos plásmidos fueron

cedidos por el Dr. Michael E. Greenberg (Harvard Medical School, Boston)[201]

A cada experimento se le agrego un que expresa el gen de la β -galactosidasa (RSV β -gal), el mismo se utilizó como control de la eficiencia de las transfecciones.

Para el clonado y amplificación los vectores empleados presentan un gen de resistencia a ampicilina, a excepción del vector pN3-Sp1 que presenta un gen de resistencia a kanamicina.

PCR en TIEMPO REAL

4.1 Preparación de muestra para qRT-PCR

Luego de finalizada la incubación, los explantos o los cultivos celulares fueron congelados a -80°C hasta la extracción del ARN.

Al descongelar las muestras, se colocan en 1ml de TRISURE (Bioline), por Eppendorf y en el caso de los explantos placentarios se los disgrega con un politron (Tissue Ruptor, Qiagen) hasta que se logra llegar a una homogeneidad. Se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos y luego se agregó 200 μl de cloroformo por tubo, se mezclaron por agitación cada uno por 15 segundos y fueron incubados por 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm a 4°C por 15 minutos. Al finalizar la centrifugación, se pasó la fase acusa, (parte superior) conteniendo el ARN a tubo nuevo. Se agregó 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 . Para finalizar se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol 75% por tubo por inversión se mezcló y se centrifugó a 9000 rpm durante 5 minutos a 4°C . Se desecho el sobrenadante, dejando secar el pellet en hielo por 10 minutos, luego se resuspendió el pellet en 50 μl de agua destilada, homogeneizando completamente. Para medir la concentración de ARN obtenida se utilizó un espectrofotómetro para microvolumenes (NanoDrop).

4.2 Retrotranscripción: Síntesis de ADNc

Para obtener ADNc, 5 μg de ARN total fueron retrotranscriptos empleando el kit "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit" (Roche), que aporta a la mezcla

final de reacción 2,5 μ M de primers oligo dT, 1 mM de cada desoxinucleótido, 10 U de transcriptasa reversa, 20 U de inhibidores de ARNasa y buffer de reacción (50 mM Tris/HCl, 30 mM KCl, 8 mM MgCl₂, pH = 8,5). Siguiendo las instrucciones del proveedor, la mezcla fue retrotranscripta en un termociclador (T-Gradient, Biometra) a 55°C durante 1 h. Posteriormente, la muestra se incubó a 85°C durante 5 minutos para inactivar la transcriptasa reversa. El ADNc obtenido se almacenó a -20°C hasta el momento de realizar la PCR cuantitativa.

4.3 PCR cuantitativa (qPCR)

La qPCR se realizó empleando las siguientes secuencias de primers: para leptina, sentido: 5' GAACCCTGTGCGGATTCTT 3' ; y antisentido, 5' CCAGGTCGTTGGATATTTGG 3' ; y para ciclofilina (como control de carga) sentido: 5' CTTCCCCGATGAGAACTTCA 3' ; y antisentido, 5' TCTTGGTGCTCTCCACCTTC 3' .

La reacción se realizó con el kit "SensiMix™ Plus SYBR Kit" (Quantace), preparando una mezcla de 20 μ l de volumen final por pocillo conteniendo 3 μ l de ADNc, 0,6 μ l de cada primer en una concentración 10 μ M, 10 μ l de Master Mix 2X (conteniendo el intercalante SYBR green) y agua destilada. Para cada par de primers se incluyeron dos pocillos sin el agregado de ADNc como controles negativos. Cada muestra fue analizada por triplicado.

Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador MJ Mini BioRAD (Bio Rad), iniciando con un precalentamiento de 10 minutos a 95°C, seguido de 45 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. La especificidad de los productos detectados se analizó mediante una curva de desnaturalización en cada una de las muestras analizadas.

Los datos obtenidos fueron recogidos y analizados por el programa BioRAD CFX Manager. La cuantificación del ARNm de leptina, normalizada de acuerdo a la cantidad de ARNm de ciclofilina y relativa al control, se calculó de acuerdo al método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ [202].

INMUNOFLUORESCENCIA

Las células BeWo fueron cultivadas ON sobre cubreobjetos estériles en medio DMEM/F12 10% SFB. Al día siguiente, se indujeron con 100 nM de E₂ en los tiempos indicados en la figura, luego se realizaron 3 lavados con PBS y posteriormente, las células se incubaron durante 20 min con paraformaldehído 3% v/v, para fijarlas. Se procedió a hacer un lavado de 5min y éste se repitió tres veces. Luego se realizó la permeabilización durante 5 min, con Tritón 0,1% v/v en PBS. Se lavaron 3 veces y luego se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos durante 30 min, con la solución AFI (BSA 0,5 % v/v, Tween 20 0,2% v/v, azida sódica 0,1% v/v Tris 50nM pH 8).

Se incubó ON a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente diluidos en AFI: anti ER α (1:50, policlonal, conejo, Santa Cruz) o Rel A (1:100, monoclonal, ratón, Santa Cruz). Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS de 10 min, y se bloqueó durante 20 min con BSA 1% y a continuación se incubó con los anticuerpos secundarios diluidos en BSA durante una hora y media a 37 °C: Alexa 488nm conejo (1/100, Thermo Fisher) o Alexa 563nm ratón (1/100, Thermo Fisher). Se volvieron a lavar con PBS 3 veces por 10 min, y luego se realizó la tinción de los núcleos con DAPI 1x durante 20 min a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados con PBS por 10min tres veces; las muestras fueron montadas con Mowiol (Sigma) y guardadas en oscuridad a 4°C hasta el momento de ser analizadas.

Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio de epifluorescencia convencional (Nikon Eclipse E600W) equipado con una cámara digital (Nikon Coolpix 5000), y analizadas con el programa FIJI/ImageJ.

INMUNOPRECIPITACIÓN

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 10 cm de diámetro, en un medio DMEM/F12 privado de suero por 24 hs, y llegada a su confluencia de 100%, se indujeron 100 nM de E₂ durante 90 min. Luego las placas se lavaron dos veces con PBS frío y se despegaron las células de manera mecánica con un rastrillo de goma. Seguidamente, se centrifugó a 2500rpm por 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante, y se resuspendieron las células en solución de lisis para inmunoprecipitación (molibdato de sodio 20mM, EDTA 1mM, Hepes 10mM pH7.4) favoreciendo la ruptura celular mediante el uso de un homogeneizador manual (tipo Dounce). Durante todo el proceso las células se mantuvieron en hielo. Se centrifugó el homogenato a 12000 rpm durante 10min a 4°C y se fraccionó el sobrenadante obtenido en dos alícuotas: fracción inmune (I) fracción no inmune (NI).

A la inmunoprecipitación específica (I) se le suplementó el anticuerpo de interés, mientras al control no específico (NI) se le adicionó IgG de ratón. Posteriormente se agregaron a ambas fracciones una solución de proteína-A Sefarosa 50% p/v (SIGMA P3391) y se incubó durante 3 hs a 4°C en rotación constante. Luego se prosiguió a centrifugar las fracciones a 3000 rpm por 5 min. El precipitado obtenido se lavó tres veces con solución de lisis para inmunoprecipitación y se resuspendió en solución de siembra para proteínas 2X (Tris-HCl 100nM pH 6.8, 2-Metamercaptoetanol 2%, lauril sulfato de sodio (SDS) 4%, glicerol 20%, Azul de bromofenol 0,2%) y finalmente se calentaron las muestras a 95°C por 5 min para su desnaturalización.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el programa GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA), por el método de ANOVA y otros test a posteriori, Bonferroni y Dunnett. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Se indican en las figuras la Media $\pm$ Desvió estándar. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (u.a.).

RESULTADOS

Capítulo 1

**Estudio de los factores de transcripción involucrados en
la regulación ejercida por el estradiol sobre la expresión
de leptina en células placentarias**

Acción del factor de transcripción Sp1 en la expresión de leptina placentaria

El factor de transcripción Sp1 aumenta la expresión de leptina en células placentarias

Para lograr un mayor conocimiento sobre el mecanismo por el cual el estradiol regula la expresión de la leptina en la placenta, decidimos examinar el efecto del factor de transcripción Sp1 en la expresión de dicha citoquina en las células de la placenta humana.

Se usó la línea celular BeWo como modelo de células trofoblásticas, como se reportó previamente [24, 203]. Al analizar la secuencia del promotor de leptina se hallaron varios sitios de unión para Sp1. **(Figura I13)** Uno de estos sitios se encuentra dentro de las regiones identificada como PLE (*enhancer* de leptina placentaria), que previamente fue identificada dentro la región mínima responsable de la inducción de leptina por estradiol. Dado estos antecedentes, nuestra hipótesis es que este sitio de unión a Sp1 podría regular la expresión de leptina en las células placentarias.

Teniendo en cuenta esto, se decidió estudiar el efecto del Sp1 en la expresión de leptina en células placentarias. Para ello, las células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con el vector reportero pL1951 que contiene la región promotora del gen de leptina comprendida entre -1951 pb y +42 pb río arriba del gen reportero LUC, en presencia de tres diferentes concentraciones, 0,5, 1 y 5 µg, de un plásmido de expresión de Sp1, durante 48hs en medio DMEM/F12 1%SFB. Luego se determinó a través de ensayos de Western Blot la proteica de leptina, y se pudo observar que la sobreexpresión del factor de transcripción Sp1, en las concentraciones de 1 y 5µg, aumenta significativamente la expresión endógena de leptina en las células BeWo. **Figura R1).**

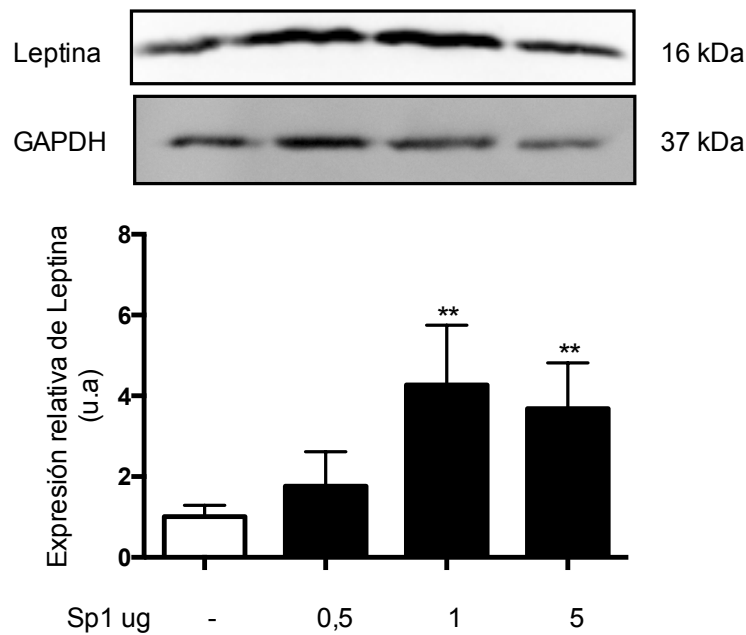


Figura R1: Las células BeWo, fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos reporteros pL1951, en conjunto con el vector de expresión Sp1 en distintas concentraciones como se indica, fueron incubadas por 48hs en DMEM/F12 1%SFB. La expresión de leptina fue determinada por ensayo de Western Blot como se indica en Materiales y Métodos. Se muestra un Western Blot representativo. Cada determinación se realizó por triplicado ($n=3$)** $p<0,01$ respecto al control sin tratamiento, según el test de comparación múltiple de Dunnett. (a.u: unidades arbitrarias.)

Para una mayor comprensión de la regulación ejercida por el factor Sp1 sobre la expresión de leptina, se realizaron ensayos de transfecciones transitorias con plásmidos conteniendo distintas regiones del promotor de leptina río arriba del gen reportero Luc. Las células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con el vector reportero pL1951 y con tres concentraciones diferentes, 0,5, 1 y 5 µg, del plásmido de expresión de Sp1. Luego de 48 horas de incubación, en medio DMEM-F12 1% SFB, se obtuvieron los extractos a partir de los cuales se determinó la actividad de luciferasa relativa a la de β -galactosidasa. **(Figura R2A).** En la figura se observa que la sobreexpresión del factor de transcripción Sp1 con 0,5 y 1 µg de plásmido aumenta significativamente la expresión de leptina, sin embargo con 5µg de plásmido no se ve el mismo efecto, lo que podría deberse al secuestro de factores de la maquinaria de transcripción basal.

Para poder comprender mejor el efecto del factor Sp1 sobre la expresión de leptina, se realizó una transfección transitoria con el vector reportero pL1860, que contiene la región promotora mínima de leptina que responde a estradiol comprendida entre -1951 pb y -1947, y que además presenta un posible un sitio de unión para Sp1. Se transfectaron 0,05, 0,5 y 5µg del plásmido de expresión de Sp1, usando al vector vacío p1611 como control. Como se muestra en la figura **Figura R2B**, con la sobreexpresión de Sp1 se observa un aumento en la actividad transcripcional de este vector reportero. Teniendo en cuenta que se realizó un control con el vector vacío p1611 y no se ven cambios en la actividad promotora, podemos descartar que este efecto se deba a la acción del Sp1 sobre el promotor mínimo pSV40 contenido en el vector, (**Figura R2B, interna**), siendo el efecto específico de la región del promotor de leptina clonada.

Teniendo en cuenta estos resultados decidimos realizar un control de sobreexpresión del factor de transcripción Sp1 determinado por Western Blot (**Figura R2C**). Para ello se realizó una transfección transitoria con el plásmido Sp1, con tres concentraciones 0,5, 1 y 5µg, y mediante Western Blot se evidenció que hay un aumento de la expresión de Sp1.

Conjuntamente estos resultados sugieren un efecto regulatorio del factor de transcripción Sp1 sobre la expresión de leptina.

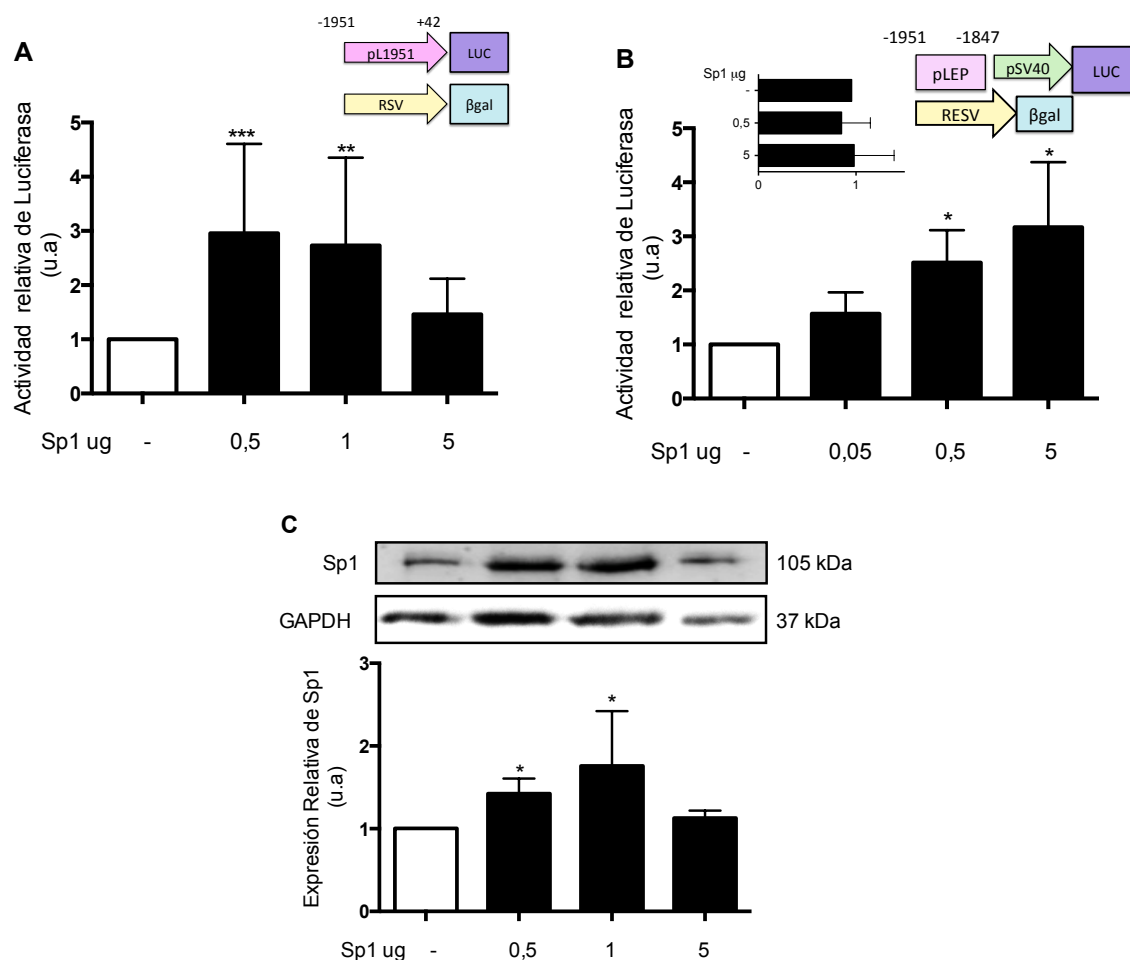


Figura R2: Células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos reporteros pL1951 **(A)** y pL1860 **(B)**, y el vector de expresión de Sp1 en distintas concentraciones según se indica. En la figura interna **(B)** se realizaron similares experimentos con el plásmido vacío p1611, a modo de control. Después de 48 horas se determinó la actividad de luciferasa relativa a la eficiencia de la transfección y al control. **(C)** Células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido de expresión para Sp1. Luego de la transfección fueron incubadas por 48 horas en DMEM/F12 1%, y se realizó un Western Blot para determinar la expresión de Sp1. Se muestra un Western Blot representativo. Cada determinación se realizó por triplicado ($n=3$) * $p<0,05$; ** $p<0,01$ *** $p<0,001$ respecto al control sin tratamiento, según el test de comparación múltiple de Bonferroni. (a.u: unidades arbitrarias.)

Como estrategia complementaria para confirmar que el factor de transcripción Sp1 genera un aumento en la expresión de leptina se evaluó la acción del inhibidor del factor de transcripción Sp1 ácido Betulínico (BA). Este compuesto promueve la degradación dependiente de proteosoma del factor de transcripción Sp1 [204]. Para ello las células BeWo fueron cultivadas en ausencia de suero y tratadas con concentraciones crecientes de BA. Posteriormente por Western Blot se evaluó la expresión de leptina y Sp1. En la **Figura R3** se observa que el tratamiento con BA disminuye la expresión de leptina en todas las concentraciones utilizadas.

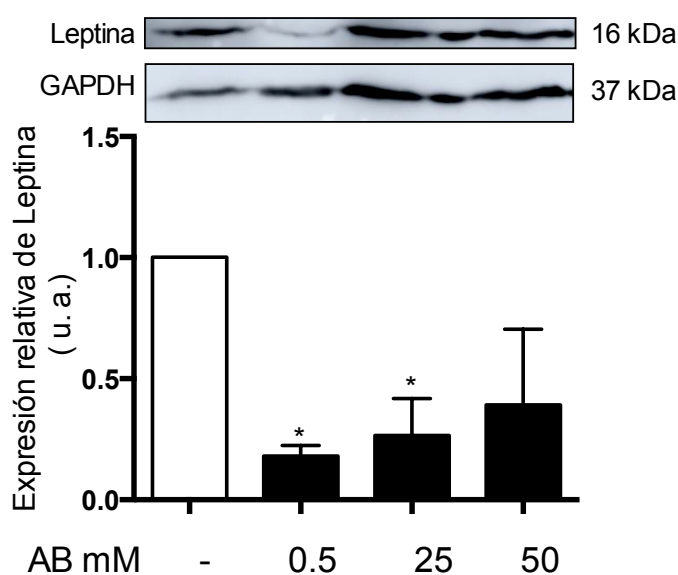


Figura R3: Células BeWo fueron tratadas con el inhibidor del factor Sp1, ácido betulínico, en las concentraciones indicadas por 48 horas. Las proteínas fueron separadas por gel de SDS-PAGE, y la expresión de leptina determinada por Western Blot. El control de carga se realizó con anti-GAPDH. Las bandas densitometradas se muestran en la figura, éstas son resultados representativos de dos réplicas. (n=2) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecto al control, según el test de comparación múltiple de Dunnett. (a.u: unidades arbitrarias.)

En paralelo se determinó la expresión proteica de Sp1 para verificar la acción del ácido betulínico. Como se puede observar en la **Figura R4** el tratamiento con el ácido betulínico produce una disminución del nivel de Sp1 endógeno. Todos estos resultados en conjunto estarían demostrando el rol de Sp1 en la inducción de la expresión de leptina placentaria.

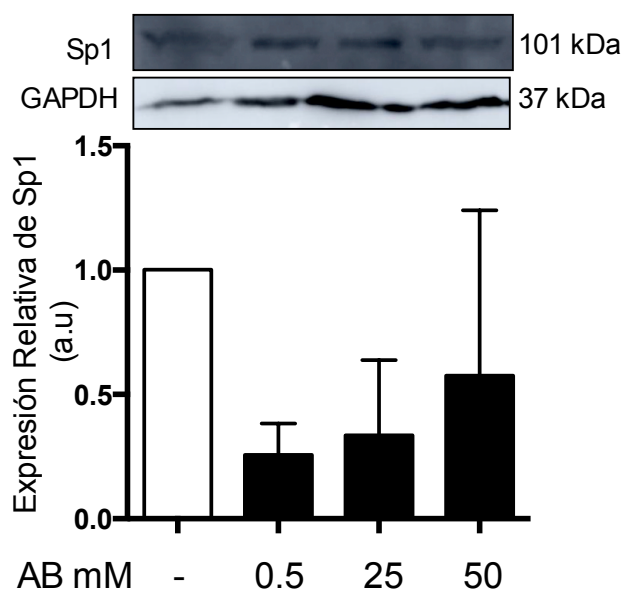


Figura R4: Células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con el vector pL1951, y posteriormente tratadas con el inhibidor del factor Sp1, ácido betulínico, en las concentraciones indicadas, por 48 horas. Las proteínas fueron separadas en el gel de SDS-PAGE, y la expresión de leptina determinada por Western Blot. El control de carga se realizó con anti-GAPDH. Las bandas densitometradas se muestran en la figura, éstas son resultados representativos de dos réplicas. (n=2) (a.u: unidades arbitrarias.)

El efecto inductor del E₂ sobre leptina es dependiente del factor de transcripción Sp1

Para profundizar en el análisis de una posible participación del factor Sp1 en la regulación de la expresión de leptina por estradiol, decidimos estudiar el efecto del tratamiento con E₂.

Las células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con el vector de expresión de Sp1, en tres concentraciones, 0,5, 1 y 5µg posteriormente fueron tratadas con E₂ 100nM y-se determinó la expresión del ARNm de leptina endógena por qRT-PCR. Como puede observarse en la **Figura R5**, la sobreexpresión de Sp1, aumenta la expresión de leptina significativamente. Al combinar con el tratamiento con E₂ 100nM se puede ver que hay un incremento significativamente mayor en la expresión de leptina.

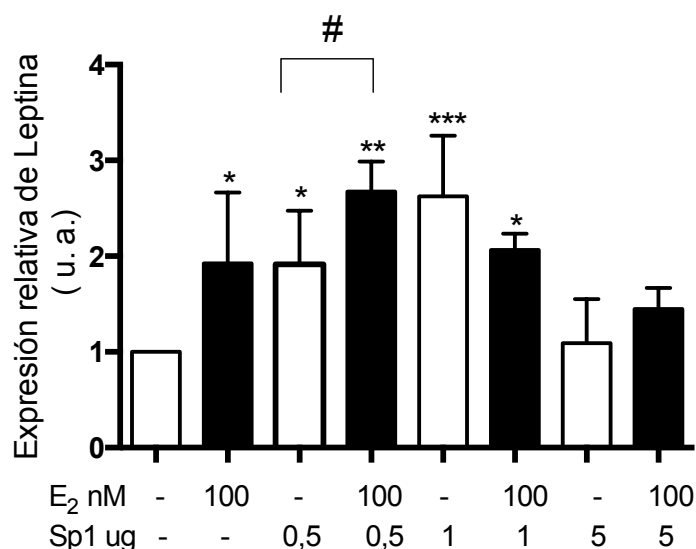


Figura R5: Células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido de expresión de Sp1 y posteriormente tratadas con E₂ durante 48 horas en DMEM F12 con SFB 1%. Se cuantificó el ARN mensajero de leptina por qRT-PCR como se describe en Materiales y Métodos. Se utilizó ciclofilina como estándar interno. (n=2) *p>0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs control sin tratamiento, # p>0,05 respecto a su control respectivo, según el test de comparación múltiple de Bonferroni. (a.u: unidades arbitrarias.)

En función de estos resultados, decidimos evaluar la acción de Sp1 sobre la inducción del estradiol en la actividad del promotor de leptina. Para ello se realizaron transfecciones transitorias con el plásmido de expresión para Sp1 y posterior tratamiento con E₂. Para dicho fin, células BeWo fueron transfectadas con el vector reportero pL1951, y el vector de expresión para Sp1, en tres concentraciones 0,5, 1 y 5 µg, posteriormente se trataron las células con 100nM de E₂. En la **Figura R6** se observa que tanto la sobreexpresión de Sp1 como el tratamiento con E₂, estimulan la expresión de leptina. Particularmente con las concentraciones de 100nM de E₂ y 0,5 µg del plásmido de Sp1 se puede ver que el estímulo es sinérgico. Sin embargo el efecto se perdió con las concentraciones de E₂/Sp1 que son mas bajas, lo que sugiere que habría un balance delicado entre las señales transcripcionales que están regulando la expresión de leptina en la células placentarias.

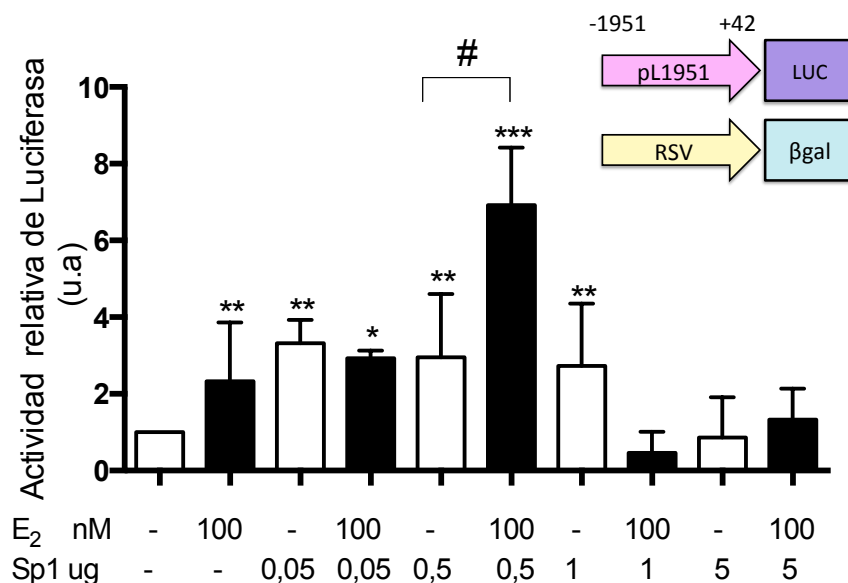


Figura R6: Células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido de expresión de Sp1 y el vector reportero pL1951 y posteriormente tratadas con E₂ durante 48 horas en DMEM F12 con SFB 1%. La actividad de luciferasa fue medida en los extractos celulares y normalizada con la actividad de β-galactosidasa según se indica en Materiales y Métodos. (n=6). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs control sin tratamiento, # p<0,05 respecto a su control respectivo, según el test de comparación múltiple de Bonferroni. (a.u: unidades arbitrarias.)

Dado que el vector reportero p1860, presenta la región promotora entre -1952 pb y -1847pb conteniendo un posible sitio de unión para Sp1, se decidió estudiar la acción de Sp1 sobre el efecto del tratamiento con E₂ en la expresión de leptina utilizando este vector reportero. Para ello las células BeWo fueron transfectadas con dicha construcción y con cantidades crecientes del plásmido de expresión de Sp1, 0,05, 0,5 y 5μg y dos concentraciones de E₂ 10 y 100 nM. Como se observa en la **Figura R7**, con ambas concentraciones de E₂ se genera un aumento significativo de la expresión de leptina como se ha reportado previamente [94]. Además se observa una inducción significativa de la expresión de la leptina en células donde se sobreexpresó Sp1 con 0,05μg, en presencia de 10nM de E₂. Cabe aclarar que para observar el efecto del tratamiento con estradiol sobre la acción de la sobreexpresión de Sp1 (mostrada en la **Figura R 2B**), los resultados se graficaron relativos al valor control promedio obtenidos con cada concentración de expresión de Sp1 en ausencia del estrógeno.

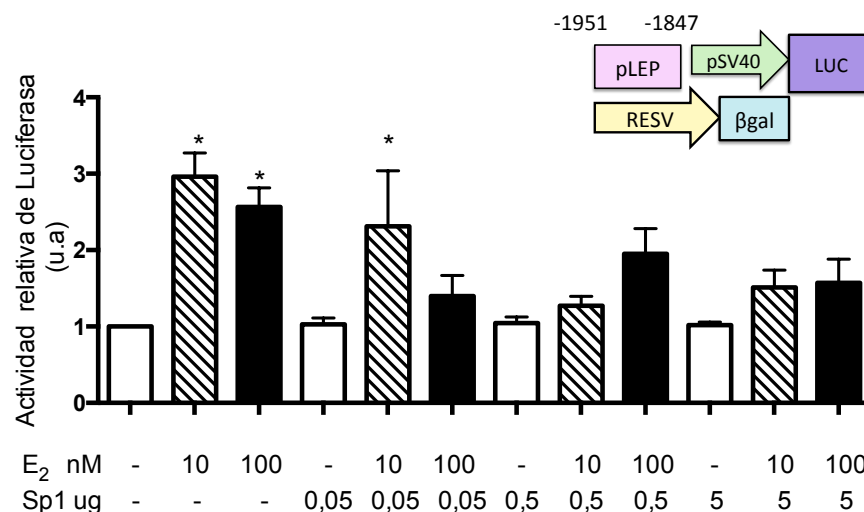


Figura R7: Células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido pL1860, que contiene la región del promotor de leptina desde -1951 pb a -1847, y el plásmido de expresión de Sp1, y posteriormente fueron tratadas con E₂ en diferentes concentraciones, como se indica, durante 48 horas, en medio DMEM F12 suplementado con SFB 1%. La actividad de luciferasa se midió del extracto celular y se normalizó contra la actividad de β-galactosidasa (n=4). *p<0,05 respecto al control correspondiente, según el test de comparación múltiple de Bonferroni. (a.u: unidades arbitrarias.)

Para profundizar el conocimiento del rol que juega el Sp1 sobre aumento que genera el E₂ en la expresión de leptina placentaria, decidimos utilizar un vector reportero que presenta la misma región del promotor de leptina clonada en el vector pL1860 pero que contiene mutada la secuencia de reconocimiento del factor de transcripción Sp1. Dicho plásmido, denominado pL1896 presenta la mutación CGCC por TAGT en el sitio de unión de Sp1 (**Figura R8 A**). Como se puede observar en la **Figura R8 B** al utilizar esta construcción el efecto del E₂ sobre la expresión de leptina se ve anulado. Estos resultados estarían demostrando que es necesario que el sitio de unión del Sp1 esté intacto para que se pueda evidenciar la inducción de la expresión de leptina mediada por E₂ en las células placentarias, y sugeriría la participación del factor de Sp1 en los efectos regulatorios de E₂ sobre la expresión de leptina placentaria.

A

-1962 gccctggtctcctgcagttaccctcaggttactagggtggtgaa**aaactccgcctggt**a **Sp1**
tagt
half ERE
-1902 aattt**gtggtcag**accagttttctgctctcgaacactgttttctgttggttaagatgttt

B

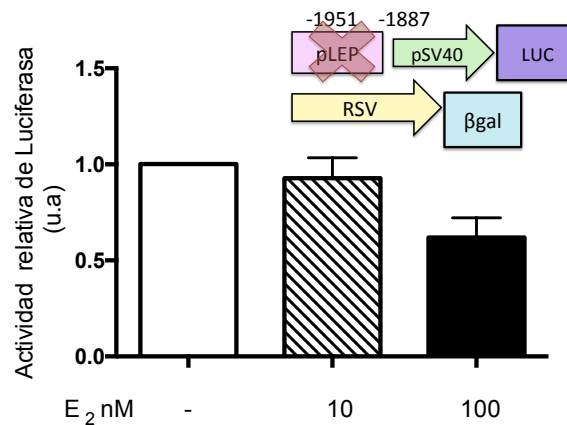


Figura R8: A. Secuencia del promotor de leptina conteniendo el enhancer de la leptina placentaria (PLE) indicada en negrita. Los putativos elementos relacionados a la acción de E₂, sitio de unión al Sp1 y halfERE se indican dentro de un recuadro. El sitio mutado para el factor Sp1, presente en pL1896, se encuentra indicado debajo del recuadro del elemento de unión a Sp1. **B.** Células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido pL1896, que contiene la región del promotor de leptina desde -1951 pb a 1887 pb, con una mutación en el sitio de unión para el factor Sp1, posteriormente las células fueron tratadas con E₂ como se indica en la figura durante 48 horas con medio DMEM-F12 suplementado con 1% de SFB. La actividad de luciferasa se midió de los extractos celulares y se normalizó contra la actividad de β-galactosidasa (n=4). (a.u: unidades arbitrarias.)

La inducción de la expresión de leptina por Sp1 es insensible al antiestrógeno ICI 182 780

En base a lo previamente descrito donde hemos observado que el factor de transcripción Sp1 estaría involucrado en el aumento de la expresión de leptina mediada por E₂, decidimos estudiar el efecto del antiestrógeno ICI 182 780 (ICI), sobre la expresión de leptina. Previamente hemos reportado que el efecto sobre la expresión de leptina generado por el E₂ se ve disminuido por este antiestrógeno de manera dosis dependiente [94]. Para ello células BeWo fueron transfectadas con el vector pL1951 y el plásmido de expresión para Sp1, en concentraciones crecientes y luego se trataron con el antagonista ICI en una concentración de 100nM. Posteriormente se determinó la expresión de leptina, por Western Blot. Como puede observarse, en la **Figura R9** el tratamiento con ICI no genera cambios sobre la inducción de la expresión endógena de leptina mediada por Sp1, en ninguna de sus concentraciones, determinada por Western Blot.

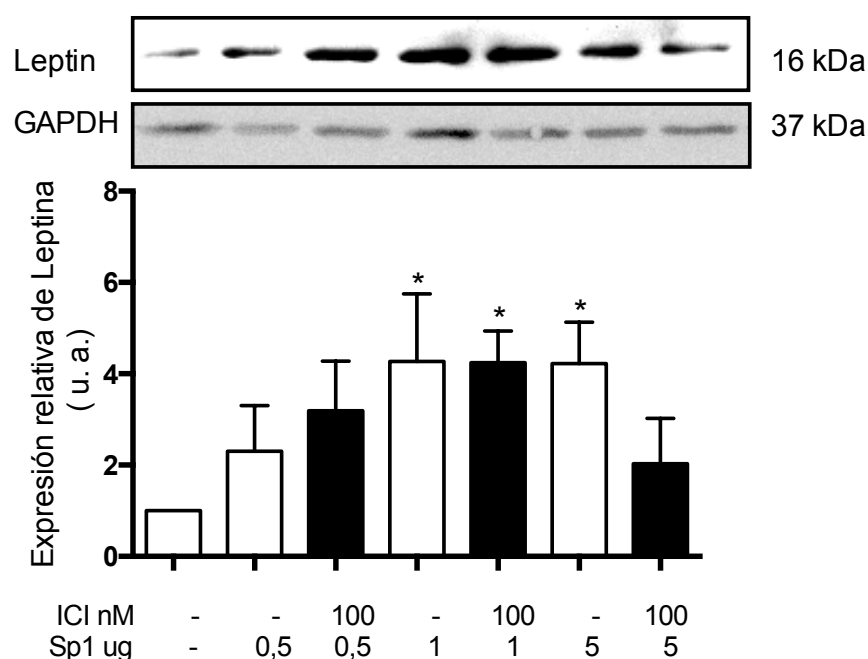


Figura R9: Células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con el vector pL1951, y el vector Sp1 en distintas concentraciones, y posteriormente tratadas con el antiestrógeno ICI 182 780 (ICI), por 48 horas. Las proteínas fueron separadas en gel de SDS-PAGE, y la expresión de leptina determinada por Western Blot. El control de carga se realizó con anti-GAPDH. Las bandas densitometradas se muestran en la

figura, éstas son resultados representativos de dos réplicas. (n=2) * $p < 0,05$ respecto al control, según el test de comparación múltiple de Bonferroni. (a.u: unidades arbitrarias.)

A partir de lo observado anteriormente, quisimos estudiar la actividad del promotor de leptina al sobreexpresar Sp1 en presencia de ICI. Las células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con el vector reportero pL1951, y con cantidades crecientes del vector de expresión del factor Sp1, y luego fueron tratadas con el antiestrógeno ICI (**Figura R10**). Se puede observar que hay un aumento significativo tanto en la expresión basal como en la inducción obtenida por la sobreexpresión del factor Sp1 sobre el promotor de leptina placentaria, lo que indicaría que el ICI no estaría ejerciendo alguna modificación en el efecto generado por Sp1 sobre el promotor de leptina.

Estos resultados sugieren que la inducción de la expresión de leptina por Sp1 no estaría siendo afectada por el antiestrógeno ICI.

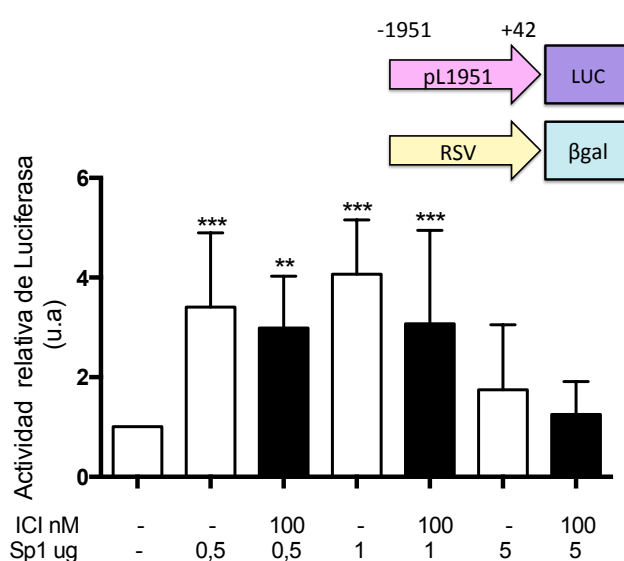


Figura R10: Células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con el vector pL1951, y el vector de expresión del factor Sp1 en distintas concentraciones, y posteriormente tratadas con el antiestrógeno ICI 182 780 (ICI), por 48 horas. Se determinó la actividad de luciferasa en el extracto celular y se normalizó contra la actividad de β -galactosidasa. (n=7) ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto al control, según el test de comparación múltiple de Bonferroni. (a.u: unidades arbitrarias.)

El efecto de los factores de transcripción ER α y Sp1 en la inducción de la expresión de la leptina placentaria mediada por E₂

Evidencias previas demuestran que el receptor de estrógeno se puede unir al factor de transcripción Sp1 y de esta manera regular la transactivación de diferentes genes [205].

Para analizar si existe una acción conjunta de ER α sobre el efecto que ejerce el Sp1 sobre la expresión de leptina, se decidió estudiar la región mínima de respuesta a E₂ del promotor del gen de la leptina donde se sabe que se encuentra un sitio de unión para el factor de transcripción Sp1 y un sitio *half*ERE de unión de ER α [108].

Como primera estrategia experimental se analizó la actividad basal del promotor de leptina. Células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con el vector pL1860, el vector de expresión del receptor ER α humano (HEGO) y el vector de expresión para Sp1.

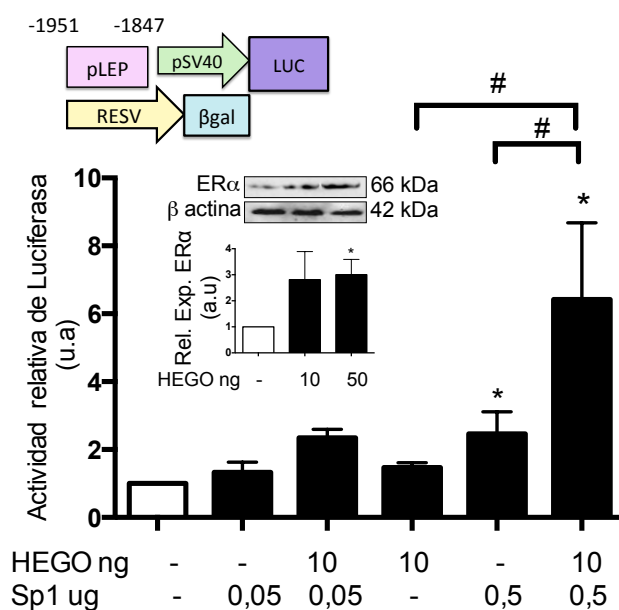


Figura R11: Células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con el vector p1860, junto con distintas cantidades de los vectores de expresión Sp1 y HEGO, el cual codifica para el receptor humano ER α . Dos días después se determinó la actividad de luciferasa en el extracto celular y se normalizó contra la actividad de β -galactosidasa. En la figura interna las células BeWo fueron transfectadas con diferentes concentraciones del vector de expresión HEGO. Dos días después los extractos celulares fueron

*preparados como se indica en Materiales y Métodos. Se determinó mediante Western Blot la expresión proteica del ER α . Las proteínas fueron separadas mediante gel SDS-PAGE. El control de carga se realizó con anti-actina. Las bandas densitometradas se muestran en la figura, éstas son resultados representativos de tres réplicas. (n=3). *p<0,05 respecto al control y #p<0,05 entre los tratamientos indicados, según el test de comparación múltiple de Bonferroni. (a.u: unidades arbitrarias).*

Como se puede apreciar en la **Figura R11**, la sobreexpresión del factor Sp1 produce un aumento en la expresión de la leptina como se discutió anteriormente. Por otro lado la cotransfección con el vector de expresión para ER α y el factor de transcripción Sp1 aumentan sinérgicamente la expresión de leptina en las concentraciones de HEGO 10ng y Sp1 0,5 μ g.

En estos experimentos se utilizaron pequeñas cantidades de plásmido de expresión HEGO de manera de no saturar el sistema. Puede observarse en el inset de la **Figura R11** el control de expresión de ER α determinado por Western Blot en células BeWo transfectadas con el vector HEGO.

Para profundizar en el análisis de la participación del ER α y el factor Sp1 sobre la expresión de la leptina se evaluó la actividad promotora de esta construcción en presencia de concentraciones crecientes de E₂.

En la **Figura R 12**, se puede observar que la cotransfección con los vectores HEGO y Sp1 anula el efecto estimulador del E₂ sobre el vector p1860. Cabe aclarar que para observar el efecto del tratamiento con estradiol por sobre la acción de la sobreexpresión de Sp1 (mostrada en la Figura R1B), los resultados se graficaron relativos al valor control promedio obtenido con cada concentración de plásmido de expresión de Sp1 utilizada, en ausencia del estrógeno.

Una segunda estrategia experimental consistió en estudiar la actividad promotora de leptina dependiente de Sp1 en la línea celular BeWo-Sh2. Esta línea celular, expresa un siRNA contra ER α inducible por doxiciclina.

Para ello las células BeWo-Sh2 fueron transfectadas transitoriamente, con el vector pL1951 y el vector de expresión de Sp1 en concentraciones crecientes, luego se las trató con E₂ durante 48hs y se determinó la actividad de luciferasa relativa a β -galactosidasa.

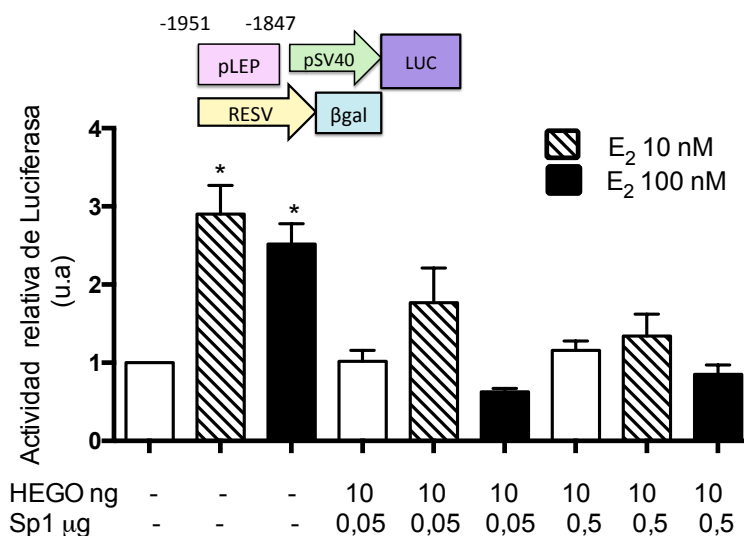


Figura R12: Células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con el vector p1860, junto con distintas cantidades de los vectores de expresión Sp1 y HEGO, el cual codifica para el receptor ER α . Dos días después se determinó la actividad de luciferasa en el extracto celular y se normalizó contra la actividad de β -galactosidasa. (n=3). *p>0,05 respecto al control según el test de comparación múltiple de Bonferroni. (a.u: unidades arbitrarias.)

En la **Figura R13** se puede observar que la disminución de los niveles de expresión de ER α suprimió la inducción de E₂ sobre a expresión de leptina tal como se reportó anteriormente [108]. Más aún en estas condiciones se suprimió la inducción ejercida por el factor de transcripción Sp1 sobre leptina, lo que estaría sugiriendo que ER α es necesario para que se evidencie el efecto de Sp1. Como control positivo, en uno de los experimentos se omitió el agregado de doxíciclina, de esta manera se evita el silenciamiento de ER α . Los resultados obtenidos corroboran el efecto inductor del E₂ sobre el vector pL1951 (**Figura R13 interna**).

Para profundizar en los resultados obtenidos se decidió evaluar, qué sucedía con los niveles de expresión de leptina, utilizando el vector p1896 que presenta la región promotora del gen de leptina entre -1951y -1887 pb, y el posible sitio de unión a Sp1 mutado.

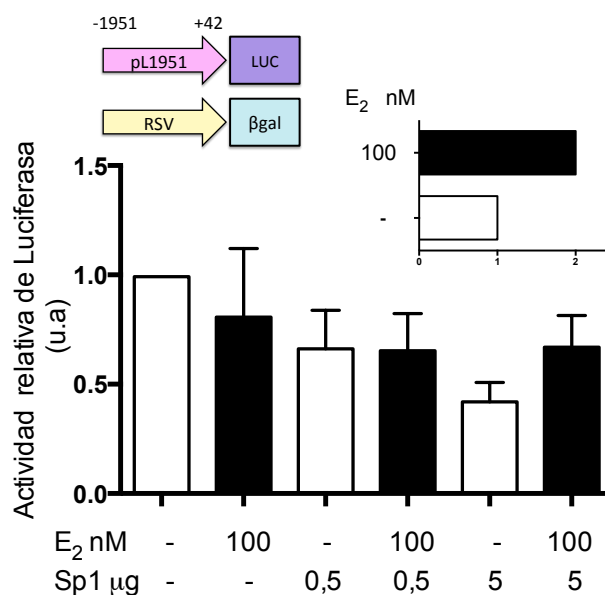


Figura R13: Células BeWo-Sh2 fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido pL1951 y el vector de expresión de Sp1, posteriormente se le adicionó E₂. Luego de 48 horas se determinó la actividad de luciferasa en el extracto celular y se normalizó contra la actividad de β-galactosidasa. **Figura interna R13** A modo de control, se omitió el agregado de doxiciclina, para corroborar el efecto inductor del E₂ sobre el vector p1951 (n=2).

Con este fin, las células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con éste vector en presencia de distintas cantidades del vector de expresión de Sp1 y el vector HEGO, luego de 48h se determinó la actividad de luciferasa relativa a la eficiencia de transfección. Al utilizar esta construcción no se evidenció inducción de la actividad del reportero con la sobreexpresión de los factores de transcripción Sp1 y ERα, por separado o en combinación (**Figura R14**). En estos experimentos se utilizó la concentración de 50 ng de plásmido HEGO. Como se muestra en la **Figura R14 interna**, la cantidad de plásmido HEGO transfectado es capaz de inducir la expresión del promotor de leptina en la construcción análoga que no posee mutado el sitio de unión al factor de transcripción Sp1 (plásmido pL1860). Estos resultados sugieren que es necesario que esté presente el sitio de unión a Sp1 intacto para

poder evidenciar el efecto que genera el ER α sobre la expresión de la leptina en esta región promotora (**Figura R14**).

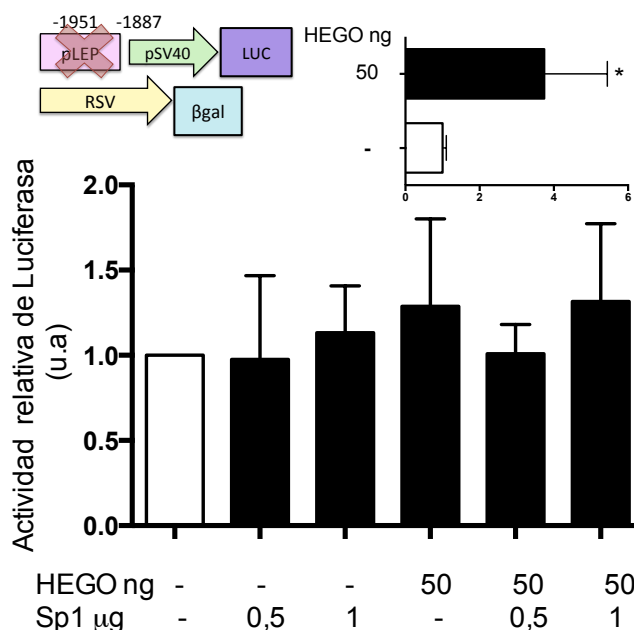


Figura R14: Células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido pL1896 en conjunto con los vectores de expresión HEGO y Sp1 en distintas concentraciones durante 48 horas. Posteriormente se determinó la actividad de luciferasa en el extracto celular y se normalizó contra la actividad de β -galactosidasa. (n=4) En la **Figura Interna R14** las células BeWo fueron transfectadas con el plásmido pL1860 en conjunto con el vector de expresión HEGO como control. (n=2) * $p < 0,05$ respecto al control, según el test de comparación múltiple de Dunnett.

En base a lo previamente descrito nos interesó evaluar el efecto del E₂ sobre la inducción que ejerce el factor de transcripción Sp1 en la expresión de leptina placentaria utilizando un vector que presenta una mutación en el sitio de unión para el ER α , halfERE. Dicho plásmido, denominado pL1895 presenta la mutación GTC por AGT en el sitio de unión halfERE (**Figura R15 A**). Para ello las células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con éste vector y con distintas concentraciones del vector de expresión para Sp1, posteriormente se las trató con E₂ durante 48h, luego se determinó la actividad de luciferasa relativa a la eficiencia de transfección. Como se puede observar por resultados preliminares mostrados en la **Figura R15 B**, se ve anulada la inducción de la expresión de leptina, ejercida por el factor de

transcripción Sp1 con las concentraciones de 0,5 y 1 μg , también se pierde el efecto inductor observado en experimentos previos con Sp1 0,5 y E₂ 1 μg . Sin embargo al utilizar las concentraciones 1 y 5 μg de Sp1 y posterior tratamiento con E₂, se puede observar un aumento en la expresión de leptina. Podríamos inferir que a altas concentraciones de Sp1 el efecto es independiente de la mutación del sitio de unión a ER α , tal vez actuando a través del sitio de unión a Sp1 presente en esta región del promotor de leptina. Estos resultados estarían demostrando que es necesario que el sitio de unión del *half*ERE esté intacto para que se pueda evidenciar la inducción de la expresión de leptina mediada por E₂ en las células placentarias, y sugeriría la participación del factor de transcripción Sp1 en los efectos regulatorios de E₂ sobre la expresión de leptina placentaria.

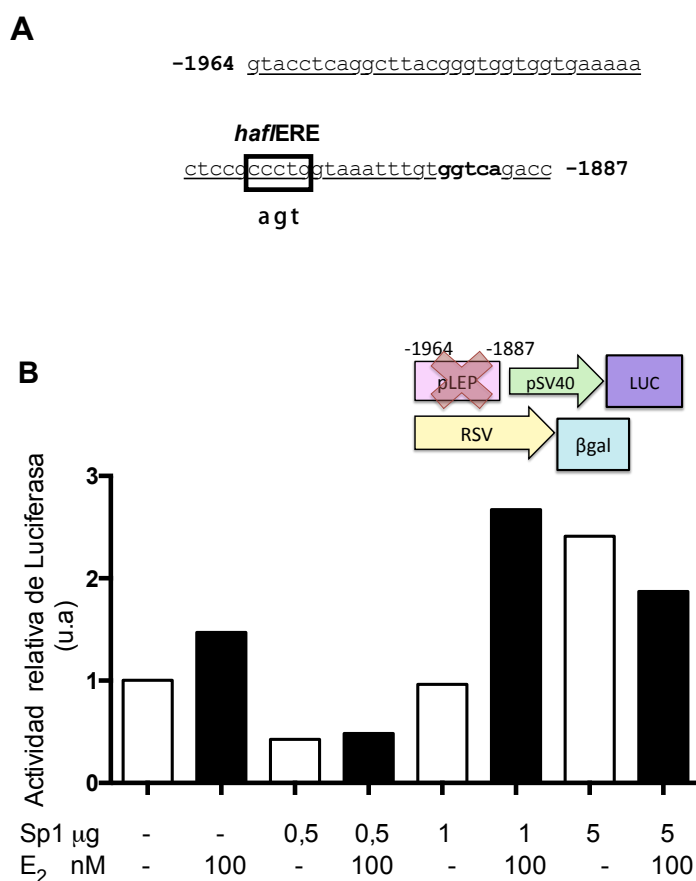


Figura R15: A. Secuencia del promotor de leptina desde -1964 a -1887 analizada por el Matinspector 7.7.3. Se indica el "enhancer" de leptina placentaria subrayado, y el elemento *half*ERE se indican dentro de un recuadro. El sitio mutado para el *half*ERE, presente en pL1895, se encuentra indicado debajo del recuadro del *half*ERE. **B.** Células

BeWo fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido pL1895 en conjunto con el vector de expresión para el factor Sp1 en distintas concentraciones, luego se le adicionó E₂ durante 48 horas. Posteriormente se determinó la actividad de luciferasa en el extracto celular y se normalizó contra la actividad de β-galactosidasa. (n=1)

También estudiamos la interacción entre los factores de transcripción Sp1 y ERα en las células BeWo, a través de ensayos de coinmunoprecipitación. Para ello, las células fueron tratadas con E₂ 100nM, por 48 horas en medio privado de suero, y luego se siguió con el protocolo de inmunoprecipitación, como se menciona en Materiales y Métodos. Se realizaron experimentos inmunoprecipitando con anticuerpo contra ERα, o el anticuerpo contra Sp1. Luego mediante Western Blot, se evidenció la presencia de las proteínas ERα y Sp1 respectivamente. En la **Figura R16 A** se muestran los resultados obtenidos inmunoprecipitando con el anticuerpo anti ERα. Se puede observar que en las condiciones ensayadas el factor de transcripción Sp1 coinmunoprecipita junto a ERα.

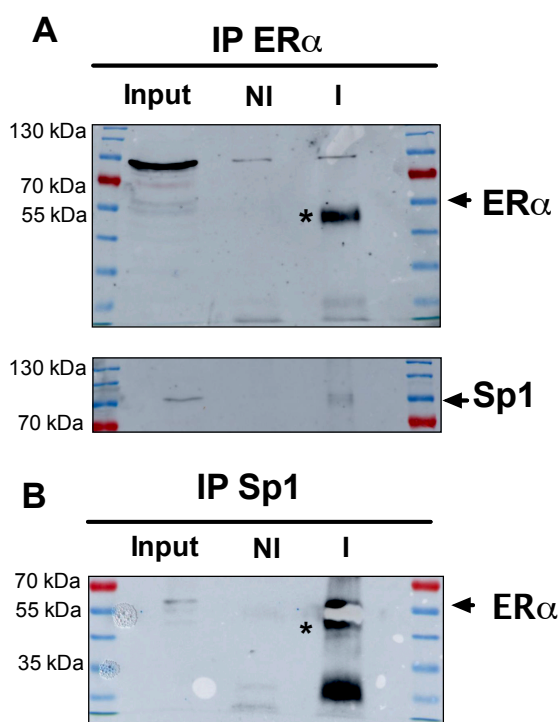


Figura R16: A. ERα endógeno fue inmunoprecipitado de un extracto total de células BeWo, y luego se reveló por Western Blot con los anticuerpos ERα y Sp1 según se describe en Materiales y Métodos. **B.** Sp1 endógeno fue inmunoprecipitado de un extracto total de células BeWo, y luego se reveló por Western Blot con el anticuerpo

*anti ER α según se describe en Materiales y Métodos. NI: no inmunoprecipitado I: inmunoprecipitado. * Inmunoglobulina de la cadena pesada, revelada, porque se utilizó en el Western Blot el mismo Anticuerpo secundario, que se utilizó durante la inmunoprecipitación.*

En la **Figura R16B** se observan los resultados obtenidos inmunoprecipitando con el anticuerpo anti Sp1. Como puede observarse en las condiciones ensayadas el factor de transcripción ER α coinmunoprecipita con Sp1. Estos resultados sugieren fuertemente que ambos factores de transcripción podrían interactuar entre si en células placentarias BeWo como ya fue descrito para la activación del promotor de la kisspeptina 1 en las células hipotalámicas GT-1 [206] y la proteína integral de membrana Claudina-5 [207] entre otros genes, formando un complejo *in vivo* para mediar la inducción del E₂.

Todo este conjunto de resultados sugieren un efecto cooperativo entre los factores de transcripción ER α y Sp1 en la inducción de la expresión de leptina placentaria. Esta acción se puede deber a un proceso multifactorial y puede depender de la presencia, de la concentración y de la localización de los ERs, del factor de transcripción Sp1.

Capítulo 2

**Estudio del factor de transcripción NF κ B en la regulación
ejercida por el estradiol sobre la expresión de leptina en
células placentarias**

Participación del factor NFκB en la expresión de leptina placentaria

Como hemos mencionado en la introducción el factor de transcripción NFκB, actúa como un regulador central de respuesta inmune e inflamatoria. En su forma activa presenta una estructura dimérica, entre otras, compuesta por las subunidades p50 y p65 (Rel A), las cuales son las subunidades mas abundantes. Sin embargo, NFκB puede jugar un papel muy importante en la fertilidad femenina. Se sugieren tres líneas de evidencias: 1. Donde se muestra que la señalización de NFκB y la activación de p65 se encuentran involucradas en la angiogénesis durante el desarrollo del cuerpo lúteo, 2. también participaría del control de la implantación endometrial y 3. regulando la respuesta inmune Th1-Th-2 que cambia preparándose el sistema inmune materno para la implantación del blastocisto [208].

En la secuencia promotora del gen de la leptina hemos determinado que se encuentran varios sitios potenciales de unión para el factor NFκB. Por otro lado se sabe que existe una relación estrecha entre la acción de este factor y los ERs, por ello decidimos estudiar si la activación de este factor está involucrada en la inducción de la expresión de leptina por estradiol.

La inhibición del NFκB anula el efecto del E₂

Como primera estrategia, se realizaron experimentos utilizando sulfasalazina, un inhibidor de la Iκκ, la quinasa activadora del NFκB. El tratamiento con sulfasalazina inhibe la translocación del NFκB, hacia el núcleo, y este efecto actúa en paralelo a un bloqueo de la degradación de la IκB, que es independiente de la síntesis de proteínas [209]. Se realizaron curvas de concentración de sulfasalazina para determinar las dosis máximas que no resultaran tóxicas para las células. En los experimentos realizados para analizar la expresión de leptina en presencia de este inhibidor se utilizaron dosis menores a las empleadas en la bibliografía debido a que concentraciones mayores resultaron tóxicas para las células BeWo. En los experimentos tanto las células BeWo como los explantos placentarios, fueron tratados con concentraciones de 10, 100 y 1000 nM de sulfasalazina, luego de 30 min se les agrego E₂ 100nM y se incubaron durante 48 horas. Posteriormente se analizó y el ARNm por qRT-PCR.

Como se observa en la **Figura R17**, el aumento ejercido por E₂ en la expresión de

leptina se ve significativamente disminuido con el agregado de sulfasalazina, en todas las concentraciones estudiadas tanto en cultivos celulares como en explantos placentarios. No se observaron variaciones significativas sobre los niveles de leptina no inducidos.

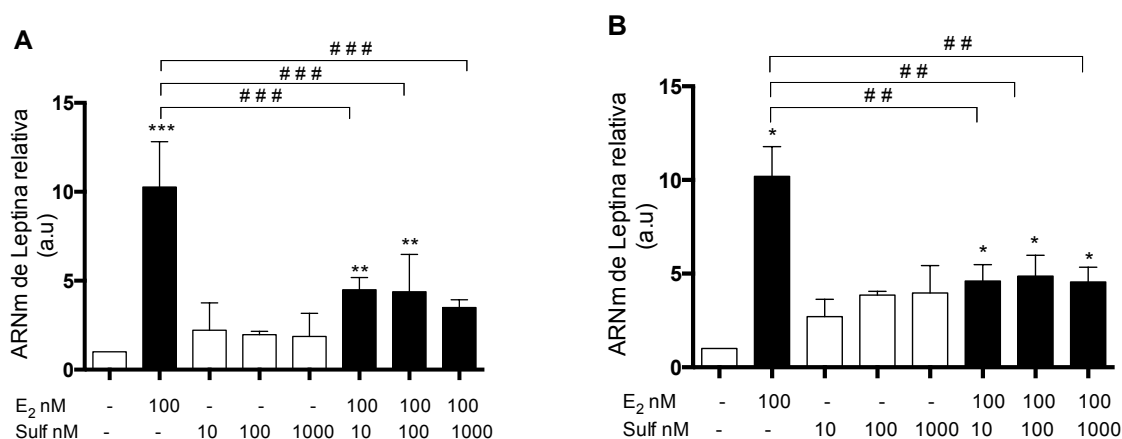


Figura R17: Células BeWo **(A)** y explantos placentarios **(B)**, fueron tratadas con sulfasalazina según se indica y posteriormente se agregó E₂ 100nM. Luego el ARN se extrajo como se indica en Materiales y Métodos. El ARNm de leptina se cuantificó mediante qRT-PCR. Se utilizó ciclofilina como estándar interno. (n=2) *p<0,05; **p<0,01, respecto al control y ##p<0,01 ###p<0,001 vs a E₂ 100nM, según el test de comparación múltiple de Dunnett.

En este punto nos interesó evaluar si se correspondían estos resultados a nivel proteico, por lo que decidimos determinar el efecto del E₂ sobre la expresión de leptina luego del tratamiento con este inhibidor mediante ensayos de *Western Blot*. Como se observa en la **Figura R18**, tanto en las células BeWo como en los explantos placentarios, el aumento ejercido por E₂ sobre la expresión de leptina se ve reducido en presencia del inhibidor de NFκB sulfasalazina. En estos experimentos se determinó que, también se reduce la expresión endógena de leptina luego del tratamiento con el inhibidor del NFκB. Estos resultados en conjunto estarían sugiriendo la participación de los dímeros del factor de transcripción NFκB en el efecto regulatorio del estradiol sobre la expresión de leptina placentaria.

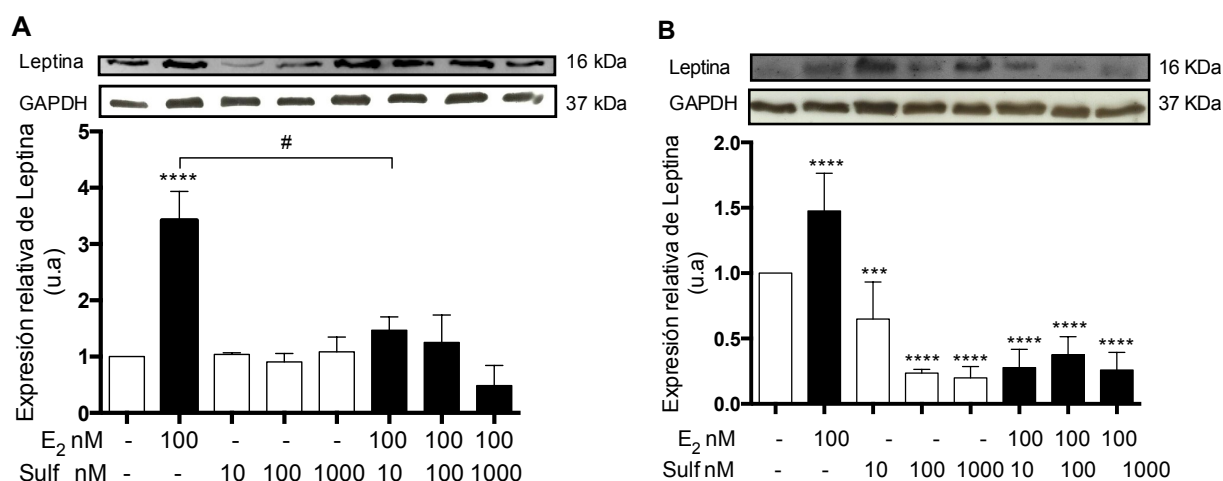


Figura R18: Células BeWo **(A)** y explantos placentarios **(B)** fueron pretratados con sulfasalazina según se indica durante 30 min y posteriormente se agregó E₂ 100nM. Luego de 48 horas se determinó la expresión de leptina por Western Blot. El control de carga se realizó con anti-GAPDH. Las bandas densitometradas se muestran en la figura, éstas son resultados representativos. (n=9). ***p<0,001; ****p<0,001 respecto al control, #<0,05 respecto vs a E₂ 100nM, según el test de comparación múltiple de Dunnett.

Efecto de la sobreexpresión de p65 sobre la expresión de leptina placentaria mediada por E₂

Para profundizar en el análisis de una posible regulación del factor de transcripción NFκB en la expresión de leptina ejercida por E₂, decidimos estudiar el efecto de la sobreexpresión de la subunidad p65, responsable de la actividad transcripcional de los dímeros de NFκB.

Para ello las células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con el vector reportero pL1951 y el vector Rel A, que permite expresar la subunidad p65, y luego fueron tratadas con E₂. Posteriormente se midió la actividad transcripcional del gen reportero. Como se puede observar en la **Figura R19** la sobreexpresión de Rel A 0,5μg, aumenta significativamente la actividad reportera basal de pL1951. Sin embargo esta actividad no muestra una variación significativa en los experimentos en presencia de E₂. Estos resultados se podrían atribuir a un efecto de transrepresión ejercido por el factor NFκB sobre la inducción de la expresión de

leptina por E_2 como se ha reportado previamente en otras líneas celulares para el $ER\beta$ [210, 211].

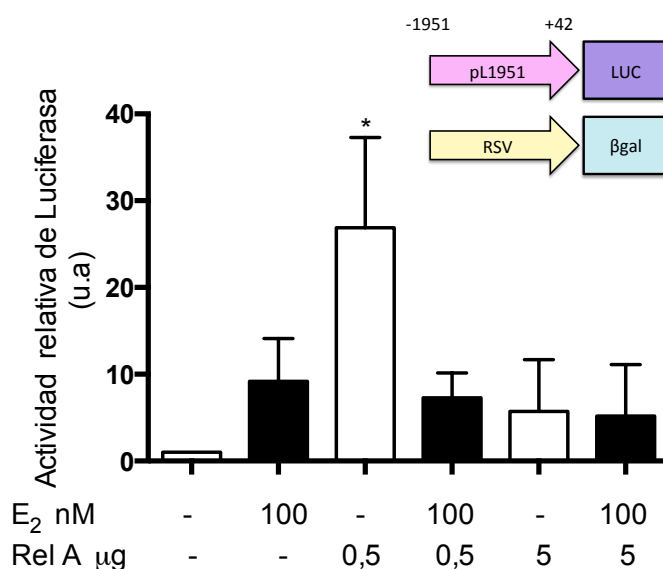


Figura R19: Células BeWo fueron transfectadas con el plásmido reportero pL1951 y el vector de expresión de la subunidad p65 de $NF\kappa B$ (Rel A). Posteriormente se le agregó E_2 en las concentraciones indicadas y 48 horas después se determinó la actividad de luciferasa relativa en el extracto celular y se normalizó contra la actividad de β -galactosidasa. (n=2) $* < 0,05$ vs al control, según el test de comparación múltiple de Dunnett.

Para demostrar la participación de la subunidad p65 en la regulación de la expresión de leptina placentaria, decidimos realizar un abordaje distinto. Se utilizaron células BeWo-Sh2 tratadas con doxicilina, las cuales presentan una reducción en los niveles de $ER\alpha$ tal como se explicó en experimentos anteriores. Las células fueron transfectadas con el vector reportero pL1951 y el vector de expresión Rel A y luego se las trató con E_2 . En la **Figura R20** se observan los resultados obtenidos. Se evidencia la anulación del efecto del E_2 sobre la actividad transcripcional del vector pL1951, tal como se describió en la **Figura R11** y se reportó anteriormente [108]. Al sobreexpresar Rel A se pudo observar una marcada inhibición de la expresión del gen reportero en la actividad basal del promotor de leptina.

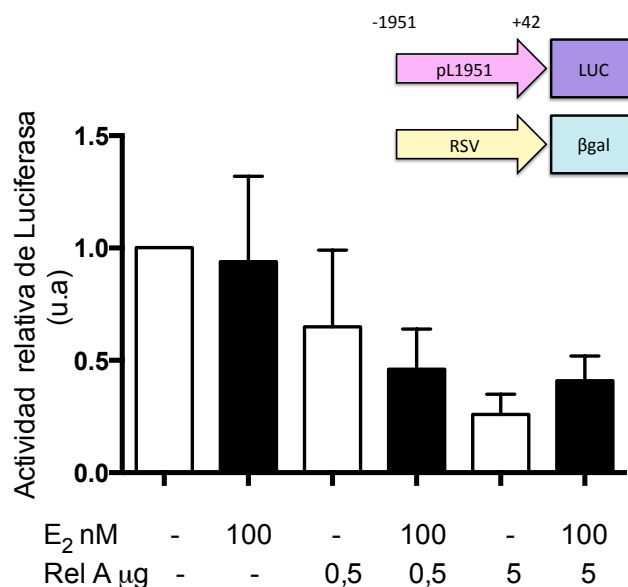


Figura R20: Células BeWo-Sh2 fueron transfectadas con los plásmidos pL1951 y Rel A, que permite expresar la subunidad p65 de NFκB. Posteriormente se le agregó E₂ en las concentraciones indicadas y 48 horas después se determinó la actividad de luciferasa relativa en el extracto celular y se normalizó contra la actividad de β-galactosidasa. (n=2).

Estos resultados estarían sugiriendo que el efecto de la sobreexpresión de p65 sobre el nivel basal de actividad del reportero sería dependiente de la expresión de ERα ya que al disminuir los niveles de este receptor el efecto de p65 se suprime. Por otro lado la sobreexpresión de p65 no estaría afectando la expresión de leptina mediada por E₂ en presencia o ausencia de ERα.

Con el objetivo de profundizar en la regulación ejercida por NFκB y E₂ se estudió en las células BeWo la localización subcelular de las proteínas p65 y ERα por inmunofluorescencia en células BeWo tratadas con E₂.

En primera instancia se realizó una curva de tiempo, donde las células se trataron durante 0, 30, 90, 120 y 180 minutos con E₂ 100 nM. En estos experimentos se visualizan las proteínas endógenas.

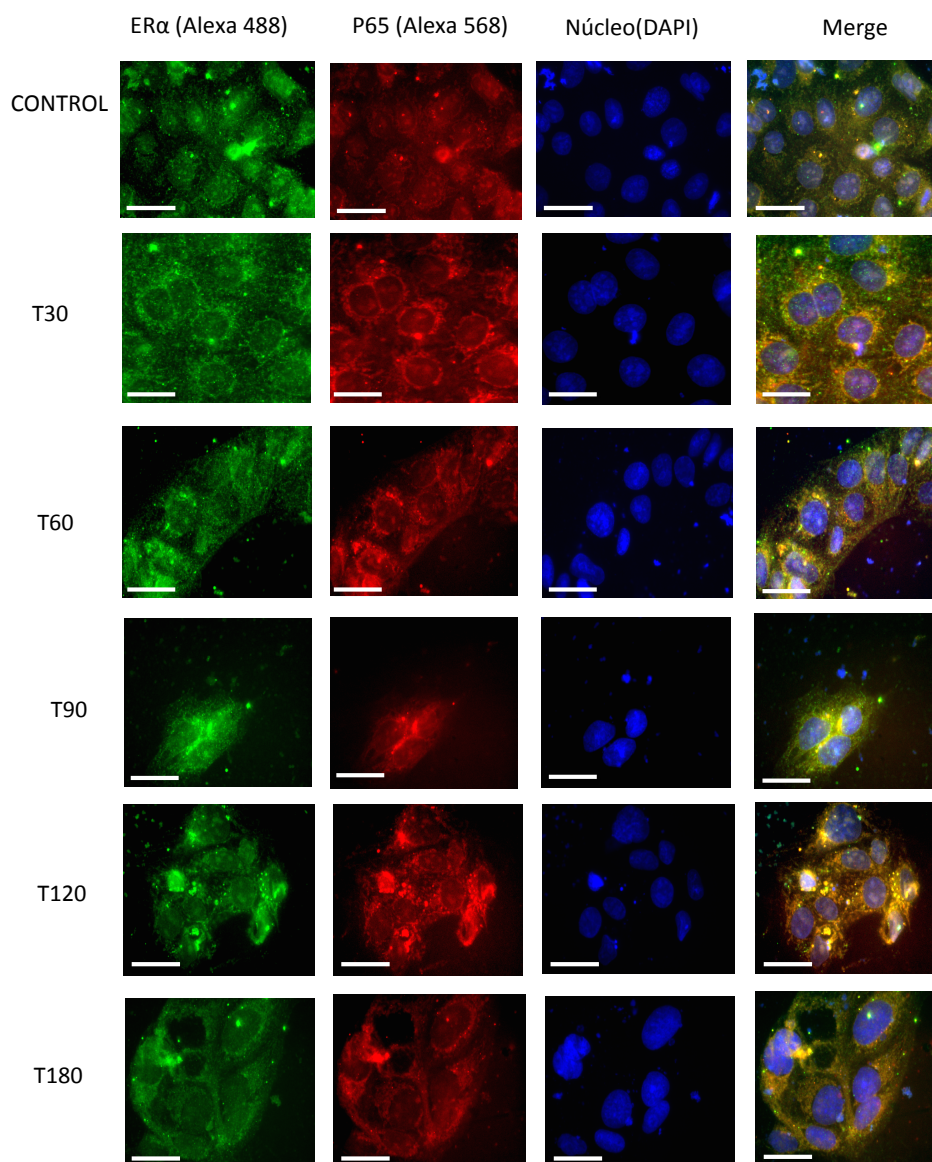


Figura R21: Las células BeWo fueron crecidas sobre cubre objetos en medio DMEM/F12 10% SFB. Luego de 24 horas fueron tratadas con E₂ 100 nM a distintos tiempos como se muestra en la figura, en medio DMEM/F12 1% SFB. Posteriormente fueron fijadas, permeabilizadas y bloqueadas como se describió en Materiales y Métodos.

Las células fueron incubadas durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-ER α y anti-p65. Para detectar la marcación se utilizaron dos anticuerpos secundarios uno ALEXA 488 anti-conejo (verde) y uno ALEXA 568 anti-ratón (rojo), el núcleo fue marcado con DAPI (azul). Los preparados fueron examinados con un microscopio de fluorescencia convencional. Se muestran imágenes representativas de cada experimento. (n=2) Barra: 100 μ m.

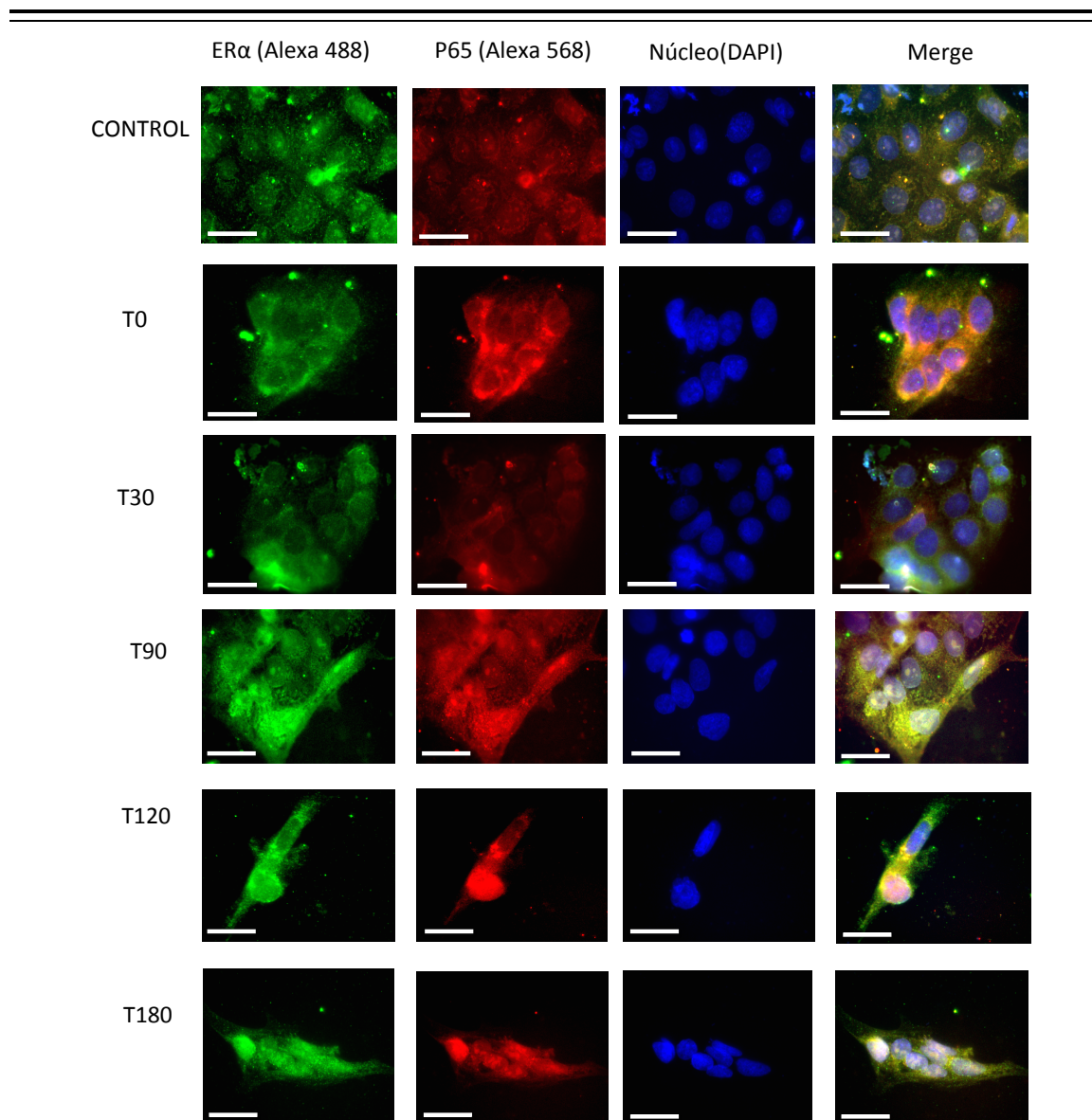


Figura R22: Las células BeWo fueron crecidas sobre cubre objetos en medio DMEM/F12 10% SFB. Luego fueron transfectadas, en medio privado de suero, con el plásmido Rel A y 24 horas después fueron tratadas con E_2 100nM a distintos tiempos, como se muestra en la figura, en medio DMEM/F12 1% SFB. Posteriormente fueron fijadas, permeabilizadas y bloqueadas como se describió en Materiales y Métodos. Las células fueron incubadas durante la noche a 4 °C con el anticuerpo primario anti-ER α y anti-p65. Para detectar la marcación se utilizaron dos anticuerpos secundarios uno ALEXA 488 anti-conejo (verde) y uno ALEXA 568 anti-ratón (rojo), el núcleo fue marcado con DAPI (azul). Los preparados fueron examinados con un microscopio de fluorescencia convencional. Se muestran imágenes representativas de cada experimento. (n=2) Barra: 100 μ m.

En la **Figura R21**, se puede observar que la localización subcelular de ER α y p65 se comporta de manera similar en los tiempos de tratamiento con E₂ 100 nM analizados. Las proteínas se encuentran preferentemente localizadas en el citoplasma de las células BeWo.

Posteriormente se realizaron experimentos de análisis de localización subcelular de p65 y ER α en ensayos de sobreexpresión de la proteína p65. Células BeWo fueron transfectadas con el vector Rel A y posteriormente tratadas con E₂ durante distintos tiempos. Las células fueron analizadas por inmunofluorescencia. En la **Figura R22**, se puede observar que la localización de ER α y p65 posee un comportamiento similar. A tiempos cortos de tratamiento con E₂ 100nM ambas proteínas se localizan en el citoplasma, y a tiempos más prolongado se observa que migran al núcleo, siendo aún más evidente a partir de los 90 minutos.

Al sobreexpresar p65 el equilibrio de la localización de la proteína se desplaza hacia el núcleo con el tratamiento con E₂ 100 nM. De manera similar al analizar la localización de ER α se observa que está favorecida la migración al núcleo con el tratamiento de E₂ 100 nM.

Por otro lado se realizaron experimentos de sobreexpresión de ambas proteínas ER α y p65 y se determinó la localización subcelular de las mismas a través de inmunofluorescencia. Células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con ambos vectores, HEGO y Rel A, e incubadas en presencia de E₂100 nM o el antiestrógeno ICI 182,780 100nM, durante 180 minutos. Como se observa en la **Figura R23**, en el control sin transfectar la expresión de ER α y p65 se detectó en el citoplasma celular. Por otro lado teniendo en cuenta los diferentes tratamientos, p65 y ER α , en presencia de E₂ se observan en el citoplasma a los 180 minutos de tratamiento. En el caso de los experimentos de cotransfección con los vectores de expresión HEGO y Rel A, ambos factores de transcripción se encuentran localizados en el núcleo. La localización no cambia en esta situación con el tratamiento con E₂ 100nM. Se puede observar que al sobreexpresar p65 y HEGO se sigue favoreciendo la migración de ambas proteínas hacía el núcleo.

Estos resultados sugieren que ambas proteínas presenta el mismo patrón de localización, ya sean sobreexpresadas o no.

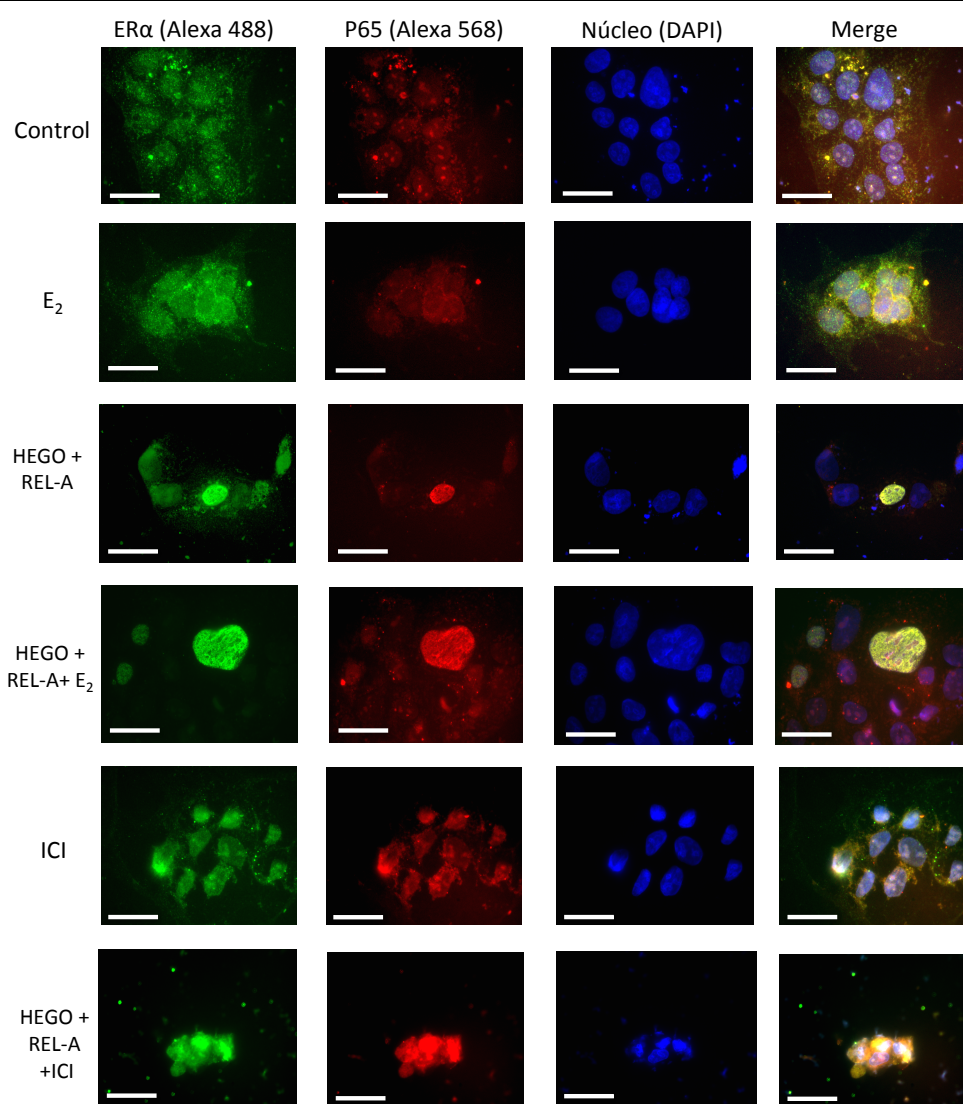


Figura R23: Células BeWo fueron crecidas sobre cubre objetos en medio DMEM/F12 10% SFB. Luego fueron transfectadas, en medio privado de suero, con el plásmido Rel A y HEGO y 24 horas después fueron tratadas con el antiestrogeno ICI 100 nM o E₂, durante 180 minutos según se indica en la figura. Posteriormente fueron fijadas, permeabilizadas y bloqueadas como se describió en Materiales y Métodos.

Las células fueron incubadas durante la noche a 4 °C con el anticuerpo primario anti-ER α y anti-p65. Para detectar la marcación se utilizaron dos anticuerpos secundarios uno ALEXA 488 anti-conejo (verde) y uno ALEXA 568 anti-ratón (rojo), el núcleo fue marcado con DAPI (azul). Los preparados fueron examinados con un microscopio de fluorescencia convencional. Se muestran imágenes representativas de cada experimento. (n=2) Barra: 100 μ m.

Por otro lado se analizó el efecto del tratamiento con el antiestrógeno ICI en la localización subcelular de las proteínas ER α y p65 (**Figura R23**). En los experimentos donde las células BeWo se encuentran transfectadas con los vectores de expresión HEGO y Rel A y luego tratadas con ICI 100 nM, se observa que ambas proteínas se encuentran en el núcleo, lo que nos indicaría que el antiestrógeno no estaría ejerciendo efecto alguno sobre la localización subcelular de ER α o p65.

Con el objetivo de profundizar en los resultados obtenidos de localización de ER α y p65 obtenidos por inmunofluorescencia, se decidió realizar ensayos de inmunoprecipitación. Para ello se realizaron experimentos donde se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti ER α y luego mediante Western Blot, se determinó la presencia de p65 en el inmunoprecipitado. Se realizaron ensayos similares inmunoprecipitando con anticuerpo anti Sp1.

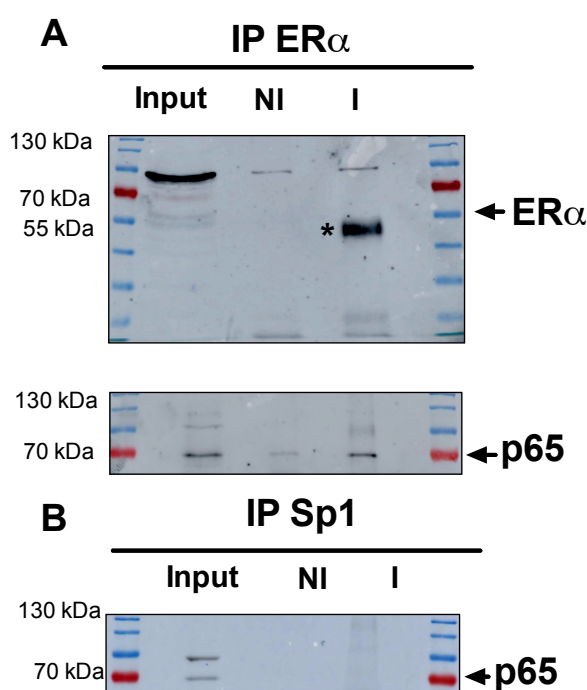


Figura R24: **A.** El factor ER α endógeno fue inmunoprecipitado de un extracto total de células BeWo, y luego se reveló por Western Blot con los anticuerpos ER α y p65 según se describe en Materiales y Métodos. **B.** El factor Sp1 endógeno fue inmunoprecipitado de un extracto total de células BeWo, y luego se reveló por Western Blot con los anticuerpos p65 según se describe en Materiales y Métodos. NI: no inmunoprecipitado I: inmunoprecipitado. * Inmunoglobulina de la cadena pesada, revelada, porque se

utilizó el mismo anticuerpo secundario en el Western Blot al que se utilizó durante la inmunoprecipitación.

Como se puede observar en la **Figura R24 A**, al inmunoprecipitar con el anticuerpo anti ER α fue posible visualizar la proteína p65 en el inmunoprecipitado, lo que estaría reforzando los resultados obtenidos que vimos anteriormente, en los ensayos de localización subcelular. Por otro lado, dado los resultados obtenidos en los que ER α induce la expresión de leptina y esta regulación está involucrando la participación de Sp1 y NF κ B, se decidió analizar la posible formación de complejos entre ER α -NF κ B y Sp1. Para ello se realizaron experimentos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti Sp1 y luego se reveló la presencia de p65 en el inmunoprecipitado.

Sin embargo, como se observa en la **Figura R24 B** no se reveló banda de p65 en el inmunoprecipitado lo que podría estar indicando que ER α se encontraría en diferentes complejos, interactuando con distintas proteínas dependiendo de los estímulos.

Estos resultados en conjunto sugieren que existiría un efecto cooperativo entre el ER α y el factor NF κ B.

La interacción entre ERs y los factores de transcripción puede depender de las vías de señalización activadas, de la presencia y dinámica de los cofactores, de la presencia y la estructura del ligando, del tipo y distribución de secuencias regulatorias y de la estructura de la cromatina presente en el promotor [212, 213].

Capítulo 3

**Efecto de la vía de transducción de señales de PKA sobre
la expresión de leptina dependiente de E_2**

La vía de señalización de PKA media el efecto del E₂ sobre la expresión de leptina placentaria

El AMPc es la molécula de señalización más antigua conocida. Hay evidencia reportada donde se describió que el aumento intracelular del AMPc generó la disminución de la expresión del ARNm de leptina y de la secreción proteica en adipocitos en ratas [214], y que esta inhibición está mediado por la vía de PKA [115]. Sin embargo se ha observado que la secreción en las células BeWo y en los explantos placentarios se ve aumentada por forskolina, un activador de la adenilato ciclasa (AC) [73, 116]. También hay evidencia donde se ha observado que el AMPc aumenta la expresión de leptina a nivel de ARNm y de proteína tanto en células de coriocarcinoma como en explantos de placenta humana a término. En ambos modelos, ejercería su acción a través de la vía de PKA [96, 106].

Teniendo esta información se decidió analizar si la vía de la PKA se encuentra involucrada en el efecto inductor de E₂ sobre la expresión de leptina, para ello se realizaron experimentos utilizando inhibidores farmacológicos de la vía. Se analizó el efecto de un inhibidor específico de PKA, H89 y de un inhibidor de la adenilato ciclasa SQ22,536. Se trataron las células BeWo con H89 10 μ M y SQ22,536 100 μ M y 30 minutos después se les adicionó el E₂ 100 nM en medio privado de suero. Se determinó el ARNm de leptina por qRT-PCR. Los resultados obtenidos se grafican en la **Figura R25**, donde se puede observar una disminución significativa de la expresión del ARNm de leptina con el pretratamiento con cada uno de los inhibidores, tanto a nivel de expresión de leptina basal como en la inducida por E₂. Los resultados obtenidos con los inhibidores farmacológicos, nos demostraría que la vía de PKA podría estar involucrada en la inducción que ejerce el E₂ sobre la expresión de leptina en células BeWo.

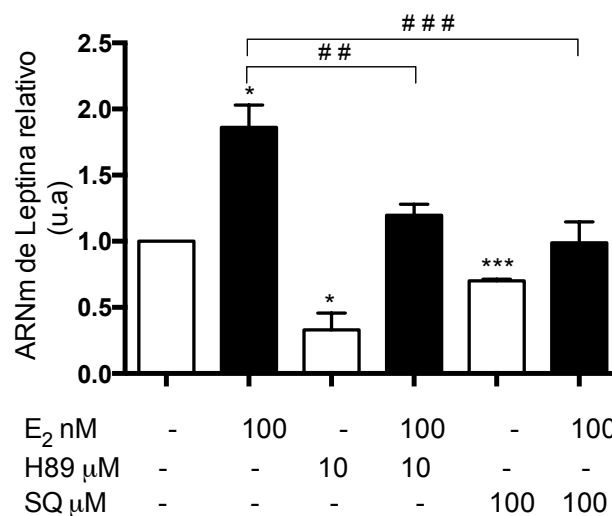


Figura R25: Células BeWo fueron tratadas con H89 10 uM o SQ 22536 100 uM, posteriormente se les adicionó E₂ 100nM. Luego de 48 horas el ARN se extrajo como se indica en Materiales y Métodos. El ARNm de leptina se cuantificó mediante qRT-PCR. Se utilizó ciclofilina como estándar interno. (n=2) *p<0,05, ***p<0,001; respecto al control y ##<0,01, ###<0,001, vs a E₂ 100nM, según el test de comparación múltiple de Dunnett.

Para profundizar en el papel de la vía de PKA en la estimulación de la expresión de leptina inducida por E₂, decidimos evaluar la expresión de leptina a nivel proteico. Para ello las células BeWo, fueron tratadas con el inhibidor H89 10 μM y posteriormente se les agregó E₂ 100 nM en medio privado de suero. En la **Figura R26**, se puede observar que el aumento ejercido por el E₂ sobre la expresión de leptina, se ve inhibido por el pretratamiento con H89. Estos resultados reforzarían lo visto en la **Figura R25**, indicando que la vía de PKA estaría mediando el efecto que ejerce el E₂ sobre la expresión de leptina en las células BeWo.

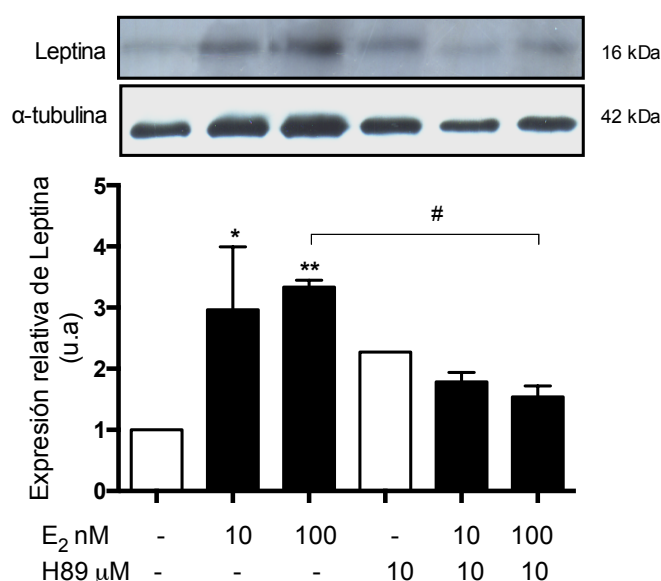


Figura R26: Células BeWo fueron tratadas con H89 10 μ M posteriormente se les adicionó E₂ 10 nM y 100nM. Luego de 48 horas se determinó la expresión de leptina por Western Blot. El control de carga se realizó con α -tubulina. Las bandas densitometradas se muestran en la figura, éstas son resultados representativos de tres réplicas. (n=3) * p <0,05, ** p <0,01; respecto al control, #<0,05 vs E₂ 100nM, según el test de comparación múltiple de Dunnett.

Posteriormente decidimos evaluar el efecto a nivel proteico del tratamiento con el inhibidor de la adenilato ciclasa, SQ22,536. Se trataron las células BeWo con 100 μ M de SQ y 1, 10, y 100 nM de E₂, en medio depletado de suero. Los resultados analizados en la **Figura R27** muestran una disminución significativa en el efecto del E₂ sobre la expresión de leptina. Por otro lado se observa que el tratamiento con SQ también disminuye la expresión basal de leptina. Los resultados obtenidos sugieren que la vía de PKA estaría modulando el efecto inductor del E₂ sobre la expresión de leptina en las células BeWo.

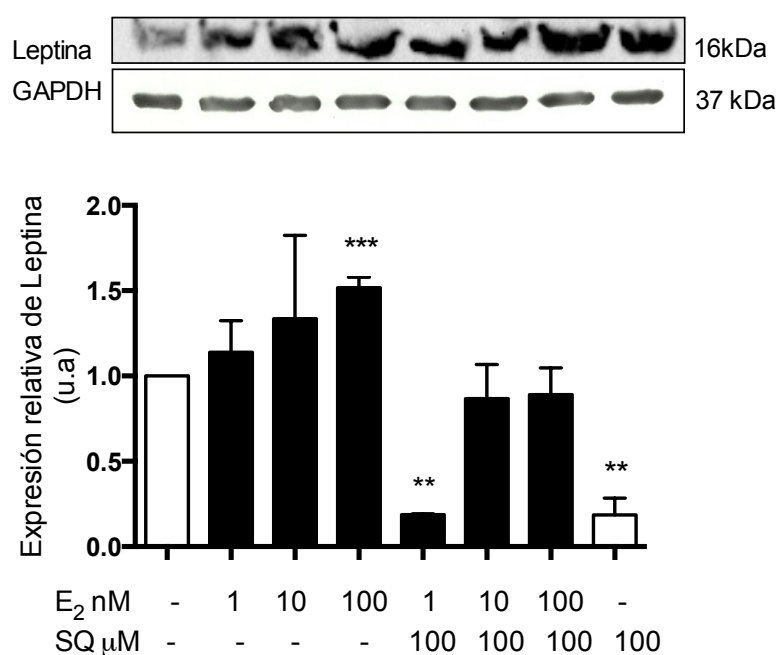


Figura R27: Células BeWo fueron tratadas con SQ 22536 100 μ M, posteriormente se les adicionó E₂, 1 nM, 10nM y 100nM. Luego de 48 horas se determinó la expresión de leptina por Western Blot. El control de carga se realizó con GAPDH. Las bandas densitometradas se muestran en la figura, éstas son resultados representativos de dos réplicas. (n=3) **p<0,01, ***p<0,001; respecto al control, según el test de comparación múltiple de Dunnett..

Para profundizar en el análisis de una posible regulación del efecto inductor del E₂ a través de la vía de la PKA, se decidió estudiar el efecto del tratamiento con los inhibidores en un modelo más fisiológico. Para ello se utilizaron, células de explantos placentarios humanos provenientes de placentas normales a término.

Los explantos fueron tratados con los inhibidores H89 10 μ M y SQ22,536 100 μ M durante 30 minutos y luego se los trató con E₂ 100 nM durante 24 horas. Mediante ensayos de Western Blot evaluamos la expresión de leptina. Como podemos observar en la **Figura R28** el aumento ejercido por el E₂ sobre la expresión de leptina, se ve bloqueado en presencia de cada uno de los inhibidores.

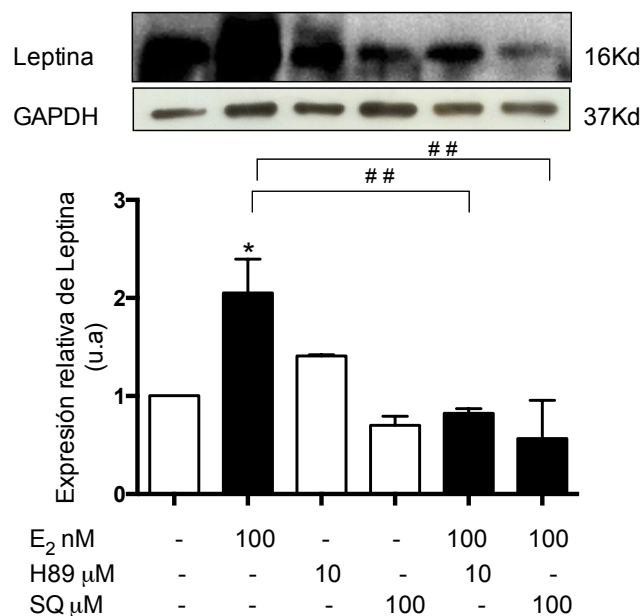


Figura R28: Explantos obtenidos de placentas humanas normales a término fueron tratados con H89 10 μ M y SQ 22536 100 μ M, posteriormente se les adicionó E₂ 100nM. Luego de 24 horas se determinó la expresión de leptina por Western Blot. El control de carga se realizó con GAPDH. Las bandas densitometradas se muestran en la figura, éstas son resultados representativos de dos réplicas (n=3). * $p < 0,05$, respecto al control, ## $< 0,01$ vs E₂ 100nM, según el test de comparación múltiple de Dunnett.

Estos resultados refuerzan la idea de que la vía de PKA está involucrada en el efecto de E₂ sobre la expresión de leptina, ya que al inhibir la vía de señalización mediada por PKA se suprimió la inducción de la leptina por E₂, tanto a nivel del ARNm como a nivel proteico, tanto en células BeWo como en explantos de placentas normales humanas a término.

Efectos de CREB en la expresión de leptina placentaria inducida por E₂

Se sabe que en el promotor de leptina se encuentran varios elementos de respuesta a AMPc, denominados CRE. Particularmente uno se localiza cerca del sitio de unión para el Sp1 así como también de la secuencias *half ERE* en la región mínima del promotor de respuesta a estradiol (**Figura I13**).

Estudios previos de nuestro grupo de trabajo han demostrado que CREB aumenta su estado de fosforilación cuando las células placentarias son incubadas con un análogo permeable de AMPc, y que la sobreexpresión de CREB aumenta la actividad transcripcional del promotor de leptina [80, 96, 106]. Estos resultados sugieren que estas secuencias podrían participar en la regulación transcripcional de la leptina en la placenta, y que la proteína CREB interactuaría con dichas secuencias mediando efectos estimulatorios del AMPc sobre la expresión de leptina.

Para analizar si la vía de transducción de señales mediada por AMPc se encuentra involucrada en el efecto inductor del estradiol sobre la expresión de leptina a nivel de los factores de transcripción, se realizaron transfecciones transitorias en células BeWo con los vectores de expresión CREB-M y CREB-K, que codifican para dos mutantes dominantes negativos de CREB. La mutante CREB-M presenta una sustitución en la posición 133 de serina por alanina, de esta manera se anula su sitio principal de fosforilación. Por otro lado, CREB-K tiene la capacidad de formar dímeros pero no es capaz de interactuar con la secuencia CRE presente en el ADN. De esta manera podemos analizar el efecto que tiene la proteína CREB sobre la regulación de la expresión de leptina inducida por E₂.

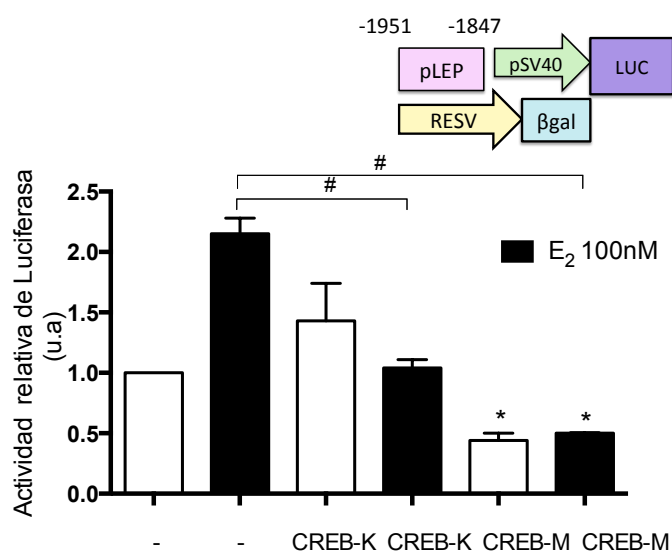


Figura R29: Células BeWo fueron transfectadas el plásmidos p1860, y con las construcciones CREB-K (5μg) y CREB-M (5μg). Se las incubó por 48 hs en presencia de 100nM de E₂ y posteriormente se determinó la actividad de luciferasa relativa en el extracto celular y se normalizó contra la actividad de β-galactosidasa. Los resultados

se relativizaron al control realizado sin la expresión de las proteínas mutadas (n=2). *<0,05 vs al control, #<0,05 respecto al tratamiento con E₂ en ausencia de los vectores CREB-M y CREB-K, según el test de comparación múltiple de Dunnett.

Para ello células BeWo fueron transfectadas con el vector p1860, que presenta la región del promotor de leptina de -1951 a -1847 pb, y con los vectores CREB-K o CREB-M, y luego se las trató con E₂. Los resultados obtenidos en la **Figura R29** nos indican que la expresión de CREB-K o CREB-M inhiben los efectos estimulatorios ejercidos por el E₂ en la expresión de leptina placentaria. Por otro lado se puede observar que el vector CREB-M genera una disminución significativa en los niveles de la actividad basal del promotor de leptina.

A partir de lo observado anteriormente, se decidió realizar experimentos con el vector CREB-M y el vector reportero pL1951. De los resultados obtenidos mostrados en la **Figura R30**, observamos una disminución significativa de los niveles de la actividad promotora basal de esta construcción reportera, como así también de la inducida por E₂.

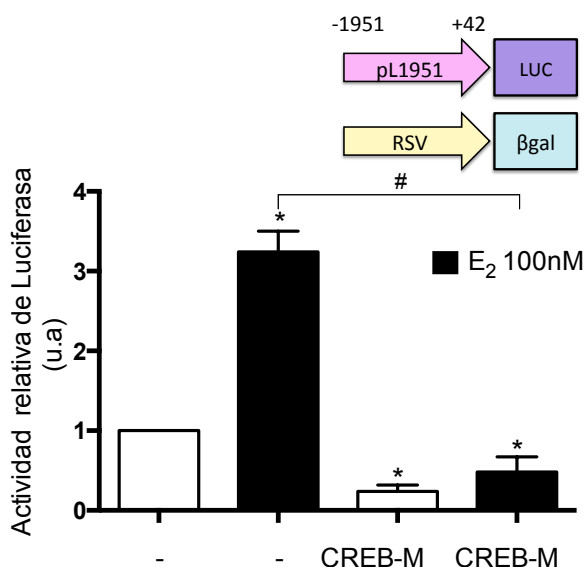


Figura R 30: Células BeWo fueron transfectadas con el plásmido pL1951, y con la construcción CREB-M (5μg). Posteriormente, se le adicionó E₂ en la concentración indicada y dos días después se determinó la actividad de luciferasa relativa en el extracto celular y se normalizó contra la actividad de β-galactosidasa. Los resultados se relativizaron al control realizado sin la expresión de CREB-M. (n=2). *<0,05 vs al

control, #<0,05 respecto al tratamiento con E₂ en ausencia de los vectores CREB-M, según el test de comparación múltiple de Dunnett.

Los resultados obtenidos sugieren que el factor de transcripción CREB sería una proteína involucrada en la regulación de la expresión de leptina placentaria, tanto a nivel basal como en la inducida por E₂.

La acetilación y la deacetilación median el efecto del E₂ en la expresión de leptina

Para profundizar en el estudio de la participación de CREB en la expresión de leptina placentaria inducida por E₂, nos planteamos analizar el efecto de CBP (proteína de unión a CREB) en presencia de E₂ y analizar la expresión de leptina. Esta proteína, es un coactivador que modula la actividad de distintos factores de transcripción, entre otros aumentando la actividad de ER [183].

Para ello realizamos una transfección transitoria con el vector de expresión para CBP y posteriormente tratamos las células con E₂ y determinamos el ARNm de leptina mediante qRT-PCR.

Como se puede observar en la **Figura R31**, al sobreexpresar la proteína CBP se produce un aumento del ARNm de leptina inducido por E₂.

No podemos explicar por qué la sobreexpresión de CBP con 0,5 µg produce una disminución de la expresión de leptina placentaria. Se necesita realizar más experimentos para dilucidar este comportamiento.

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de CBP potencia el efecto del E₂ sobre la expresión de leptina.

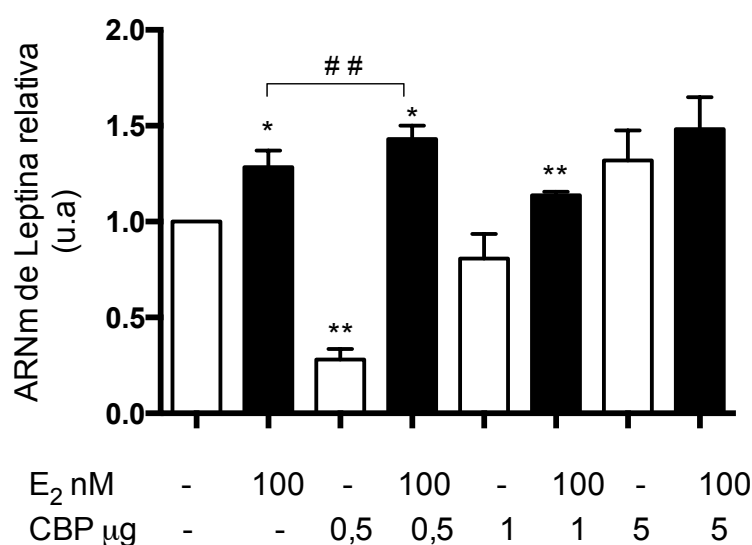


Figura R31: Células BeWo fueron transfectadas con el plásmido de expresión CBP, posteriormente se les adicionó E₂ 100nM. Luego el ARN se extrajo como se indica en Materiales y Métodos. El ARNm de leptina se cuantificó mediante qRT-PCR. Se utilizó ciclofilina como estándar interno. (n=2) *p<0,05; **p<0,01 respecto al control, ##<0,01 vs E₂ 100nM según el test de comparación múltiple de Dunnett.

Como otra estrategia experimental se realizaron experimentos de transfecciones transitorias con el plásmido reportero pL1951. Las células BeWo fueron transfectadas con el vector pL1951 y con el vector de expresión para CPB, y luego se las trató con E₂. A las 48 horas se midió la expresión del promotor de leptina placentaria. En la **Figura R32**, se observa que la sobreexpresión de CBP con 0,5 y 1 μg genera un aumento significativo de la actividad reportera basal. Mas aún el factor de transcripción CBP sobreexpresado con 1 μg de plásmido incrementa significativamente la actividad promotora inducida por 100 nM E₂.

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de CBP, produce una estimulación sobre el efecto inductor de E₂ en la expresión de leptina, lo que estaría indicando que CBP podría estar involucrado en la regulación de la expresión de leptina inducida por E₂.

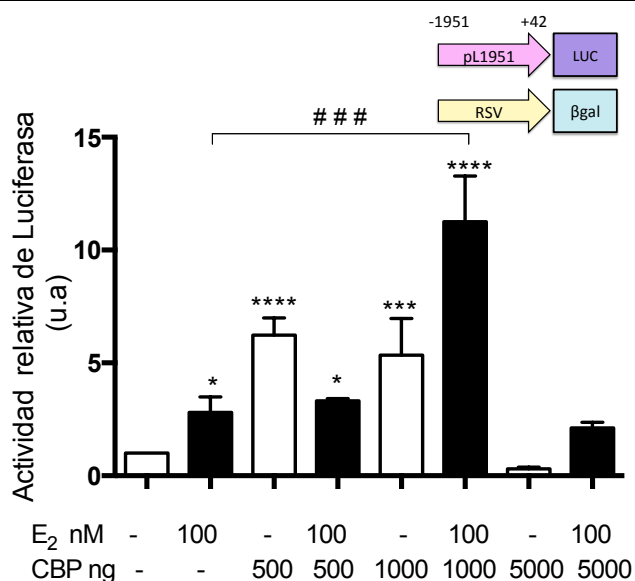


Figura R32: Las células BeWo fueron transfectadas con el vector pL1951 y el plásmido de expresión CBP en las concentraciones indicadas, posteriormente se les adicionó E₂ 100nM. Luego de 48 horas, se determinó la actividad de luciferasa relativa en el extracto celular y se normalizó contra la actividad de β-galactosidasa. (n=5) *<0,05; ***p<0,001; ****p<0,001 vs al control, ###p<0,001 vs E₂ 100 nM, según el test de comparación múltiple de Dunnett.

Dado que CBP posee actividad de acetiltransferasa de histonas, decidimos investigar si su efecto potenciador de la expresión de leptina placentaria podría deberse a esta actividad enzimática más que a su función coactivadora general. Para analizar esta posible función de la sobreexpresión de la proteína CBP sobre la expresión de leptina decidimos realizar ensayos sobreexpresando la proteína HDAC-1 que posee actividad de histona deacetilasa. Su función es remover el grupo acetilo de algunos de los residuos de arginina o lisina de las histonas, resultando en una mayor condensación de la estructura de la cromatina, lo que se asocia con la represión de genes [215].

Las células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con el vector de expresión para HDAC-1 para así determinar el ARNm de leptina.

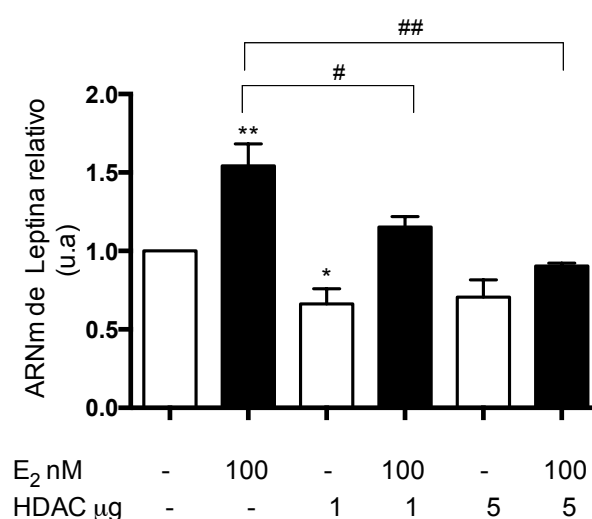


Figura R33: Las células BeWo fueron transfectadas con el plásmido de expresión para la proteína HDAC-1, posteriormente se les adicionó E₂ 100 nM. Luego de 48 horas, el ARN se extrajo como se indica en Materiales y Métodos. El ARNm de leptina se cuantificó por qRT-PCR. Se utilizó ciclofilina como estándar interno. (n=2) *p<0,05; **p<0,01 respecto al control, # p<0,05; ##p<0,01 vs E₂ 100nM según el test de comparación múltiple de Dunnett.

Como se puede observar en la **Figura R33**, la sobreexpresión de la proteína HDAC-1 disminuyó significativamente la expresión del ARNm de leptina tanto a nivel basal como en el inducido por E₂. Esta disminución en la expresión del ARNm de leptina se debe a la acción que ejerce ésta histona deacetilasa sobre la expresión genómica y la inhibición del efecto estimulador del E₂.

A partir de lo observado anteriormente se decidió realizar experimentos con el vector HDAC-1 y el vector reportero pL1951. Cuando analizamos la actividad de promotor de leptina luego de la transfección del vector de expresión de HDAC-1, observamos que se produce una disminución en la actividad de promotor de leptina tanto a nivel basal como en el inducido por E₂ (**Figura R34**).

Estos resultados en conjunto estarían sugiriendo que la proteína HDAC-1 generaría una disminución en la expresión a nivel del ARNm como de actividad del promotor de la leptina.

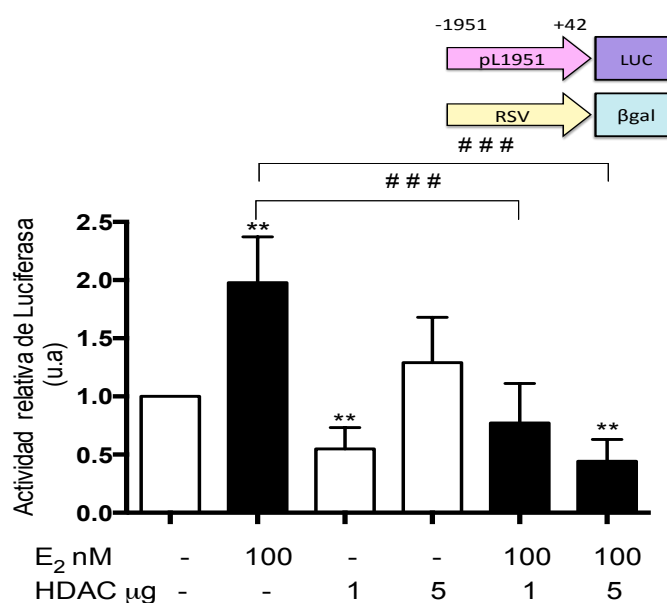


Figura R34: Células BeWo fueron transfectadas con el vector pL1951 y el plásmido de expresión de la proteína HDAC-1 en las concentraciones indicadas, posteriormente se les adicionó E₂ 100 nM. Luego de 48 horas, se determinó la actividad de luciferasa relativa en el extracto celular y se normalizó contra la actividad de β-galactosidasa. (n=5) *<0,05, **p<0,01; vs al control, ###p<0,001 vs E₂ 100nM, según el test de comparación múltiple de Dunnett.

Siguiendo con la misma línea de razonamiento, y así poder confirmar los resultados obtenidos hasta el momento, decidimos utilizar un inhibidor de histonas deacetilasas denominado TSA (Tricostatina A). Para ello, las células BeWo fueron tratadas con TSA 0,5 y 1 µM y posteriormente se le adicionó 100 nM de E₂. Mediante ensayos de qRT-PCR se midió la expresión del ARNm de leptina. En la **Figura R35** se puede evidenciar que el tratamiento con TSA es capaz de generar un aumento en los niveles de ARNm de leptina inducido por E₂. Este resultado muestra que el inhibidor de deacetilasas, el TSA, podría modular la inducción de E₂ sobre la expresión de leptina e involucrar modificaciones de acetilación de histonas, en células BeWo.

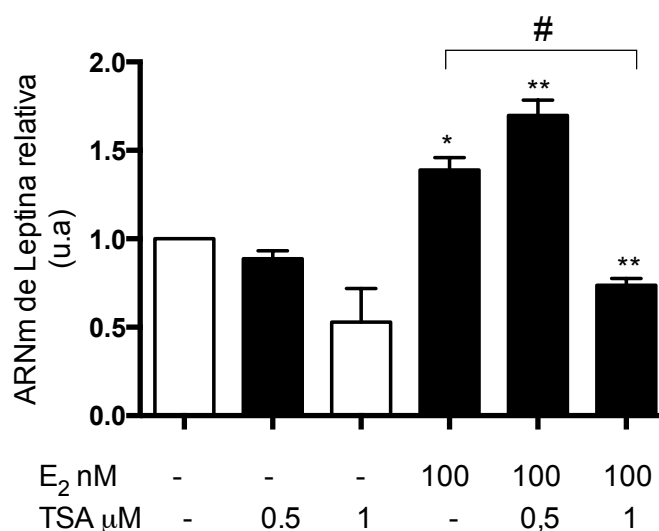


Figura R35: Células BeWo fueron tratadas con TSA, posteriormente se les adicionó E₂ 100 nM. Luego de 48 horas El ARN se extrajo como se indica en Materiales y Métodos. El ARNm de leptina se cuantificó mediante qRT-PCR. Se utilizó ciclofilina como estándar interno. (n=2) *p<0,05, **p<0,01; respecto al control, #p<0,05 vs E₂ 100nM según el test de comparación múltiple de Dunnett.

En base a lo previamente descripto en células BeWo, nos propusimos evaluar la expresión de leptina en explantos placentarios tratados con TSA y E₂ como modelo más fisiológico. En estos experimentos se realizó la determinación de la expresión de leptina mediante Western Blot. En la **Figura R36**, se puede observar que el tratamiento con 0,5 y 1 μM de TSA aumenta significativamente la expresión de leptina en este modelo. En estos ensayos no se observó incremento en la expresión de leptina inducida por E₂ luego del tratamiento con el inhibidor de deacetilasas. Se ha descripto que TSA es capaz de inhibir la acción del ERα en otros tejidos [216]. Tal vez este pueda ser el motivo por el cual no se observa variación en la expresión de leptina inducida por E₂ en los explantos tratados con TSA.

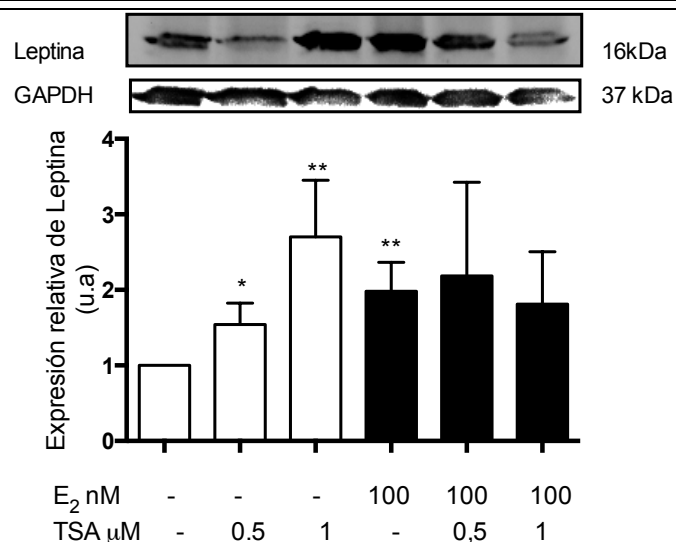


Figura R36: Explantos de placentas humanas normales a término fueron tratados con TSA en las concentraciones indicadas, posteriormente se les adicionó E₂ 100 nM. Luego de 48 horas se determinó la expresión de leptina por Western Blot. El control de carga se realizó con anti-GAPDH. Las bandas densitometradas se muestran en la figura, éstas son resultados representativos de cuatro réplicas. (n=4)*p<0,05, **p<0,01; respecto al control, según el test de comparación múltiple de Dunnett.

Como control de los ensayos anteriores, decidimos analizar la acetilación de una de las histonas, la H3 (H3_{AC}). Para ello células BeWo fueron tratadas con el inhibidor TSA, en concentraciones crecientes y luego de la estimulación con E₂, se estudió la acetilación de H3 mediante ensayo de Western Blot. Si bien estos resultados son preliminares, se puede observar en la **Figura R37**, que el tratamiento con TSA, parecería generar un aumento de la acetilación de la histona H3 (H3_{AC}) con ambas concentraciones. Las células inducidas con E₂ 100nM muestran resultados similares.

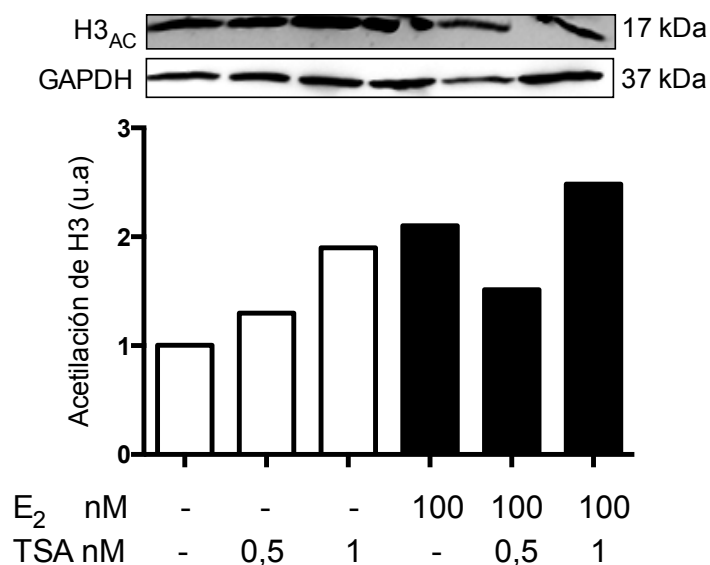


Figura R37: Células BeWo fueron tratadas con TSA, posteriormente se les adicionó E₂ 100 nM. Luego de 48 horas se determinó la expresión de H3 acetilada (H3_{AC}) por Western Blot. El control de carga se realizó con anti-GAPDH. Las bandas densitometradas se muestran en la figura, éstas son resultados representativos (n=1).

Con el objetivo de evaluar la relación entre la vía de la PKA y la acetilación de la histona H3 (H3_{AC}), se realizaron experimentos en presencia del inhibidor SQ22,536. Para ello células BeWo fueron tratadas con el inhibidor y posteriormente se les agregó 1, 10 o 100 nM de E₂. Se midió la deacetilación de la histona H3 mediante el ensayo de Western Blot. En la **Figura R38**, se observa una disminución significativa de la acetilación de la histona H3 en presencia de estradiol 1 y 10 nM. El tratamiento con SQ 100 µM produce una disminución de la presencia de H3 acetilada en presencia o ausencia de estradiol.

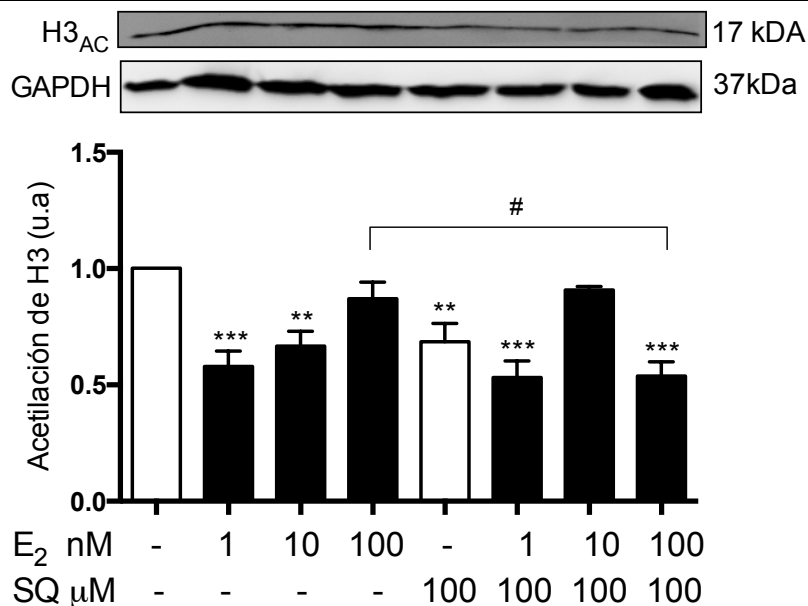


Figura R38: Células BeWo fueron tratadas con SQ 22536 100 uM, posteriormente se les adicionó E₂ 1 nM, 10nM y 100 nM. Luego de 48 horas se determinaron los niveles de histona H3 acetilada (H3_{AC}) por Western Blot. El control de carga se realizó con anti GAPDH. Las bandas densitometradas se muestran en la figura, éstas son resultados representativos de dos réplicas. (n=2) **p<0,01, ***p<0,001; respecto al control, #<0,05 vs E₂ 100nM, según el test de comparación múltiple de Dunnett.

Estos resultados estarían sugiriendo una interrelación entre la inducción de la expresión de leptina ejercida por el E₂ y el eje CREB/CBP mediado por la vía de señalización de PKA. Por otro lado demostramos la posibilidad de involucrar modificaciones por acetilación de las histonas presentes en la región de promotor de leptina, ya que tanto la sobreexpresión de una histona deacetilasa, como su inhibición modifican la acción que ejerce el estradiol sobre la expresión de la leptina placentaria.

DISCUSIÓN

La implantación del blastocito en el epitelio luminal del endometrio es uno de los pasos más importantes en el establecimiento y mantenimiento del embarazo. Un problema menor podría llevar a graves defectos de corto o largo plazo [217].

Una implantación exitosa depende de la sincronización del desarrollo de los estadios del embrión en sí mismo y una serie de eventos complejos tanto moleculares como celulares que son inducidos durante el embarazo en el útero mediante reguladores autocrinos y paracrinos [16]. Muchas moléculas, como las hormonas, citoquinas, moléculas de adhesión y factores de crecimiento, forman parte del diálogo del blastocisto y el endometrio materno para lograr la implantación [217].

Particularmente en este trabajo de Tesis nos enfocamos en los factores de transcripción y transducción de señales involucrados en la expresión de una citoquina en particular, la leptina y la inducción que genera el estradiol sobre ésta, en las células de placenta humana.

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 [88, 218].

El nivel de leptina durante el embarazo es elevado, llegando a su pico durante el segundo trimestre y hasta el final del embarazo, mientras que en el plasma materno los niveles disminuyen a los valores normales 24hs después del parto [106].

La regulación completa de la producción de leptina en la placenta todavía se encuentra poco descrita, sin embargo trabajos previos han demostrado que hCG y AMPc aumentan la expresión de leptina a través de un *crosstalk* entre las vías de señalización de PKA y MAPK [103, 219]. También se sabe que se encuentra regulada por factores como la insulina, la hipoxia, los glucocorticoides y el 17 β -estradiol (E₂) [80, 104, 129].

En este trabajo en particular nos centramos en el estudio de la regulación del efecto inductor del E₂ sobre la expresión de la leptina placentaria.

Los esteroides juegan un rol importante en el desarrollo y el mantenimiento de los tejidos reproductivos [220]. El E₂ es el estrógeno más potente y dominante en los humanos [97]. La placenta humana sintetiza estrógeno durante el embarazo [221], asociado a la invasión del citotrofoblasto [222, 223] y a la diferenciación del

trofoblasto [159, 162]. El estradiol puede influenciar en diferentes aspectos el funcionamiento de la placenta y el desarrollo fetal en los humanos y en los primates [155], juega un rol crucial en la regulación del crecimiento fetal, el inicio del parto, la esteroideogénesis del parto, la liberación de neuropéptidos, de glicoproteínas y también la secreción de leptina [103]. Se ha evidenciado que el E₂ aumenta la actividad del promotor de leptina en las células JEG-3 [104].

Estudios previos de nuestro grupo de trabajo han demostrado que induce la expresión de leptina placentaria no solo en las células BeWo sino también en los explantos placentarios humanos probablemente involucrando ambos receptores de estrógenos, solubles y de membrana [94].

El estradiol puede modular su efecto a través de mecanismos genómicos o no genómicos. La actividad tradicional de un ERE implica la unión del receptor unido al ligando en una secuencia palindrómica específica de ADN dentro de los promotores de los genes que responden a los estrógenos [142]. Los efectos genómicos de los estrógenos también podrían explicarse por un mecanismo ERE independiente, ya que los ERs pueden regular la expresión génica mediante la modulación de la función de otras clases de factores de transcripción a través de interacciones proteína-proteína en el núcleo. Se reportaron genes con promotores con secuencias ricas en GC que son reguladas de igual manera a través de una interacción de los ERs con los distintos factores de transcripción como Sp1. Otros factores que pueden interactuar con los ERs incluyen a C/EBP, NFκB, CRE y AP-1 [25, 142, 205].

En este trabajo de tesis, se emplearon como modelos experimentales la línea celular trofoblástica BeWo y explantos de placentas humanas a término, en donde se ha reportado la expresión de leptina y de su receptor, así como también la presencia de los receptores de estrógenos ERα y ERβ [72, 116, 199, 224]. Las células BeWo son células citotrofoblásticas que han sido utilizadas por distintos investigadores como modelo para el estudio de la expresión, secreción y acción de leptina en células trofoblásticas [72, 203]. Los explantos de placenta conservan la matriz extracelular placentaria, de modo que las células se encuentran en un ambiente similar al natural y responderían de modo comparable al que lo harían *in vivo* [225].

El factor de transcripción Sp1 aumenta la expresión de leptina placentaria

Sp1 es un factor de transcripción que se encuentra en todos los tipos celulares de los mamíferos. Sin embargo, se conoce que se encuentra involucrado en la regulación tejido específica del ciclo celular, y de genes de respuesta de distintas vías de señalización [173]. Sp1 funciona a través del reclutamiento de la maquinaria basal de transcripción y de la interacción con la proteína de unión TATA (TBP) y múltiples factores asociados a TBP (TAFs) [226]. El factor Sp1 también regula la expresión de los genes a partir de la modulación del estado de la cromatina. Se ha descubierto que interactúa con enzimas que modifican histonas, incluyendo la histona acetil transferasa p300/CBP [177]. También otras proteínas pueden unirse a Sp1 y activar la transcripción sinérgicamente, tales como las proteínas ER. Cuando el ER se une a Sp1 aumenta la unión Sp1-DNA a los elementos de respuesta ERE independientemente de los estrógenos [212].

Teniendo en cuenta que el estradiol juega un rol importante en el control de numerosas hormonas placentarias y pareciera mediar la expresión de leptina placentaria, hipotetizamos que el factor de transcripción Sp1 podría regular el efecto del E₂ sobre la expresión de leptina.

A partir de un ensayo *in silico*, se ha encontrado que el promotor de leptina comprendido entre las bases -1951 y -1847, contiene la región *half ERE* y un sitio de unión para Sp1. Este sitio se encuentra muy cerca del *enhancer* de leptina placentaria descrito anteriormente [100] (**Figura I13**).

Para elucidar los efectos específicos de los estrógenos y determinar los factores de transcripción que median su mecanismo de acción, decidimos estudiar su acción sobre la expresión de leptina, directamente sobre el promotor de leptina, dado que se ha identificado la secuencia consenso de elementos sensibles a estrógenos (ERE) en la región promotora de LEP.

Teniendo en cuenta estos datos, se decidió estudiar la regulación de la expresión de leptina por el factor de transcripción Sp1. La sobreexpresión de Sp1 se analizó en las células BeWo (**Figura R1**). Se observó un aumento significativo a través del análisis por Western Blot. La expresión de leptina en los modelos estudiados fue analizada por Western blot, qRT-PCR y transfecciones transitorias, con los vectores pL1951 y pL1860. El vector pL1951 contiene clonado el promotor de leptina hasta -1951pb y el vector pL1860 contiene clonada la región comprendida entre -1951 a -1847pb

que contiene uno de los *enhancers* de leptina placentarios descritos por Bi y colaboradores [100]. Esta región promotora es además, la mínima región de respuesta a E₂ según resultados ya publicados de nuestro grupo de investigación [94]. Los resultados obtenidos, demuestran un aumento a nivel proteico de leptina después de ser sobreexpresado el factor de transcripción Sp1 con 1 o 5 µg de plásmido.

Las transfecciones transitorias realizadas en las células BeWo con los vectores reporteros, pL1951 como para pL1860 (**Figura R 2A-2B**), demostraron un aumento en la expresión de leptina, sugiriendo un efecto regulatorio del factor de transcripción Sp1 sobre la expresión de leptina.

Con la intención de corroborar la participación del factor Sp1 en la expresión de la leptina, se utilizó un inhibidor del factor Sp1, ácido betulínico (BA) y se midió tanto la expresión de leptina como la expresión del factor Sp1. Se observó una disminución significativa tanto de la expresión proteica de leptina como de la expresión proteica de factor Sp1.

El ácido betulínico promueve la degradación dependiente de proteosoma del factor de transcripción Sp1 [204], por lo que estos resultados estarían reforzando los resultados obtenidos previamente sobre la participación del factor Sp1 en la expresión de leptina placentaria.

Por otro lado, decidimos estudiar el efecto de la sobreexpresión del factor de transcripción Sp1 sobre la inducción ejercida por el E₂ sobre la expresión de leptina placentaria. Pudimos observar que cuando agregamos el tratamiento con E₂ se muestra un efecto sinérgico en la inducción de Sp1 sobre la expresión de leptina en los ensayos de qRT-PCR. Sp1, así como otros miembros de su familia, se une a la secuencia de unión de Sp1 consenso y también a secuencias no consenso con afinidades variables. Sin embargo la importancia de las secuencias específicas ricas en GC en el promotor de genes en la mediación de transactivación es altamente variable y depende del contexto celular y de la expresión relativa de coactivadores nucleares y otros cofactores [212]. Reportes previos han demostrado que el Sp1 está involucrado en la regulación de la expresión del gen de leptina en adipocitos [110]. También se ha reportado que una mutación en el sitio de unión del Sp1 en el promotor de la leptina produce una reducción significativa en la actividad del

promotor en los adipocitos 3T-L1, sugiriendo que el factor Sp1 tiene un papel importante en esta regulación [227].

Para una mayor caracterización del efecto que ejerce el factor de transcripción Sp1 sobre la expresión de leptina realizamos transfecciones transitorias con diferentes concentraciones del vector de expresión Sp1 y posterior tratamiento con E₂. Se utilizaron con los vectores reporteros pL1951 y pL1860 (**Figura R5-6**). Se pudo demostrar que el E₂ incrementa significativamente la inducción del Sp1 sobre la expresión de leptina. Esta inducción es dependiente de la integridad del sitio de unión del Sp1, debido a que no se observa efecto alguno del tratamiento con E₂, al utilizar la construcción que contiene el sitio de unión al Sp1 mutado, lo que sugiere un entrecruzamiento de señales entre los factores de transcripción Sp1 y ER (**Figura R8**).

Algunas proteínas pueden unirse al factor Sp1 y activar la transcripción sinérgicamente, como por ejemplo los ER [173]. El ER y la proteína Sp1 interactúan físicamente y forman un complejo proteína-proteína en ausencia del ADN. Se ha observado que la delección del dominio de unión al DNA del ER no suprime la sinergia del ER con el Sp1, lo que estaría indicando que el ER puede regular la transcripción en ausencia de un ERE funcional [105]. Estudios recientes han demostrado que ER α preferente se une a C-terminal de del dominio de unión al ADN del Sp1. También, se ha observado por transfecciones transitorias en células MCF-7 de cáncer de mama, que ER α /Sp1 pueden activar la transcripción a partir de un sitio de unión a Sp1 consenso rico en GC. También se observó esta respuesta en los ER α que no presentan dominios de unión al DNA [228].

Publicaciones previas han reportado que la unión de ER al Sp1 aumenta la unión Sp1-ADN con su elemento de respuesta independientemente del estrógeno, pero la transactivación de este gen usualmente está aumentada con la presencia del estrógeno [105]. La transcripción mediada por Sp1 puede ser alterada para responder a distintas vías de señalización, alternativamente, los factores de transcripción pueden sobreactivar la transcripción dependiente de Sp1 interactuando con Sp1 unido a ADN, pero no uniéndose directamente al ADN [173].

En este trabajo de tesis nuestros resultados refuerzan el mecanismo a través del cual el Sp1 induce la expresión de leptina en la placenta, en coordinación con el ER α . En los resultados obtenidos se puede observar que la sobreexpresión de ER α en las

células BeWo aumenta sinérgicamente el efecto generado por Sp1 incrementando así la inducción de la expresión de leptina (**Figura R11**). Por otro lado este aumento no fue modificado luego del tratamiento con E₂, sugiriendo que el efecto es ligando independiente. Estos resultados se encuentran en concordancia con información previamente reportada, donde se muestra que hay interacción entre el ER con la proteína Sp1 en presencia o ausencia de E₂ y por esto podría ser hormona independiente [105]. Se ha reportado que el ERα preferentemente se une a la región C-terminal del dominio de unión al DNA de la proteína Sp1 [228]. Por otro lado, se demostró que la unión del ER a la proteína Sp1 aumenta la unión entre Sp1-DNA independientemente del estrógeno, aunque la transactivación del gen es aumentada por la presencia del ligando [105].

Muchos promotores de genes sensibles a E₂, como la leptina, contienen ambos sitios, los ricos en GC y los *half*-ERE que interactúan cooperativamente para activar la expresión de los genes. De acuerdo con el “modelo genómico clásico” los ligandos activan la unión del ERα a un ERE específico para modular la actividad transcripcional de los genes blanco para E₂. Sin embargo un 35% de los genes de respuesta al E₂ se transcriben por la asociación indirecta de ER-ADN a través de la interacción proteína-proteína con varios factores de transcripción como Sp1, factor nuclear kappa B (NFκB) o la proteína de activación 1 (AP-1) [173]. Por ejemplo, Sp1 y el ERα puede formar un complejo *in vivo* para mediar la activación del promotor de la kisspetina-1 en la células hipotalámicas GT-1, donde el E₂ aumenta la expresión de KiSS1 a través del complejo proteico ERα/Sp a nivel molecular [206]. También median la activación de la proteína integral de membrana Claudina-5, en células endoteliales microvasculares cerebrales (cEND) [207], entre otros genes. La acción de los ERs en el sitio de unión del Sp1 depende del ligando, del tipo de célula y del tipo del receptor [212]. Sin embargo, se ha reportado que los ratones *knockeados* heterocigotas para Sp1/Sp3 no son viables y manifiestan graves defectos en la placenta [229].

Por otro lado hemos analizado células que tienen la expresión del ERα disminuida por la acción de un siRNA específico, llamadas BeWo-Sh2. Este siRNA está expresado en un plásmido inducible con doxiciplina. La línea celular BeWo-Sh2 fue generada por transfección estable de este vector en la línea BeWo y seleccionadas por G418. En este contexto donde la expresión del ERα está disminuida, se ve anulado

completamente el efecto del factor Sp1 sobre la expresión de leptina (**Figura R13**). Estos resultados sugieren que es necesaria la expresión de ER α para que se evidencie el efecto inductor generado por el factor Sp1. Por otro lado analizamos el efecto de la sobreexpresión de ER α con una construcción reportera que presenta la región mínima de respuesta a E₂ y una mutación para el sitio de unión del factor Sp1 pero que mantiene intacto el ERE. En este caso, los resultados evidenciaron la falta de activación ejercida por ER α sobre la actividad transcripcional de la leptina (**Figura R12**). Estos resultados demostraron que el sitio de unión de Sp1 contribuye a la señalización de E₂-ER α .

Con el fin de seguir avanzando en el estudio del factor Sp1 en la expresión de leptina inducida por E₂, se analizó el efecto de la sobreexpresión de Sp1 sobre un vector reportero que presenta una mutación en el sitio de unión para el ER α , *halfERE*. Se observó que en este contexto se pierde el efecto inductor del factor Sp1 sobre la expresión de leptina en las concentraciones más bajas, sin embargo en las concentraciones más elevadas se observa un aumento de la expresión de leptina. Se podría argumentar que a altas concentraciones del factor Sp1 el efecto es independiente del sitio de unión ERE.

En conjunto estos resultados estarían demostrando que es necesario que el sitio de unión del *halfERE* esté intacto para que se pueda evidenciar la inducción de la expresión de leptina mediada por Sp1 en las células placentarias, y sugeriría la participación del factor de transcripción Sp1 en los efectos regulatorios de E₂ sobre la expresión de leptina placentaria.

Para completar el estudio de la acción del factor de transcripción Sp1 sobre la inducción ejercida por el estradiol sobre la expresión de leptina, decidimos estudiar los efectos del antiestrógeno ICI 182,780. Este antagonista está compuesto con una cadena alquilsulfinilo en la posición 7 α , y es un análogo del estradiol. El ICI 182,780 es capaz de unirse al ER por lo que el receptor pierde la posibilidad de dimerizar, y en el modelo clásico del mecanismo de acción de estradiol, se promueve la degradación del receptor. De esta manera la localización nuclear del receptor se ve perturbada y se refleja en el fracaso del reclutamiento de los coactivadores transcripcionales [230]. Nuestros resultados demostraron que la acción del factor Sp1 sobre la expresión de leptina es insensible al tratamiento con ICI (**Figura R9-10**), creemos que esto se debe a que en nuestro sistema el ICI no es capaz de

bloquear el entrecruzamiento que se produce entre ER α y Sp1, que estaría induciendo la expresión de leptina.

Sin embargo se ha observado que el ICI 182,780 es un potente agonista de ER α y ER β cuando estos receptores son dirigidos al núcleo con los factores de transcripción AP-1, Sp1 y STAT-5, de modo que no todos los caminos de señalización son inhibidos por este antiestrógeno [97]. También se sabe que el ICI 182,780 actúa como agonista del receptor GPR30, proteína de transmembrana acoplada a proteína G que media, algunos de los efectos del E₂ en queratinocitos, células endometriales y células ováricas [139, 152].

Habiendo demostrado que ER α y Sp1 estarían actuando conjuntamente en la modulación de la expresión de leptina, decidimos evaluar su posible interacción por coimmunoprecipitación. Se pudo evidenciar la presencia del factor Sp1 en el inmunoprecipitado de la proteína ER α (**Figura R16A**), como también la presencia de ER α en la inmunoprecipitación de Sp1 (**Figura R16B**). Lo que estaría sugiriendo que ambos factores de transcripción ER α y Sp1 podrían interactuar en las células BeWo, para mediar la inducción del E₂.

Se ha identificado la isoforma del ER α de 67KDa corresponde al producto de traducción de al menos seis transcritos de ER α que difieren en su 5'UTRs y es considerada el ER α completo. La mayoría de los estudios que utilizan líneas celulares, han apoyado la identificación de la banda de ER α 67 identificada en músculo esquelético y tejido adiposo de ratas preñadas, y se ha denominado como ER α completo [231].

Se conoce que la relación entre los ERs y los factores de transcripción junto con la regulación de la expresión génica es compleja.

La interacción entre los ERs y otros factores de transcripción puede ser directa o indirecta, y puede ser dependiente o independiente de la presencia de elementos de respuesta para dichos factores de transcripción (ERE o half ERE, sitios CRE, etc.) existen otros factores a tener en cuenta, por ejemplo AP-1, CBP, CREB y SP1. [149, 180, 182, 232, 233]. Los factores de transcripción pueden sufrir modificaciones post-traduccionales que modifican su actividad. Algunas de estas modificaciones están relacionadas con la activación de cascadas de señalización por parte del E₂ [97]. En el caso de Sp1, se ha reportado que su fosforilación modifica su unión al

ADN y su glicosilación lo hace resistente a la degradación dependiente del proteasoma [234]. También hay que tener en cuenta la distancia existente entre los elementos ERE y los elementos de respuesta a distintos factores de transcripción. Los estudios de Safe y colaboradores [212], muestran que la distancia encontrada entre las secuencias *half ERE* y secuencias ricas en GC en distintos promotores es muy variable, lo cual se suma a la diversidad de las secuencias nucleotídicas con las que estos factores interactúan, dificultando la predicción de la interacción entre ERs y Sp1.

Modulación del factor de transcripción NFκB sobre el efecto del E₂ en la expresión de leptina placentaria

En el análisis *in silico* del promotor de leptina podemos observar que están presentes varios elementos reguladores de la transcripción vinculados a la acción de E₂, como el sitio de unión del Sp1 y el ERE, ya mencionados, también hay sitios de unión para los factores de transcripción NFκB, C/EBP, CRE, STAT y c-Jun/ATF2. Por ello en el **Capítulo Dos** de este trabajo de tesis decidimos estudiar el factor de transcripción NFκB. Este factor podría estar regulando los efectos mediados por estradiol, interactuando con los receptores ERα y ERβ, como se ha visto en estudios previos, en los cuales regula la transcripción génica interactuando con sus propias secuencias regulatorias presentes en las regiones promotoras [142, 144, 150].

También se relacionó la propiedad que presenta la leptina de ser una citoquina con la capacidad de incrementar la respuesta inmune inflamatoria [235], al igual que el factor de transcripción NFκB que es capaz de regular la respuesta inmune e inflamatoria en diversos tejidos como el cerebro y el tracto reproductivo [236].

Para estudiar el papel que juega el NFκB en la regulación de la expresión de leptina placentaria, realizamos diferentes experimentos. En primer lugar decidimos inhibir la vía del NFκB, en células BeWo y explantos placentarios, a través del tratamiento con sulfasalazina. Esta droga sintética es un antiinflamatorio de la familia de las sulfonamidas [237]. Se ha demostrado que inhibe la activación del factor de transcripción NFκB a través de la inhibición directa de la Iκκ [209, 238]. En primer lugar fue necesario determinar las dosis que no generaran efecto citotóxico a las células BeWo, determinando una concentración máxima de uso de 1μM. Analizamos la expresión proteica de leptina por Western Blot y el ARNm por qRT-PC en

presencia de distintas dosis de este inhibidor. En ambos casos se puede observar una disminución significativa de la expresión de leptina **(Figura R17-18)**. Inhibiendo directamente la acción del NFκB, con sulfasalazina que mitiga la activación de este factor, se han descrito previamente resultados similares donde se observa la disminución de la liberación de la IL6, IL8 y de la TNFα, en placentas humanas [239]. También hay registro de que la sulfasalazina genera una inhibición sobre la activación del NFκB en las células de colon SW620, impidiendo la translocación de la subunidad Rel A al núcleo así como la fosforilación de la IκBα y la subsiguiente degradación de la misma [209].

En segundo lugar se estudió el efecto de la sobreexpresión de la subunidad p65 de NFκB. Esta subunidad representa la forma activa que migra al núcleo para ejercer su función de activador transcripcional. En los experimentos de sobreexpresión de la subunidad p65 se obtuvo un aumento significativo de la actividad transcripcional de leptina en células BeWo **(Figura R19)**. Sin embargo, al combinar la sobreexpresión de la subunidad p65 con el tratamiento, con E₂ no se observa este efecto inductor. Este fenómeno se puede deber a una relación de transrepresión entre el E₂/ER y el NFκB, mecanismo por el cual el ER inhibe la translocación de la subunidad p65 del NFκB al núcleo [240], como ya se ha reportado en otras líneas celulares [211, 241]. Varios autores han descrito distintos mecanismos moleculares por el cual ER inhibe al NFκB, y sugieren una competencia por el coactivador del receptor nuclear, entre el ER activado y el NFκB [242]. Otro mecanismo podría ser el que regula la expresión de TNFα. En este caso el ER genera la inhibición de la inducción del TNFα mediada por NFκB, a partir de la inducción del miembro de NFκB p105 recluta activamente al complejo NFκB reteniéndolo en el citoplasma [243].

Por ejemplo, en células endometriales y osteoblastos, en el modelo de la regulación del promotor de la IL-6, que ha sido ampliamente estudiado, se ha evidenciado que la inducción de la activación de este gen por el NFκB puede ser inhibida por el E₂ [192, 244]. Donde la activación del promotor de la IL-6 estaría reprimida debido a la interferencia de la función transactivadora de p65 y NF-IL6 por ER a través de un mecanismo alternativo, como es la interacción proteína-proteína [245, 246].

Muchos grupos han reportado que ocurre una represión recíproca de la transcripción entre el ER y el NFκB activado [247, 248]. Este "crosstalk" entre el ERα

y el NFκB es dependiente del tipo de célula e involucra una interacción directa proteína-proteína, que produce la inhibición de la unión al DNA, la inducción de la expresión de la IκB, y además la competición por los coactivadores [211].

Ensayos posteriores, de sobreexpresión de la subunidad p65 en las células BeWo-Sh2, mostraron anulado el efecto inductor del E₂ sobre la expresión del promotor de leptina (**Figura R20**). Estos resultados sugieren que la acción de la subunidad p65 aumentaría la transcripción de leptina, proponiendo la participación de los dímeros NFκB en el efecto regulatorio del ER sobre la expresión de leptina placentaria.

Por otro lado nuestros hallazgos estarían apoyados por la evidencia de la existencia de un "crosstalk" positivo entre el ER y el NFκB [193, 194]. Se ha evidenciado que el ER y el NFκB actúan en conjunto para aumentar la expresión de la síntesis de la prostaglandina E [195], del receptor de la serotonina 1A [194], de la prolactina en las células pituitarias [193] y de la ciclica D1 en las células mamarias [249]. Para estudiar el entrecruzamiento entre la señal entre ER y NFκB se analizaron microarreglos en células de cáncer de mama tratadas con E₂, TNFα o ambos, obteniendo tres tipos diferentes de "crosstalk" positivos entre el ER y el NFκB fueron identificados en las células de cáncer de mama. 1: El TNFα puede aumentar la actividad de E₂ en 30% de los genes regulados por E₂. 2: El E₂ puede mejorar un 15% la actividad de TNFα en los genes regulados por TNFα, como BIRC3. 3: El E₂ junto con TNFα causan mayor aumento de la transcripción de un subconjunto específico de genes, incluyendo PHLDA1 y IL17RB [250].

Dada la importancia del efecto ejercido por el factor de transcripción NFκB, sobre la expresión de leptina placentaria, decidimos evaluar la presencia y localización de ERα y la subunidad p65 en las células BeWo, por ensayos de inmunofluorescencia y su posible interacción por coinmunoprecipitación.

Se ha caracterizado la presencia de receptores de ERα y ERβ en cortes histológicos de placentas humanas a término, mostrando la expresión de ERα en el núcleo de las células citotrofoblásticas, no así en los sinciotrofoblastos. Sin embargo el ERβ, fue inmunolocalizado en los sinciotrofoblastos y en algunos citotrofoblastos [155, 251]. Cultivos in vitro de células trofoblásticas derivadas de placentas muestran la expresión de ERα en la superficie celular, luego pasa a ser citoplasmática, perinuclear o nuclear cuando las células dejan de dividirse. La expresión de ERα y

ER β en los citotrofoblastos depende del grado de diferenciación de las células [155, 252]. En las células BeWo se ha evidenciado la presencia de ER α en la fracción nuclear y de membrana, mientras que el ER β se detectó principalmente en la fracción nuclear [108].

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis por inmunofluorescencia (**Figura R22-23**), muestran que ER α y p65 comparten el mismo patrón de localización en todos los tiempos de tratamiento con E₂ 100 nM, y que la migración a la localización nuclear se encuentra favorecida por la sobreexpresión de p65 y luego del tratamiento con E₂. Los resultados obtenidos muestran que las proteínas ER α y p65 endógenas presentan una localización citoplasmática en ausencia o presencia de E₂, sin embargo al sobreexpresar las proteínas es cuando se favorece la migración al núcleo.

Esta localización conjunta de ambas proteínas brindaría evidencia de una acción conjunta entre los factores ER α y NF κ B. Sin embargo solo se estudió la localización subcelular de ER α y p65, pero no lo que sucede a nivel del promotor de leptina una vez translocadas al núcleo. Queda pendiente investigar qué ocurre luego de que ambas se translocan al núcleo, y observar si se encuentra regulada la unión al promotor de leptina.

Hay evidencia reportada de la existencia de modificaciones postraduccionales de las subunidades del NF κ B que podrían participar en la terminación de la respuesta transcripcional del NF κ B [253, 254]. La fosforilación de Rel A en la Ser-536 por la I κ κ α , aumenta la aparición de macrófagos, y este proceso conlleva a la resolución de la inflamación [255]. Así como también que la terminación de la transcripción dependiente del NF κ B puede estar determinada por la acetilación de Rel A en Lys-122 y Lys-123, las cuales generan una disminución en la afinidad de unión al DNA [254]. También se ha reportado un mecanismo regulatorio entre el receptor de glucocorticoides (GR) y p65 que genera la represión de la expresión de la IL-6 [256, 257].

La regulación de la expresión del gen IL-6 es un excelente ejemplo de cómo el acoplamiento cruzado de distintas vías, como la de la del NF-IL6 y el NF κ B, en ciertas situaciones pueden activar la transcripción del gen y en otras, el GR junto con el NF κ B, pueden generar la represión de la expresión del gen [258]. Esta actividad

funcional antagonista que presentan p65 y GR ofrece un marco para las acciones opuestas de mediadores inflamatorios y esteroides.

Por otro lado hemos realizado experimentos de coimmunoprecipitación. Al inmunoprecipitar ER α fue posible visualizar la proteína p65 en el inmunoprecipitado (**Figura R24**). Estos resultados, estarían sugiriendo que existe una interacción entre ambas proteínas, que daría lugar a pensar que existiría un efecto cooperativo entre el ER α y el NF κ B en las células BeWo.

Se ha reportado que los ER se encuentran junto con p65 en el ADN de los genes blanco. Una posible explicación a la interacción directa que presenta el p65 con los ER es que la interacción se realice de forma indirecta con otra proteína de la maquinaria de transcripción, y no con el p65 directamente [259]. También se ha reportado que la interacción entre ER y NF κ B puede reprimir la expresión del gen de la IL-6. Lo que indicaría que ER puede modular la actividad transcripcional del NF κ B [260].

Estos resultados nos sugieren que el NF κ B estaría modulando el efecto del ER sobre la expresión de leptina, pero resta aún dilucidar el efecto de la interrelación NF κ B-ER en el promotor de leptina.

La vía de señalización mediada por PKA modula la expresión de leptina dependiente de E₂

Muchas de las funciones que se atribuyen al trofoblasto de la placenta humana, incluyendo la producción y el transporte de los nutrientes esenciales al feto, se encuentran regulados por segundos mensajeros, incluyendo el AMPc [261]. Se ha demostrado que el aumento del AMPc intracelular genera una disminución en la expresión del ARNm de leptina y en la secreción de leptina por los adipocitos de rata, y que este efecto inhibitorio es dependiente de la proteína quinasa A [115, 214]. Por otro lado se ha reportado que en células BeWo y en explantos placentarios, la secreción de leptina se ve aumentada por forskolina y activadores de PKA [73, 116]. Por este motivo se decidió estudiar el efecto del AMPc sobre la expresión del leptina dependiente de E₂.

Debido a que el AMPc juega un papel importante en el control de la expresión de genes específicos y la modulación de varias hormonas en la placenta, y además podría ejercer su acción a través de la vía de PKA, decidimos realizar experimentos

con un inhibidor de dicha quinasa, H89 y un inhibidor de la adenilato ciclasa SQ25536, para observar sus efectos en la expresión de leptina placentaria. En presencia de los inhibidores se observó una disminución significativa en la expresión de leptina basal como en la inducida por estradiol (**Figura R25-28**), tanto en los explantos placentarios como en las células BeWo. De esta manera demostramos que la inhibición de la vía de señalización de PKA generó una disminución de la expresión de leptina, sugiriendo que la vía de PKA es responsable en parte de la estimulación de la leptina por E₂.

El inhibidor farmacológico H89 ha demostrado tener un potente poder selectivo e inhibitorio hacia la acción de la PKA, y no así para otras quinasa como la PKG o la PKC [262].

La participación de la vía de señalización de PKA en la inducción de la expresión de leptina por AMPc se ha demostrado, en trabajos previos por nuestro grupo de investigación, donde al sobreexpresar la subunidad catalítica de PKA, se produce un incremento en la expresión de leptina [96]. También hay evidencia de que PKA juega un rol principal en la señalización biológica de varias hormonas en la placenta, como la epinefrina, los prostanoides y la hCG [119].

Entre los sustratos de PKA se encuentra CREB [114, 121]. CREB es la principal proteína regulatoria transcripcional regulada por el AMPc que se une a elemento consenso del ADN en respuesta al AMPc (elemento CRE) en sus genes blanco. CREB es importante para la expresión de muchos genes de repuestas a AMPc en diferentes tipos celulares y en repuestas a diferentes tipos de señales [122]. Hay evidencia de que el AMPc es capaz de inducir la fosforilación de CREB no solo en células de coriocarcinoma humano sino también en explantos placentarios. Además, la sobreexpresión del factor de la subunidad catalítica de PKA o del factor de transcripción CREB genera un aumento en la actividad del promotor de leptina de manera dosis dependiente [96].

También se han encontrado en el promotor de la leptina la presencia de varios elementos CRE, donde la interacción con el factor de transcripción CREB podría tener una acción en la regulación de la expresión de leptina (**Figura I13**).

En este contexto se decidió analizar la participación de CREB en la expresión de leptina inducida por E₂. Se realizaron experimentos de transfección transitoria en células BeWo, con vectores de expresión para distintas mutantes de CREB, donde se

vio que éste factor de transcripción estaría participando en la inducción ejercida por el E₂ sobre la expresión de leptina como así también sobre su expresión basal (**Figura R29-30**). Esto podría estar indicando que este factor responde a la integración de distintas señales recibidas por las células placentarias durante la gestación, ya que también se tiene el reporte de que está involucrado en los efectos estimulatorios de la expresión de leptina por hCG y AMPc [80, 96, 124].

Se ha observado que CBP es capaz de aumentar la habilidad de ER para transactivar sus genes blanco [183].

En primer lugar se analizó el efecto del coactivador CBP en presencia de E₂, y su efecto en la expresión de leptina. Se pudo observar un aumento significativo de la actividad promotora de leptina, al igual que un aumento de los niveles de ARNm de leptina (**Figura R31-32**).

Reforzando estos resultados hay evidencia donde se ha visto que CBP es capaz de revertir la inhibición del E₂ sobre el NFκB, permitiendo al ER efectuar su acción [263].

Dado que CBP posee actividad de acetiltransferasa [201] decidimos investigar si su efecto potenciador de la expresión de leptina placentaria podría deberse a esta actividad enzimática más que a su función coactivadora general. Por lo cual decidimos realizar ensayos de sobreexpresión de la proteína HDAC-1. En estos experimentos observamos que la expresión del gen reportero se ve disminuida y se suprime el efecto estimulatorio del E₂ sobre la expresión de leptina (**Figura R33, 34**).

La histona deacetilasa HDAC-1 se encuentra unida a la matriz nuclear, donde presenta un rol crítico en la organización y funcionamiento de la cromatina [264, 265]. Según lo reportado en otro modelo experimental, las células T5 de cáncer de mama humanas, el E₂ disminuiría la tasa de deacetilación de histonas, pero no así con la tasa de la acetilación de histonas [266].

Para reforzar los resultados obtenidos de la participación de CBP en la regulación de la expresión de leptina mediada por E₂, se analizó la expresión de leptina en explantos placentarios y en células BeWo, tratados con un inhibidor de deacetilasas denominado TSA (Tricostatina A). TSA es un inhibidor potente y específico de las histonas deacetilasas, *in vivo* posee un efecto sobre la proliferación y diferenciación de las células que puede ser atribuido a la inhibición enzimática [267]. Hemos

observado que la expresión basal e inducida por E_2 de leptina en los explantos placentarios se encuentra aumentada en presencia de TSA. Sin embargo el mismo tratamiento en las células BeWo produjo un aumento en la expresión basal de leptina pero no en la inducida por E_2 . Esto puede ser corroborado por la evidencia provista por el grupo de Gunin y colaboradores donde demuestran que TSA lleva a la disminución de la expresión del $ER\alpha$ en el tejido uterino [268]. Como también se ha observado que los inhibidores de las histonas deacetilasas como el TSA, son capaces de disminuir el nivel del $ER\alpha$ en el ovario, en el endometrio y en la línea celular de cáncer de glándula mamaria [216, 269].

Por otro lado, se ha encontrado que la expresión de leptina en condrocitos normales está altamente aumentada luego del tratamiento con el agente demetilante, 5'-2-dexocitidina (AZA) y TSA, dado que ambos presentan un efecto sinérgico que aumenta su expresión [270]. También hay evidencia de que el TSA aumenta de manera dosis dependiente la regulación de ciertos marcadores de deciduización tales como la proteína de unión al factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGFBP-1) y la prolactina (PRL) que se encuentran inducidos por el E_2 y la progesterona (P_4) en las células endometriales estromales (ESCs) [271].

El siguiente enfoque fue analizar la acetilación de la histona H3 ($H3_{AC}$), en las células BeWo. En primer lugar se utilizó el inhibidor TSA y se observó un aumento tanto de la acetilación de la $H3_{AC}$ en condiciones basales o luego del tratamiento con E_2 . Resultados previos han demostrado que TSA por si solo aumenta los niveles de acetilación de histonas, sin embargo se observa un aumento significativo de la acetilación en H3 yH4 al adicionar E_2 más P_4 en ESCs [271].

Los receptores nucleares de hormonas esteroides reclutan distintas acetiltransferasas de histonas (HATs) al unirse al ligando y por lo tanto causan un aumento en el incremento del nivel de la acetilación de histonas alrededor de la región sensible al receptor nuclear [272]. Luego, el ADN que se encuentra enrollado fuertemente alrededor de un núcleo de histonas deacetiladas se relaja, y la acumulación de histonas acetiladas en el nucleosoma en esta región conducen a la expresión de los genes blanco de las hormonas esteroideas [272].

En segundo lugar, se determinó la acetilación de la H3 en presencia de SQ 22,536, inhibidor de la adenilato ciclasa, donde se obtuvo una disminución en la acetilación

de la H3 en presencia o ausencia de E₂. Estos resultados sugieren que la vía de señalización de PKA estaría involucrada en este efecto.

Estos resultados estarían sugiriendo la participación de CBP en la regulación de leptina mediada por E₂, y que esta regulación estaría mediada por la acetilación de histonas, ya que las modificaciones de las histonas en el ADN podrían estar influyendo en la acción que ejerce el estradiol sobre la expresión de la leptina placentaria.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo ayudan a dilucidar los mecanismos involucrados en la regulación transcripcional de leptina, una molécula clave en el diálogo materno-fetal.

CONCLUSIÓN

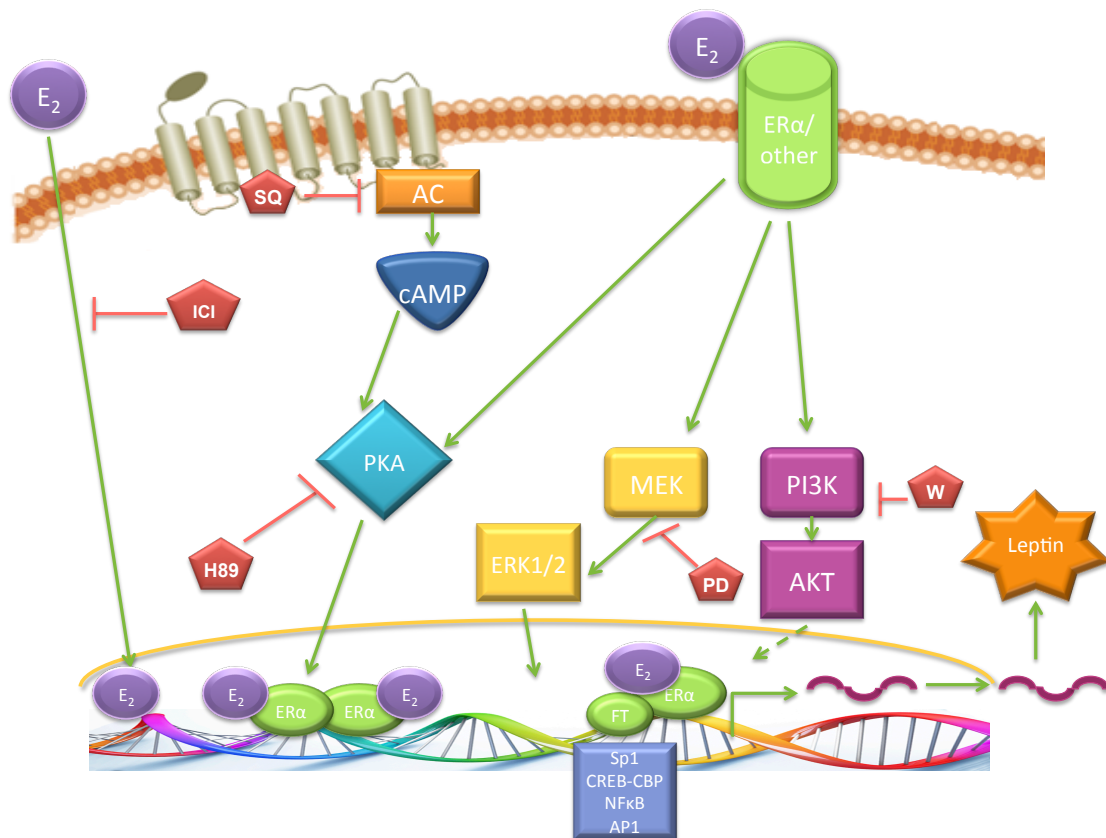
La placenta es el órgano que establece la interacción materno fetal durante el embarazo, y la leptina podría tener efectos sobre el crecimiento feto-placentario, la angiogénesis y la inmunomodulación, afectando funciones maternas y fetales. En si la leptina presenta un rol importante en la regulación de la fertilidad [69].

La regulación completa de la producción de leptina en la placenta todavía se encuentra poco descripta.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, validan la hipótesis de que la actividad transcripcional del promotor de leptina, podría estar modulada por la unión de distintos factores de transcripción como Sp1 y NFκB a diferentes sitios regulatorios, de esta manera el E₂ estaría actuando de manera genómica y no genómica.

Los efectos del E₂ estarían regulados por la participación del ERα, e implicaría la activación de la vía de señalización de PKA.

En conclusión, a partir de los resultados obtenidos, se ha desarrollado un modelo que muestra los mecanismos posibles que participan en la regulación de la expresión de la leptina placentaria mediada por E₂. El E₂ puede interactuar con los receptores de estrógenos, como el ER, el cual está localizado en la membrana plasmática y en el interior celular. La interacción en la membrana, lleva a la activación de la vías de señalización de MAPKs PI3K y PKA, las cuales regularían la expresión génica de la leptina. En el núcleo, el receptor de estrógenos puede actuar sobre elementos de respuesta a estrógenos (ERE), pero también podría interactuar con otros factores de transcripción en el promotor del gen de leptina, como NFκB, Sp1, o CREB.



Modelo propuesto. El modelo propuesto muestra al ERα en los mecanismos involucrados en la expresión de leptina. ERα directamente o a través de la interacción con diferentes factores de transcripción mediando la acción del E₂ en la expresión de leptina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Helena Curtis (†) NSB, Adriana Schnek, Alicia Massarini. Invitación a la Biología en contexto social 1993; Madrid: panamericana 800 pp.
- [2] Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M and Fisher SJ. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest.* 2004;114(6):744-54.
- [3] Johannes W.Rohen EL-D. Embriología funcional una perspectiva desde la biología del desarrollo 2006; España: E.M Panamericana. 24 pp.
- [4] T.W. Sadler P. Langman Embriología Médica con Orientación Médica 1963; España: E.M. Panamericana. 41 pp.
- [5] Lunghi L, M.E Ferretti, S. Medici, C. Biondi and F. Vesce. Control of human trophoblast function 2007: *Reprod Biol Endocrinol*
- [6] Dey S. Implantation. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction-Elsevier. 2006;3rd edition.
- [7] Goldman-Wohl D and Yagel S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;187(1-2):233-8.
- [8] Curtis H BN, Schnek A, Flores G. Biología. 2000; (Ed.) Panamericana EM.
- [9] F. Gary Cunningham KJL, Steven L. Bloom, Catherine, Y. Spong, Jodi S. Dashe, Barbara L. Hoffman, Brian M. Casey, Jeanne S. Sheffield. Obstetricia.
- [10] Jose Botella LLusia JACN, M. Escudero Fernandez, E. Gomez de la Concha, F Nogale Fernandez, J. F. Perez Gutierrez, F. Perez y Perez, F. J. Puerta Fonolla, J. Sanz Esponera, J.A. Fernandez-Tresguerres. La Placenta Fisiología y Patología 1993; Madrid: Diaz de Santos
- [11] Carlson BM. Embriología Humana y Biología del Desarrollo 2005; Madrid
- [12] Maltepe E, A.I Bakardjiev, and S.J Fisher. The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development 2010.
- [13] Norwitz ER, Schust DJ and Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med.* 2001;345(19):1400-8.
- [14] P. Bischof AM, A. Campana Paracrine and Autocrine Regulators of Trophoblast Invasion. *Placenta.* 2000;(21):S55-S6014.
- [15] Alberts B, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. Watson. Biología Molecular de la Célula 1994; Barcelona: E. Omega.
- [16] Staun-Ram E and Shalev E. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005;3:56.
- [17] Vitiello D and Patrizio P. Implantation and early embryonic development: implications for pregnancy. *Semin Perinatol.* 2007;31(4):204-7.
- [18] Thijssen JH. Progesterone receptors in the human uterus and their possible role in parturition. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;97(5):397-400.
- [19] Tuckey RC. Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta.* 2005;26(4):273-81.
- [20] Adashi EY, A.J. Rock, and Z. Rosenwaks. Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology 1996; Philadelphia: Lippincott-Raven.
- [21] Bowen JM, Chamley L, Keelan JA and Mitchell MD. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition. *Placenta.* 2002;23(4):257-73.
- [22] Bowen JM, Chamley L, Mitchell MD and Keelan JA. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women. *Placenta.* 2002;23(4):239-56.

-
- [23] Huppertz B, Kadyrov M and Kingdom JC. Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195(1):29-39.
- [24] Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T and Nakao K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med*. 1997;3(9):1029-33.
- [25] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L and Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-32.
- [26] Goldenberg D, Santos JL, Hodgson MI and Cortes VA. [Novel physiological and therapeutic implications of leptin]. *Rev Med Chil*. 2014;142(6):738-47.
- [27] Houseknecht KL and Portocarrero CP. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. *Domest Anim Endocrinol*. 1998;15(6):457-75.
- [28] Wauters M, Considine RV and Van Gaal LF. Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol*. 2000;143(3):293-311.
- [29] Henson MC and Castracane VD. Leptin in pregnancy: an update. *Biol Reprod*. 2006;74(2):218-29.
- [30] Gong DW, Bi S, Pratley RE and Weintraub BD. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem*. 1996;271(8):3971-4.
- [31] Houseknecht KL, Mantzoros CS, Kuliawat R, Hadro E, Flier JS and Kahn BB. Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. *Diabetes*. 1996;45(11):1638-43.
- [32] Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI and Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 1996;379(6566):632-5.
- [33] Janeckova R. The role of leptin in human physiology and pathophysiology. *Physiol Res*. 2001;50(5):443-59.
- [34] Zeng F, Zhang G, Liu F and Alfano RR. Diffuse optical tomography based on a WKB approximation. *J Biomed Opt*. 1997;2(4):426-36.
- [35] Imagawa K, Numata Y, Katsuura G, Sakaguchi I, Morita A, Kikuoka S, Matumoto Y, Tsuji T, Tamaki M, Sasakura K, Teraoka H, Hosoda K, Ogawa Y and Nakao K. Structure-function studies of human leptin. *J Biol Chem*. 1998;273(52):35245-9.
- [36] Fruhbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J*. 2006;393(Pt 1):7-20.
- [37] Boute N, Zilberfarb V, Camoin L, Bonnafe S, Le Marchand-Brustel Y and Issad T. The formation of an intrachain disulfide bond in the leptin protein is necessary for efficient leptin secretion. *Biochimie*. 2004;86(6):351-6.
- [38] Senaris R, Garcia-Caballero T, Casabiell X, Gallego R, Castro R, Considine RV, Dieguez C and Casanueva FF. Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology*. 1997;138(10):4501-4.
- [39] Dos Santos E DF, Vialard F & Dieudonne MN The role of leptin and adiponectin at the fetal-maternal interface in human. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 2015;24:47-63.
- [40] Perez-Perez A, Maymo J, Gambino Y, Duenas JL, Goberna R, Varone C and Sanchez-Margalet V. Leptin stimulates protein synthesis-activating translation machinery in human trophoblastic cells. *Biol Reprod*. 2009;81(5):826-32.
- [41] Cervero A, Horcajadas JA, Dominguez F, Pellicer A and Simon C. Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. *Reprod Biomed Online*. 2005;10(2):217-23.

-
- [42] Israel D and Chua S, Jr. Leptin receptor modulation of adiposity and fertility. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(1):10-6.
- [43] Ahima RS and Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:413-37.
- [44] Munzberg H and Morrison CD. Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism.* 2015;64(1):13-23.
- [45] Caprio M, Fabbri E, Isidori AM, Aversa A and Fabbri A. Leptin in reproduction. *Trends Endocrinol Metab.* 2001;12(2):65-72.
- [46] Fruhbeck G, Jebb SA and Prentice AM. Leptin: physiology and pathophysiology. *Clin Physiol.* 1998;18(5):399-419.
- [47] Barr VA, Lane K and Taylor SI. Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms. *J Biol Chem.* 1999;274(30):21416-24.
- [48] Sweeney G. Leptin signalling. *Cell Signal.* 2002;14(8):655-63.
- [49] Lammert A, Kiess W, Bottner A, Glasow A and Kratzsch J. Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;283(4):982-8.
- [50] Cervero A, Horcajadas JA, Martín J, Pellicer A and Simon C. The leptin system during human endometrial receptivity and preimplantation development. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(5):2442-51.
- [51] Cameo P, Bischof P and Calvo JC. Effect of leptin on progesterone, human chorionic gonadotropin, and interleukin-6 secretion by human term trophoblast cells in culture. *Biol Reprod.* 2003;68(2):472-7.
- [52] Perez-Perez A, Maymo J, Duenas JL, Goberna R, Calvo JC, Varone C and Sanchez-Margalet V. Leptin prevents apoptosis of trophoblastic cells by activation of MAPK pathway. *Arch Biochem Biophys.* 2008;477(2):390-5.
- [53] Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG, Jr. and Schwartz MW. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature.* 2001;413(6858):794-5.
- [54] Cervero A, Dominguez F, Horcajadas JA, Quinonero A, Pellicer A and Simon C. Embryonic adhesion is not affected by endometrial leptin receptor gene silencing. *Fertil Steril.* 2007;88(4 Suppl):1086-92.
- [55] Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S and McCann SM. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(3):1023-8.
- [56] Casabiell X, Pineiro V, Vega F, De La Cruz LF, Dieguez C and Casanueva FF. Leptin, reproduction and sex steroids. *Pituitary.* 2001;4(1-2):93-9.
- [57] Foster DL and Olster DH. Effect of restricted nutrition on puberty in the lamb: patterns of tonic luteinizing hormone (LH) secretion and competency of the LH surge system. *Endocrinology.* 1985;116(1):375-81.
- [58] Kennedy GC and Mitra J. Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *J Physiol.* 1963;166:408-18.
- [59] Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA and O'Rahilly S. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med.* 1999;341(12):879-84.
- [60] Garcia-Mayor RV, Andrade MA, Rios M, Lage M, Dieguez C and Casanueva FF. Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and pubertal stage. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(9):2849-55.
- [61] Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D and Flier JS. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest.* 1997;99(3):391-5.

-
- [62] Almog B, Gold R, Tajima K, Dantes A, Salim K, Rubinstein M, Barkan D, Homburg R, Lessing JB, Nevo N, Gertler A and Amsterdam A. Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;183(1-2):179-91.
- [63] Barkan D, Hurgin V, Dekel N, Amsterdam A and Rubinstein M. Leptin induces ovulation in GnRH-deficient mice. *FASEB J*. 2005;19(1):133-5.
- [64] Duggal PS, Van Der Hoek KH, Milner CR, Ryan NK, Armstrong DT, Magoffin DA and Norman RJ. The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. *Endocrinology*. 2000;141(6):1971-6.
- [65] Lin Q, Poon SL, Chen J, Cheng L, HoYuen B and Leung PC. Leptin interferes with 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling to inhibit steroidogenesis in human granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:115.
- [66] Zamorano PL, Mahesh VB, De Sevilla LM, Chorich LP, Bhat GK and Brann DW. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology*. 1997;65(3):223-8.
- [67] Bornstein SR, Uhlmann K, Haidan A, Ehrhart-Bornstein M and Scherbaum WA. Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes*. 1997;46(7):1235-8.
- [68] Bajari TM, Nimpf J and Schneider WJ. Role of leptin in reproduction. *Curr Opin Lipidol*. 2004;15(3):315-9.
- [69] Hohos NM and Skaznik-Wikiel ME. High-Fat Diet and Female Fertility. *Endocrinology*. 2017;158(8):2407-19.
- [70] Imani B, Eijkemans MJ, de Jong FH, Payne NN, Bouchard P, Giudice LC and Fauser BC. Free androgen index and leptin are the most prominent endocrine predictors of ovarian response during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrheic infertility. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(2):676-82.
- [71] Herrid M, Palanisamy SK, Ciller UA, Fan R, Moens P, Smart NA and McFarlane JR. An updated view of leptin on implantation and pregnancy: a review. *Physiol Res*. 2014;63(5):543-57.
- [72] Magarinos MP, Sanchez-Margalet V, Kotler M, Calvo JC and Varone CL. Leptin promotes cell proliferation and survival of trophoblastic cells. *Biol Reprod*. 2007;76(2):203-10.
- [73] Coya R, Gualillo O, Pineda J, Garcia MC, Busturia MA, Aniel-Quiroga A, Martul P and Senaris RM. Effect of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate, glucocorticoids, and insulin on leptin messenger RNA levels and leptin secretion in cultured human trophoblast. *Biol Reprod*. 2001;65(3):814-9.
- [74] Yura S, Sagawa N, Mise H, Mori T, Masuzaki H, Ogawa Y and Nakao K. A positive umbilical venous-arterial difference of leptin level and its rapid decline after birth. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;178(5):926-30.
- [75] Perez-Perez A, Toro A, Vilarino-Garcia T, Maymo J, Guadix P, Duenas JL, Fernandez-Sanchez M, Varone C and Sanchez-Margalet V. Leptin action in normal and pathological pregnancies. *J Cell Mol Med*. 2018;22(2):716-27.
- [76] Aplin JD. The cell biological basis of human implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2000;14(5):757-64.
- [77] Achache H and Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*. 2006;12(6):731-46.

-
-
- [78] Coya R, Martul P, Algorta J, Aniel-Quiroga MA, Busturia MA and Senaris R. Effect of leptin on the regulation of placental hormone secretion in cultured human placental cells. *Gynecol Endocrinol*. 2006;22(11):620-6.
- [79] Castellucci M, De Matteis R, Meisser A, Cancellato R, Monsurro V, Islami D, Sarzani R, Marzioni D, Cinti S and Bischof P. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. *Mol Hum Reprod*. 2000;6(10):951-8.
- [80] Maymo JL, Perez Perez A, Sanchez-Margalet V, Duenas JL, Calvo JC and Varone CL. Up-regulation of placental leptin by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*. 2009;150(1):304-13.
- [81] Bajoria R, Sooranna SR, Ward BS and Chatterjee R. Prospective function of placental leptin at maternal-fetal interface. *Placenta*. 2002;23(2-3):103-15.
- [82] Singh HJ, Abu Bakar A, Che Romli A and Nila A. Raised leptin concentrations in feto-placental tissues from women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2005;24(2):191-9.
- [83] Lepercq J, Cauzac M, Lahlou N, Timsit J, Girard J, Auwerx J and Hauguel-de Mouzon S. Overexpression of placental leptin in diabetic pregnancy: a critical role for insulin. *Diabetes*. 1998;47(5):847-50.
- [84] Li RH, Poon SC, Yu MY and Wong YF. Expression of placental leptin and leptin receptors in preeclampsia. *Int J Gynecol Pathol*. 2004;23(4):378-85.
- [85] Mutter WP and Karumanchi SA. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc Res*. 2008;75(1):1-8.
- [86] Acromite M, Ziotopoulou M, Orlova C and Mantzoros C. Increased leptin levels in preeclampsia: associations with BMI, estrogen and SHBG levels. *Hormones (Athens)*. 2004;3(1):46-52.
- [87] Grisaru-Granovsky S, Samueloff A and Elstein D. The role of leptin in fetal growth: a short review from conception to delivery. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008;136(2):146-50.
- [88] Tessier DR, Ferraro ZM and Gruslin A. Role of leptin in pregnancy: consequences of maternal obesity. *Placenta*. 2013;34(3):205-11.
- [89] Radaelli T, Varastehpour A, Catalano P and Hauguel-de Mouzon S. Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. *Diabetes*. 2003;52(12):2951-8.
- [90] Sagawa N, Yura S, Itoh H, Mise H, Kakui K, Korita D, Takemura M, Nuamah MA, Ogawa Y, Masuzaki H, Nakao K and Fujii S. Role of leptin in pregnancy--a review. *Placenta*. 2002;23 Suppl A:S80-6.
- [91] Li RH, Yu MM, Cheung AN and Wong YF. Expression of leptin and leptin receptors in gestational trophoblastic diseases. *Gynecol Oncol*. 2004;95(2):299-306.
- [92] Mandruzzato G, Antsaklis A, Botet F, Chervenak FA, Figueras F, Grunebaum A, Puerto B, Skupski D, Stanojevic M and Wapm. Intrauterine restriction (IUGR). *J Perinat Med*. 2008;36(4):277-81.
- [93] Linnemann K, Malek A, Schneider H and Fusch C. Physiological and pathological regulation of feto/placento/maternal leptin expression. *Biochem Soc Trans*. 2001;29(Pt 2):86-90.
- [94] Gambino YP, Maymo JL, Perez-Perez A, Duenas JL, Sanchez-Margalet V, Calvo JC and Varone CL. 17Beta-Estradiol Enhances Leptin Expression in Human Placental Cells Through Genomic and Nongenomic Actions. *Biol Reprod*. 2010.

-
- [95] Meibner. Synergistic effects of hypoxia and insulin are regulated by different transcriptional elements of the human leptin promoter. . Biochemical and Biophysical Research Communications . 2003;303:707-12.
- [96] Maymo JL, Perez Perez A, Duenas JL, Calvo JC, Sanchez-Margalet V and Varone CL. Regulation of placental leptin expression by cyclic adenosine 5'-monophosphate involves cross talk between protein kinase A and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. Endocrinology. 2010;151(8):3738-51.
- [97] Bjornstrom L and Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. Mol Endocrinol. 2005;19(4):833-42.
- [98] He Y, Chen H, Quon MJ and Reitman M. The mouse obese gene. Genomic organization, promoter activity, and activation by CCAAT/enhancer-binding protein alpha. J Biol Chem. 1995;270(48):28887-91.
- [99] Isse N, Ogawa Y, Tamura N, Masuzaki H, Mori K, Okazaki T, Satoh N, Shigemoto M, Yoshimasa Y, Nishi S and et al. Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. J Biol Chem. 1995;270(46):27728-33.
- [100] Bi S, Gavrilova O, Gong DW, Mason MM and Reitman M. Identification of a placental enhancer for the human leptin gene. J Biol Chem. 1997;272(48):30583-8.
- [101] Ashworth CJ, Hoggard N, Thomas L, Mercer JG, Wallace JM and Lea RG. Placental leptin. Rev Reprod. 2000;5(1):18-24.
- [102] Henson MC and Castracane VD. Leptin in pregnancy. Biol Reprod. 2000;63(5):1219-28.
- [103] Chardonens D, Cameo P, Aubert ML, Pralong FP, Islami D, Campana A, Gaillard RC and Bischof P. Modulation of human cytotrophoblastic leptin secretion by interleukin-1alpha and 17beta-oestradiol and its effect on HCG secretion. Mol Hum Reprod. 1999;5(11):1077-82.
- [104] O'Neil JS, Burow ME, Green AE, McLachlan JA and Henson MC. Effects of estrogen on leptin gene promoter activation in MCF-7 breast cancer and JEG-3 choriocarcinoma cells: selective regulation via estrogen receptors alpha and beta. Mol Cell Endocrinol. 2001;176(1-2):67-75.
- [105] Porter W, Saville B, Hoivik D and Safe S. Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. Mol Endocrinol. 1997;11(11):1569-80.
- [106] Maymo JL, Perez AP, Gambino Y, Calvo JC, Sanchez-Margalet V and Varone CL. Review: Leptin gene expression in the placenta--regulation of a key hormone in trophoblast proliferation and survival. Placenta. 2011;32 Suppl 2:S146-53.
- [107] Maharjan S, Serova LI and Sabban EL. Membrane-initiated estradiol signaling increases tyrosine hydroxylase promoter activity with ER alpha in PC12 cells. J Neurochem. 2010;112(1):42-55.
- [108] Gambino YP, Maymo JL, Perez Perez A, Calvo JC, Sanchez-Margalet V and Varone CL. Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: Molecular mechanisms underlying estrogen functions in trophoblastic cells - Focus on leptin expression. Placenta. 2012.
- [109] Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D and Fowler P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. Clin Endocrinol (Oxf). 1997;47(1):101-6.

-
- [110] Mason MM, He Y, Chen H, Quon MJ and Reitman M. Regulation of leptin promoter function by Sp1, C/EBP, and a novel factor. *Endocrinology*. 1998;139(3):1013-22.
- [111] Maymo JL, Perez Perez A, Maskin B, Duenas JL, Calvo JC, Sanchez Margalet V and Varone CL. The alternative Epac/cAMP pathway and the MAPK pathway mediate hCG induction of leptin in placental cells. *PLoS One*. 2012;7(10):e46216.
- [112] Menon KM, Munshi UM, Clouser CL and Nair AK. Regulation of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor expression: a perspective. *Biol Reprod*. 2004;70(4):861-6.
- [113] Blanco AByG. *Química Biológica* 1963.
- [114] Hoeffler JP, Meyer TE, Yun Y, Jameson JL and Habener JF. Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science*. 1988;242(4884):1430-3.
- [115] Szkudelski T, Nowicka E and Szkudelska K. Leptin secretion and protein kinase A activity. *Physiol Res*. 2005;54(1):79-85.
- [116] Yura S, Sagawa N, Ogawa Y, Masuzaki H, Mise H, Matsumoto T, Ebihara K, Fujii S and Nakao K. Augmentation of leptin synthesis and secretion through activation of protein kinases A and C in cultured human trophoblastic cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(10):3609-14.
- [117] Li AW, Morash B, Hollenberg AN, Ur E, Wilkinson M and Murphy PR. Transcriptional regulation of the leptin gene promoter in rat GH3 pituitary and C6 glioma cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;176(1-2):57-65.
- [118] Morash B, Johnstone J, Leopold C, Li A, Murphy P, Ur E and Wilkinson M. The regulation of leptin gene expression in the C6 glioblastoma cell line. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;165(1-2):97-105.
- [119] Strauss JF, 3rd, Kido S, Sayegh R, Sakuragi N and Gafvels ME. The cAMP signalling system and human trophoblast function. *Placenta*. 1992;13(5):389-403.
- [120] Pertseva MN and Shpakov AO. [Conservatism of the insulin signal system in the evolution of vertebrate and invertebrate animals]. *Zh Evol Biokhim Fiziol*. 2002;38(5):430-41.
- [121] Gonzalez GA and Montminy MR. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*. 1989;59(4):675-80.
- [122] Mukherjee A, Park-Sarge OK and Mayo KE. Gonadotropins induce rapid phosphorylation of the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in ovarian granulosa cells. *Endocrinology*. 1996;137(8):3234-45.
- [123] Bornfeldt KE and Krebs EG. Crosstalk between protein kinase A and growth factor receptor signaling pathways in arterial smooth muscle. *Cell Signal*. 1999;11(7):465-77.
- [124] Maymo JL, Perez Perez A, Gambino Y, Calvo JC, Sanchez-Margalet V and Varone CL. Review: Leptin gene expression in the placenta--regulation of a key hormone in trophoblast proliferation and survival. *Placenta*. 2011;32 Suppl 2:S146-53.
- [125] Meissner U, Spranger R, Lehner M, Allabauer I, Rascher W and Dotsch J. Hypoxia-induced leptin production in human trophoblasts does not protect from apoptosis. *Eur J Endocrinol*. 2005;153(3):455-61.
- [126] Perez-Perez A, Maymo J, Gambino Y, Guadix P, Duenas JL, Varone C and Sanchez-Margalet V. Insulin enhances leptin expression in human trophoblastic cells. *Biol Reprod*. 2013;89(1):20.

-
- [127] Cammisotto PG, Bukowiecki LJ, Deshaies Y and Bendayan M. Leptin biosynthetic pathway in white adipocytes. *Biochem Cell Biol.* 2006;84(2):207-14.
- [128] Ambrosini G, Nath AK, Sierra-Honigsmann MR and Flores-Riveros J. Transcriptional activation of the human leptin gene in response to hypoxia. Involvement of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 2002;277(37):34601-9.
- [129] Grosfeld A, Andre J, Hauguel-De Mouzon S, Berra E, Pouyssegur J and Guerre-Millo M. Hypoxia-inducible factor 1 transactivates the human leptin gene promoter. *J Biol Chem.* 2002;277(45):42953-7.
- [130] Leal-Cerro A, Soto A, Martinez MA, Dieguez C and Casanueva FF. Influence of cortisol status on leptin secretion. *Pituitary.* 2001;4(1-2):111-6.
- [131] Forhead AJ, Thomas L, Crabtree J, Hoggard N, Gardner DS, Giussani DA and Fowden AL. Plasma leptin concentration in fetal sheep during late gestation: ontogeny and effect of glucocorticoids. *Endocrinology.* 2002;143(4):1166-73.
- [132] Jeong KH, Sakihara S, Widmaier EP and Majzoub JA. Impaired leptin expression and abnormal response to fasting in corticotropin-releasing hormone-deficient mice. *Endocrinology.* 2004;145(7):3174-81.
- [133] Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, Lai CF and Tartaglia LA. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(16):8374-8.
- [134] Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem.* 1997;272(10):6093-6.
- [135] Reidy SP and Weber J. Leptin: an essential regulator of lipid metabolism. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2000;125(3):285-98.
- [136] Hall JM, Couse JF and Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem.* 2001;276(40):36869-72.
- [137] Rama S, Petrusz P and Rao AJ. Hormonal regulation of human trophoblast differentiation: a possible role for 17beta-estradiol and GnRH. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;218(1-2):79-94.
- [138] Malassine A and Cronier L. Hormones and human trophoblast differentiation: a review. *Endocrine.* 2002;19(1):3-11.
- [139] Prossnitz ER, Oprea TI, Sklar LA and Arterburn JB. The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;109(3-5):350-3.
- [140] Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M and Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 2001;81(4):1535-65.
- [141] Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids.* 2000;65(5):227-51.
- [142] Acconcia F and Kumar R. Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. *Cancer Lett.* 2006;238(1):1-14.
- [143] Acconcia F and Marino M. The Effects of 17beta-estradiol in Cancer are Mediated by Estrogen Receptor Signaling at the Plasma Membrane. *Front Physiol.* 2011;2:30.
- [144] Nadal A, Diaz M and Valverde MA. The estrogen trinity: membrane, cytosolic, and nuclear effects. *News Physiol Sci.* 2001;16:251-5.
- [145] Thomas C and Gustafsson JA. Estrogen receptor mutations and functional consequences for breast cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(9):467-76.
- [146] Hart LL and Davie JR. The estrogen receptor: more than the average transcription factor. *Biochem Cell Biol.* 2002;80(3):335-41.

-
- [147] Aplin JD and Kimber SJ. Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;2:48.
- [148] Yan Y, Yu L, Castro L and Dixon D. ERalpha36, a variant of estrogen receptor alpha, is predominantly localized in mitochondria of human uterine smooth muscle and leiomyoma cells. *PLoS One*. 2017;12(10):e0186078.
- [149] Marino M, Galluzzo P and Ascenzi P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics*. 2006;7(8):497-508.
- [150] Thomas C and Gustafsson JA. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(8):597-608.
- [151] Levin ER. Membrane oestrogen receptor alpha signalling to cell functions. *J Physiol*. 2009;587(Pt 21):5019-23.
- [152] Hammes SR and Levin ER. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev*. 2007;28(7):726-41.
- [153] Notas G, Kampa M, Pelekanou V and Castanas E. Interplay of estrogen receptors and GPR30 for the regulation of early membrane initiated transcriptional effects: A pharmacological approach. *Steroids*. 2012;77(10):943-50.
- [154] Barton M. Position paper: The membrane estrogen receptor GPER--Clues and questions. *Steroids*. 2012;77(10):935-42.
- [155] Bukovsky A, Cekanova M, Caudle MR, Wimalasena J, Foster JS, Henley DC and Elder RF. Expression and localization of estrogen receptor-alpha protein in normal and abnormal term placentae and stimulation of trophoblast differentiation by estradiol. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;1:13.
- [156] Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC and Wu G. Comparative aspects of implantation. *Reproduction*. 2009;138(2):195-209.
- [157] Seshagiri PB, Sen Roy S, Sireesha G and Rao RP. Cellular and molecular regulation of mammalian blastocyst hatching. *J Reprod Immunol*. 2009;83(1-2):79-84.
- [158] Ramathal CY, Bagchi IC, Taylor RN and Bagchi MK. Endometrial decidualization: of mice and men. *Semin Reprod Med*. 2010;28(1):17-26.
- [159] Cronier L, Guibourdenche J, Niger C and Malassine A. Oestradiol stimulates morphological and functional differentiation of human villous cytotrophoblast. *Placenta*. 1999;20(8):669-76.
- [160] Ni X, Nicholson RC, King BR, Chan EC, Read MA and Smith R. Estrogen represses whereas the estrogen-antagonist ICI 182780 stimulates placental CRH gene expression. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(8):3774-8.
- [161] Yashwanth R, Rama S, Anbalagan M and Rao AJ. Role of estrogen in regulation of cellular differentiation: a study using human placental and rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;246(1-2):114-20.
- [162] Albrecht ED, Bonagura TW, Burleigh DW, Enders AC, Aberdeen GW and Pepe GJ. Suppression of extravillous trophoblast invasion of uterine spiral arteries by estrogen during early baboon pregnancy. *Placenta*. 2006;27(4-5):483-90.
- [163] Ashton SV, Whitley GS, Dash PR, Wareing M, Crocker IP, Baker PN and Cartwright JE. Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(1):102-8.
- [164] Albrecht ED and Pepe GJ. Estrogen regulation of placental angiogenesis and fetal ovarian development during primate pregnancy. *Int J Dev Biol*. 2010;54(2-3):397-408.

-
- [165] Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev.* 2007;28(5):521-74.
- [166] Ietta F, Bechi N, Romagnoli R, Bhattacharjee J, Realacci M, Di Vito M, Ferretti C and Paulesu L. 17 β -Estradiol modulates the macrophage migration inhibitory factor secretory pathway by regulating ABCA1 expression in human first-trimester placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298(3):E411-8.
- [167] Blesson CS. Estrogen Receptors in Leukocytes- Possible Impact on Inflammatory Processes in Female Reproductive System, in *Update on Mechanisms of Hormone Action- Focus on Metabolism, Growth and Reproduction* 2011.
- [168] Doria A, Cutolo M, Ghirardello A, Zampieri S, Vescovi F, Sulli A, Giusti M, Piccoli A, Grella P and Gambari PF. Steroid hormones and disease activity during pregnancy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2002;47(2):202-9.
- [169] Fraccaroli L, Alfieri J, Larocca L, Calafat M, Roca V, Lombardi E, Ramhorst R and Leiros CP. VIP modulates the pro-inflammatory maternal response, inducing tolerance to trophoblast cells. *Br J Pharmacol.* 2009;156(1):116-26.
- [170] Briggs MR, Kadonaga JT, Bell SP and Tjian R. Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science.* 1986;234(4772):47-52.
- [171] Laenen K, Haegeman G and Vanhoenacker P. Structure of the human 5-HT₇ receptor gene and characterization of its promoter region. *Gene.* 2007;391(1-2):252-63.
- [172] van Vliet J, Crofts LA, Quinlan KG, Czolij R, Perkins AC and Crossley M. Human KLF17 is a new member of the Sp/KLF family of transcription factors. *Genomics.* 2006;87(4):474-82.
- [173] L. O Connor JG, C. Bonifer. The Role of the Ubiquitously Expressed Transcription Factor Sp1 in Tissue-specific Transcriptional Regulation and in Disease. *Yale J biol Med* 2016;89(4):513-25.
- [174] Cawley S, Bekiranov S, Ng HH, Kapranov P, Sekinger EA, Kampa D, Piccolboni A, Sementchenko V, Cheng J, Williams AJ, Wheeler R, Wong B, Drenkow J, Yamanaka M, Patel S, Brubaker S, Tammana H, Helt G, Struhl K and Gingeras TR. Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell.* 2004;116(4):499-509.
- [175] Saffer JD, Jackson SP and Annarella MB. Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol Cell Biol.* 1991;11(4):2189-99.
- [176] Bevilacqua A, Fiorenza MT and Mangia F. A developmentally regulated GAGA box-binding factor and Sp1 are required for transcription of the hsp70.1 gene at the onset of mouse zygotic genome activation. *Development.* 2000;127(7):1541-51.
- [177] Suzuki T, Kimura A, Nagai R and Horikoshi M. Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding. *Genes Cells.* 2000;5(1):29-41.
- [178] Wierstra I. Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;372(1):1-13.
- [179] Beishline K and Azizkhan-Clifford J. Sp1 and the 'hallmarks of cancer'. *FEBS J.* 2015;282(2):224-58.
- [180] Han WD, Si YL, Zhao YL, Li Q, Wu ZQ, Hao HJ and Song HJ. GC-rich promoter elements maximally confers estrogen-induced transactivation of LRP16 gene through ER α /Sp1 interaction in MCF-7 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;109(1-2):47-56.

-
-
- [181] Lonze BE and Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. 2002;35(4):605-23.
- [182] Lazennec G, Thomas JA and Katzenellenbogen BS. Involvement of cyclic AMP response element binding protein (CREB) and estrogen receptor phosphorylation in the synergistic activation of the estrogen receptor by estradiol and protein kinase activators. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001;77(4-5):193-203.
- [183] Smith CL, Onate SA, Tsai MJ and O'Malley BW. CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(17):8884-8.
- [184] Chan HM and La Thangue NB. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 13):2363-73.
- [185] Bannister AJ and Kouzarides T. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*. 1996;384(6610):641-3.
- [186] Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH and Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. 1996;87(5):953-9.
- [187] Wade PA. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum Mol Genet*. 2001;10(7):693-8.
- [188] Ito K, Barnes PJ and Adcock IM. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1 β -induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol*. 2000;20(18):6891-903.
- [189] Forsberg EC and Bresnick EH. Histone acetylation beyond promoters: long-range acetylation patterns in the chromatin world. *Bioessays*. 2001;23(9):820-30.
- [190] Suenaga M, Soda H, Oka M, Yamaguchi A, Nakatomi K, Shiozawa K, Kawabata S, Kasai T, Yamada Y, Kamihira S, Tei C and Kohno S. Histone deacetylase inhibitors suppress telomerase reverse transcriptase mRNA expression in prostate cancer cells. *Int J Cancer*. 2002;97(5):621-5.
- [191] Hiramoto M, Shimizu N, Sugimoto K, Tang J, Kawakami Y, Ito M, Aizawa S, Tanaka H, Makino I and Handa H. Nuclear targeted suppression of NF-kappa B activity by the novel quinone derivative E3330. *J Immunol*. 1998;160(2):810-9.
- [192] Ray A, Prefontaine KE and Ray P. Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor. *J Biol Chem*. 1994;269(17):12940-6.
- [193] Adamson AD, Friedrichsen S, Semprini S, Harper CV, Mullins JJ, White MR and Davis JR. Human prolactin gene promoter regulation by estrogen: convergence with tumor necrosis factor- α signaling. *Endocrinology*. 2008;149(2):687-94.
- [194] Wissink S, van der Burg B, Katzenellenbogen BS and van der Saag PT. Synergistic activation of the serotonin-1A receptor by nuclear factor-kappa B and estrogen. *Mol Endocrinol*. 2001;15(4):543-52.
- [195] Frasor J, Weaver AE, Pradhan M and Mehta K. Synergistic up-regulation of prostaglandin E synthase expression in breast cancer cells by 17 β -estradiol and proinflammatory cytokines. *Endocrinology*. 2008;149(12):6272-9.
- [196] Miller RK, Genbacev O, Turner MA, Aplin JD, Caniggia I and Huppertz B. Human placental explants in culture: approaches and assessments. *Placenta*. 2005;26(6):439-48.
- [197] Liu F, Soares MJ and Audus KL. Permeability properties of monolayers of the human trophoblast cell line BeWo. *Am J Physiol*. 1997;273(5 Pt 1):C1596-604.

-
-
- [198] Ramos AJ, Cantero MR, Zhang P, Raychowdhury MK, Green A, MacPhee D and Cantiello HF. Morphological and electrical properties of human trophoblast choriocarcinoma, BeWo cells. *Placenta*. 2008;29(6):492-502.
- [199] Wang H, Zhou L, Gupta A, Vethanayagam RR, Zhang Y, Unadkat JD and Mao Q. Regulation of BCRP/ABCG2 expression by progesterone and 17beta-estradiol in human placental BeWo cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290(5):E798-807.
- [200] Hagen G, Muller S, Beato M and Suske G. Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO J*. 1994;13(16):3843-51.
- [201] Shaywitz AJ and Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:821-61.
- [202] Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
- [203] Cauzac M, Czuba D, Girard J and Hauguel-de Mouzon S. Transduction of leptin growth signals in placental cells is independent of JAK-STAT activation. *Placenta*. 2003;24(4):378-84.
- [204] Leask A. Sp1king out cancer (....and fibrosis?). *J Cell Commun Signal*. 2012;6(1):61-2.
- [205] Safe S KK. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol* 2008;41(5):263.
- [206] Li D, Mitchell D, Luo J, Yi Z, Cho SG, Guo J, Li X, Ning G, Wu X and Liu M. Estrogen regulates KiSS1 gene expression through estrogen receptor alpha and SP protein complexes. *Endocrinology*. 2007;148(10):4821-8.
- [207] Burek M, Steinberg K and Forster CY. Mechanisms of transcriptional activation of the mouse claudin-5 promoter by estrogen receptor alpha and beta. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;392(1-2):144-51.
- [208] Faustmann G, Tiran B, Maimari T, Kieslinger P, Obermayer-Pietsch B, Gruber HJ, Roob JM and Winklhofer-Roob BM. Circulating leptin and NF-kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells across the menstrual cycle. *Biofactors*. 2016;42(4):376-87.
- [209] Wahl C, Liptay S, Adler G and Schmid RM. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest*. 1998;101(5):1163-74.
- [210] Xing D, Oparil S, Yu H, Gong K, Feng W, Black J, Chen YF and Nozell S. Estrogen modulates NFkappaB signaling by enhancing IkappaBalpha levels and blocking p65 binding at the promoters of inflammatory genes via estrogen receptor-beta. *PLoS One*. 2012;7(6):e36890.
- [211] Chu S, Nishi Y, Yanase T, Nawata H and Fuller PJ. Transrepression of estrogen receptor beta signaling by nuclear factor-kappaB in ovarian granulosa cells. *Mol Endocrinol*. 2004;18(8):1919-28.
- [212] Safe S and Kim K. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol*. 2008;41(5):263-75.
- [213] De Bosscher K, Vanden Berghe W and Haegeman G. Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor kappaB. *Oncogene*. 2006;25(51):6868-86.
- [214] Sliker LJ, Sloop KW, Surface PL, Kriauciunas A, LaQuier F, Manetta J, Bue-Valleskey J and Stephens TW. Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem*. 1996;271(10):5301-4.

-
- [215] Chrun ES, Modolo F and Daniel FI. Histone modifications: A review about the presence of this epigenetic phenomenon in carcinogenesis. *Pathol Res Pract*. 2017;213(11):1329-39.
- [216] Alao JP, Lam EW, Ali S, Buluwela L, Bordogna W, Lockey P, Varshochi R, Stavropoulou AV, Coombes RC and Vigushin DM. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A represses estrogen receptor alpha-dependent transcription and promotes proteasomal degradation of cyclin D1 in human breast carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res*. 2004;10(23):8094-104.
- [217] Rice A and Chard T. Cytokines in implantation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1998;9(3-4):287-96.
- [218] Genbacev O and Miller RK. Post-implantation differentiation and proliferation of cytotrophoblast cells: in vitro models--a review. *Placenta*. 2000;21 Suppl A:S45-9.
- [219] Gambino YP, Perez Perez A, Duenas JL, Calvo JC, Sanchez-Margalet V and Varone CL. Regulation of leptin expression by 17beta-estradiol in human placental cells involves membrane associated estrogen receptor alpha. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(4):900-10.
- [220] Chen Z, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA and Zhao H. Directed evolution of human estrogen receptor variants with significantly enhanced androgen specificity and affinity. *J Biol Chem*. 2004;279(32):33855-64.
- [221] Everett RB and MacDonald PC. Endocrinology of the placenta. *Annu Rev Med*. 1979;30:473-88.
- [222] Jiang B, Kamat A and Mendelson CR. Hypoxia prevents induction of aromatase expression in human trophoblast cells in culture: potential inhibitory role of the hypoxia-inducible transcription factor Mash-2 (mammalian achaete-scute homologous protein-2). *Mol Endocrinol*. 2000;14(10):1661-73.
- [223] Genbacev O, Joslin R, Damsky CH, Polliotti BM and Fisher SJ. Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *J Clin Invest*. 1996;97(2):540-50.
- [224] Schiessl B, Mylonas I, Kuhn C, Kunze S, Schulze S, Friese K and Jeschke U. Expression of estrogen receptor-alpha, estrogen receptor-beta and placental endothelial and inducible NO synthase in intrauterine growth-restricted and normal placentals. *Arch Med Res*. 2006;37(8):967-75.
- [225] Lappas M, Permezel M and Rice GE. Leptin and adiponectin stimulate the release of proinflammatory cytokines and prostaglandins from human placenta and maternal adipose tissue via nuclear factor-kappaB, peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma and extracellularly regulated kinase 1/2. *Endocrinology*. 2005;146(8):3334-42.
- [226] Emili A, Greenblatt J and Ingles CJ. Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol*. 1994;14(3):1582-93.
- [227] Zhang P, Klenk ES, Lazzaro MA, Williams LB and Considine RV. Hexosamines regulate leptin production in 3T3-L1 adipocytes through transcriptional mechanisms. *Endocrinology*. 2002;143(1):99-106.
- [228] Safe S. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam Horm*. 2001;62:231-52.
- [229] Kruger I, Vollmer M, Simmons DG, Elsasser HP, Philipsen S and Suske G. Sp1/Sp3 compound heterozygous mice are not viable: impaired erythropoiesis and severe placental defects. *Dev Dyn*. 2007;236(8):2235-44.

-
- [230] Robertson JF. ICI 182,780 (Fulvestrant)--the first oestrogen receptor down-regulator--current clinical data. *Br J Cancer*. 2001;85 Suppl 2:11-4.
- [231] Alonso A, Fernandez R, Ordóñez P, Moreno M, Patterson AM and Gonzalez C. Regulation of estrogen receptor alpha by estradiol in pregnant and estradiol treated rats. *Steroids*. 2006;71(13-14):1052-61.
- [232] Teyssier C, Belguise K, Galtier F, Cavailles V and Chabos D. Receptor-interacting protein 140 binds c-Jun and inhibits estradiol-induced activator protein-1 activity by reversing glucocorticoid receptor-interacting protein 1 effect. *Mol Endocrinol*. 2003;17(2):287-99.
- [233] Bjornstrom L and Sjoberg M. Estrogen receptor-dependent activation of AP-1 via non-genomic signalling. *Nucl Recept*. 2004;2(1):3.
- [234] Segura JA, Donadio AC, Lobo C, Mates JM, Marquez J and Alonso FJ. Inhibition of glutaminase expression increases Sp1 phosphorylation and Sp1/Sp3 transcriptional activity in Ehrlich tumor cells. *Cancer Lett*. 2005;218(1):91-8.
- [235] Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, Klein AS, Bulkley GB, Bao C, Noble PW, Lane MD and Diehl AM. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J*. 1998;12(1):57-65.
- [236] Bacot SM, Lenz P, Frazier-Jessen MR and Feldman GM. Activation by prion peptide PrP106-126 induces a NF-kappaB-driven proinflammatory response in human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2003;74(1):118-25.
- [237] Habens F, Srinivasan N, Oakley F, Mann DA, Ganesan A and Packham G. Novel sulfasalazine analogues with enhanced NF-kB inhibitory and apoptosis promoting activity. *Apoptosis*. 2005;10(3):481-91.
- [238] Weber CK, Liptay S, Wirth T, Adler G and Schmid RM. Suppression of NF-kappaB activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of IkappaB kinases alpha and beta. *Gastroenterology*. 2000;119(5):1209-18.
- [239] P. Dharane (néé Ligam). U. Manuelpillai EW, D. W. Walker. NFkB- dependent increase of kynurenine pathway activity in human placenta: Inhibition by sulfasalazine. *Placenta*. 2012;31:997-1002.
- [240] Ghisletti S, Meda C, Maggi A and Vegeto E. 17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization. *Mol Cell Biol*. 2005;25(8):2957-68.
- [241] Guzeloglu-Kayisli O, Halis G, Taskiran S, Kayisli UA and Arici A. DNA-binding ability of NF-kappaB is affected differently by ERalpha and ERbeta and its activation results in inhibition of estrogen responsiveness. *Reprod Sci*. 2008;15(5):493-505.
- [242] Speir E, Yu ZX, Takeda K, Ferrans VJ and Cannon RO, 3rd. Competition for p300 regulates transcription by estrogen receptors and nuclear factor-kappaB in human coronary smooth muscle cells. *Circ Res*. 2000;87(11):1006-11.
- [243] Hsu SM, Chen YC and Jiang MC. 17 beta-estradiol inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced nuclear factor-kappa B activation by increasing nuclear factor-kappa B p105 level in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;279(1):47-52.
- [244] Stein B and Yang MX. Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta. *Mol Cell Biol*. 1995;15(9):4971-9.
- [245] Diamond MI, Miner JN, Yoshinaga SK and Yamamoto KR. Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science*. 1990;249(4974):1266-72.

-
- [246] Yang-Yen HF, Chambard JC, Sun YL, Smeal T, Schmidt TJ, Drouin J and Karin M. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell*. 1990;62(6):1205-15.
- [247] McKay LI and Cidlowski JA. Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol Endocrinol*. 1998;12(1):45-56.
- [248] McKay LI and Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev*. 1999;20(4):435-59.
- [249] Rubio MF, Werbajh S, Cafferata EG, Quagliano A, Colo GP, Nojek IM, Kordon EC, Nahmod VE and Costas MA. TNF-alpha enhances estrogen-induced cell proliferation of estrogen-dependent breast tumor cells through a complex containing nuclear factor-kappa B. *Oncogene*. 2006;25(9):1367-77.
- [250] Frasor J, Weaver A, Pradhan M, Dai Y, Miller LD, Lin CY and Stanculescu A. Positive cross-talk between estrogen receptor and NF-kappaB in breast cancer. *Cancer Res*. 2009;69(23):8918-25.
- [251] Bukovsky A, Caudle MR, Cekanova M, Fernando RI, Wimalasena J, Foster JS, Henley DC and Elder RF. Placental expression of estrogen receptor beta and its hormone binding variant--comparison with estrogen receptor alpha and a role for estrogen receptors in asymmetric division and differentiation of estrogen-dependent cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;1:36.
- [252] Bukovsky A, Cekanova M, Caudle MR, Wimalasena J, Foster JS, Henley DC and Elder RF. Expression and localization of estrogen receptor-alpha protein in normal and abnormal term placentae and stimulation of trophoblast differentiation by estradiol. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;1:36.
- [253] Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene*. 2006;25(51):6717-30.
- [254] Kiernan R, Bres V, Ng RW, Coudart MP, El Messaoudi S, Sardet C, Jin DY, Emiliani S and Benkirane M. Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *J Biol Chem*. 2003;278(4):2758-66.
- [255] Lawrence T, Bebién M, Liu GY, Nizet V and Karin M. IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature*. 2005;434(7037):1138-43.
- [256] Ray A, LaForge KS and Sehgal PB. On the mechanism for efficient repression of the interleukin-6 promoter by glucocorticoids: enhancer, TATA box, and RNA start site (Inr motif) occlusion. *Mol Cell Biol*. 1990;10(11):5736-46.
- [257] Ray A, LaForge KS and Sehgal PB. Repressor to activator switch by mutations in the first Zn finger of the glucocorticoid receptor: is direct DNA binding necessary? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(16):7086-90.
- [258] Ray A and Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(2):752-6.
- [259] Feldman I, Feldman GM, Mobarak C, Dunkelberg JC and Leslie KK. Identification of proteins within the nuclear factor-kappa B transcriptional complex including estrogen receptor-alpha. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196(4):394 e1-11; discussion e11-3.
- [260] Ray P, Ghosh SK, Zhang DH and Ray A. Repression of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the

transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B by the estrogen receptor. FEBS Lett. 1997;409(1):79-85.

[261] Feinman MA, Kliman HJ, Caltabiano S and Strauss JF, 3rd. 8-Bromo-3',5'-adenosine monophosphate stimulates the endocrine activity of human cytotrophoblasts in culture. J Clin Endocrinol Metab. 1986;63(5):1211-7.

[262] Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T and Hidaka H. Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. J Biol Chem. 1990;265(9):5267-72.

[263] Harnish DC, Scicchitano MS, Adelman SJ, Lyttle CR and Karathanasis SK. The role of CBP in estrogen receptor cross-talk with nuclear factor-kappaB in HepG2 cells. Endocrinology. 2000;141(9):3403-11.

[264] Sun J-M, Chen, H. Y., Moniwa, M, Samuel, S, and David, J. R. Histone deacetylases: transcriptional regulation and other cellular functions 1999.

[265] Stenoien DL, Patel K, Mancini MG, Dutertre M, Smith CL, O'Malley BW and Mancini MA. FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent. Nat Cell Biol. 2001;3(1):15-23.

[266] Sun JM, Chen HY and Davie JR. Effect of estradiol on histone acetylation dynamics in human breast cancer cells. J Biol Chem. 2001;276(52):49435-42.

[267] Yoshida M, Kijima M, Akita M and Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. J Biol Chem. 1990;265(28):17174-9.

[268] Gunin AG, Kapitova IN and Suslonova NV. Effects of histone deacetylase inhibitors on estradiol-induced proliferation and hyperplasia formation in the mouse uterus. J Endocrinol. 2005;185(3):539-49.

[269] Margueron R, Duong V, Castet A and Cavailles V. Histone deacetylase inhibition and estrogen signalling in human breast cancer cells. Biochem Pharmacol. 2004;68(6):1239-46.

[270] Iliopoulos D, Malizos KN and Tsezou A. Epigenetic regulation of leptin affects MMP-13 expression in osteoarthritic chondrocytes: possible molecular target for osteoarthritis therapeutic intervention. Ann Rheum Dis. 2007;66(12):1616-21.

[271] Sakai N, Maruyama T, Sakurai R, Masuda H, Yamamoto Y, Shimizu A, Kishi I, Asada H, Yamagoe S and Yoshimura Y. Involvement of histone acetylation in ovarian steroid-induced decidualization of human endometrial stromal cells. J Biol Chem. 2003;278(19):16675-82.

[272] Robyr D, Wolffe AP and Wahli W. Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. Mol Endocrinol. 2000;14(3):329-47.

.....
Lic. Schanton Malena

.....
Dra. Cecilia Varone