



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA

Rol de la leptina en la interfase materno-fetal en condiciones de hipoxia química.

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

LIC. DE DIOS NATALY

Directora: Dra. Cecilia L. Varone

Consejero de estudio: Dra. Ramhorst E. Rosanna

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

Buenos Aires, 2024

RESUMEN

Rol de la leptina en la interfase materno-fetal en condiciones de hipoxia química

La leptina desempeña un papel crucial en la placenta durante el embarazo, contribuyendo tanto al desarrollo fetal como al mantenimiento de la salud materna. Este órgano esencial produce leptina y expresa sus receptores, lo que sugiere una participación directa de esta hormona en los procesos placentarios. Uno de los roles principales de la leptina en la placenta es regular el crecimiento fetal, además, influye en la proliferación celular y la angiogénesis en la placenta.

La hipoxia, es un evento necesario durante las primeras semanas de gestación y tiene un rol significativo en la función placentaria y el desarrollo fetal. Sin embargo, la hipoxia prolongada puede llevar a la restricción del crecimiento placentario y a una disminución de la invasión del trofoblasto, lo que puede afectar adversamente el embarazo materno, la salud fetal y la susceptibilidad a enfermedades adultas. En la placenta preecláptica se evidencia una regulación positiva de la señalización de hipoxia mediada por el factor de transcripción inducible por hipoxia, HIF-1 α .

En este contexto, la leptina puede desempeñar un papel crucial como un mediador clave de la respuesta adaptativa de la placenta a la hipoxia. Reportes previos han demostrado que la expresión de leptina y sus receptores aumenta en respuesta a la hipoxia en la placenta, indicando su papel en la regulación de la respuesta celular a la hipoxia y en la adaptación de la placenta a condiciones de disminución de oxígeno.

Este trabajo de tesis se desarrolló con el objetivo de investigar la acción de la leptina como un factor de señalización importante que modula los efectos de la hipoxia en la placenta, regulando procesos como la migración, proliferación celular y apoptosis. Además, se estudió la participación de las vías de señalización MAPK y PI3K.

La hipoxia placentaria se estudió mediante la estabilización de HIF-1 α , un regulador clave en la respuesta a la hipoxia. Se utilizaron dos abordajes: la exposición de células trofoblásticas al CoCl₂, un mimético de hipoxia química, y el uso de una cámara de hipoxia ajustada al 2% de O₂.

Mediante modelos de células trofoblásticas, BeWo y Swan-71, se demostró que ambos métodos estabilizan HIF-1 α tras 24 y 48 horas de tratamiento. También se utilizaron explantos de placentas normales humanas a término.

Se determinó que CoCl₂ induce varios parámetros y mediadores apoptóticos, incluidos el clivaje de Caspasa-3, PARP-1 y Bid; la liberación de citocromo C, la expresión de la Procaspasa-8, la presencia de núcleos apoptóticos y determinación de la presencia de fragmentos de ADN de bajo peso molecular del ADN.

La modulación de la leptina en la hipoxia sobre promotores e inhibidores de la apoptosis fue analizada. La leptina protege de la muerte celular, evidenciado por la disminución del clivaje de Caspasa-3 y PARP-1 y la fragmentación del ADN, mediante la activación de las vías de PI3K y MAPK. Se encontró que la leptina disminuye la expresión de Procaspasa-8 y la liberación de Citocromo C a través de las vías MAPK y PI3K, respectivamente. En el modelo de hipoxia (2% de O₂), generado con cámara de hipoxia, la leptina disminuyó el clivaje de PARP-1 al modular la señalización de HIF-1 α a través de la vía de PI3K.

Asimismo, la leptina revierte en células citotrofoblásticas los niveles de intermediarios mitocondriales aumentados durante la hipoxia química, como la relación BAX/BCL-2, la expresión de Bad y Bak y la expresión de Bid y su clivaje t-Bid, promoviendo la supervivencia mediante la activación de las vías Akt y ERK 1/2. Además, la leptina en el contexto de hipoxia química incrementa la fosforilación de Bad en la Ser112 asociada a la supervivencia celular y aumenta la expresión de factores antiapoptóticos como BCL-xL y MCL-1.

En cuanto a su rol en la proliferación celular, se evidenció que la hipoxia química reduce la proliferación y viabilidad de células Swan-71. Durante la hipoxia química, la leptina promueve la supervivencia de células trofoblásticas, y aumenta la expresión de Ki-67 y PCNA, dos marcadores asociados a la proliferación celular. Leptina disminuye los niveles de expresión y localización nuclear de p53, regulador del ciclo celular y apoptosis, mediante la activación de la vía de PI3K y modulación de la señalización a través de HIF-1 α en hipoxia. Además, incrementa los niveles de Mdm-2, principal regulador negativo de la vida media de p53, a través de PI3K/Akt y MAPK. También se demostró que la leptina promueve la migración de células trofoblásticas tras estabilizar HIF-1 α con CoCl₂ mediante la activación de la vía de PI3K. La estimulación con leptina

promueve la proliferación celular y protege contra la apoptosis inducida por CoCl_2 , además de estimular la migración de células trofoblásticas en esta condición de estrés.

Finalmente, encontramos una interrelación durante la estabilización de HIF-1 α que aumentó la expresión de leptina, y a su vez, la leptina reduce los niveles de HIF-1 α a través de la activación de la vía de MAPK.

Estos hallazgos sugieren que la leptina posee efectos protectores durante la hipoxia en la placenta, promoviendo la supervivencia celular, lo que resulta de gran importancia para la función placentaria y el desarrollo fetal bajo condiciones de estrés por hipoxia.

En resumen, el rol de la leptina durante la hipoxia en la placenta es un área de investigación en evolución que merece mayor atención. Comprender cómo la leptina regula la respuesta de la placenta a la hipoxia podría tener importantes implicaciones para el diagnóstico y tratamiento de complicaciones del embarazo asociadas con la hipoxia, así como para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para mejorar la salud materna y fetal.

Palabras clave: Leptina, placenta, hipoxia, Factor-1 inducible por hipoxia (HIF-1 α), proliferación, apoptosis, p53, vías de señalización, migración.

ABSTRACT

Leptin role at the maternal-fetal interface under chemical hypoxia condition

Leptin plays a crucial role in the placenta during pregnancy, contributing to both fetal development and maternal health. This essential organ produces leptin and expresses its receptors, suggesting a direct involvement of this hormone in placental physiology.

One of the main roles of leptin in the placenta is to regulate fetal growth, and it also influences cell proliferation and placental angiogenesis in the placenta. Hypoxia is a necessary event during the early weeks of gestation and plays a significant role in placental function and fetal development. However, prolonged hypoxia can lead to restricted placental growth and decreased trophoblast invasion, adversely affecting maternal pregnancy, fetal health, and susceptibility to adult diseases. Positive regulation of hypoxia signaling mediated by the hypoxia-inducible transcription factor 1, HIF-1 α , is evident in preeclamptic placenta. In this context, leptin is a key mediator of the placenta's adaptive response to hypoxia.

Previous reports have shown that leptin and its receptors expression increase in response to placental hypoxia, indicating its role in regulating cellular response to hypoxia and placental adaptation to decreased oxygen conditions.

The aim of this thesis work focus in the study of leptin action as an important signaling factor that modulates placental hypoxia, effects of hypoxia on migration, cell proliferation, and apoptosis. The involvement of MAPK and PI3K signaling pathways was also studied.

Placental hypoxia was studied through HIF-1 α , a key regulator in the hypoxia response. Two approaches were used: the exposure of trophoblastic cells to CoCl₂, a chemical hypoxia mimetic, and cell incubation in a hypoxia chamber set to 2% O₂. Using trophoblastic cell models BeWo and Swan-71, it was demonstrated that both methods stabilize HIF-1 α after 24 and 48 hours of treatment. Placental explants from term normal pregnancies were also used.

Leptin stimulation promotes cell proliferation and protects from CoCl_2 induced apoptosis, and stimulates trophoblast cell migration under this stress conditions. It was determined that CoCl_2 induces several apoptotic parameters and mediators, including cleavage of Caspase-3, PARP-1, and Bid; Cytochrome C release; Procaspase-8 expression; presence of apoptotic nuclei; and DNA fragmentation.

The modulation of leptin on apoptosis promoters and inhibitors during hypoxia was analyzed. Leptin protected from cell death, evidenced by Caspase-3 and PARP-1 cleavage and DNA fragmentation decreased, through PI3K and MAPK pathways activation.

It was found that leptin diminished Caspase-8 expression and Cytochrome C release through MAPK and PI3K pathways, respectively. Leptin also downregulated PARP-1 cleavage in a hypoxic chamber (O_2 2%) involving HIF-1 α and PI3K signaling pathways.

Furthermore, leptin reversed mitochondrial intermediates levels increased during chemical hypoxia, such as BAX/BCL-2 ratio, Bad, Bak and Bid expression and Bid cleavage, promoting survival through Akt and ERK 1/2 signaling pathways. Additionally, in the context of chemical hypoxia, increased Bad phosphorylation at Ser112 associated with cell survival and increased expression of anti-apoptotic factors like BCL-xL and MCL-1.

Regarding its role on cell proliferation, it was observed that chemical hypoxia reduced proliferation and viability of Swan-71 cells. During chemical hypoxia treatment, leptin promoted trophoblastic cell survival and increased expression of Ki-67 and PCNA, markers associated with cell proliferation. Leptin decreased p53 expression and nuclear localization, a regulator of cell cycle and apoptosis, through PI3K pathway and the modulation of HIF-1 α signaling in hypoxia condition.

Additionally, it increased Mdm-2 levels, a key negative regulator of p53's half-life, through PI3K/Akt and MAPK. It was also demonstrated that leptin promoted trophoblastic cell migration after HIF-1 α stabilization with CoCl_2 through the activation of PI3K signaling pathway.

Finally, we found that the stabilization of HIF-1 α increased the expression of leptin, and in turn, leptin reduces the levels of HIF-1 α through the activation of the MAPK pathway.

These findings suggest that leptin has protective effects during placental hypoxia, promoting cell survival, which is crucial for placental function and fetal development under hypoxic stress conditions.

In summary, the role of leptin during placental hypoxia is an evolving research area deserving greater attention. Understanding how leptin regulates placental response to hypoxia could have significant implications for diagnosing and treating pregnancy complications associated with hypoxia, as well as developing new therapeutic strategies to improve maternal and fetal health.

Keywords: Leptin, placenta, hypoxia, Hypoxia-Inducible Factor (HIF-1 α), proliferation, apoptosis, p53, signaling pathways, migration.

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

- “Placental apoptosis increased by Hypoxia Inducible Factor-1 stabilization is counteracted by leptin”

Nataly de Dios, Rodrigo Riedel, Malena Schanton, Paula Balestrini, Luciano Pérez, Antonio Pérez-Pérez, Tomás Etcheverry, Roberto Casale, Mariana Farina, Víctor Sánchez Margalet, Julieta Maymó, Cecilia Laura Varone. *Biology of Reproduction* (2024). Jun 26:ioae095. Doi: 10.1093/biolre/ioae095.

- Leptin overrides impaired proliferation and migration of chemical hypoxic trophoblast cells involving p53 and PI3K pathways- Manuscrito en producción

ABREVIATURAS

- AIF: Factor inductor de apoptosis
- ARNm: ARN mensajero
- CRH: Hormona corticotropina
- CTB: Citotrofoblasto
- CTBev: Citotrofoblasto extraveloso
- CTBv: Citotrofoblasto veloso
- DMG: Diabetes mellitus gestacional
- DR: Death receptor
- EGF: Factor de crecimiento epidermal
- ERK: Extracellular-signal-regulated kinases
- FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos
- FSH: Hormona folículo estimulante
- GFBP-1: Factor de crecimiento de insulina
- GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina
- hCG: Gonadotropina coriónica humana
- HLA-G: Antígeno leucocitario humano G
- hPL: Lactógeno placentario
- IGF: Factor de crecimiento tipo insulina
- IL: Interleuquina
- JAK: Janus Quinasa
- JNK: quinasa N-terminal de cJun
- LepR: Receptor de leptina
- LepRs: Isoforma corta del receptor de leptina

- LH: Hormona luteinizante
- LIF: Factor inhibidor de leucemia
- MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos
- MCI: Macizo celular interno
- MEC: Matriz extracelular
- MMP: Metaloproteasa de matriz
- NK: Natural killer
- OSM: Oncostatina-M
- PARP-1: Poli (ADP-ribosa) polimerasa-1
- PE: Preeclampsia
- PG: Prostaglandina
- PI3K: Fosfatidilinositol-3 quinasa
- PKC: Proteína quinasa C
- PRL: Prolactina
- Rb: Proteína retinoblastoma
- RCIU: Restricción del crecimiento intrauterina
- SLR: Receptor soluble de leptina
- STAT: Signal transducer and activator of transcription
- STB: Sinciotrofoblasto
- STBv: Sinciotrofoblasto veloso
- TEM: Transición epitelio mesenquimal
- TGF- β : Factor de crecimiento transformante β
- TRAIL: TNF-related apoptosis inducing ligand
- TRH: Hormona liberadora de tirotrófina
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis no habría sido posible sin el apoyo de muchas personas a lo largo de estos años. Es imposible no mirar hacia atrás y recordar a cada persona que estuvo en este largo camino acompañándome. En un trayecto lleno de retos, alcanzar metas que a veces parecían inalcanzables habría sido imposible sin la compañía y el cariño que recibí. A todos ustedes, les debo mucho más que simples palabras; me brindaron el mayor regalo que podría haber recibido: su gran apoyo.

En primer lugar, quisiera expresar mi profunda gratitud a mi directora, Ceci, por su orientación, paciencia y constante apoyo durante todo el proceso, sin duda este tiempo fue más que una guía para mí, nuestras charlas, risas, me acompañaran por siempre. Gracias por siempre confiar en mí, por todos tus gestos, por animarme, enseñarme y por ser una gran compañera en este trayecto.

Agradezco también a la AGENCIA y a CONICET por el financiamiento que hizo posible este proyecto, y a la querida Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, que ha sido mi segunda casa desde los tiempos de la licenciatura, brindándome no solo formación académica, sino también crecimiento personal. Al Departamento de Química Biológica y al IQUIBICEN, no solo por los recursos brindados, sino también por la increíble calidad humana de todas las personas que forman parte de este instituto.

Mis compañeros de laboratorio, ¿qué hubiera sido estos años sin ellos? fueron una parte fundamental de este camino.

Desde los comienzos, con Male, por su buena energía, charlas, por haberme ayudado al principio donde todo era nuevo para mí. A Tamara, que en su paso por el laboratorio se convirtió en una gran compañera de mates y charlas.

Rodri, un genio de la vida, que esta hermosa carrera me permitió conocer, un gran maestro, mi más sentido agradecimiento a él, no podría haberlo logrado sin tu ayuda y compromiso.

A Luchito, otro gran compañero, tu elocuencia, responsabilidad, compromiso y amor por la ciencia, me dieron el ánimo que necesité muchas veces para continuar. Tus palabras y nuestras charlas las tendré siempre presente conmigo.

Maby, tu dulzura y calidez hace que a pesar de que nos conozcamos hace poco, parezca que nos conozcamos de toda la vida, además de ser una gran observadora y detallista a la hora de trabajar, espero poder seguir disfrutando de tu compañía

July, nuestra segunda mama del labo, fuiste también mi sostén muchas veces, gracias, gracias y gracias por nuestras charlas de mañana, nuestros consejos y por tu buena predisposición de siempre para ayudarme.

A mis amigas del alma, me acompañaron y me acompañan siempre, dándome palabras de apoyo, con mates, comida, vinito, siempre juntas, siempre caminando al lado.

A Jime, esa gran amiga que me dio la facultad, desde nuestras juntadas interminables para estudiar, hasta nuestros encuentros por los pasillos haciendo el doctorado, qué placer haberte conocido. Gracias, por el ánimo mutuo cuando la vida científica se complica, hasta nuestras charlas profundas de la vida misma, te quiero tanto!

A mis compañeros de comu, esa hermosa banda de gente tan pero tan linda que la docencia me permitió conocer. Están siempre pendiente de todo, alegrándose por cada pasito, nuestras charlas, mates me acompañan desde hace ya 7 años. Son una fuente constante de alegría, apoyo y lucha. ¡Gracias!

A mi familia, mi base y mi sostén. Mi papa, mi mama y mi hermana, es imposible escribir esto sin llorar de felicidad, su compañía me permitió muchísimas veces, más de las que puedo recordar ahora, terminar trabajos, cursos, presentaciones y sobre todo la escritura de esta tesis. Están ahí, a la par de mi andar, junto a mí. Realmente no podría haberlo logrado sin tenerlos a ellos conmigo. Siempre alegrándose de cada logro, padeciendo conmigo mis temores y frustraciones.

Delfi, mi pequeña, mi miedosa, mi hermanita, no tan chiquita, gracias por tus palabras y compañía, por estar, por salvarme si necesito algo, sos una gran persona, te amo mucho! Mi viejo, mi ángel, que, hacia lo imposible por ir a buscarme a la facu, después de un día largo, para que pueda llegar a tiempo a mi casa, haciéndome el aguante en todo momento, siempre preguntándome como iba, qué necesitaba, si podía ayudarme en algo, nuestras charlas, nuestros momentos compartidos, su gran regalo, que cambió mi vida, mi *motito*, me permitió poder manejar más livianamente los horarios. Mi vieja, mi otro ángel, mi refugio, no tengo palabras para agradecerte todo lo que hiciste y haces

por mí, tu apoyo incondicional, tus “como estas mi vida” todas las mañanas, tu aguante, todo y más. Espero que Juana sienta un poco de todo el amor que siento por ustedes.

A Marce, mi compañero desde hace ya 16 años, pasamos de todo y siempre juntos, desde donde pudimos acompañándonos. Gracias por sacarme siempre una sonrisa, estás ahí para hacer de momentos complejos, más llevaderos. Gracias por entender, por bancarme, por respetar mis momentos, por darme siempre ánimo de seguir adelante, por todo y más.. gracias!

A mis 4 bebés perrunos, Nina, Zuvi, Rosa y Galo, mis amores, cada uno llegó a mi vida en momentos distintos y estoy infinitamente agradecida de tenerlos. Llegar a casa y se alegren de verme, que duerman acurrucados conmigo, me llena de amor y paz. Son todo lo que está bien, quiero disfrutar de su presencia, muchos años más.

Y el agradecimiento final, a lo más importante que tengo, a mi bebe, Juanita. Me acompañaste en mi panza, desde el último año de la carrera, te bancaste una tesina, ya eso, ¡es un montón!. Soy inmensamente afortunada de tenerte en mi vida, de poder mimarte, amarte, y darte todo lo que soy. Cada día me inspiras a ser una mejor persona, con cada palabra y conversación que compartimos. Aunque mis días sean largos, empezar la mañana despertándote con besos me da fuerzas y hace que te extrañe un poquito menos hasta que volvemos a encontrarnos en ese abrazo que nos damos al vernos de nuevo...qué hermosa sos y qué gran compañera! Voy a estar para acompañarte en todo lo que decidas hacer, a tu lado la vida es mucho más fácil. Sos consciente a pesar de tu corta edad, de que este gran logro es también gracias a vos. Tus besos y abrazos cuando lo necesité me dieron fuerzas para seguir. Te amo con todo mi corazón.

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	5
ABREVIATURAS.....	9
AGRADECIMIENTOS.....	11
ÍNDICE.....	14
INTRODUCCIÓN	18
Implantación y placentación.....	18
Implantación del blastocisto	18
Migración, invasión trofoblástica y remodelación de las arterias espirales uterinas	22
Placentación.....	24
La Placenta humana	27
Estructura y función de la placenta humana	27
Leptina como hormona placentaria	29
Caracterización de leptina y sus receptores	29
Funciones de leptina.....	37
Factor Inducible por Hipoxia-1 (HIF-1).....	49
Características generales y regulación de HIF-1 α	49
Rol de HIF-1 α durante la placentación.....	55
Apoptosis	56
Muerte celular programada: Apoptosis.....	56
Familia de proteínas BCL-2	59

Proteína supresora de tumores: p53	62
Modulación de p53 en hipoxia	64
Proliferación celular y apoptosis en placenta	66
El rol de HIF en la proliferación y apoptosis placentaria	68
El rol de la leptina en la proliferación y apoptosis.....	69
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	72
OBJETIVOS.....	73
MATERIALES Y MÉTODOS	74
Modelos Experimentales.....	74
Líneas celulares.....	74
Explantos de placentas humanas a término	74
Cultivos celulares	75
Cultivo y mantenimiento de líneas celulares	75
Determinación del número de células.....	75
Congelamiento de células.....	76
Tratamiento de las células en cultivo.....	76
Tratamiento de explantos placentarios	77
METODOLOGÍA	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Ensayo de proliferación	78
Ensayo de viabilidad por colorimetría de MTT.....	78
Preparación de extractos de proteínas y acondicionamiento de muestras para SDS-PAGE.	79
Determinación de la concentración de proteínas.....	79
Preparación de geles desnaturalizantes de proteínas	80
Western Blot	80
Determinación de los niveles de ARN_m.....	82

Extracción de ARN total	82
Retrotranscripción del ARN mensajero.....	82
PCR cuantitativa en tiempo real.....	82
Ensayo de fragmentación del ADN	84
Inmunofluorescencia Indirecta	84
Ensayo de migración celular	85
Análisis estadístico.....	86
RESULTADOS	87
Modelo de inducción de hipoxia química	87
Estabilización de HIF-1 α luego del tratamiento con CoCl ₂ en células trofoblásticas.....	87
Estudio de marcadores apoptóticos luego de la estabilización de HIF-1 α en células trofoblásticas .	90
Rol de la leptina sobre la apoptosis de células trofoblásticas	94
Leptina disminuye la apoptosis de células trofoblásticas luego de la estabilización de HIF-1 α	94
Leptina disminuye el clivaje de Caspasa-3 luego de la estabilización de HIF-1 α	98
Leptina disminuye el clivaje de PARP-1 luego de la estabilización de HIF-1 α	104
Leptina modula el clivaje de PARP-1 a través de la señalización de HIF-1 α en condiciones de baja concentración de oxígeno (2%).....	109
Vías de señalización involucradas en la regulación de PARP-1 mediada por la leptina bajo condiciones de baja concentración de oxígeno (2%).	110
Rol de la leptina sobre la regulación de la expresión de Procaspasa-8 luego de la estabilización de HIF-1 α	111
Rol de la leptina sobre la regulación de la expresión del Citocromo C mediada por la leptina luego de la estabilización de HIF-1 α	115
Mecanismos de la leptina sobre la modulación de la apoptosis en células trofoblásticas	118
Rol de la leptina sobre la proliferación en células trofoblásticas.....	136
La estabilización de HIF-1 α atenúa la proliferación de células Swan-71.....	137
Leptina promueve la proliferación de células Swan-71 luego de la estabilización de HIF-1 α	140

Vías de señalización involucradas en la regulación de la proliferación mediada por la leptina luego de la estabilización de HIF-1 α	145
Rol del eje p53 en la supervivencia de células trofoblásticas mediada por la leptina.....	151
La estabilización de HIF-1 α aumenta la expresión de p53	151
Leptina disminuye la expresión de p53 luego de la estabilización de HIF-1 α	152
Leptina regula la expresión de Mdm-2 luego de la estabilización de HIF-1 α	159
Leptina regula la expresión de p53 bajo condiciones de baja concentración de oxígeno (2%).	163
Leptina regula la vía de p53 a través PI3K/Akt bajo condiciones de baja concentración de oxígeno (2%)	164
Leptina estimula la migración de células trofoblásticas.....	165
Regulación de HIF-1α mediado por leptina	169
Leptina modula la estabilidad de HIF-1 α	170
Efecto de la estabilización de HIF-1α sobre la expresión de leptina	172
HIF-1 α modula los niveles de leptina.....	172
<i>Discusión.....</i>	174
<i>CONCLUSIONES</i>	198
<i>BIBLIOGRAFÍA.....</i>	200

INTRODUCCIÓN

Implantación y placentación

Implantación del blastocisto

La implantación es un proceso crucial en el desarrollo temprano del embrión. Este evento altamente regulado implica la adhesión, la invasión y la interacción molecular entre el blastocisto y el revestimiento del útero, conocido como endometrio [1].

Durante la fase inicial de la implantación, el blastocisto, una estructura esférica compuesta por una capa de células externas llamadas trofoblasto y una masa celular interna, se adhiere a la pared del útero. Esta adhesión es mediada por moléculas de adhesión específicas en la superficie del trofoblasto y receptores correspondientes en las células del endometrio [2]. Una vez que se establece la adhesión, las células trofoblásticas comienzan a invadir el endometrio, creando así una conexión íntima entre el embrión y el tejido materno. Esta invasión es esencial para el suministro de nutrientes al embrión en desarrollo y para la formación de la placenta, que proporcionará soporte y protección al feto en crecimiento durante todo el embarazo.

Al mismo tiempo, el endometrio experimenta cambios importantes en respuesta a señales liberadas por el embrión, preparándose para el mantenimiento del embarazo. Estos cambios incluyen la proliferación y la diferenciación de las células del endometrio, así como la formación de estructuras especializadas, como las glándulas secretoras, que proporcionarán un ambiente favorable para el crecimiento y desarrollo del embrión.

Después de la fecundación, tienen lugar las divisiones de segmentación, las cuales se suceden de forma exponencial, generando 4, 8, 16 células hasta formar una agrupación de células del mismo tipo, conocida como mórula. Estas divisiones se producen en el cigoto a lo largo de la trompa uterina (**Figura I1**). Durante este proceso, los blastómeros permanecen protegidos dentro de la zona pelúcida [3].

Luego, se produce la primera etapa de diferenciación celular, dando origen al blastocisto. Esta estructura fundamental del blastocisto se compone de la masa celular interna y la capa circundante de células trofoblásticas. La masa celular interna dará lugar

principalmente a los tejidos internos del embrión, mientras que las células trofoblásticas posteriormente formarán la placenta [4].

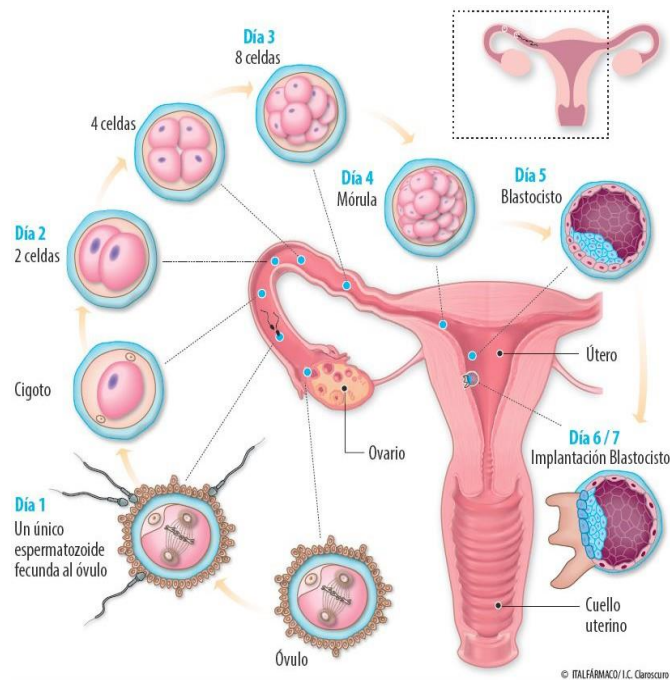


Figura 11: Etapas tempranas hasta la formación del blastocisto. Después de la fecundación en las trompas de Falopio, el cigoto experimenta diversas divisiones mitóticas hasta la formación de la mórula. A medida que avanza hacia el lumen uterino, se transforma en blastocisto.

Se requiere una estrecha comunicación entre el blastocisto y el útero para que se produzca la implantación. Este proceso implica una interacción entre las células del trofoblasto y el endometrio y solo puede ocurrir durante un período de tiempo limitado conocido como "ventana de receptividad" [5].

El endometrio sufre un proceso llamado decidualización 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].

La implantación puede dividirse en tres etapas distintas: aposición, adhesión y penetración (**Figura I2**). Durante la aposición, las células del trofoblasto se colocan cerca del epitelio luminal. Esta fase implica un reconocimiento inicial entre el embrión y el endometrio, facilitado por moléculas de adhesión en ambas superficies. A esta etapa le sigue la adhesión, en la que se forma una unión lo suficientemente fuerte entre el trofoblasto y el epitelio luminal. Finalmente, la etapa de penetración implica la invasión del trofoblasto en el epitelio luminal [6] .

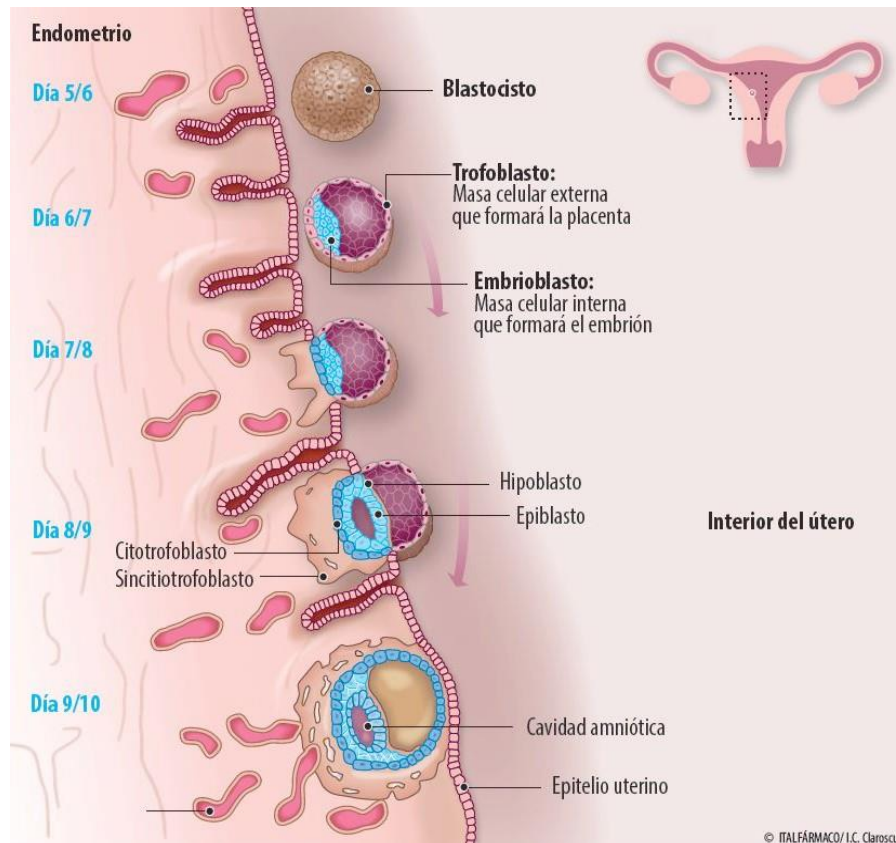


Figura I2: Estadios del proceso de implantación de un blastocisto humano. Representación esquemática de la interfase materno-fetal durante la implantación del blastocisto humano. Los blastocistos se orientan con el MCI hacia el epitelio uterino y la primera invasión del endometrio es realizada por los sincitiotrofoblastos temprano.

La diferenciación del trofoblasto es un proceso crucial en el desarrollo temprano del embarazo, durante el cual las células del trofoblasto (la capa externa del blastocisto) se especializan para formar estructuras esenciales que facilitan la implantación del embrión en el endometrio y el establecimiento de la placenta. Este proceso de diferenciación depende de una variedad de factores autocrinos y paracrinos que, a través de mecanismos específicos y finamente regulados, estimulan la expresión de numerosos genes e incrementan la producción de hormonas y factores de crecimiento.

Después de la implantación, las células madre del trofoectodermo generan los primeros linajes del trofoblasto: los citotrofoblastos (CTB) mononucleares tempranos y el sincitiotrofoblasto (STB) primitivo multinucleado. El sincitiotrofoblasto primitivo representa el primer tipo de célula placentaria invasiva que se expande en la decidua materna [7]. La diferenciación de los CTB a través de las vías vellosa y extravellosa permitirá el desarrollo y la morfogénesis de las vellosidades libres y de anclaje, hasta alcanzar la estructura observada en la placenta madura. Los citotrofoblastos que se diferencian a través de la vía vellosa se denominan citotrofoblastos vellosos (CTBv), y los que lo hacen por la vía extravellosa, citotrofoblastos extravellosos (CTBev) (**Figura 13**). Anormalidades durante la diferenciación trofoblástica a lo largo de las vías vellosa o extravellosa pueden originar diversas patologías y complicaciones del embarazo, incluyendo preeclampsia (PE), restricción del crecimiento intrauterino (IUGR), placentas cretas y enfermedades trofoblásticas gestacionales (GTD).

La implantación del blastocisto implica un proceso de tres pasos: (1) identificación de un endometrio receptivo; (2) la superposición de una firma molecular originada en el blastocisto sobre el endometrio receptivo antes de la implantación; y finalmente (3) la invasión del blastocisto, que culmina en la decidualización y la placentación [8].

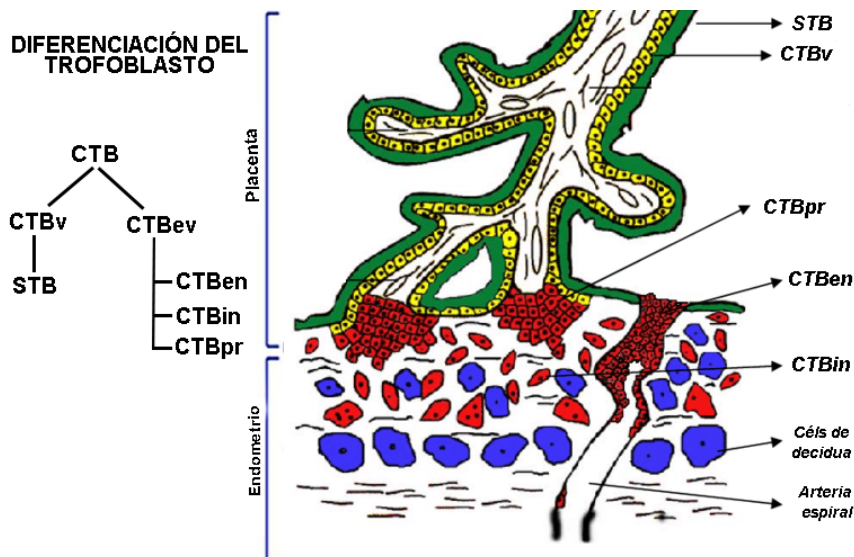


Figura I3: Esquema de la diferenciación del trofoblasto humano. Los citotrofoblastos vellosos (CTBv) mediante el proceso de fusión celular originan el sincitiotrofoblasto (STB). Los citotrofoblastos extravellosos (CTBev) progenitores altamente proliferativos (CTBpr), migran hacia la decidua y adoptan un fenotipo invasivo (CTBin, citotrofoblastos intersticiales) o endovascular (CTBen, citotrofoblastos endovasculares). Modificado de [9].

El citotrofoblasto extravelloso que migra hacia las arterias espirales, desplaza y reemplaza el revestimiento endotelial de las arterias, creando vasos de baja resistencia y alta capacidad. Estos vasos proporcionan un flujo sanguíneo adecuado para la placenta durante todo el embarazo. La diferenciación del trofoblasto en estas dos líneas celulares mayores continúa durante todo el embarazo. El STB 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 [10].

Migración, invasión trofoblástica y remodelación de las arterias espirales uterinas

La migración trofoblástica es un proceso fundamental durante la implantación y la placentación en el embarazo humano. Este evento es crucial para establecer una conexión adecuada entre el embrión en desarrollo y el útero, lo que facilita el intercambio de nutrientes, oxígeno y desechos entre la madre y el feto. Además, este proceso está finamente regulado por una variedad de factores, incluidas las señales hormonales y las interacciones con el entorno uterino [11].

La diferenciación del citotrofoblasto al citotrofoblasto extraveloso implica una serie de cambios a nivel molecular, que incluyen modificaciones en las integrinas y metaloproteinasas (MMPs), alteraciones en la expresión de cadherinas, modificaciones en la vía de señalización de Wnt y la adquisición de marcadores mesenquimales. Se ha propuesto que este proceso de diferenciación implica una transición pseudoepitelio-mesenquimal (TEM, por sus siglas en inglés). Durante esta transición, los trofoblastos pierden su fenotipo epitelial caracterizado por la adhesión a través de uniones estrechas y adoptan un fenotipo mesenquimal más invasivo [12].

Durante la gestación, es crucial que las arterias espirales uterinas sean remodeladas adecuadamente para asegurar un embarazo exitoso. En condiciones normales, los CTBev penetran e invaden la capa media de las arterias espirales. Como parte de este proceso, el tejido elástico y la matriz extracelular adicional son degradados enzimáticamente y reemplazados por material fibrinoide [13].

La remodelación de las arterias uterinas implica una serie de cambios específicos que incluyen: i) el reemplazo del endotelio y la capa media de músculo liso por los trofoblastos invasivos, ii) la pérdida de elasticidad, iii) el aumento del diámetro y iv) la pérdida del control vasomotor materno [14]. De esta manera se reduce la resistencia al flujo sanguíneo y aumenta la perfusión útero-placentaria (**Figura I4**). Sin embargo, en embarazos atípicos, como en la condición de preeclampsia temprana, aunque los citotrofoblastos pueden invadir el área dentro y alrededor de las arterias espirales, las arterias no experimentan una remodelación completa. Esto significa que el flujo sanguíneo desde la madre hacia la placenta no se optimiza, lo que puede afectar la función placentaria adecuada [15]

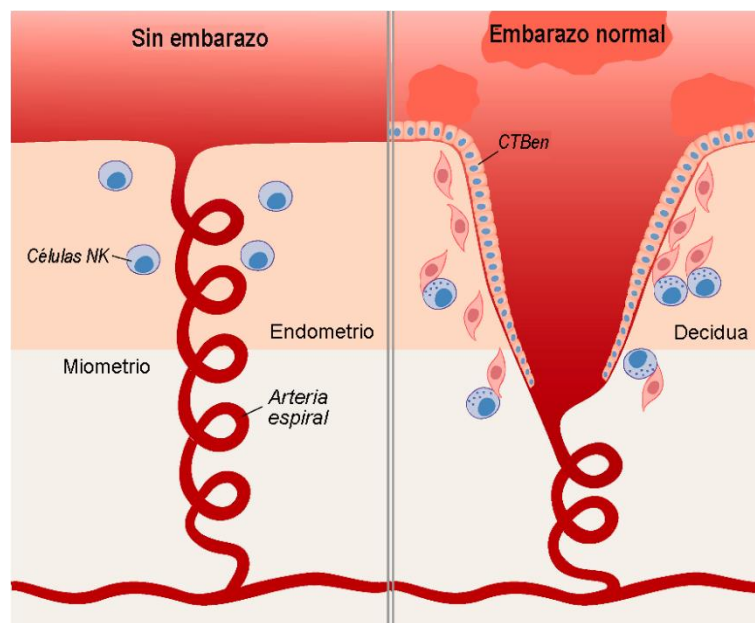


Figura 14: Ilustración de la remodelación de las arterias espirales uterinas en un embarazo normal en contraposición a un útero sin embarazo. Adaptado de [16].

Los trofoblastos endovasculares (CTBen) adoptan un fenotipo similar al de las células endoteliales y obstruyen la luz de las arterias espirales, en un proceso conocido como invasión endovascular [17]. Además, crea un ambiente con bajo oxígeno en el tejido placentario, lo que favorece la proliferación celular durante las primeras etapas del embarazo [18]. Aproximadamente a las 12 semanas de gestación, los tapones luminales en las arterias espirales comienzan a disolverse, aumentando así la disponibilidad de oxígeno en el tejido placentario [19]. Este periodo de invasión profunda y su subsecuente progresión lateral para incluir arterias espirales adicionales, puede finalmente determinar el funcionamiento óptimo de la placenta [20].

Placentación

La placentación es un proceso vital que sucede tras la implantación y es fundamental para el desarrollo del órgano de nutrición fetal, la placenta. Este órgano se compone de dos partes: una fetal que se adhiere al corion y otra parte materna que se integra con la mucosa uterina [21].

Las demandas metabólicas del feto aumentan durante el embarazo, y la placenta se adapta a estas necesidades mediante el desarrollo y la adaptación de la vasculatura de las vellosidades coriónicas, asegurando así un crecimiento fetal sostenido [22]. Las

vellosidades coriónicas son la unidad estructural y funcional de la placenta [23]. La formación apropiada de estas vellosidades, en conjunto con la presencia del STB y la vasculatura, desempeña un papel crucial en las funciones placentarias, que incluyen la producción hormonal y la regulación del crecimiento fetal. La circulación eficiente entre la madre y el feto en la placenta es fundamental para un intercambio adecuado de oxígeno y nutrientes, así como para la eliminación de los desechos metabólicos del feto [24].

Alrededor del día 10 después de la concepción comienza el desarrollo y la morfogénesis de las vellosidades placentarias [25]. Las células citotrofoblásticas comienzan a extender proyecciones, dando lugar a las estructuras conocidas como 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 que se forman las vellosidades primarias, estas se expanden y dan origen a las vellosidades secundarias. En su interior, las vellosidades secundarias presentan una zona central mesenquimal, rodeadas por una capa de células citotrofoblásticas, mientras que en el exterior se encuentra el STB [26].

Al concluir la tercera semana de gestación, surgen las vellosidades terciarias, que constituyen una expansión adicional de las vellosidades secundarias. Estas vellosidades terciarias están atravesadas por vasos sanguíneos fetales [26] (**Figura I5**).

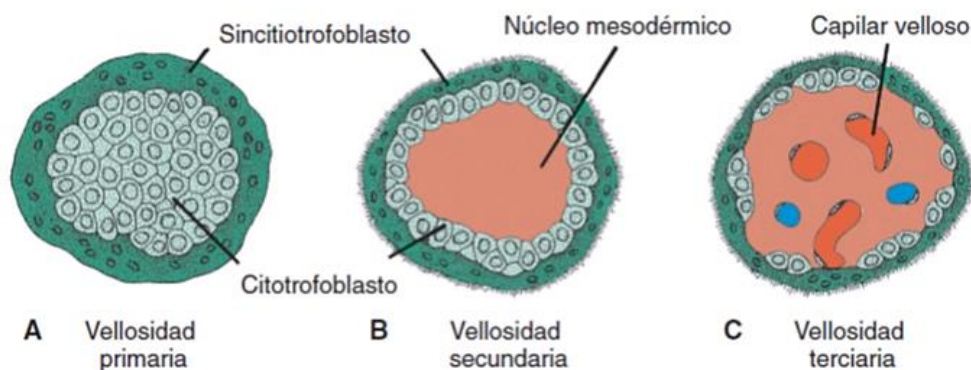


Figura I5: Esquema de las vellosidades coriónicas. Las vellosidades coriónicas constituyen la unidad funcional de la placenta y pueden encontrarse en tres estadios distintos: primarias (A); secundarias (B), que presentan mesénquima, y terciarias (C), que atraviesan los vasos maternos. Adaptado de [27].

Las vellosidades pueden ser clasificadas por su relación en vellosidades flotantes, por encontrarse libremente en el espacio intervelloso, y vellosidades de anclaje, cuya función es estabilizar la integridad anatómica de la interfase materno-placentaria (**Figura 16**). La relación vellosidad flotante/vellosidad de anclaje incrementa según progresa la gestación, particularmente en el segundo y tercer trimestre [26].

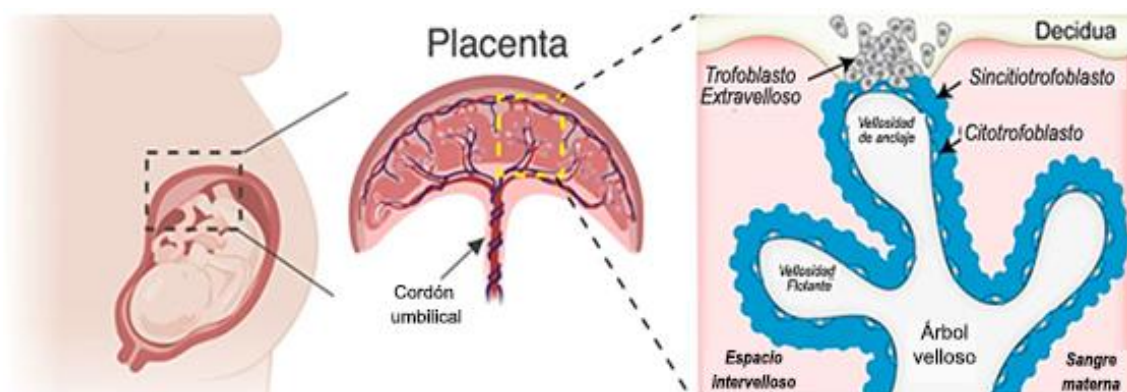


Figura 16: Estructura placentaria humana. Un árbol de vellosidades ampliado muestra vellosidades flotantes y de anclaje. Las vellosidades coriónicas están revestidas por sincitiotrofoblastos y una capa interna de citotrofoblastos (que se vuelven más discontinuos durante el embarazo) que se fusionan para reponer la capa sincitial externa. Los trofoblastos extravelosos invasivos se extienden desde el árbol vellositario hasta la decidua materna y anclan la placenta a la pared uterina y remodelan la microvasculatura materna. Adaptado de [25].

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 intravellosos. Los tabiques formados principalmente por tejido materno, subdividen el espacio intravelloso en compartimientos denominados “cotiledones” [3].

La Placenta humana

Estructura y función de la placenta humana

La placenta humana es de tipo hemocorial, ya que el corion penetra en el endometrio y está en contacto directo con los vasos sanguíneos maternos. 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 17**).

Desde el principio la placenta realiza todas las funciones necesarias para un organismo: nutrición, intercambio de gases, circulación, excreción y secreción de hormonas. 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 STB [3].

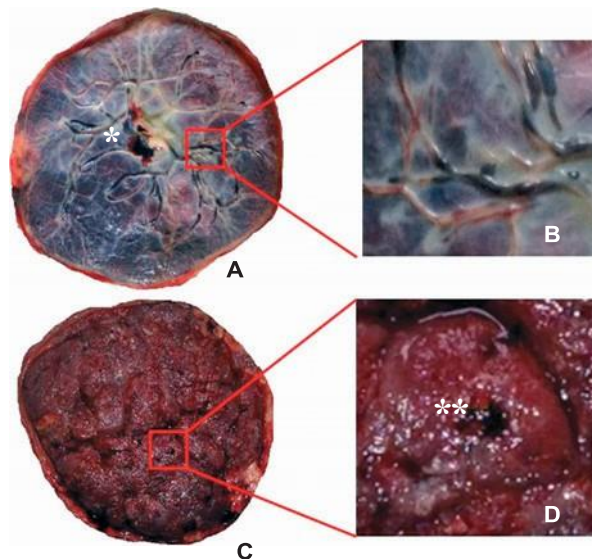


Figura 17: Placenta humana a término. Cara fetal: placa coriónica (inserción del cordón umbilical, asterisco). A. Vasos fetales en la placa coriónica. B. Cara materna: placa basal. C. Cotiledón (orificio de entrada de una arteria helicoidal, asteriscos) [28].

La placenta produce un gran número de hormonas (**Tabla 11**) y entre ellas se encuentran la gonadotrofina coriónica (hCG) que es producida tempranamente por el STB y su principal función es mantener el cuerpo lúteo funcional; la progesterona que es utilizada por el feto como sustrato para la síntesis de corticoides fetales y la lactógeno placentaria (hPL) que es producida por el STB y estimula el desarrollo de la glándula mamaria, así como el crecimiento de órganos fetales y de la placenta [29, 30].

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

Tabla 11: Principales hormonas placentarias. Adaptado de [31].

La placenta no solo produce hormonas, sino que también genera un ambiente tolerogénico para el feto frente a la respuesta inmune materna. En este sentido, el trofoblasto produce factores inmunosupresores e inmunomoduladores desde etapas tempranas. Sin embargo, la función de protección no se limita únicamente al sistema inmunitario, ya que la placenta también protege al feto de xenobióticos, infecciones y enfermedades maternas [29]. La acción de estas hormonas es fundamental para la correcta implantación y desarrollo de la interfaz materno-fetal, pero no son las únicas hormonas involucradas en el proceso de gestación.

En 1997, Masuzaki y colaboradores describieron a la leptina como una nueva hormona placentaria en humanos [32]. Se sugiere que esta hormona podría tener efectos sobre el crecimiento fetal, la angiogénesis y la inmunomodulación, afectando tanto las funciones maternas como fetales [33]. Sin embargo, muchos de los efectos fisiológicos y moleculares de la leptina durante el embarazo y su posible papel como hormona reguladora en el proceso de implantación no se comprenden totalmente.

Leptina como hormona placentaria

Caracterización de leptina y sus receptores

Características de la leptina

La leptina, el producto proteico del gen de la obesidad (Ob o Lep) es una hormona de 16 kDa cuyo principal sitio de síntesis es el tejido adiposo, aunque la expresión de la leptina es mucho más amplia (**Figura I8**).

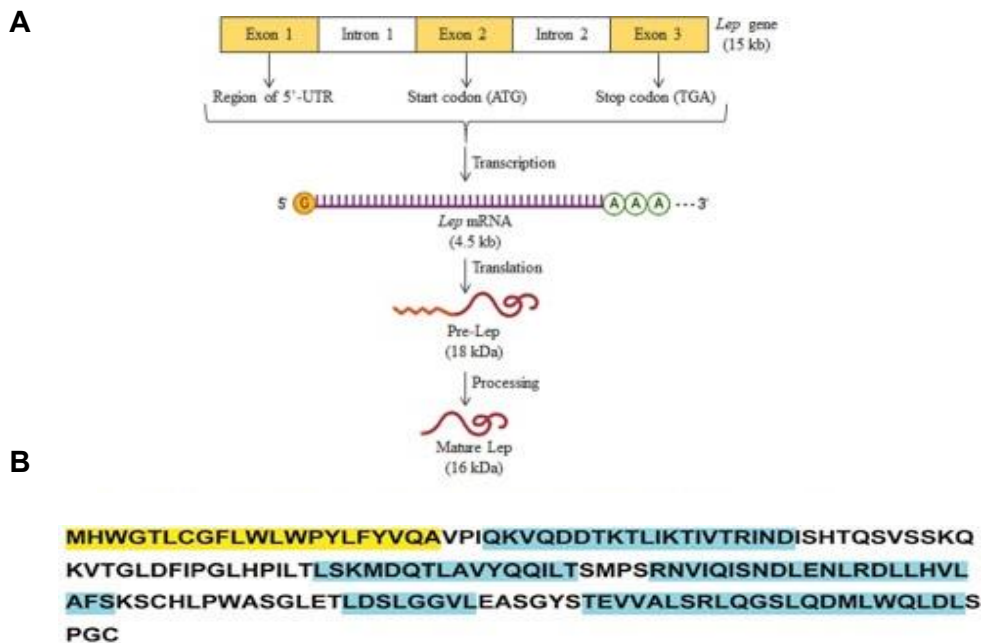


Figura I8: Representación esquemática de la transcripción y traducción de la leptina. (A)

El gen de la leptina (Lep) abarca 15 kb de ADN genómico. La transcripción de *Lep* da como resultado la síntesis de ARNm de 4,5 kb. Una pre-proteína de 18 kDa formada tras la traducción del ARNm de *Lep* se procesa para formar un producto secretor final de 16 kDa. **(B)** 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 [34].

Su estructura terciaria se asemeja a la de citoquinas de cadena larga y helicoidal, como el factor inhibidor de la leucemia y la interleuquina 6 (IL6) [34] (**Figura I9**). 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 [35].

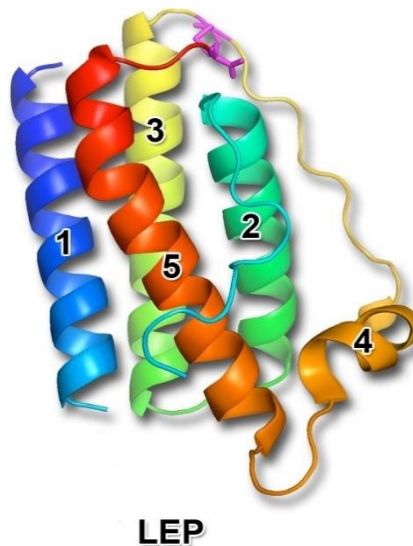


Figura 19: Modelo tridimensional de la leptina, presenta cuatro alfa hélices antiparalelas y un puente disulfuro entre las cisteínas 96 y 146 (marcado en rosa) necesario para su actividad biológica.

Las distintas regiones estructurales de la leptina tienen diferentes funciones. La región comprendida entre los aminoácidos 22 al 115, es esencial para su actividad biológica y su unión al receptor [36]. 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 [37].

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 [38].

En humanos, la mayoría de la leptina circula unida a macromoléculas séricas, que pueden modular la bioactividad y la biodisponibilidad del ligando en los tejidos blanco [39], normalmente se une a la isoforma soluble del receptor [40].

Los niveles de leptina aumentan durante la noche, los niveles circulantes diurnos son opuesto a los reportados del cortisol en humanos [41]. 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 [41].

Además del papel canónico en la alimentación, se la considera una hormona multifuncional en los humanos, donde la expresión del gen de leptina se ha detectado en tejido adiposo, mucosa gástrica, células del epitelio mamario, testículo, ovario y en la placenta [42]. La leptina ejerce efectos pleiotrópicos tales como la modulación de la termogénesis, la angiogénesis, la hematopoyesis, la ontogénesis, la condrogénesis, y regulación de las funciones neuroendócrinas, inmunes, como así también de la presión arterial [43, 44]. La leptina y sus receptores también han sido detectados en líneas celulares de coriocarcinoma humano como BeWo y JEG-3, 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 [45].

Los niveles circulantes de leptina experimentan un aumento durante el embarazo, alcanzando su punto máximo durante el segundo trimestre y al final del mismo. Sin embargo, es importante destacar que los niveles de leptina en el plasma materno regresan a los valores normales aproximadamente 24 horas después del parto [46]. Aunque sería lógico suponer que el aumento de la adiposidad durante el embarazo, como ocurre en la obesidad, contribuye a la hiperleptinemia durante esta etapa, los niveles elevados de leptina no pueden explicarse únicamente por un aumento del índice de masa corporal. Las células trofoblásticas producen leptina localmente, lo que sugiere que la concentración efectiva de esta hormona puede ser aún mayor en la placenta [47].

Receptores de leptina

La naturaleza pleiotrópica de la leptina se sustenta en la distribución ubicua de sus receptores, conocidos como receptores de leptina (Lep-R u Ob-R) [37]. Estos receptores de membrana son similares a la familia de receptores de citoquinas de clase I, que incluye a los receptores de IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, LIF, hormona de crecimiento, prolactina y eritropoyetina [37].

Se han descrito seis isoformas generadas por splicing alternativo, denominadas: Lep-Ra, Lep-Rb, Lep-Rc, Lep-Rd y Lep-Rf, que tienen en común un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular variable, característico de cada una de las isoformas. Según el largo del dominio intracelular, las isoformas se pueden clasificar en tres clases: cortas, largas y secretada [48]. LepRa, LepRb, LepRc, LepRd y LepRf son las isoformas de membrana, mientras que Lep-Re es la isoforma soluble que carece de los dominios intracelular y transmembrana [49] (**Figura I10**).

Inicialmente, se creía que las acciones directas de la leptina estaban limitadas al sistema nervioso central. Sin embargo, la distribución casi universal de los receptores de leptina Lep-Ra y Lep-Rb refleja la variedad de efectos biológicos en los tejidos extraneurales, lo que evidencia la gran diversidad funcional de la leptina [50].

Las regiones que son idénticas en todas las isoformas de membrana del receptor incluyen el dominio de unión al ligando extracelular, el dominio transmembrana y los primeros 29 aminoácidos en el dominio citoplasmático [37]. Dado que los receptores de leptina no poseen actividad quinasa intrínseca, su asociación con otras moléculas de señalización es fundamental para activar los componentes río abajo de la vía de transducción de señales [51]. Cada subtipo de receptor comparte dos regiones de homología de unión a citoquinas (CHR1 y CHR2), donde CHR2 representa el principal sitio de unión para la leptina, un dominio similar a IgG y dos dominios de fibronectina tipo 3 (FN3) dentro de su C-terminal (**Figura I10**).

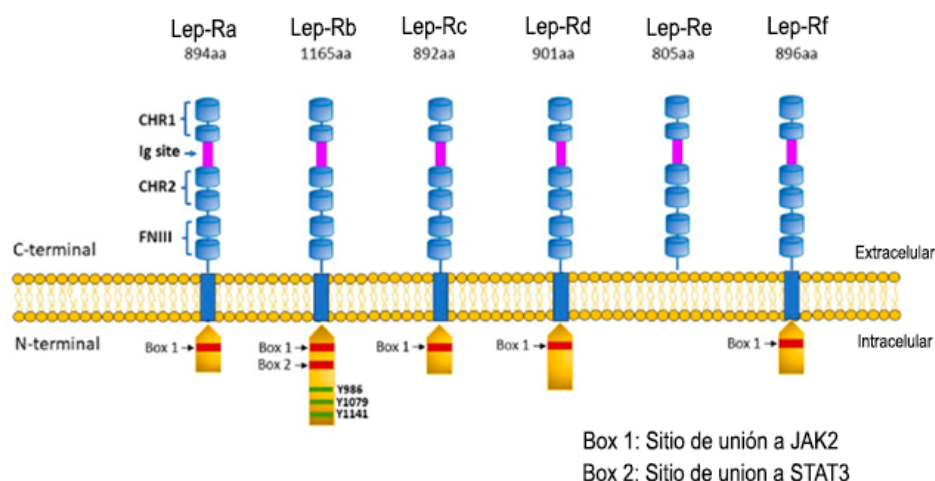


Figura I10: Subtipos de receptores de leptina. Se han identificado seis isoformas diferentes de Lep-R. Todas las isoformas tienen regiones transmembrana excepto el receptor Lep-Re, que funciona como un receptor de unión a leptina soluble no anclado a la membrana celular. El dominio N-terminal intracelular expresa un motivo Box-1, fundamental para la unión de JAK2. El receptor Lep-Rb es la única isoforma larga que también expresa un motivo Box-2 y contiene 3 residuos de tirosina (Y986, Y1076 y Y1141). Adaptado de [54].

Tal como se mencionó en el apartado anterior, se cree que el receptor soluble de leptina (Lep-Re) es la principal proteína sérica que interactúa con la leptina circulante, pudiendo de esta manera estabilizarla, secuestrarla o simplemente funcionar como un transportador [49, 55]. Se postula que esta isoforma podría mejorar la señalización de la leptina al reducir su degradación, aunque se sugiere que un exceso de Lep-Re puede disminuir la capacidad de unión de la leptina al receptor de membrana. La presencia de esta isoforma podría explicar la resistencia a la leptina durante el embarazo, donde concentraciones elevadas de leptina no provocan la señal de saciedad en la madre [56].

La leptina se une a su receptor en una relación estequiométrica 1:1 y, al formar homodímeros Lep-R, resulta en un complejo ligando-receptor tetramérico [57]. El cambio conformacional que se genera por la formación del complejo es crítico para la activación de la señalización por leptina [50].

Con respecto a su localización, la isoforma larga es la predominante en el hipotálamo y participa en los efectos neuroendocrinos y en la regulación de la homeostasis energética ejercidos por leptina [58]. Su expresión también se ha descrito en diversos órganos y tipos celulares, como pulmón, riñón, adipocitos, células endoteliales, células sanguíneas mononucleares, estómago, músculo, hígado e islotes pancreáticos [59-61].

La síntesis y secreción de leptina, así como la expresión de sus receptores funcionales en las células trofoblásticas, han sido ampliamente documentadas, lo que sugiere que la leptina puede ejercer su función a través de un mecanismo paracrino o autocrino. Se ha reportado que, durante el tercer trimestre del embarazo, los niveles de receptores de leptina muestran una marcada expresión [46].

En la placenta humana se han caracterizado las isoformas del receptor de leptina cortas y larga, así como el receptor soluble [62]. Más aún, la isoforma larga fue localizada en las células citotrofoblásticas, en el epitelio luminal y en células estromales de la decidua materna, así como también en oocitos humanos y en embriones aún no implantados [63]. Una vez unida a los receptores placentarios, la leptina desencadena efectos locales y periféricos, que contribuyen a la homeostasis placentaria [64].

Cascadas de señalización activadas por leptina

En los últimos años, el estudio de los eventos de señalización desencadenados por la unión de la leptina a sus receptores ha contribuido a una mejor comprensión de los mecanismos bioquímicos y moleculares subyacentes a la función de esta hormona. La similitud de los receptores de leptina con otros receptores de citoquinas llevó a identificar la vía JAK/STAT como una de las principales cascadas de señalización activadas por la leptina [65]. En la **Figura I11**, se muestran las principales vías de señalización activadas por el Lep-R.

La señalización JAK/STAT se compone de una familia de cuatro tirosinas quinasas (JAK) y siete factores de transcripción (STATs) que son regulados por fosforilación en residuos específicos de serina y tirosina [55, 66]. El dominio intracelular de todas las isoformas del Lep-R contiene el dominio de unión a JAK box-1, mientras que la isoforma larga, Lep-Rb, también incluye el dominio box-2 y los sitios de unión a STAT [67].

Tanto las isoformas del receptor largo como el corto tienen la capacidad de formar homodímeros en ausencia de un ligando, y el grado de esta asociación no cambia significativamente con la estimulación del ligando, lo que sugiere que la dimerización no juega un papel clave en la activación del receptor. Contrario a otros receptores de citoquinas de clase I, la leptina no sufre heterodimerización con receptores de citoquinas estructuralmente similares [51, 68]. Sin embargo, la formación de dímeros parece participar activamente en la señalización post-receptor [50]. Se ha observado que la formación de heterodímeros del receptor que contenían tanto Lep-Ra como Lep-Rb no lograron activar la vía JAK/STAT, mientras que los dímeros de Lep-Rb sí lo hicieron [69].

El siguiente paso crucial implica la transfosforilación y activación de las JAKs asociadas al receptor [70]. Una vez activadas, son capaces de fosforilar residuos de tirosina, creando sitios de unión para los dominios homólogos a Src2 (SH2), así como para la proteína adaptadora Shc. El dominio intracelular fosforilado proporciona un sitio de unión para las proteínas STAT, que se activan, se translocan al núcleo y estimulan la transcripción de genes blanco [37].

La fosforilación de la tirosina 1138 del Rb-e principalmente asocia a STAT3 (el principal mediador de las funciones neurondocrinas de leptina), que después de la fosforilación dependiente de JAK2, se transloca al núcleo para regular la expresión génica específica [66, 71]. Se ha informado que, la leptina es capaz de estimular la señalización JAK2/STAT3, lo cual se ha correlacionado con la invasividad del trofoblasto [72]. Finalmente, la fosforilación de Tyr1077, el principal sitio de fosforilación mediador de los efectos de la leptina en la reproducción, promueve el reclutamiento y la activación transcripcional de STAT5 y es esencial para la función reproductiva femenina continua y adecuada [73]. A su vez, la Tyr985 fosforilado también recluta a SOCS3, un regulador negativo de la acción de la leptina. Se presume que el mecanismo de retroalimentación negativa de la señalización de leptina mediado por cambios en SOCS3, sea la base del desarrollo de resistencia a la leptina en relación con la hiperleptinemia observada en el contexto de la mayoría de los casos de obesidad [74].

Señalización de MAPK

Como se mencionó anteriormente, la activación de JAK2 estimula la fosforilación de múltiples residuos en el dominio intracelular de la isoforma total del receptor de leptina, incluyendo tirosina 985, tirosina 1138 y tirosina 1077. Cada uno de estos residuos fosforilados recluta un conjunto distinto de moléculas de señalización posteriores. La fosforilación de Tyr985 recluta la tirosina fosfatasa 2 (SHP2), que inicia la cascada de quinasa regulada por señales extracelulares mitogénicas (MAPK) [71, 73].

Cada subfamilia de MAPK está compuesta por un módulo de señalización de tres quinasas evolutivamente conservadas que se activan de forma secuencial. Así, la MAPK quinasa quinasa (MAPKKK o MEKK) activa a la MAPK quinasa (MAPKK o MEK), que a su vez activa a la MAPK por fosforilación. Las MAPKKK son proteínas a menudo activadas por fosforilación o por interacción directa con proteínas de unión a guanósín trifosfato (GTP), como la familia Ras/Rho, en respuesta a estímulos extracelulares. Mediante fosforilación dual en residuos treonina y tirosina, las MAPK son activadas. Una vez activas, fosforilan a sus sustratos en residuos serina o treonina [75].

La activación de las isoformas Lep-Ra o Lep-Rb pueden estimular la vía de señalización Ras-MAPK en varios tipos celulares [74, 76-79]. Se ha descrito la activación la vía de MAPK/ERK 1,2 en distintos contextos, tales como, células de linaje osteoblástico, monocitos o tejido adiposo [74, 80]. En las células del músculo liso

vascular, la leptina induce hipertrofia a través de p38 MAPK, lo que indica el papel potencial relevante de esta hormona en la fisiología cardiovascular y un impacto en la remodelación de vasos sanguíneos [81].

Se ha reportado que la vía de ERK1/2 se encuentra activa en citotrofoblastos de primer trimestre [82] y que promueve la diferenciación trofoblástica en placenta humana [83]. De esta manera, las MAPK regulan procesos como mitosis, cambios en los patrones de expresión génica, metabolismo y muerte celular programada, permitiendo a las células sobrevivir, proliferar, inducir apoptosis e interactuar con múltiples tipos celulares.

Señalización de PI3K/Akt

El último grupo de proteínas involucradas en señalización mediada por JAK2 activado en la porción intracelular del receptor de leptina, incluye a las IRS (Sustratos del Receptor de Insulina), pertenecientes al grupo de proteínas de anclaje. Aunque las IRS no tienen actividad enzimática, pueden ser fosforiladas en múltiples residuos de tirosina. Las proteínas IRS ejercen la activación de PI3K (fosfatidilinositol 3 quinasa) mediante asociación con su subunidad reguladora, p85, y aumentando la actividad del dominio catalítico. La estimulación de PI3K conduce a la activación de serina/treonina quinasas, como PDK1 (quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1), que es capaz de activar Akt, otra serina/treonina quinasa que representa un paso clave en la posterior señalización río abajo [84].

La vía de PI3K también es activada por el receptor de leptina en células placentarias [85] y controla funciones celulares tales como crecimiento, supervivencia y regulación de la diferenciación invasiva del trofoblasto humano, siendo la activación alterada de esta vía asociada a procesos tumorales. La proteína Akt fosforila a proteínas involucradas en la supervivencia celular como lo son MDM-2, p53, BAD, mTOR y p27 [86].

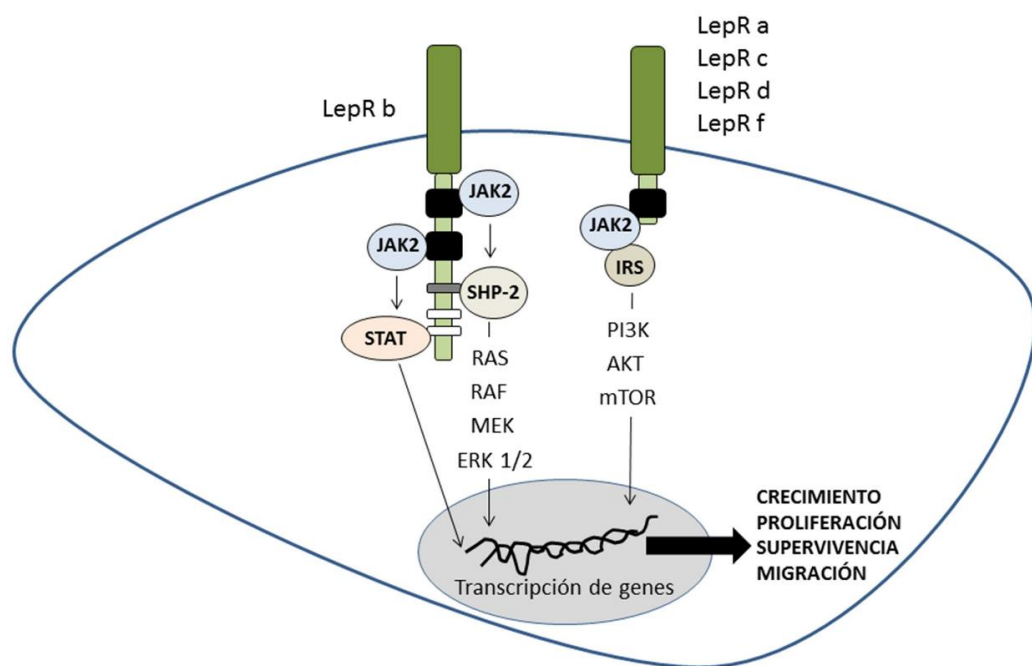


Figura I11: Cascadas de señalización activadas por leptina. La unión de leptina a sus receptores puede desencadenar la activación de las vías de JAK2/STAT, MAPK o PI3K/Akt. Se muestra en la figura los intermediarios y acciones principales de las cascadas de señalización de MAPK (ERK1/2) y PI3k/Akt.

Funciones de leptina

Se han descrito numerosas funciones biológicas de la leptina (**Figura I12**). La función clásica de la leptina se asocia a la inhibición del apetito para modular la saciedad y la homeostasis energética. Sin embargo, es bien sabido que la leptina se produce y ejerce distintas funciones en muchos tejidos y sus niveles elevados están asociados con la llegada de la madurez reproductiva y la fertilidad [55].

La leptina desempeña un papel crucial en diversos procesos fisiológicos tales como, la regulación de la homeostasis de la glucosa [87, 88], la inflamación [89, 90], la angiogénesis [91], la hematopoyesis, la función inmune [92] y especialmente la reproducción. Esta hormona pleiotrópica ejerce una influencia integral en la fisiología normal del sistema reproductivo, con interacciones complejas en todos los niveles del eje hipotalámico-pituitario-gonadal (HPG). Además, la placenta también produce leptina, desempeñando una función importante de manera autocrina o paracrina [71]. Más aún, distintos estudios han revelado que los estados de exceso, deficiencia o resistencia a la leptina pueden estar asociados con una función reproductiva patológica [71, 93, 94].

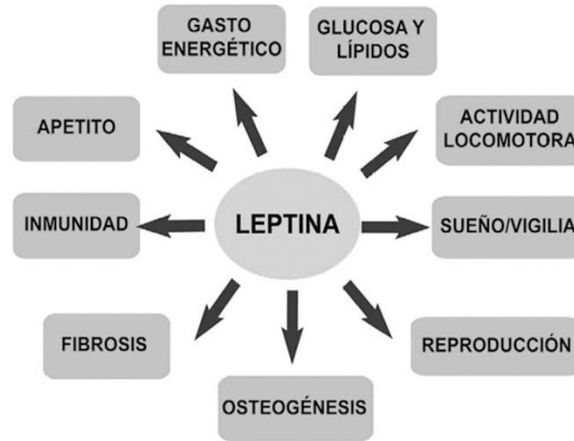


Figura I12: Funciones de leptina. Se han descrito numerosos efectos fisiológicos de la leptina, tanto en animales de experimentación como en humanos. Adaptado de [95].

Función clásica sobre la homeostasis energética

La leptina, una hormona mayormente liberada por las células adiposas, desempeña un papel crucial en la regulación del apetito y el gasto energético, influyendo así en el equilibrio energético del cuerpo. Es considerada una molécula señalizadora en el sistema nervioso central, especialmente en el hipotálamo, donde se ha localizado su receptor, para llevar a cabo la regulación del equilibrio energético, así como también actúa como sensor de las reservas [34, 96, 97]. Investigaciones han evidenciado que las lesiones tempranas en esta área del cerebro suelen resultar en obesidad severa [98].

En ratones, mutaciones en el gen de la leptina genera obesidad [99] y un efecto similar se observa en humanos deficientes de Lep-Rb [100]. Tanto en roedores como en humanos sus niveles plasmáticos están altamente correlacionados con el índice de masa corporal y la masa de tejido adiposo, asociado al efecto sensor de reservas y del balance energético [53].

En sujetos delgados con una masa de tejido adiposo relativamente pequeña, la mayoría de la leptina se encuentra en forma unida, mientras que la proporción de leptina libre aumenta en el suero de los pacientes obesos [39]. Se especula que la relación leptina libre/total no es constante, sino que, dependiendo del estado metabólico y nutricional, existe un equilibrio dinámico entre las proteínas fijadoras circulantes y la leptina libre. La leptina libre puede tener un recambio más rápido debido a la escisión proteolítica o al aumento de su eliminación [101].

Los receptores de leptina han sido identificados en el plexo coroides y en el hipotálamo, una región involucrada en la regulación del apetito, la ingesta y el peso corporal. La leptina interactuaría en el encéfalo con la mayoría de los neuropéptidos involucrados en la regulación del balance energético y la ingesta [102], disminuye los niveles de péptidos orexígenos y aumenta los niveles de péptidos anorexígenos. A su vez, las neuronas que sintetizan hormona liberadora de corticotropina (CRH), hormona liberadora de tirotrófina (TRH) y oxitocina en el núcleo paraventricular, son controladas indirectamente por la leptina y median los efectos inhibidores de la leptina sobre la ingesta de comida, la termogénesis y la secreción neuroendocrina [103].

Función en la reproducción

La primera evidencia sobre la influencia de la leptina en la reproducción se originó en estudios con ratones que carecen de expresión de leptina, lo que resulta en obesidad e infertilidad. Además, muestran niveles muy bajos de hormonas sexuales, no ovulan y carecen de ciclos estrales, lo que los mantiene en un estado prepuberal indefinido [99, 104]. El tratamiento con leptina recombinante en hembras que carecen de la expresión de leptina restaura todos sus parámetros hormonales, así como sus ciclos estrales y la fertilidad [105]. Este hecho sugiere que la leptina sería necesaria para el normal funcionamiento reproductivo [93, 106]. De esta manera, la función de leptina de regulación de la reserva energética se ha extendido a la reproducción, al establecimiento de la pubertad y a la gestación (**Tabla I2**) [107, 108].

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

Tabla 12: Efectos de leptina en la reproducción femenina. Modificado de [109].

La leptina regula el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal en diversos niveles al estimular la síntesis y liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), así como de las hormonas folículo-estimulante (FSH) y luteinizante (LH) [110]. En humanos, los niveles de leptina están correlacionados con los niveles de LH, FSH, estradiol (E2) y testosterona, lo que sugiere que la leptina podría desempeñar un papel permisivo en la iniciación de la pubertad [111].

La leptina no sólo participa en el control de la secreción de gonadotropinas a través de sus acciones hipotalámicas/hipofisarias, sino que la leptina circulante o producida localmente por las gónadas también puede proporcionar una modulación directa de la función ovárica y testicular.

Diversos estudios han demostrado que leptina es capaz de causar tanto efectos estimulatorios [112-114] como inhibitorios [115, 116] sobre las funciones del ovario. La leptina inhibe la producción de hormonas esteroideas en el ovario, tanto en roedores como en humanos [117, 118]. Se le atribuye también un rol importante a la leptina en el desarrollo del oocito, la ovulación y la expresión de VEGF en el ovario [119]. Se ha observado en roedores que la leptina modula el estado oxidativo del tejido ovárico y puede tener efectos tanto estimulantes como inhibidores en el proceso ovulatorio.

Se ha propuesto que, los efectos estimulantes están mediados por la activación de las vías de señalización STAT3 y ERK1/2. Específicamente, se ha encontrado que concentraciones bajas de leptina tienen un efecto protector, mientras que concentraciones elevadas de esta hormona parecen estar asociadas con la muerte celular [120, 121].

La leptina se expresa en el líquido folicular, en el cual desempeña un papel tanto en el desarrollo folicular, donde se ha detectado su transcripción en las etapas iniciales del folículo, como también en la función lútea posterior, donde se encuentra principalmente en los folículos maduros. Además, se han identificado receptores de leptina en las células granulosas, de la teca y las intersticiales del ovario humano [122]. En mujeres con síndrome de ovario poliquístico (SOP), se ha observado una correlación entre los niveles séricos de leptina y una reducción en la tasa de fertilización, implantación y embarazo después de ensayos de fertilización in vitro [123].

Función en el embarazo

Al igual que el tejido adiposo, la placenta es un potente órgano endocrino capaz de expresar y secretar leptina. De hecho, la leptina placentaria humana es idéntica a la derivada del tejido adiposo en términos de tamaño, carga e inmunorreactividad [124]. Durante el embarazo, se observa un aumento significativo en los niveles de leptina en suero en comparación con mujeres no embarazadas, especialmente durante el segundo y tercer trimestre.

Se ha informado que la leptina contribuye al adecuado desarrollo fetal y al funcionamiento óptimo de la placenta. En la placenta, la leptina regula diversos procesos, como el transporte de nutrientes, la angiogénesis, la proliferación de las células trofoblásticas y la modulación del sistema inmunológico [125, 126].

En humanos se reportó la expresión de leptina en blastocistos, en citotrofoblastos, en STBs, en cultivos primarios de células amnióticas, en endometrio y en células endoteliales de la vasculatura de las vellosidades coriónicas [127, 128].

Se ha observado que induce la producción de hCG en las células del trofoblasto y mejora la mitogénesis. Además, estimula la absorción de aminoácidos y aumenta la síntesis de proteínas en la matriz extracelular, incluyendo metaloproteinasas. Se ha sugerido que la leptina también puede tener un papel autocrino local como modulador inmunológico o antiinflamatorio en la placenta[129].

Las concentraciones de leptina en la sangre del cordón umbilical humano están relacionadas con el tamaño de la placenta [33]. Este hallazgo respalda el papel de la leptina en la regulación del crecimiento placentario, lo que podría contribuir a la hipertrofia placentaria en situaciones de sobreproducción de leptina. Además, la leptina podría influir en el crecimiento fetal.

La leptina producida por la placenta materna puede ser una respuesta al crecimiento fetal y estar vinculada a la entrega de nutrientes por parte de la placenta [127]. Las vellosidades placentarias del primer trimestre secretan niveles de leptina hasta 50 veces más altos que las vellosidades en el término del embarazo, y este proceso es potenciado por IL1A, 17 β -estradiol e IL6 [127, 128].

Función en la implantación

Como se mencionó anteriormente, la implantación del blastocisto es el paso más crítico del proceso reproductivo. Durante este proceso, el blastocisto se adhiere íntimamente a la superficie endometrial materna para iniciar la formación de la placenta [130]. En la secuencia compleja de eventos esenciales para el establecimiento de un embarazo exitoso, se ha sugerido que una amplia gama de mediadores moleculares participan en esta interacción temprana entre el feto y la madre, incluyendo hormonas, moléculas de adhesión, citoquinas, factores de crecimiento, lípidos y otros [131].

Se demostró que la secreción de leptina por parte de las células endometriales puede ser regulada positivamente por la presencia de blastocistos. Otros estudios han determinado que, en ratones, la expresión del receptor de leptina en las células endometriales está influenciada por el estado de preñez [128]. Además, se ha observado que la implantación se ve obstaculizada por la inyección intrauterina de un

anticuerpo o un péptido antagonista de la leptina, lo que sugiere que el endometrio también es un objetivo de la acción de la leptina [132].

Dado que tanto el endometrio secretor como el blastocisto expresan el receptor de leptina y la propia leptina, sugiere que esta hormona tiene un rol crucial en sobre el proceso implantatorio y desempeña una función crucial en el diálogo entre el blastocisto y el endometrio [133].

A su vez, se ha observado la expresión del receptor de leptina en la decidua materna, siendo susceptible a la acción de la leptina. Por lo tanto, se propone que la leptina desempeña un papel importante en la señalización de la implantación del embrión en mamíferos [134].

Experimentos in vitro con embriones murinos mostraron que el agregado de leptina promueve el desarrollo de blastocistos y que los mismos, independientemente de ser cocultivados o no con células endometriales, secretan leptina [71]. En la misma línea, se ha observado que pacientes con problemas de fertilidad exhiben una expresión reducida del receptor de leptina en el endometrio. Además, en mujeres que han experimentado abortos espontáneos recurrentes, los niveles séricos de leptina también son inferiores en comparación con aquellas que tienen embarazos normales [108, 132], lo que sustentaría un rol de leptina en la implantación embrionaria.

Reportes previos de nuestro laboratorio, han demostrado que la leptina regula positivamente la proliferación de células trofoblásticas derivadas de placentas humanas a término [45], así como también la síntesis de proteínas [85, 135]. Otra evidencia de la importancia de la leptina en la implantación es el hecho de que en estudios con explantos placentarios humanos mostraron que tanto leptina como su receptor se expresan en los citotrofoblastos extravelosos, donde leptina promueve la síntesis y secreción de MMP-2 y MMP-9, sugiriendo su implicancia en la invasión trofoblástica [136]. Se ha demostrado también, que la leptina es un regulador de la angiogénesis dado que promueve la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la de su receptor VEGF-R2 y la inducción de la neovascularización [126].

Los factores mencionados apoyan el concepto de la leptina como una citoquina placentaria que contribuye al ambiente favorable para la implantación del embrión [137].

Leptina en embarazos patológicos

La disregulación de la función autocrina y paracrina de la leptina en la interfase materno-fetal puede estar asociada al desarrollo de diversas patologías del embarazo [108]. Se ha encontrado que los niveles plasmáticos de leptina maternos y fetales están disregulados en la diabetes mellitus gestacional (DMG), preeclampsia (PE) y restricción del crecimiento intrauterino (RCIU); pudiendo significar un efecto o causa de las perturbaciones [138] (**Figura I13**).

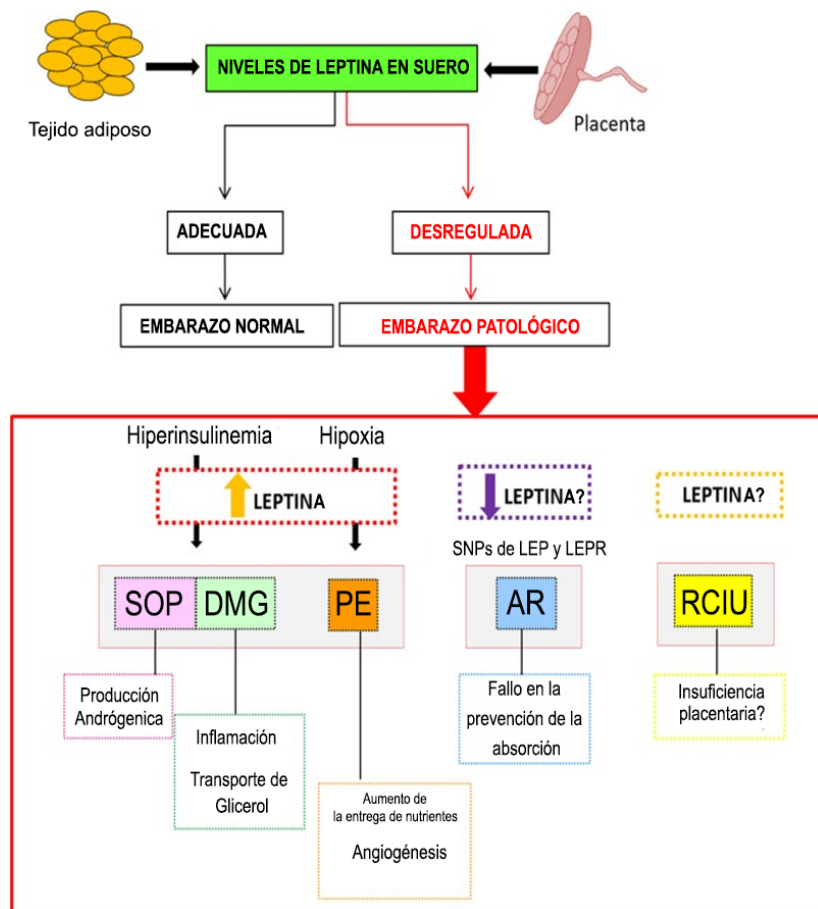


Figura I13: Trastornos del embarazo asociados a la leptina. La desregulación de los niveles de leptina se ha correlacionado con la patogénesis de diversos trastornos asociados con la reproducción y la gestación, incluido el síndrome de ovario poliquístico (SOP), el aborto espontáneo recurrente (AR), la diabetes mellitus gestacional (DMG), la preeclampsia (PE) y la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU). Adaptado de [139].

Leptina y diabetes gestacional

Durante el embarazo, se produce un estado de resistencia a la insulina, generado por la interacción de varios factores como la secreción de cortisol, hPL, estrógenos y progesterona. Cuando el funcionamiento de las células beta pancreáticas no es suficiente para contrarrestar este ambiente diabetogénico, se desencadena la diabetes gestacional (DMG) [140]. La diabetes mellitus gestacional es el trastorno metabólico más común durante el embarazo, está caracterizado por una intolerancia a la glucosa que se desarrolla típicamente en el segundo y tercer trimestre. Esto conduce a niveles elevados de glucosa en sangre, con distintos grados de gravedad [141].

Esta patología se relaciona con una elevada morbilidad y mortalidad perinatal. Además, se caracteriza por la resistencia a la insulina, la hiperinsulinemia y la hiperleptinemia. Estas condiciones asociadas a la DMG afectan el transporte de nutrientes a través de la placenta y el suministro de nutrientes al feto [142, 143].

Se ha reportado que la expresión de leptina en estos casos se encuentra considerablemente aumentada en placenta, de hecho, se propuso a la leptina como un predictor bioquímico de la DMG en el primer trimestre [144, 145]. Por otro lado, en este contexto, se ha observado que la expresión del receptor de leptina es similar a la de embarazos normales, sugiriendo que la DMG sólo se asocia con cambios en la expresión de leptina [146]. La comparación del perfil de expresión génica placentaria entre embarazos normales y diabéticos revela que el incremento en la síntesis de leptina en la DMG se asocia con una mayor producción de citoquinas proinflamatorias, como la IL-6 y el TNF α , lo cual conduce al desarrollo de un entorno inflamatorio crónico que promueve la producción de leptina [147].

Leptina y preeclampsia

La preeclampsia (PE) es una de las complicaciones gestacionales más comunes, con una prevalencia que oscila aproximadamente entre el 2% y el 15% de todos los embarazos. Se define como hipertensión gestacional que aparece después de las 20 semanas de embarazo, acompañada de proteinuria o edema generalizado y en algunos casos, de daño orgánico específico. Esta condición representa un riesgo potencialmente mortal tanto para la madre como para el feto, aumentando la tasa de mortalidad y morbilidad [148].

Los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la preeclampsia siguen en gran medida sin explicación, y se supone que es un proceso de dos etapas de alteración de la perfusión útero-placentaria con o sin invasión trofoblástica defectuosa previa (etapa 1), seguida de disfunción endotelial general e inflamación vascular que conducen a la preeclampsia sistémica y daños orgánicos (etapa 2) [148].

Durante el embarazo normal se produce una transformación fisiológica del segmento miometrial de la arteria espiral. Las células del trofoblasto se extienden tanto al segmento decidual como a un tercio del segmento miometrial de la arteria espiral.

En los embarazos afectados por preeclampsia, una característica clave asociada con el fracaso de la transformación fisiológica de las arterias espirales, es la falta de invasión de los trofoblastos en el segmento miometrial de la arteria espiral. La resultante falta de transformación de los vasos sanguíneos da como resultado arterias espirales estrechas, un patrón alterado de flujo sanguíneo y una perfusión útero-placentaria reducida, generando un aumento del estrés oxidativo, hipoxia placentaria, causando disfunción endotelial [16, 149]. Investigaciones recientes han demostrado que la perturbación en la circulación de factores antiangiogénicos contribuye al desarrollo de la preeclampsia [150]. **(Figura I14).**

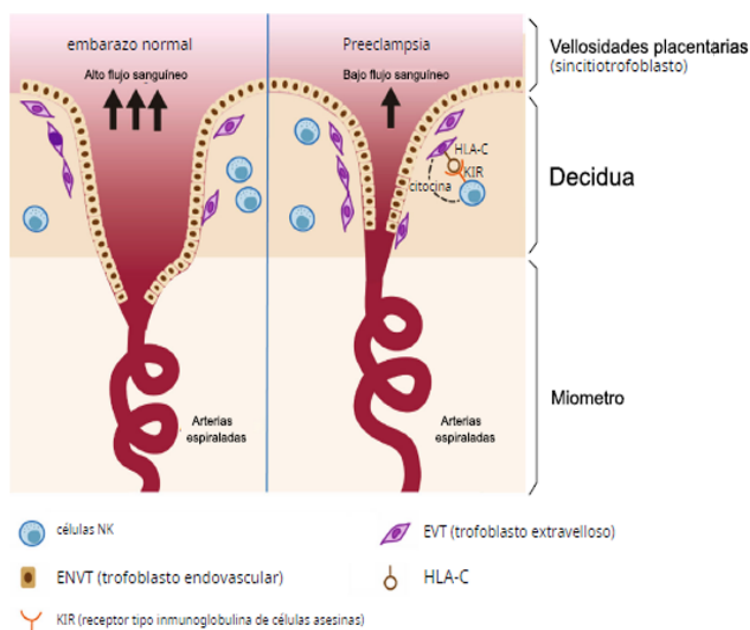


Figura I14: Esquema de la remodelación de las arterias espirales uterinas en un embarazo normal en contraposición a un embarazo con preeclampsia. Adaptado de [16].

En varios casos de preeclampsia de aparición tardía, que culminan en nacimientos a término, los recién nacidos no presentan restricciones en el crecimiento, lo cual es incompatible con una mala placentación, en contraposición al modelo original de preeclampsia en dos etapas [151]. Por lo tanto, el modelo original de dos etapas era aplicable principalmente a la preeclampsia de aparición temprana.

En 2014, Redman et al. sugirieron una nueva etiología de la preeclampsia relacionada con una segunda fase placentaria [152]. Este modelo comprende una mala perfusión útero-placentaria a término, sin mala placentación, que ocurre cuando la placenta excede la capacidad uterina, provocando la compresión de las vellosidades terminales y, consecuentemente, impidiendo la perfusión intervillosa. Esto causa hipoxia y estrés del STB de la misma manera que la perfusión disfuncional asociada con la enfermedad de aparición temprana. Así, estas dos vías tienen procesos y causas diferentes, pero desencadenan respuestas maternas similares, ambas mediadas por el estrés del STB. La mala placentación se considera una "causa extrínseca" de disfunción placentaria. Se sugiere que la Etapa 1 (disfunción placentaria), previamente presentada como un evento temprano en el embarazo, también puede ocurrir tardíamente debido a una causa diferente [153].

Se cree que los trastornos metabólicos y los mecanismos compensatorios homeostáticos insuficientes que involucran a la leptina durante el embarazo desempeñan un papel decisivo en el desarrollo de la PE y dan lugar al crecimiento intrauterino comprometido y bajo peso al nacer [139, 154].

En mujeres con PE los niveles de leptina placentaria son 8 veces mayores [155] en comparación con el control normotensa, así como también la expresión del ARNm de leptina [156, 157] y de la forma soluble de su receptor en placenta [126]; indicando que la alteración en los niveles de leptina y de sus receptores podría alterar la angiogénesis y los eventos de remodelación aportando a la disfunción endotelial.

Estudios en células BeWo mostraron que en condiciones de hipoxia la expresión de leptina es significativamente mayor que en células cultivadas a presiones normales de oxígeno, sugiriendo que el aumento en la expresión de leptina observado en pacientes con PE podría ser resultado de la deficiente circulación útero-placentaria [158].

La regulación positiva de la leptina podría asociarse al estrés placentario, principalmente debido a la hipoxia presente en la placenta preeclámpsica. Además, los niveles séricos de leptina parecen estar elevados en la preeclampsia incluso antes del inicio clínico de la enfermedad, lo que sugiere un posible valor pronóstico [159].

Además, se ha observado que la leptina inhibe el aumento de la apoptosis de las células placentarias durante la preeclampsia [147]. Dado que la leptina es un potente factor angiogénico, su aumento en la placenta podría promover el suministro de sangre mediante neovascularización. También se ha demostrado que la leptina participa en la regulación de los transportadores de nutrientes placentarios, lo que sugiere que la hiperleptinemia en la preeclampsia podría ser una respuesta compensatoria para estimular la entrega de nutrientes a una placenta insuficientemente perfundida [147].

Los mecanismos que involucran a la leptina en la fisiopatología de la PE siguen siendo difíciles de estudiar y existe incertidumbre sobre si la leptina representa las complicaciones de la PE establecida o si la desregulación de la leptina es un catalizador para la aparición de la enfermedad. De todos modos, existen múltiples etapas potenciales en el embarazo en las que los niveles desregulados de leptina pueden afectar el crecimiento fetal [160].

En consecuencia, varios estudios recientes, han buscado nuevos biomarcadores moleculares de la PE, lo que podría mejorar los resultados de los pacientes con PE en la clínica. Estudios del transcriptoma de la base de datos GEO o utilizando la herramienta de software, DESeq2 identifican entre otros al gen de leptina como un nuevo biomarcador de diagnóstico de la PE [161, 162].

Leptina y RCIU

La mala remodelación arterial genera incapacidad para suministrar adecuadamente nutrientes al feto se conoce como insuficiencia placentaria, y puede dar lugar a la restricción del crecimiento intrauterino, que afecta entre el 5% y el 10% de los embarazos en países desarrollados [163]. La RCIU se caracteriza por una disminución en la velocidad de crecimiento fetal, generalmente asociada a una mala nutrición del feto, bajo peso al nacer y está asociada con una alta incidencia de morbilidad y mortalidad perinatal, así como un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas en la edad adulta [164, 165]. Esta patología puede ser causada por factores nutricionales, genéticos o relacionados con la circulación en la placenta [166].

Se ha sugerido que una deficiencia en la producción de leptina podría estar implicada en la RCIU, aunque los resultados obtenidos son inconsistentes. Algunos estudios han mostrado que niveles más altos de leptina en la madre, el feto y el cordón umbilical se asocian con RCIU, mientras que los niveles de leptina en la placenta no se ven afectados [157]. Otros autores han afirmado que no hay diferencias en los niveles de leptina encontrados en el cordón umbilical de embarazos complicados con RCIU en comparación con embarazos normales [165]. Sin embargo, un estudio encontró que los niveles séricos de leptina en la madre no difieren, pero los niveles de ARNm y proteínas de leptina están aumentados en las placentas de embarazos con RCIU, lo que sugiere que la leptina podría ser un posible marcador de insuficiencia placentaria [167].

Dado el rol de la leptina sobre el diálogo materno-fetal, es importante realizar estudios que nos permitan dilucidar la asociación de la leptina con el embarazo patológico y más aún poder establecer a la leptina como un biomarcador de patologías asociadas con el embarazo.

Factor Inducible por Hipoxia-1 (HIF-1)

Características generales y regulación de HIF-1 α

La hipoxia se define como una reducción o deficiencia de oxígeno en los órganos, tejidos o células. Esta disminución en la tensión de oxígeno puede ser resultado de un suministro insuficiente o un aumento en el consumo de oxígeno. El estado de hipoxia puede ser causado por condiciones fisiológicas normales o por situaciones patológicas. Cada tejido o célula responde de manera única a esta condición, adaptándose de acuerdo a sus propias características y necesidades [168].

Todos los organismos poseen la capacidad de detectar y responder a condiciones de baja disponibilidad de oxígeno. Como cualquier estímulo fisiológico, la respuesta ante la hipoxia puede distinguirse en aguda y crónica [169].

En particular, el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF) desempeña un papel central en la adaptación celular a la hipoxia. La activación del factor de transcripción HIF-1 α es la vía más estudiada frente a la adaptación de las células en condición de hipoxia [170].

Se ha evidenciado que tanto HIF-1 como su secuencia de reconocimiento en el ADN (HRE) son componentes comunes en una respuesta celular a hipoxia en mamíferos [171]. La estabilización de HIF-1 es un marcador de hipoxia, que se la utiliza para la detección en esta condición [168].

HIF-1 es un heterodímero que consta de una subunidad alfa (HIF-1 α) de 120 kDa y una subunidad beta (HIF-1 β) de 91-94 kDa [172]. La subunidad beta, también conocida como ARNT (Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) se expresa de manera constitutiva [173, 174]. Se han identificado tres isoformas de la subunidad α del factor de transcripción HIF: 1 α , -2 α y -3 α . HIF-1 α es el mejor caracterizado y forma un heterodímero con la subunidad HIF-1 β [170]. HIF-1 pertenece a la subfamilia Per-ARNT-Sim (PAS) dentro de la familia de factores de transcripción básicos de hélice-bucle-hélice (bHLH) (**Figura I15**).

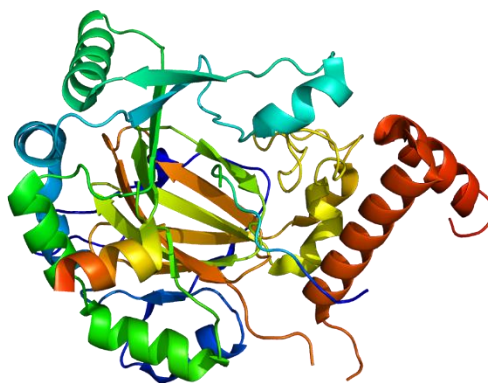


Figura I15: Estructura de HIF-1 α . HIF-1 α contiene un dominio hélice-bucle-hélice básico cercano al C-terminal [175].

Ambas subunidades de HIF-1 son similares entre sí y contienen los siguientes dominios: en la región N-terminal poseen dominios de unión al ADN PAS que facilita la heterodimerización en la región central (bHLH-PAS). HIF-1 α tiene dos dominios de transactivación (NTAD y CTAD) y un dominio inhibidor (ID), mientras que HIF-1 β posee solo el dominio CTAD. El dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD) de HIF-1 α controla su degradación por la vía ubiquitina-proteosoma [176, 177] (**Figura I16**).

Mientras que la subunidad β de HIF-1 es esencialmente insensible a los cambios en las concentraciones de O₂, la abundancia y activación de las subunidades α , son inducidas ante la disminución de concentración de O₂ [178].

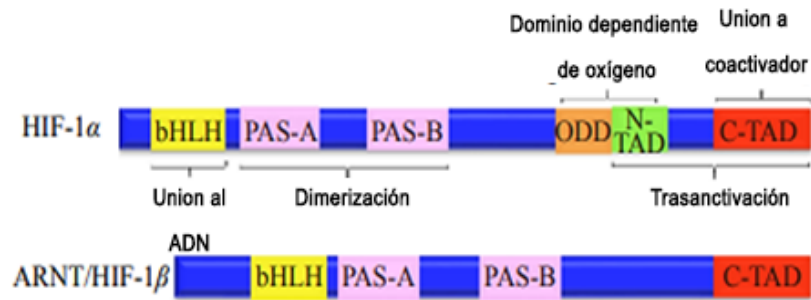


Figura I16: Esquema de las subunidades de HIF-1. Se esquematiza las subunidades del heterodímero HIF-1. Ambas subunidades de HIF-1 contienen bHLH y dominios PAS, que son requeridos para la formación de complejos heterodiméricos y para la unión al ADN. HIF-1 α contiene: dos dominios de localización nuclear, NLS-C y NLS-N; un dominio dependiente de O₂, donde se encuentran dos residuos de prolina, que es el que regula esta subunidad; dos dominios de transactivación, TAD-C y TAD-N. HIF-1 β contiene un solo dominio de transactivación. Adaptado de [178].

En condiciones de normoxia, HIF-1 α tiene una vida media corta (5 minutos) debido a su rápida degradación. La subunidad α de HIF-1 es hidroxilada selectivamente en varios residuos de prolina (Pro 402 y Pro 562) en el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD) que luego son reconocidos por el producto del gen supresor de tumores von Hippel-Lindau (pVHL), un componente de la ubiquitina E3 ligasa. El complejo ubiquitin E3 ligasa promueve la poliubiquitinación de HIF-1 α y su degradación por el proteasoma [179]. HIF-1 α también es regulado por el factor inhibitorio de HIF-1 (FIH), que hidroxila la Asn803 dentro del dominio de transactivación C-terminal de HIF-1 α en normoxia, interrumpiendo su interacción con los coactivadores de transcripción p300/CBP (CREB-Binding Protein) y previniendo la actividad transcripcional [177, 180] (**Figura I17**).

Las hidroxilasas dependientes de oxígeno (PHDs) requieren de oxígeno, 2-oxoglutarato, ácido ascórbico y hierro (Fe²⁺) como cofactores. En condiciones de hipoxia, la actividad de las PHDs está inhibida, la unión de pVHL es bloqueada y, en consecuencia, los niveles de HIF aumenta [181]. Frente a una disminución en la tensión del oxígeno, HIF-1- α se transloca al núcleo, donde se dimeriza con la subunidad β y se unen a una secuencia de ADN conservada conocida como elemento de respuesta a la hipoxia para transactivar genes de respuesta a la hipoxia. La hidroxilación de Asn803 también es inhibida en ausencia de oxígeno, permitiendo que el complejo p300/CBP se una a HIF-1 α /2 α para estimular la transactivación de HIF durante la hipoxia [178].

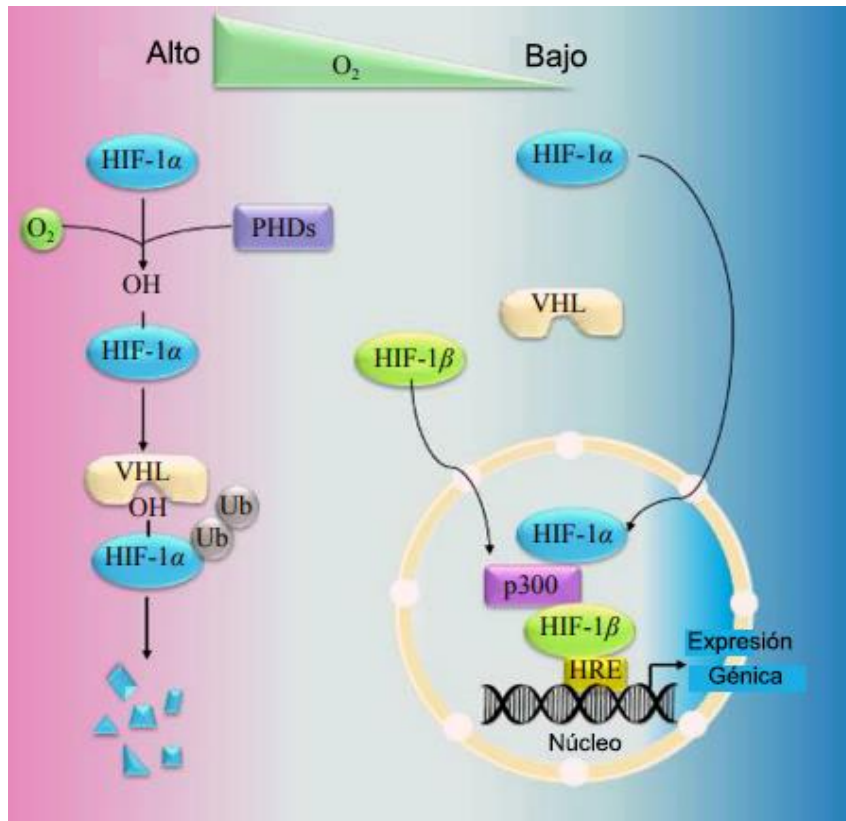


Figura I17: Mecanismo de detección de oxígeno y regulación de HIF-1α. Bajo condiciones de normoxia, la proteína HIF-1α es reconocida por la enzima proli hidroxilasa (PHD), antes de combinarse con la proteína von Hippel-Lindau (VHL) y promueve su ubiquitinación (Ub). Posteriormente, es degradada por el proteasoma. Bajo condiciones de hipoxia, PHD se encuentra inactiva. HIF-1α y HIF-1β se translocan al núcleo, formando un complejo con p300 en el núcleo, que se une al elemento de respuesta a la hipoxia y activa la transcripción génica específica. Adaptado de [178].

Durante la hipoxia luego del incremento en la expresión de HIF-1α, se induce un aumento en la producción de eritrocitos mediante la activación transcripcional de genes que codifican para eritropoyetina (EPO). También aumenta la angiogénesis mediada por factor de VEGF y los transportadores de glucosa y enzimas glicolíticas que facilitan la producción de ATP en ausencia de O₂; logrando así un incremento en el transporte de O₂ [169].

En resumen, HIF-1 α desempeña un papel crucial en procesos biológicos vitales al regular la activación transcripcional de diversos genes, y está estrechamente ligado a numerosas enfermedades, incluyendo el cáncer, Alzheimer, la isquemia cerebral, entre otros [182]. Más aún, es de particular interés su participación en la angiogénesis, proliferación y viabilidad celular durante gestaciones anómalas como son la PE y RCIU (Figura I18) [183].

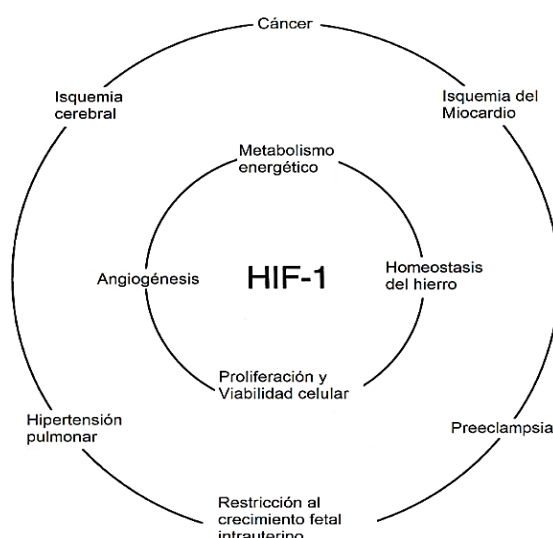


Figura I18: HIF-1 α se encuentra involucrada en diversos procesos celulares. En el círculo interno (angiogénesis, metabolismo energético, homeostasis del hierro, proliferación y viabilidad celular) se observan los procesos esenciales fisiológicos y del desarrollo en los cuales participa HIF-1 α , a través de la transactivación de genes blanco. Dicha transactivación también puede contribuir a respuestas de protección o patológicas en varias enfermedades severas, como se observa en el círculo externo (restricción al crecimiento intrauterino, preeclampsia, hipertensión pulmonar, isquemia cerebral, cáncer, isquemia del miocardio). Adaptado de [184].

La actividad transcripcional y la estabilidad de HIF-1 α es regulada por modificaciones post-traduccionales que incluyen la fosforilación, hidroxilación, acetilación, ubiquitinación y sumoilación [179, 185].

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a una disminución en los niveles de oxígeno [186] o por citoquinas que generan ROS en normoxia como TNF- α [187] o IL-1 β [188], conducen a la estabilización de HIF. La producción de ROS por las mitocondrias aumenta en condiciones de hipoxia y se ha sugerido que la mitocondria actúa como un sensor de oxígeno al aumentar la producción de ROS durante la hipoxia [189].

Existen estudios que indican una modulación en la actividad transcripcional de HIF-1 α dependiente de distintas vías de señalización. La vía PI3K puede activar la quinasa mTOR, que a su vez puede llevar a la regulación de HIF-1 α . En algunos contextos, la activación de mTOR puede promover la traducción de HIF-1 α , pero en otros puede resultar en una retroalimentación negativa que disminuye la estabilidad de HIF-1 α [190]. A su vez, puede promover la actividad de factores que inducen la ubiquitinación y posterior degradación de HIF-1 α , reduciendo así sus niveles y actividad transcripcional [191].

Si bien hay varios estudios acerca de la modulación positiva de la vía de MAPK sobre la actividad de HIF-1 α [192], también se ha reportado que la señalización de MAPK/ERK 1/2 regula negativamente tanto la síntesis como la activación transcripcional de HIF-1 α mediante mecanismos que incluyen la fosforilación, interacción con otros factores y la regulación de la estabilidad de HIF. Esta regulación es esencial para la correcta respuesta celular a cambios en el entorno de oxígeno y otros estímulos [193, 194]. La señalización a través de la vía MAPK puede influir en la interacción entre HIF-1 α y la proteína VHL, promoviendo la ubiquitinación y degradación de HIF-1 α [195].

Por otro lado, la reducción de la expresión del gen supresor de tumores p53 se ha asociado con un aumento en los niveles de HIF1 α en cáncer de colon humano, ya que p53 puede inducir la ubiquitinación y degradación de HIF-1 α a través de Mdm2. En general, Hsp90 (chaperona 90) se une directamente a HIF-1 α , lo que provoca un cambio conformacional en su estructura y modifica la transactivación de su unión a HIF-1 β [196, 197].

Se ha sugerido que durante períodos prolongados de hipoxia se activa un mecanismo de retroalimentación que reduce la expresión de HIF-1 α . Un aumento en los niveles de las PHDs podría contribuir a la disminución de HIF-1 α , lo cual difiere de lo que ocurre durante períodos cortos de hipoxia [198].

Se ha descrito que el aumento de leptina en la preeclampsia, dado la reducción del flujo sanguíneo e hipoxia placentaria han llevado a proponer que, el gen de leptina podría ser inducido por la hipoxia [199]. En este sentido se ha determinado, que el gen de la leptina es un gen inducible por hipoxia en células BeWo dependiente de la actividad transcripcional de HIF-1 α [199].

Existe un efecto bidireccional entre HIF-1 y la leptina. La unión de HIF-1 α a la región promotora del gen de la leptina induce su expresión [200]. Por otro lado, la leptina podría regular positivamente la actividad de HIF-1, induciendo por ejemplo, la unión de HIF-1 al promotor de su gen blanco, VEGF [201].

Rol de HIF-1 α durante la placentación

Durante el primer trimestre, las células trofoblásticas extravelosas (CTBev) invaden la decidua, ocluyendo las arteriolas espirales uterinas, restringiendo el flujo sanguíneo hacia el espacio intravelloso, lo que resulta en un ambiente bajo en oxígeno que es esencial para el desarrollo placentario y embrionario [202], en consecuencia el desarrollo temprano de la placenta humana ocurre normalmente en un ambiente hipóxico.

Entre las semanas 11 y 12 de gestación, las arteriolas espirales uterinas se vuelven permeables, permitiendo un flujo sanguíneo materno significativo y aumentando los niveles de oxígeno. Es en ese momento en el que se genera un cambio en el fenotipo del citotrofoblasto, de proliferativos a invasivos que está regulado por la concentración de O₂ [203]. El ambiente hipóxico es esencial para la invasión e infiltración del citotrofoblasto en la decidua materna para el mantenimiento de la circulación materno-fetal en los primeros períodos del embarazo [204]. Se ha demostrado que los ratones deficientes en HIF-1 α fueron viables hasta el día 9.5, pero no más allá del día 10.5, debido a graves defectos placentarios, que incluyen la invasión placentaria superficial de la decidua y alternación de la diferenciación trofoblástica [205].

HIF-1 α es considerado un biomarcador clave de la función placentaria y la vascularización durante el embarazo. La incorrecta remodelación de las arterias espirales maternas durante las primeras etapas del embarazo conlleva a una retención de músculo en los vasos, lo que expone a las vellosidades trofoblásticas a diversos tipos de estrés, como la hipoperfusión seguida de hipoxia, hipoxia-reoxigenación, daño mecánico, o una combinación de estos factores. Esta situación puede desencadenar disfunción placentaria, que suele manifestarse como preeclampsia y restricción del crecimiento intrauterino [206].

La hipoperfusión o hipoxia en las vellosidades se caracteriza por una menor diferenciación sincicial, nudos sinciciales y citotrofoblastos prominentes. Más aún, se ha propuesto que la hipoxia impide la diferenciación de los trofoblastos cultivados [207]. La

evidencia reciente sugiere que HIF-1 α también se activa por estímulos no hipóxicos como el sistema renina-angiotensina, factores de crecimiento y citoquinas inmunogénicas, todos los cuales desempeñan funciones importantes en la regulación del desarrollo y la maduración placentaria [208].

La desregulación tanto de HIF-1 α como del factor de crecimiento transformante 3 (TGF3) conlleva a una desregulación en el cambio de fenotipo de los CTBs, de proliferativo a invasivo. La expresión de TGF3, mediada por HIF-1 α , mantiene un fenotipo proliferativo y no invasivo de los CTBs. Tratamientos con oligonucleótidos antisentido contra HIF-1 α o TGF3 inducen la invasión trofoblástica en condiciones de hipoxia [209]. Además, la inhibición de TGF3 también induce la invasión trofoblástica en explantos de placentas provenientes de pacientes con PE [210], sugiriendo que la expresión defectuosa de HIF-1 o TGF3 puede tener un rol importante en la PE.

La baja perfusión de la placenta conduce a la hipoxia tanto en la placenta como en el feto, lo que se considera una de las principales causas de la restricción del crecimiento intrauterino. En condiciones de hipoxia, HIF-1 α induce la expresión de IGF 1 (IGFBP-1), la cual regula negativamente los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs), que desempeñan un papel crucial en la regulación del crecimiento fetal. Se ha observado que la expresión de IGFBP-1 es mayor en los cordones umbilicales de recién nacidos con RCIU [211].

Apoptosis

Muerte celular programada: Apoptosis

La apoptosis es considerada muerte celular programada, desempeña un papel esencial en varios procesos biológicos, tales como el desarrollo embrionario, la homeostasis tisular y la respuesta inmune [212]. Morfológicamente se caracteriza por cambios en la composición de la membrana celular que permiten la unión de fagocitos, evitando de esta manera la liberación del contenido celular y la posible reacción de inflamación. Otros cambios que se producen son la alteración del citoesqueleto, condensación y fragmentación de la cromatina [213].

El proceso apoptótico puede ser dividido en tres etapas: la primera fase es la de iniciación, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte; en la segunda, o fase de ejecución, se producen la mayoría de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis; y finalmente, en la tercera etapa, o fase de eliminación, los restos celulares son degradados por los macrófagos y células adyacentes [214].

La apoptosis se puede inducir por estímulos externos (vía extrínseca) o internos (vía intrínseca). La vía de señalización extrínseca puede ser iniciada por unión del factor de necrosis tumoral (TNF) a su receptor, por unión de TRAIL (del inglés, *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) a los receptores de muerte 4 y 5 (DR4 y DR5) o por unión de FasL (del inglés, *Fattyacid synthetase Ligand*) al receptor FasR. Estas asociaciones reclutan a moléculas adaptadoras, como FADD o TRADD, las cuales activan a las Caspasas iniciadoras 8 y 10, activándose finalmente las Caspasas efectoras 3, 6 y 7 **(Figura I18)** [215].

En la cascada de señalización intrínseca, una serie de estímulos intracelulares actúan sobre la mitocondria, desencadenando cambios en su membrana que resultan en la liberación hacia el citosol de proteínas proapoptóticas. La liberación de Citocromo C activa a la proteína Apaf-1 y la Procaspasa-9, formando un complejo conocido como apoptosoma, el cual activa a la Caspasa-3, dando inicio a la vía efectora de apoptosis **(Figura I18)**. También pueden ser liberados factores inductores de apoptosis (AIF), endonucleasa G y la DNAsa activada por Caspasas (CAD), que entran al núcleo y fragmentan el ADN.

Los cambios en la membrana mitocondrial están regulados por las proteínas pertenecientes a la familia BCL-2 las cuales tienen funciones tanto pro-apoptóticas como anti-apoptóticas. A su vez, éstas se encuentran bajo el control de la proteína supresora de tumores p53 [216].

Tanto la vía extrínseca como la intrínseca no son completamente independientes, ya que pueden interactuar entre sí. Por ejemplo, una de las caspasas activadas, la Caspasa 8, puede clivar a la proteína Bid, convirtiéndola en tBid, lo que aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial y, como resultado, intensifica la cascada de apoptosis [217].

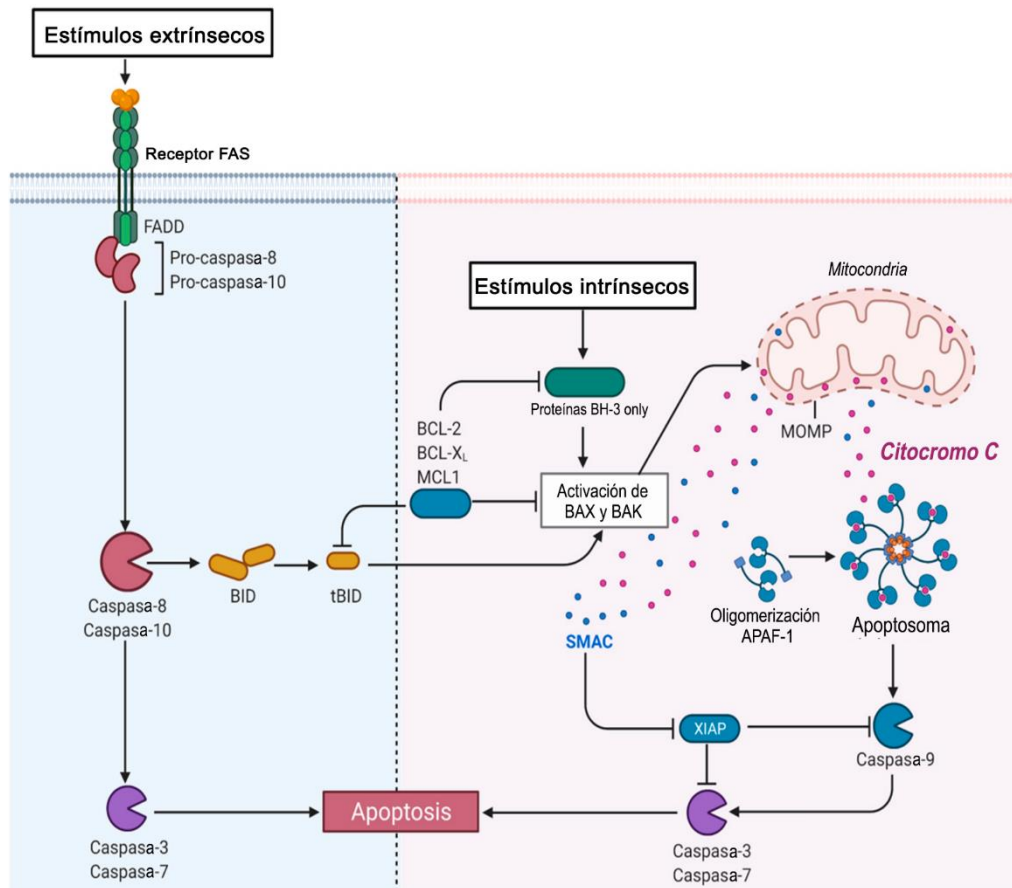


Figura I18: Vías extrínsecas e intrínsecas de apoptosis. La vía extrínseca es iniciada por TNF, TRAIL o FasL, activando a Caspasa-8 que activa a Caspasa-3. Las proteínas de la familia BCL-2 con un único dominio BH3 se unen a la familia de proteínas antiapoptóticas BCL-2 para anular su inhibición sobre BAX y Bak y así activarlas. BAX y Bak oligomerizan y permeabilizan la membrana mitocondrial externa generando la liberación de Citocromo C al citoplasma donde forma el apoptosoma junto a Apaf-1, activando a Caspasa-9, que activa a Caspasa-3, donde ambas vía apoptóticas convergen. Adaptado de [218].

Familia de proteínas BCL-2

Las proteínas de la familia BCL-2 reguladoras de la apoptosis, y la interacción entre los miembros de la familia con actividades pro y antiapoptóticas determinan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y la posterior muerte celular. Estos reguladores se mantienen en un equilibrio fino y delicado en las células sanas [219]. Los miembros de la familia BCL-2 son caracterizadas por la presencia de regiones de homología BCL-2 (BH) conservados, denominados BH1, BH2, BH3 y BH4, que están formados por ocho fragmentos de hélice α unidos entre sí. El dominio BH altamente conservado, es una base importante para la función de las moléculas de la familia BCL-2.

Según la homología y función de cada proteína, la familia de proteínas BCL-2 se divide en tres subfamilias: proteínas antiapoptóticas como BCL-2 y Bcl-X_L, proteínas proapoptóticas representadas por BAX y Bak, y proteínas con un único dominio BH3, como Bad y Bid. El dominio BH3 es una estructura necesaria para la combinación de proteínas proapoptóticas y proteínas antiapoptóticas para formar dímeros y también es necesario para la función proapoptótica.

Grupo de subfamilia	Nombre de la proteína	Domino estructural
Proteínas antiapoptóticas	BCL-2	BH1.2.3.4
	Bcl-xL	BH1.2.3.4
	MCL-1	BH1.2.3
Proteínas proapoptóticas	BAX	BH1.2.3
	Bok	BH1.2.3
	Bak	BH1.2.3
	Bcl-X _s	BH3.4
Proteínas de domino BH3	Bad	BH3
	Bid	BH3
	Puma	BH3

Tabla I3: Grupos de subfamilias y dominios de las proteínas de la familia BCL-2.

Adaptado de [220].

Con respecto al dominio BH4, juega un papel importante en la función antiapoptótica, ya que una vez que se elimina, BCL-2 pierde su capacidad y no tiene ningún efecto sobre la unión de BAX para formar dímeros. Además, este dominio interactúa con otras moléculas efectoras y reguladores de la apoptosis. Todas las interacciones de unión entre las proteínas de la familia de BCL-2 son reversibles y los equilibrios se rigen por afinidades locales [216]. La **Tabla I3** resume los grupos de subfamilias y dominios de las proteínas de la familia BCL-2.

Las proteínas con actividad inhibitoria sobre la apoptosis se encuentran como proteínas integrales de la membrana externa mitocondrial y también ha sido posible dilucidar su presencia en membrana del retículo endoplásmico y membrana nuclear, mientras que diversos miembros con función proapoptótica se encuentran en citosol o en asociación al citoesqueleto; una característica relevante de estas últimas es su capacidad para translocarse y asociarse como proteínas de membrana, regulando la vía apoptótica mitocondrial al controlar la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MEM) que libera al Citocromo C y otros factores apoptóticos hacia el citosol [219].

BCL-2 es la proteína antiapoptótica más característica de la familia BCL-2. Puede inhibir la apoptosis formando un heterodímero con BAX y asegurar la supervivencia celular. Además, también puede inhibir las actividades de las Caspasas-9, 3, 6 y 7 inhibiendo así la apoptosis [221].

Por otro lado, la activación de BAX y Bak, provoca una serie de cambios conformacionales que resultan en la homo-oligomerización de estas dos proteínas y la formación de poros dentro de la MEM. La interacción a través del dominio BH3 con proteínas antiapoptóticas permite regular la activación, inhibiendo su función, al secuestrarlas [220]. En este sentido, Bak se encuentra inhibido a través de la unión a proteínas antiapoptóticas como MCL-1 y Bcl-xL [222].

Las proteínas con único dominio BH3, promueven la apoptosis a través de dos mecanismos: uno antagonizando las proteínas antiapoptóticas de la familia BCL-2 y el otro activando las proteínas proapoptóticas BAX y Bak [223]. Luego de la inducción de la apoptosis, Bid se activa postraduccionalmente a través del clivaje por Caspasa-8, como fue mencionado anteriormente, lo que da lugar a tBID (Bid truncado), el cual promueve la activación de BAX y Bak no sólo al unirse directamente a ellas, sino también al liberarlas de los complejos con miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 que

inhiben su activación [223]. De la misma manera, Bad interacciona con proteínas antiapoptóticas, permitiendo la liberación de los reguladores proapoptóticos para inducir la permeabilización de la membrana interna mitocondrial. La actividad de Bad está regulada por diversas señales intracelulares, principalmente mediante la fosforilación de las serinas 112, 136 y 155. Cuando Bad está fosforilado, su capacidad para unirse a las proteínas antiapoptóticas disminuye, lo que bloquea la apoptosis. Por el contrario, la desfosforilación de Bad aumenta su actividad proapoptótica [224].

Se ha demostrado que la hipoxia-reoxigenación en tejidos vellosos provenientes de placentas humanas a término provocó cambios en los niveles de proteínas apoptóticas, aumentando la expresión génica y proteica de BAX y Bak y redujo la expresión de ARNm de BCL-2 [225].

Respecto de la regulación de la apoptosis en el STB de placentas humana a término, la expresión de BAX evaluada mediante inmunohistoquímica resultó indetectable y fue prominente en el tejido conectivo y células perivasculares dentro del núcleo de las vellosidades. La localización de BAK, reveló inmunorreactividad en áreas aisladas de sincitio de vellosidades normales y antagónicamente la proteína antiapoptótica BCL-2 se expresó en todo el sincitio con mucha menos tinción en el citotrofoblasto [226].

En trofoblastos primarios aislados de placentas humanas a término o en células JEG3 expuestas a 1% de oxígeno se observó un aumento en la interacción de Bad con Bcl-xL mediante inmunoprecipitación. Además, la hipoxia aumentó la apoptosis e indujo la fosforilación tanto de BADser136 como de BADser155 y una disminución la fosforilación de BADser112, asociada al efecto inhibitorio de la apoptosis [227].

Se han demostrado efectos neuroprotectores de la leptina en modelos de ratón con lesión por isquemia/reperfusión cerebral y en cultivo neuronal cortical primario con privación de oxígeno, a través de la activación de la vía JAK2/STAT3, que genera un incremento en los niveles de BCL-2 y Bcl-xL y la reducción en los niveles de Citocromo C [228].

Resultados previos de nuestro laboratorio, demostraron que la leptina desempeña un rol importante sobre la apoptosis de células placentarias, modulando las proteínas de la familia BCL-2. En un modelo de privación de factores de crecimiento o estrés por pH o temperatura en las células trofoblásticas, se ha demostrado que la leptina disminuye la apoptosis al reducir la escisión de Caspasa-3 y PARP-1 y aumentar la relación BCL-2/BAX. La leptina además disminuye los niveles de t-Bid [229].

Proteína supresora de tumores: p53

El factor de transcripción p53 es un factor central en la regulación del ciclo celular. Las señales de estrés que se sabe inducen p53 incluyen, la activación de oncogenes, el daño al ADN y el estrés de replicación [230]. En respuesta a estas tensiones, p53 sufre modificaciones postraduccionales, promueve la transcripción de genes implicados en respuestas celulares específicas según el tipo de estrés, controlando así el destino de la célula [231]. Los procesos biológicos ampliamente estudiados en los que se ha demostrado que p53 desempeña un papel son la detención del ciclo celular, la senescencia, la reparación del ADN y la apoptosis. Es este rol el que le ha otorgado el apodo de “guardián del genoma” [232].

La estructura de la proteína p53 se compone de cinco regiones principales: el dominio de transactivación, el dominio rico en prolina, el dominio de unión al ADN, el dominio de tetramerización y un dominio regulador [233]. El dominio de transactivación (TAD) se localiza en el extremo N y se divide en dos regiones: TAD1 y TAD2. Estas regiones facilitan la unión de p53 a diversos cofactores y ambas son necesarias para la supresión de la tumorigénesis mediada por p53 en respuesta al estrés, como el daño agudo del ADN [234]. Sin embargo, cada dominio de transactivación confiere a p53 especificidad en la unión de cofactores, lo que a su vez influye en la respuesta celular ante un tipo específico de estrés. La región TAD también posibilita la interacción con su regulador negativo, Mdm-2 [235].

En condiciones normales los niveles de p53 se mantienen bajos y su función es reprimida por Mdm-2 y MdmX [235]. Mdm-2 es una E3 ubiquitinligasa y consiste en la principal proteína reguladora de p53. En su dominio regulatorio C-terminal p53 posee seis lisinas que pueden ser ubiquitinadas por Mdm-2 y se observa que, en presencia de altos niveles de Mdm-2, p53 es poliubiquitinada mientras que sólo se monoubiquitina cuando los niveles de Mdm-2 son bajos [236]. En el núcleo Mdm-2 enmascara a p53 inhibiendo su acción como factor de transcripción. Mdm-2 promueve la translocación de

p53 del núcleo al citoplasma, donde se produce su degradación vía proteasoma [236]. Es importante destacar que p53 también actúa como factor de transcripción del gen de Mdm-2 y en condiciones de estrés promueve su transcripción, generando un *feedback* negativo [166]. Además, Mdm-2 junto a MdmX son capaces de inhibir la función de transactivación de p53, bloqueando el reclutamiento de componentes esenciales de la maquinaria transcripcional [237].

Los distintos dominios de p53 poseen sitios conservados que pueden ser regulados por diversas modificaciones post-traduccionales, incluyendo fosforilación, acetilación, ubiquitinación y sumoilación [236]. En condiciones de estrés dos residuos serina de su dominio regulador (Ser 15, Ser 20) son fosforilados impidiendo la unión de Mdm-2 y la posterior degradación de p53. De esta manera p53 aumenta su estabilidad y en su forma activa es capaz de unirse al ADN, activando la transcripción de sus genes blanco [212].

La forma activa de p53 adopta una estructura tetramérica compuesta por dos homodímeros, lo que le permite activar la transcripción de sus genes blanco, especialmente aquellos implicados en la apoptosis. Estos genes pueden clasificarse en dos subgrupos: los relacionados con la vía extrínseca de apoptosis, como CD95/Fas/Apo-1, DR4 y DR5; y los vinculados a la vía intrínseca, como Apaf-1, BAX, Puma, Noxa y Bid. [238, 239]. Por otra parte, p21 es uno de los principales genes blanco de p53 y uno de los responsables del arresto del ciclo celular en G1, siendo c-MYC otro de los genes que contribuye a la regulación en este punto del ciclo [240]. p53 también es capaz de generar el arresto del ciclo en G2, pero en este caso la regulación ya es más compleja e involucra la expresión de varios genes capaces de influenciar la progresión del ciclo, como ciclina B, la maquinaria de la mitosis, o la topoisomerasa II [241].

Modulación de p53 en hipoxia

p53 es estabilizada rápidamente por distintos tipos de estrés celular y es de particular interés su modulación en condiciones de hipoxia [242]. Como se mencionó en el apartado anterior, el principal factor de transcripción activado bajo condiciones de hipoxia es HIF-1, siendo su subunidad alfa crítica en su regulación. Ambos factores de transcripción, p53 y HIF-1 han sido ampliamente estudiados ya que se encuentran involucrados en diferentes patologías. Con frecuencia se ha descrito que la hipoxia es un inductor de p53 [176, 243]. La acumulación de ambos factores de transcripción está regulada bajo la acción de E3 ubiquitin ligasas: Mdm-2 para p53 y pVHL para HIF-1.

La relación entre p53 y HIF-1 α , es una cinética compleja de regulación, las cuales se pueden apreciar en la **Figura I20**. Se ha descrito que la hipoxia disminuye o aumenta el nivel proteico de p53 de acuerdo con la duración y la intensidad de la hipoxia y/o el tipo de célula, mientras que p53 disminuye la actividad o estabilidad de HIF-1 α en caso de estrés severo [244].

Se ha estudiado que tanto p53 como HIF-1 α estimulan el rol de Mdm-2 [198] y pVHL [245], respectivamente, porque estos reguladores son genes blanco del factor de transcripción que regulan. Distintos reportes han demostrado que p53 promueve la ubiquitinación y la degradación proteasomal de HIF-1 α [246]. Otros estudios confirmaron esta observación al mostrar un nivel basal de HIF-1 α más alto en respuesta a la hipoxia en células p53 mutantes que en células p53 de tipo salvaje [246].

En caso de estrés severo, p53 podría inducir la degradación de la proteína HIF-1 α , aunque en condiciones más leves, p53 puede inhibir la actividad de HIF-1 α sin afectar su nivel proteico, esto último, debido a la existencia de una competencia entre p53 y HIF-1 α por la unión al coactivador transcripcional p300, cuando hay un incremento de p53 [247]. A su vez, varios informes argumentan antagónicamente que HIF-1 α podría tener efectos positivos a nivel del ARNm y proteicos de p53 [248, 249]. La forma en la que la hipoxia modula los niveles o actividad de p53 sobre HIF-1 α puede ser dependiente o independiente de Mdm-2 [250]. Se han propuesto complejos triméricos que contienen a p53, Mdm-2 y HIF-1 α con la hipótesis de que podrían promover la degradación de HIF-1 α . Este complejo podría formarse con una interacción directa entre p53 y HIF-1 α . Sin embargo, según Chen et al, se requiere de Mdm-2 para unir las dos proteínas, facilitando así la degradación de HIF-1 α y la activación de la transcripción mediada por p53 [251].

Por otro lado, pVHL afecta positivamente a p53. pVHL es capaz de aumentar la expresión o estabilización de p53 al estimular su traducción o al inhibir la ubiquitinación vía Mdm-2 y posterior degradación [252].

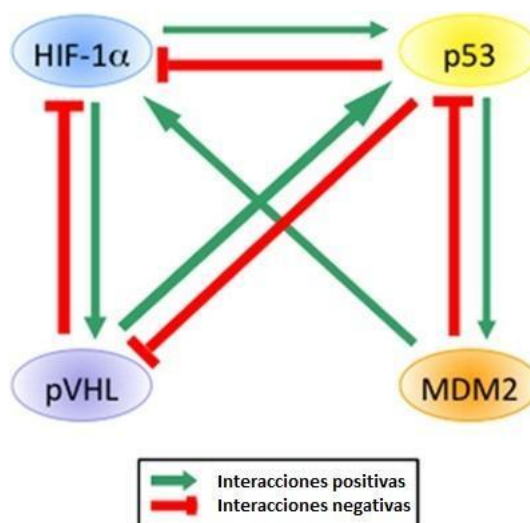


Figura I20: Representación esquemática de la modulación de HIF-1 α , p53, pVHL y Mdm-2.
Adaptado de [253]

Ambos factores de transcripción son capaces de promover la supervivencia y adaptación celular siempre y cuando las condiciones de estrés sean leves, mientras que, si las condiciones de estrés son duraderas o severas, estos factores son capaces de inducir la detención del ciclo o la muerte celular [254].

Se ha observado que la hipoxia incrementa la apoptosis de citotrofoblastos humanos proveniente de placentas humanas a término ocasionado por el aumento de los niveles de p53 con la subsiguiente inducción del proceso apoptótico. Mientras que en STBs se observa una disminución en la actividad de p53 en respuesta a hipoxia, lo cual reduce la apoptosis conducida por esta vía y, por lo tanto, limita la lesión y mantiene la integridad de esta estructura [255].

Por consiguiente, la regulación de la supervivencia y la apoptosis mediada por p53 y HIF-1 α en condiciones de hipoxia es sumamente compleja. No obstante, es crucial avanzar en la comprensión de la interacción entre estos dos factores de transcripción para mejorar nuestra comprensión de diversas enfermedades y desarrollar nuevos enfoques terapéuticos.

Proliferación celular y apoptosis en placenta

La diferenciación de las células trofoblásticas se inicia durante el proceso de implantación. La anatomía única de la placenta humana se debe en gran parte a la diferenciación de las células citotrofoblásticas. La formación, el crecimiento y el mantenimiento de la capa de STB durante el embarazo se logran mediante la fusión continua de nuevos citotrofbastos. La tasa de fusión sincitial excede los requisitos para el crecimiento de las vellosidades en el tercer trimestre, de modo que el STB se elimina continuamente hacia la circulación intravellosa materna como cuerpos sincitiales apoptóticos [256].

En los CTB que originan el sincicio se observa fosfatidilserina en superficie, activación de Caspasa-8, fragmentación del ADN y condensación de la cromatina, relacionando así la extrusión de los nudos sincitiales con las etapas de ejecución tardía de la apoptosis [257]. Comprender las vías reguladoras que gobiernan el recambio del trofoblasto vellosos es de suma importancia, ya que la preeclampsia, se caracteriza por una excesiva liberación de trofoblasto a la circulación materna [258]. Durante el desarrollo placentario, tanto el CTB vellosos como el extravellosos mantienen un subconjunto de células en contacto con la membrana basal de las vellosidades. La interacción física de los CTB proximales con la membrana basal les permite retener un fenotipo proliferativo, de esta manera el proceso de proliferación es restringido y está finamente regulado. En el compartimento extravellosos, los trofoblastos se dividen y se desplazan hacia el estroma uterino, donde dejan de proliferar y comienzan a invadir como parte de su proceso de diferenciación. Por otro lado, las células que se multiplican en el compartimento vellosos se fusionan y contribuyen al STB [259].

Una vez completado su desarrollo, la placenta continúa atravesando distintos estados de proliferación y apoptosis de manera de mantener el recambio celular y la homeostasis del tejido [260].

El proceso de apoptosis desempeña un papel crucial en varios aspectos del desarrollo placentario, incluido el crecimiento, la renovación celular y el parto. Durante la gestación, los niveles de apoptosis aumentan dentro de las vellosidades terciarias, alcanzando su punto máximo después de las 40 semanas de embarazo [212]. La expresión de p53 en los embarazos normales es predominante en los citotrofoblastos, siendo más alta durante el primer trimestre, y raramente se detecta en el STB [217]. Los CTBs extravellosos también expresan p53 y se describió recientemente su expresión en el estroma de las vellosidades [261].

El nivel de apoptosis muestra alteraciones en diversas complicaciones asociadas al embarazo. Se observa un aumento, en los abortos recurrentes durante el primer trimestre, así como en coriocarcinomas, restricción del crecimiento intrauterino y preeclampsia. En particular, se ha informado que los explantos placentarios de embarazos asociados con ambas patologías muestran una respuesta exagerada ante la exposición a TNF α o hipoxia [217, 262].

La expresión de p53 también puede verse alterada en embarazos patológicos. En este sentido, distintos grupos de investigación reportaron que los niveles de p53 también se encuentran alterados en condiciones de hipoxia [206, 263]. A su vez, se ha observado que la expresión de p53 también está incrementada en placentas de mujeres que han sufrido abortos espontáneos [264] y que la PE se asocia con alteraciones en la vía de p53 [265]. Al haberse encontrado la expresión de p53 aumentada en diversas patologías asociadas al embarazo se propuso que el estudio de p53 puede ayudar en el diagnóstico de enfermedades trofoblásticas gestacionales [262].

Varios factores intervienen para establecer un delicado equilibrio entre la proliferación y diferenciación del trofoblasto, y entre ellos las proteínas del ciclo celular desempeñan papeles dominantes durante estas transiciones. Una de las proteínas sintetizadas en las fases G1 y S tardías del ciclo celular es PCNA. PCNA es una proteína que se une a una variedad de factores necesarios para la progresión, replicación y reparación del ciclo celular. En consecuencia, desempeña funciones importantes en la síntesis, reparación y regulación del ciclo celular del ADN y es un marcador de proliferación comúnmente utilizado. Mediante inmunohistoquímica se observó que la expresión más intensa de PCNA en la placenta humana se identifica en los CTBv y CTBev. Además, PCNA también se expresa en STB, células endoteliales, células estromales vellosas, células deciduales y células de glándulas deciduales con menor

marca. La expresión de este marcador se observó intensamente en el primer trimestre y se redujo gradualmente hacia el término [266].

Por otro lado, en un estudio utilizando explantos provenientes de placenta con PE, se observó falta de estimulación de la proliferación (expresión de Ki-67) en las células trofoblásticas [267]. La inmunotinción del inhibidor del ciclo celular p27 aumentó en los CTBv y en el STB de placentas preeclámpticas [268]. Los marcadores proliferativos, PCNA y Ki-67 disminuyeron significativamente en CTBv de placentas preeclámpticas. A su vez, las tinciones CTBv de los inhibidores del ciclo celular (p27 y p57) aumentaron considerablemente en las placentas preeclámpticas [266].

El rol de HIF en la proliferación y apoptosis placentaria

El desarrollo placentario es esencial para la evolución de un embarazo exitoso, y ello implica la regulación precisa de eventos celulares como la proliferación, diferenciación y apoptosis. La apoptosis de las células trofoblásticas constituye un proceso natural de gran relevancia en el desarrollo fisiológico de la placenta humana.

Como resultado de la activación transcripcional de HIF-1 α , se inicia la transcripción de un gran número de genes blanco. Muchas de las proteínas codificadas por estos genes están implicadas en respuestas adaptativas que contrarrestan los efectos adversos de la hipoxia.

En condiciones de hipoxia, también se incrementa la expresión de proteínas involucradas en la glucólisis, lo que permite a la célula adaptarse a las bajas concentraciones de oxígeno mediante un aumento en la producción de energía a través de la vía glucolítica anaeróbica [176]. Se ha descrito que la privación de oxígeno lleva a la muerte celular por apoptosis mediado en parte por vías dependientes de HIF. HIF-1 α estimula proteínas pro-apoptóticas como BNIP o NIX y también se ha reportado que puede alterar la expresión de miembros de la familia BCL-2 [176].

FOXO3a, un miembro de la familia de factores de transcripción FOXO, desempeña un papel crucial en la regulación del estrés oxidativo, la apoptosis y la homeostasis celular [269]. En un estudio actual, se encontró que HIF-1 α y el factor de transcripción FOXO3a se expresan altamente en tejidos placentarios de pacientes con PE y en células de la línea de trofoblasto humano de primer trimestre HTR8 en condiciones de hipoxia, contribuyendo a la disfunción endotelial y a la patogénesis de la

enfermedad. La eliminación de FOXO3a o HIF-1 α utilizando ARN de interferencia específico, redujo la tasa de apoptosis en células HTR8/SVneo y tejidos placentarios de pacientes con PE. La expresión elevada de HIF-1 α aumentó la apoptosis trofoblástica al regular FOXO3a, que puede estar involucrado en la patogénesis de la PE [270].

La perfusión de oxígeno intermitente podría dar lugar a lesiones de tipo hipoxia/reoxigenación (H/R), principalmente debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y ser un potente estímulo de la apoptosis del trofoblasto, activando la vía mitocondrial [271].

La PE y RCIU se asocian con hipoperfusión placentaria e hipoxia de las vellosidades. La respuesta de las vellosidades a este entorno incluye una disminución de la diferenciación del trofoblasto y una mayor apoptosis [272]. En citotrofoblastos, la hipoxia dificulta la diferenciación in vitro [207].

HIF-1 α se postula como un mediador molecular crítico del desarrollo placentario y que su expresión prolongada, explícitamente en las células trofoblásticas, induce características fisiológicas y fisiopatológicas maternas y fetales que altera el desarrollo del linaje placentario e inhibición de la diferenciación de trofoblastos con disfunción endotelial y falta de remodelación de las arterias espirales maternas [273].

El rol de la leptina en la proliferación y apoptosis

Se han realizado numerosos estudios sobre el papel de la leptina en el crecimiento, la proliferación celular y la apoptosis. Diferentes grupos de investigación han examinado el efecto de la leptina en la proliferación de células del sistema inmunitario. La leptina promueve la proliferación de los linfocitos T, pero inhibe la proliferación de los linfocitos T reguladores, que están implicados en la prevención de enfermedades autoinmunes. Se ha observado que la leptina estimula la producción de IL-6 y TNF α en los monocitos, lo que a su vez promueve su proliferación y activación, sugiriendo así que la leptina actúa como una citoquina proinflamatoria [274]. A su vez, se encontró que leptina promueve la supervivencia de monocitos a través de la vía de ERK1/2 en células de cáncer de colon humano y células mononucleares de sangre periférica [275, 276].

Se ha explorado el efecto de la leptina en células tumorales, las cuales, debido a similitudes con las células trofoblásticas, son relevantes para comprender su función en la placenta. Estudios han revelado que la leptina promueve la proliferación celular de manera dependiente de la dosis. En el adenocarcinoma esofágico, se ha demostrado que el efecto proliferativo de la leptina está mediado por las vías de señalización de ERK, p38, PI3K/Akt y JAK2, mientras que en el cáncer de colon parece estar involucrada la vía de NF-kappaB [277].

Estudios en porcinos han revelado que, en las células de la granulosa, la leptina aumenta la expresión de p53, BAX y el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), mientras que reduce la expresión de ciclina B1. Estos hallazgos sugieren que p53 podría ser un mediador importante de la acción de la leptina en estas células [278]. Contrariamente, en células de la granulosa de pollos, se encontró que leptina disminuye la expresión de BAX y p53, mientras que aumenta los niveles de BCL-2 [278]. Lang y colaboradores demostraron que la leptina induce la proliferación celular de células hepáticas estrelladas, responsables del mantenimiento de la homeostasis de la matriz extracelular del hígado, mediante la activación de la vía PI3K/Akt [279].

Como se mencionó anteriormente la leptina es un regulador crucial del desarrollo del cerebro, capaz de influir en el desarrollo glial y neuronal. La leptina es capaz de promover la proliferación y diferenciación de células madre neuronales con un patrón dependiente de la concentración. Este cambio estuvo acompañado por la regulación positiva de p-AKT y p-ERK1/2, que son las vías de señalización clásicas de Lep-Rb. De manera similar, la leptina estimula la proliferación de células progenitoras del hipocampo adultas cultivadas en vitro, modulando la activación de Akt y STAT3 [280].

Existen diversos estudios sobre el efecto de leptina sobre la apoptosis. Se reportó que en células endoteliales la leptina inhibe la apoptosis regulando los niveles de BCL-2 [281]. En eosinófilos leptina previene la muerte celular de manera dosis dependiente, retrasando el clivaje de BAX y la liberación de Citocromo C de la mitocondria. Las vías de PI3K y MEK/ERK estarían involucradas en dichos efectos [282]. Resultados similares se describieron en neutrófilos, donde a su vez mostraron que leptina inhibe la activación de Caspasa-8 y 3 [283].

Trabajos recientes también sugieren que la leptina aumenta la capacidad del ovocito para sostener el desarrollo embrionario y potencia una regulación negativa de la apoptosis en el blastocisto temprano, mediante la activación de STAT3, incrementando la expresión de XIAP y regulando negativamente la BAX [284].

Resultados de nuestro grupo de investigación mostraron que la leptina promueve la proliferación y la supervivencia celular de las células trofoblásticas mediante la activación de las vías de señalización JAK-STAT, MAPK y PI3K. Específicamente, la leptina incrementa la proliferación celular de una manera dosis y tiempo dependiente, desplaza a las células hacia una fase G2/M y aumenta la expresión de ciclina D1, una de las proteínas clave de señalización del ciclo celular [45]. A su vez, el tratamiento con leptina exógena disminuye la apoptosis en las líneas celulares de coriocarcinoma JEG-3 y BeWo, mientras que la disminución de la expresión de leptina endógena mediante el uso de un oligonucleótido antisentido, aumenta la actividad de Caspasa 3 y disminuye la proliferación celular [45, 285]. Leptina también estimula la síntesis proteica de células JEG-3 a través de las vías de MAPK y PI3K [135]. En otro tipo de células de coriocarcinoma humano, Jar, la leptina, estimula la proliferación celular mediante la inducción de la vía IRS1/MAPK [286].

En conclusión, sugerimos que la leptina es un factor trófico y mitogénico para las células trofoblásticas en virtud de que inhibe la apoptosis y promueve la proliferación.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nuestra **hipótesis de trabajo**, a partir de los datos aportados por la literatura y nuestros resultados, se basa sintéticamente en las siguientes premisas

- La leptina posee importancia fisiológica en la reproducción y embarazo.
- La placenta es un sitio importante de producción de leptina y blanco de su acción y correlaciona con la expresión de metaloproteasas necesarias para promover el proceso invasivo de la implantación.
- En diversas patologías reproductivas (abortos recurrentes, coriocarcinomas, molas hidatiformes, preeclampsia, diabetes), los niveles de expresión de leptina cambian drásticamente.
- La preeclampsia y la diabetes asociada al embarazo se asocian con hipoxia fetal temprana y se ha reportado que la hipoxia aumenta la expresión de leptina.
- Resultados de nuestro laboratorio han situado a la leptina como una hormona capaz de estimular la proliferación celular e inhibir los procesos apoptóticos en un modelo de células Swan-71 crecidas en ausencia de suero fetal bovino. La acción antiapoptótica ejercida por la leptina en este sistema, involucra la disminución de la proteína reguladora p53 y la regulación de intermediarios como BCL-2, BAX y Bid.

Por lo tanto, planteamos que la leptina, como citoquina placentaria, es una molécula clave regulatoria del proceso implantacional, promoviendo la invasión, remodelación de las arterias uterinas y el crecimiento placentario. Estos procesos deben ocurrir de manera concertada con los niveles de las diferentes señales que controlan el diálogo materno-fetal. Postulamos como hipótesis central en este trabajo de tesis que la leptina protege de la apoptosis inducida por hipoxia y promueve la proliferación trofoblástica, involucrando las vías de señalización de MAPK y PI3K. Por otro lado, la expresión de leptina es regulada en condiciones de hipoxia.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo ha sido el estudio de los mecanismos celulares involucrados en la acción de leptina sobre la apoptosis inducida por hipoxia en células placentarias.

Objetivo general:

Para ello se investigaron los mecanismos subyacentes implicados en las patologías placentarias, con un enfoque específico en el papel de la leptina en la respuesta a la hipoxia en la placenta. Se pretende comprender cómo la hipoxia afecta la expresión y la función de la leptina, así como su impacto en la fisiopatología de diversas condiciones placentarias. También estudiar los mecanismos celulares involucrados en la acción de leptina sobre la apoptosis y proliferación frente a la hipoxia en células placentarias.

Objetivos particulares:

- Puesta a punto del tratamiento de hipoxia química en células placentarias.
- Estudio del efecto de leptina sobre la regulación de HIF-1 α en células placentarias en condiciones de hipoxia química.
- Estudio del efecto de leptina sobre la regulación de HIF-1 α en células placentarias en cámara de hipoxia 2 % O₂.
- Estudio del efecto de la estabilización de HIF-1 α sobre la apoptosis y proliferación de células placentarias.
- Estudio de la acción de leptina sobre la supervivencia de células placentarias frente a la hipoxia química.
- Determinar la participación de distintas vías de transducción de señales involucradas en la acción de leptina sobre la apoptosis inducida por hipoxia en células placentarias.
- Determinar la participación de distintas vías de transducción de señales involucradas en la acción de leptina sobre el efecto antiproliferativo de la hipoxia química en células placentarias.
- Estudio del efecto de leptina sobre la expresión de HIF-1 α y viceversa en células placentarias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelos Experimentales

Líneas celulares

Para realizar los experimentos se emplearon dos líneas celulares citotrofoblásticas, Swan-71 la cual deriva de citotrofoblastos de 7 semanas de gestación humana, inmortalizada por transformación mediada por telomerasa en el laboratorio del Dr. Gil More [287] y gentilmente cedida por las Dras. Claudia Pérez Leirós y Rosanna Ramhorst (Dto. de Qca. Biológica, FCEyN-UBA, IQUIBICEN-CONICET). Las células Swan-71 son positivas para la secreción de hCG y FFN, citoqueratina 7, vimentina y expresión de HLA-G, pero no expresan CD45, CD68. A su vez secretan una pequeña cantidad de niveles de hCG lo cual sugiere que dicha línea celular es de origen citotrofoblasto intravelloso o extravelloso, ya que las placentas del primer trimestre contienen una cantidad sustancial de citotrofoblastos intravellosos.

Por otro lado, se utilizó la línea celular derivada de un coriocarcinoma, BeWo, la cual preserva la capacidad de producir hormonas (HCG, estrógenos) y la morfología basal del citotrofoblasto. Son incapaces de diferenciarse a STBs de modo espontáneo, pero la sicialización puede inducirse hormonalmente [288]. Se ha reportado que estas células expresan leptina y su receptor [45]. Esta línea ha sido utilizada como modelo para el estudio de la expresión, secreción y acción de leptina en células trofoblásticas por distintos investigadores [58, 289, 290].

Explantos de placentas humanas a término

Los explantos de placenta in vitro son útiles para estudiar las funciones de los tejidos, incluida la captación celular, la producción y liberación de componentes secretorios, las interacciones celulares, la proliferación, el crecimiento y la diferenciación, toxicología y los procesos patológicos [291, 292]. Se sabe que mantienen su viabilidad en medio de cultivo, así como también la producción de hCG, la actividad de lactato deshidrogenasa, y la incorporación de aminoácidos [293].

En esta tesis se utilizaron explantos placentarios preparados a partir de placentas normales humanas a término provistas por el Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas, Provincia de Buenos Aires, Argentina. El uso de las muestras está aprobado por el comité de ética del Hospital “Profesor A. Posadas” y se cuenta con el consentimiento escrito de las donantes.

Cultivos celulares

Cultivo y mantenimiento de líneas celulares

Los distintos ensayos se realizaron utilizando las líneas celulares Swan-71 y BeWo. Ambas líneas celulares fueron tratadas en esterilidad dentro de una cámara de flujo laminar y los cultivos fueron mantenidos a 37°C y 5% CO₂, en 7 ml de medio DMEM/F12 (Invitrogen) conteniendo 10% de suero fetal bovino de complementado (SFB, Internegocios) y suplementos (GlutaMAX™-I CTS™ 1X, 1 mM de piruvato de sodio, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B, Invitrogen). Las células crecieron en monocapa en botellas de 25 cm² o 75 cm², con cambio periódico de medio de cultivo. Al llegar al 70% de confluencia las células fueron tripsinizadas. Para ello, se eliminó el medio de cultivo, se lavó con 5 ml de un buffer de fosfatos salino (PBS) y se trató con 0.5 ml de tripsina al 0,25% (p/v) (Invitrogen) durante 4-5 minutos a 37°C. Una vez despegadas, las células se resuspendieron en 8 ml de medio fresco, aspirándolas y bajándolas repetidas veces con la pipeta. Se realizó una dilución de dicha suspensión y se continuó el cultivo en nuevas botellas.

Determinación del número de células

Seguido al tratamiento con tripsina y dilución de las células en el medio, se contabilizó la cantidad de células totales, para ellos se colocó 10 µl de la suspensión obtenida, en el borde de un cubreobjeto cubriendo la cámara de Neubauer. El conteo de las células se realizó con un microscopio óptico a un aumento de 40X, considerando los cuatro cuadrados grandes de las esquinas de la cámara. El número de células totales por ml se calculó según la siguiente formula:

$$\frac{\text{células}}{\text{ml}} = N \times \frac{1}{4} \times 1000 \times 10$$

Donde N = número total de células en los cuatro cuadrantes.

Congelamiento de células

Para la preservación de stocks de las líneas celulares, se prepararon suspensiones de las mismas. Las células se despegaron con tripsina, luego se centrifugaron y se resuspendieron en suero fetal bobino conteniendo dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%. La suspensión se dividió en alícuotas en crioviales, los cuales se enfriaron lentamente hasta una temperatura final de -70°C y se los transfirió a nitrógeno líquido.

Tratamiento de las células en cultivo

Los tratamientos realizados en cada experimento se detallan en la leyenda de las figuras mostradas en el apartado de resultados. De manera general, luego de 24 h de sembrado las células Swan-71 o BeWo en medio fresco con 0% SFB se les agregó concentraciones crecientes de cloruro de cobalto (CoCl_2) 50, 100 y 250 μM para inducir hipoxia química evaluados en diferentes tiempos, generando curvas de concentración y tiempo. Esta sal aumenta la estabilidad del factor de transcripción HIF-1 α , al antagonizar el Fe^{+2} , un cofactor esencial requerido para que el oxígeno interactúe con las PHDs las cuales facilitan la ubiquitinación y posterior degradación del factor de transcripción por el proteasoma [294]. Se utilizó como método alternativo y más fisiológico para la estabilización de HIF-1 α , la incubación de células Swan-71 en una cámara de hipoxia durante 24 horas (2% O_2 –5% CO_2 balanceado con nitrógeno - Billups-Rothenberg Inc.). Se evaluó el efecto de la leptina recombinante 100 ng/ml (Sigma) durante la hipoxia y la participación de las vías de señalización MAPK y PI3K. Las células Swan-71 fueron pretratadas durante 30 min según corresponda con un inhibidor farmacológico específico de MAPK y PI3K, PD98059 y Wortmanina respectivamente, en presencia de leptina. Para evaluar si los efectos observados durante la hipoxia dependen de la señalización de HIF-1 α , se pretrataron a las células Swan-71 durante 30 min con 1 μM de 6- Aminoflavona (AF) (Sigma-Aldrich Corp.) para bloquear la expresión del ARN mensajero (ARNm) de HIF-1 α en ausencia o presencia de leptina (100 ng/ml).

La leptina recombinante fue preparada en solución HCl 15 mM / NaOH 7,5 mM. El PD98059 50 μ M, Wortmanina 50 nM y la se prepararon en DMSO.

Tratamiento de explantos placentarios

Se utilizaron placentas humanas a término de embarazos normales por cesárea. Luego, se procedió a realizar la extracción de los explantos placentarios para ello, se lavó 3 veces con PBS 1X estéril con el fin de limpiar el órgano y de remover la sangre excedente. Se eligió para extraer los explantos el tejido vellosa libre de infarto, calcificación o hematoma. Con pinzas y tijera de cirugía se extrajeron muestras de al menos 5 cotiledones. De estas muestras se cortaron trozos de explantos de aproximadamente 15-20 mg con separación de la membrana superficial y la decidua basal, posteriormente se colocaron en PBS 1X frío para un último lavado. Ninguna de las pacientes donantes sufría de embarazo anómalo. El protocolo de uso de las muestras de placenta está aprobado por el comité de ética del Hospital “Profesor A. Posadas”. Se cuenta además con el consentimiento escrito de las donantes. Los tratamientos realizados en cada experimento se detallan en la leyenda de las figuras mostradas en el apartado de resultados. Luego de la extracción, los explantos de placenta se colocaron en placas de 24 pocillos, conteniendo 1 ml de medio DMEM-F12 0% SFB junto a las drogas correspondiente para cada tratamiento.

Al igual que para las líneas celulares los explantos se trataron con concentraciones crecientes de cloruro de cobalto en presencia o ausencia de leptina recombinante, pretratas con los inhibidores PD98059 y Wortmanina durante 24 h conforme al diseño experimental.

Ensayo de proliferación

Las células Swan-71 (25000/pocillo) sembradas en una placa de 24 pocillos en medio DMEM-F12 0% SFB fueron incubadas en presencia o ausencia de 100 ng/ml de leptina. Para el estudio de las vías de señalización involucradas, las células se pretrataron durante 30 minutos con el inhibidor PD98059 (50 μ M) o Wortmanina (50 nM). Se colocaron en estufa a 37°C y transcurridas 24 o 48 horas se evaluó el número de células mediante conteo en cámara de Neubauer.

Ensayo de viabilidad por colorimetría de MTT

El concepto de viabilidad celular hace referencia a la cantidad de células sanas en una población y puede evaluarse utilizando ensayos que permitan determinar la actividad enzimática, la integridad de la membrana celular y la producción de ATP, entre otros indicadores. Comúnmente se utilizan ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular para evaluar el efecto de un fármaco u otro tratamiento.

El ensayo de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio) se basa en la conversión de MTT en cristales de formazán por parte de células vivas, lo que determina la actividad mitocondrial, utilizada en esta tesis para evaluar el número de células viables en proliferación. La actividad mitocondrial es constante y por lo tanto un aumento o la disminución del número de células viables está relacionada linealmente con la actividad mitocondrial [295].

Las células Swan-71 (150000/pocillo) fueron sembradas en una placa de 24 pocillos en medio DMEM-F12 0% SFB durante los tiempos indicados, con los distintos tratamientos. Luego del lavado con PBS, se agregaron 30 μ l de MTT (5 mg/mL) en 150 μ l de medio DMEM-F12 basal 0% SFB, los explantos de 15 mg, fueron cultivados con 0,5 mg/ml de MTT en 1 ml de medio DMEM-F12 basal 0% SFB. Ambos fueron incubados durante 30 min a 37°C. La enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de células metabólicamente activas transforma al MTT en formazán, un compuesto coloreado [295]. Para cuantificar el color azul obtenido se retiró el medio, se disolvieron los cristales en 200- 500 μ l de etanol 100%, se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro de placas "DR-200Bs Microplate Reader" (Diatek). Los resultados se expresaron como relaciones porcentuales de viabilidad celular respecto a los controles de cada caso y para los explantos placentarios

se cuantificó la viabilidad celular en relación a la concentración de proteínas para cada condición.

Preparación de extractos de proteínas y acondicionamiento de muestras para SDS-PAGE

Para la obtención de lisados proteicos, células Swan-71 y BeWo se cultivaron en placas de 10 cm (1x10⁶). Finalizado el tratamiento correspondiente se descartó el medio, se lavó con 2ml de PBS y las células se levantaron mecánicamente utilizando un rastrillo de goma en 1 ml de PBS 1X (scraping). Las muestras se centrifugaron 5 min a 10000 rpm y el pellet se resuspendió en 100 µl de buffer de lisis (Tris 5 mM pH 6,8; EDTA 20 mM; SDS 0,1%; NP40 1%). Para los explantos de placenta luego de los distintos tratamientos, se colocaron en 300 µL de buffer de lisis y se incubaron 30 minutos a -20 °C. Posteriormente se mezclaron por agitación y se centrifugaron a 10000g durante 20 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante.

De las muestras obtenidas se separaron 5 µl para medir la concentración de proteínas. El volumen de muestra restante se desnaturalizó por tratamiento de calor a 96°C durante 5 min en buffer de siembra (Tris 50 mM; HCl pH 7,1; 2% SDS; 2% β-mercaptoetanol; 10% glicerol; EDTA 0,1 M; 0,1% azul de bromofenol).

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas totales de los lisados celulares se determinó por el método colorimétrico del ácido bicinconínico "BCA Protein Assay Kit" (Pierce, ThermoScientific). En placas de 96 pocillos se colocaron 5 µl de muestra con 200 µl del reactivo final (50% de agua destilada, 48% de reactivo A y 2% de reactivo B), durante 30 min a 37°C. La lectura de absorbancia se realizó a 570 nm en un espectofotómetro de placa "DR-200Bs Microplate Reader" (Diatek). La concentración proteica de cada muestra se determinó realizando una curva de calibración de seroalbúmina bovina (BSA) provista por el fabricante.

Preparación de geles desnaturalizantes de proteínas

Las muestras se analizaron utilizando la técnica de SDS-PAGE 12%. En cada gel se sembró igual cantidad de proteínas de cada muestra (30 µg de proteínas/calle). En una calle en paralelo se sembraron marcadores de peso molecular preteñidos (PageRuler Prestained Protein Ladder, ThermoScientific). La electroforesis se realizó en buffer de corrida (Tris 250 mM, glicina 1,92 M), a 120 V durante aproximadamente 2 horas.

Western Blot

Luego de la migración electroforética se procedió a efectuar la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa no cargadas (Hybond, Amersham Pharmacia) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La misma se realizó en buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, 2% metanol) a 120 V durante 90 min en frío. Finalizada la transferencia, se bloqueó la membrana durante 30 min de agitación a temperatura ambiente en leche descremada 5% en buffer PBS.

Luego se lavó la membrana con PBS-Tween 20 0,05% y se procedió a incubarla a 4°C en agitación, toda la noche, con el anticuerpo primario correspondiente (ver tabla 1). Al día siguiente, la membrana se lavó 4 veces con PBS-Tween 0,05% y luego se la incubó, en agitación a temperatura ambiente durante 90 minutos, con el anticuerpo en agitación a 4°C toda la noche con el anticuerpo secundario correspondiente en PBS-leche 5%. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron:

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

Anticuerpo	Dilución	Especie	Marca
Anti- HIF 1 α	1:500	Conejo	Santa Cruz Biotechnology
Anti- PCNA	1:1000	Ratón	Santa Cruz Biotechnology
Anti- Caspasa 3	1:500	Ratón	Invitrogen
Anti- PARP-1	1:1000	Conejo	Santa Cruz Biotechnology
Anti- Caspasa 8	1:1000	Ratón	Santa Cruz Biotechnology
Anti- Citocromo C	1:1000	Ratón	Santa Cruz Biotechnology
Anti- BAX	1:1000	Conejo	Santa Cruz Biotechnology
Anti- BCL-2	1:1000	Conejo	Santa Cruz Biotechnology
Anti- Bid	1:1000	Ratón	Santa Cruz Biotechnology
Anti- Bad	1:1000	Ratón	Santa Cruz Biotechnology
Anti- p- Bad	1:1000	Ratón	Santa Cruz Biotechnology
Anti- p53	1:1000	Ratón	Santa Cruz Biotechnology
Anti- Mdm-2	1:1000	Ratón	Santa Cruz Biotechnology
Anti- Leptina	1:1000	Conejo	Santa Cruz Biotechnology

Tabla MyM 1. Especificaciones de los anticuerpos primarios utilizados.

Luego de la incubación con el anticuerpo secundario, se efectuaron 4 lavados de 5 min con PBS-Tween 0,05% y se reveló por quimioluminiscencia con partes iguales del reactivo A y el reactivo B del “Clarity Western ECL Substrate” (Biorad). Los controles de carga se realizaron con anticuerpo anti-GAPDH 1:1000 (ratón, Santa Cruz). Las bandas se visualizaron con el detector Amersham Imager 600 (GE Health Science). Las bandas fueron densitometradas con el software FIJI/ImageJ. Los datos de intensidad de quimioluminiscencia fueron relativizados a la intensidad de la banda control de GAPDH. Los datos fueron expresados como incremento o disminución relativa respecto al control correspondiente.

Determinación de los niveles de ARN_m

Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN de células Swan-71 luego del tratamiento correspondiente, se retiró el medio, se lavó con PBS y se levantaron las células en PBS con rastrillo de goma. El contenido de cada placa se trasvasó a un tubo y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Luego se añadieron 0,2 ml de cloroformo, se agitó cada tubo durante 15 seg y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 10 min a 4°C.

Luego de la centrifugación, se trasvasó la fase acuosa (superior) conteniendo el ARN a un nuevo tubo. Se agregaron 500 µl de isopropanol por cada tubo y se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4°C. Finalmente se desechó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol 75% por tubo. Se mezcló por inversión y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante, dejando secar el pellet a temperatura ambiente. Se resuspendió el pellet en 25 µl de agua destilada libre de RNasa, homogeneizando completamente. Se midió la concentración de ARN obtenida en un espectrofotómetro para microvolúmenes (NanoDrop, Eppendorf).

Retrotranscripción del ARN mensajero

El ADN copia (ADNc) se obtuvo a partir del ARN total (5 µg) utilizando el kit “Transcriptor first Strand cDNA synthesis Kit” (Roche). La mezcla de reacción se preparó según lo indicado por el kit en 20 µl finales. La reacción se realizó en un termociclador (T-gradient, Biometra) a 50°C por 1 h. La enzima retrotranscriptasa se inactivó calentando a 85°C por 5 min. El ADNc se utilizó inmediatamente para la real time PCR o se guardó a -20°C para ser utilizado posteriormente.

PCR cuantitativa en tiempo real

La mezcla de reacción se preparó con 10 µM de los “primers” sentido y antisentido (ver tabla 2), 3 µl de ADNc, en un volumen final de 20 µl, incluyendo 6,25 µl de la master mix 2X que contiene el colorante SYBR green (Fast Start universal SYBR Green, Roche).

Las reacciones de PCR se realizaron en el Chromo 4 DNA Engine (Biorad). La reacción se inició a 50°C por 2 min, seguida de 10 min a 95°C. Luego se llevaron a cabo 41 ciclos de amplificación con 15 seg de desnaturalización a 95°C, 30 seg de apareamiento a 58°C y 30 seg de extensión a 72°C. Los datos obtenidos fueron recolectados y analizados con el programa Opticon Monitor 3.1.32 (BioRad Laboratories, Inc). La cuantificación relativa se calculó de acuerdo al método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ [238]. Para las muestras tratadas, la evaluación de $2^{-\Delta\Delta CT}$ indica el cambio en la expresión génica, normalizado para los genes de mantenimiento (CICLOFILINA y GAPDH), y en relación con las células control. La especificidad de las amplificaciones se confirmó mediante el análisis de curvas de “melting”. Las mezclas de reacción sin transcriptasa reversa o ARN se realizaron en paralelo para garantizar la ausencia de contaminación de la muestra. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado con un mínimo de dos muestras por experimento.

Gen	Primer sentido	Primer Antisentido
BAD	5'-CGAGTCTTCCAGTCCTGGTG- 3'	5 -'CCAAAGGAGACAGCACGGAT- 3'
BCL-XL	5' -CCTG CCTGCCTTTGCCTAA- 3'	5' -TGGGCTCAACCAGTCCATTG- 3'
MCL-1	5'-AAGAGGCTGGGATGGGTTTG-3'	5'- CAGCAGCACATTCTGATGC-3'
BAK	5'- TTTACCGCCATCAGCAACCT-3'	5'-ATAGGCA TTCTCTGCCGTGG-3'
BID	5'-AGCACAGTGCGGATTCTGTC-3'	5'-ACCGTTGTTGACCTCACAGT-3'
BAX	5'-TTTGCTTCAGGGTTTCATC-3'	5'-CGTCCCAAAGTAGGAGAGGA-3'
BCL-2	5'-CCTGTGGATGACTGAGTACC-3'	5'-GAGACAGCCAGGAGAAATCA-3'
CASPASA-3	5'-GCAGCAAACCTCAGGGAAAC-3'	5'-TGTCGGCATACTGTTTCAGCA-3'
p-53	5'-GGAAGAGAATCTCCGCAAGAA-3'	5'-AGCTCTCGGAACATCTCGAAG-3'
CICLOFILINA	5'-CTTCCCCGATACTTCA-3'	5'-TCTTGGTGCTACCTC-3'
GAPDH	5'-TCCCTGAGCTGAACGGGAAG-3'	5'-GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT-3'

Tabla MyM 2. Secuencias de los “primers” utilizados

Ensayo de fragmentación del ADN

Luego de los tratamientos correspondientes, se homogeneizaron los explantos placentarios con 500 µL buffer de lisis (1% SDS, 50 mM EDTA, 50 mM, 50 mM NaCl). Luego se adicionó proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó a 55°C durante 2 horas. Finalizada la incubación se centrifugaron las muestras a 15000 rpm durante 15 minutos en frío, a los sobrenadantes se les agregó NaCl 5 M y posterior agitación y centrifugación a 15000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se transfirieron los sobrenadantes a tubos limpios, se agregó el doble de volumen de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se dejaron las muestras durante la noche a -20°C. Al día siguiente, se centrifugaron a 15000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, el precipitado se dejó secando en estufa a 37 °C y se resuspendió en 100 µl de H₂O estéril. Para evidenciar la fragmentación de DNA, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2% y mediante tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) se visualizó el patrón de bandas del DNA fragmentado.

Se utilizó el detector G:Box SYNGENE. Se cuantificaron las últimas 5 bandas de menor peso molecular mediante el programa Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

Inmunofluorescencia Indirecta

Las células Swan-71 se cultivaron sobre cubreobjetos circulares (12 mm) dispuestos en placas de 24 pocillos y sometidas a los tratamientos correspondientes. Luego, se retiró el medio, se lavó con PBS y las células se fijaron con 300 µl de paraformaldehído al 4% durante 30 min y se permeabilizó con tritón 0,1% v/v 2 veces durante 10 min. Posteriormente los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con una solución al 2% de BSA ("Bovine Serum Albumin") en PBS durante 1 h a temperatura ambiente durante 1 h. Se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente diluido en PBS 1X:

- Anti Ki-67 (1:100, Cell Signaling)
- Anti HIF-1α (1:50, Santa Cruz Biotechnology)
- Anti p53 (1:100, Santa Cruz Biotechnology)

Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS o tritón 0,1% v/v de 10 min y a continuación se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad con el anticuerpo secundario fluorescente acoplado a Alexa Fluor® 488 (1:1000, anti-IgG de ratón o de conejo, Thermofisher).

Luego de 3 lavados de 10 min cada uno con PBS 1X, se tiñeron los núcleos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Thermofisher) durante 10 min a temperatura ambiente. Se realizó el montaje con una gota de Prolong Antifade (Thermofisher) y se observó con un microscopio de fluorescencia invertido (Microscopio Olympus IX81) equipado con una cámara digital CCD EXi Aqua (QIMAGING). Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa FIJI/ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

Ensayo de migración celular

El ensayo de cierre de “herida” tiene como objetivo el estudio de la migración celular. Se basa en la observación del comportamiento celular luego de realizar una herida en la monocapa confluyente, en el cual las células del borde se moverán hacia la brecha hasta establecer nuevos contactos célula-célula, cerrando así la herida. Las células Swan-71 (125000 células/pocillo) fueron crecidas a confluencia en medio DMEM-F12 10% SFB en placas de 12 pocillos, las cuales previamente fueron marcadas con rayas paralelas en el reverso. Para cada uno de los tratamientos, se analizaron las heridas correspondientes de por lo menos tres monocapas y se realizaron tres ensayos independientes en cada caso. Finalizado cada tratamiento, sobre las monocapas confluentes se realizó manualmente una herida en el centro de los pocillos con un tip de 200 µL transversal a las rayas realizadas en el reverso de las placas, lavándose suavemente con PBS estéril para remover las células no adheridas. Posteriormente se agregó medio fresco basal con los tratamientos correspondientes.

Las monocapas con la herida se examinaron en los tiempos 0, 8 y 12 horas y se fotografiaron usando un microscopio de Epi-fluorescencia Zeiss Ax10. Para el análisis se utilizó el paquete de software ImageJ con la herramienta MRI Wound Healing que mide el área de la herida en las distintas fotos de cada tiempo [296]. Para cuantificar la tasa de migración celular se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de cierre de herida} = \frac{\text{Área } t \text{ 0h} - \text{Área } t \text{ X h}}{\text{Área } t \text{ 0h}} \times 100$$

Donde (tXh) corresponde a los distintos tiempos de incubación.

Análisis estadístico

Los valores obtenidos en los distintos ensayos se analizaron estadísticamente utilizando los programas GraphPad Prism 8. En todos los casos, se realizaron como mínimo tres ensayos independientes. Todos los valores se expresaron como media \pm SEM. La significancia de los resultados se analizó mediante la prueba T de Student para la comparación de 2 muestras o mediante el análisis de varianza de una vía o dos vías (ANOVA) seguido de las pruebas post-hoc de Tukey o Dunnet. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Modelo de inducción de hipoxia química

La hipoxia es un tipo de estrés celular que genera una cascada de señalización intracelular que deriva en la activación o inhibición de distintos procesos celulares como la supervivencia celular o la apoptosis. Estos efectos contrapuestos dependen de la severidad y duración de la hipoxia. Durante el inicio del embarazo, la placenta humana se desarrolla en un ambiente hipóxico causado por la oclusión de las arteriolas espirales uterinas por los CTBev y es un período crucial para el desarrollo de un embarazo exitoso. En entornos con poco oxígeno, los factores inducibles por hipoxia (HIF) son los principales reguladores en la transcripción de varios genes. Varias alternativas se han utilizado para imitar la hipoxia. Uno de los modelos más utilizados y llevado a cabo en este trabajo es el de inducir una hipoxia química mediante la utilización de cloruro de cobalto dado que estabiliza la vida media de los factores inducibles por hipoxia en condiciones normales de oxígeno [297].

Estabilización de HIF-1 α luego del tratamiento con CoCl₂ en células trofoblásticas

Análisis de la expresión de HIF-1 α

El modelo de estabilización del factor HIF-1 α se validó determinando el efecto del tratamiento con CoCl₂ sobre las células citotrofoblásticas. Para ello, células Swan-71 fueron incubadas con concentraciones crecientes de CoCl₂ 50, 100 o 250 μ M durante 24 y 48 h. Luego del tratamiento se evaluó la expresión de HIF-1 α mediante Western blot.

En la **Figura R1 A y B** se muestran una banda específica de 120 kDa, el tamaño esperado para esta proteína. El análisis densitométrico de las bandas indicó que la incubación con CoCl₂ incrementó la expresión de HIF-1 α al aumentar la dosis y el tiempo de tratamiento. Dado que parte de este estudio se llevó a cabo utilizando la línea celular derivada de un coriocarcinoma BeWo, evaluamos el efecto del tratamiento con CoCl₂ durante 24 horas en esta línea celular. Como se muestra en el apartado **C**, 100 μ M de CoCl₂ induce la estabilización de HIF-1 en células trofoblásticas BeWo.

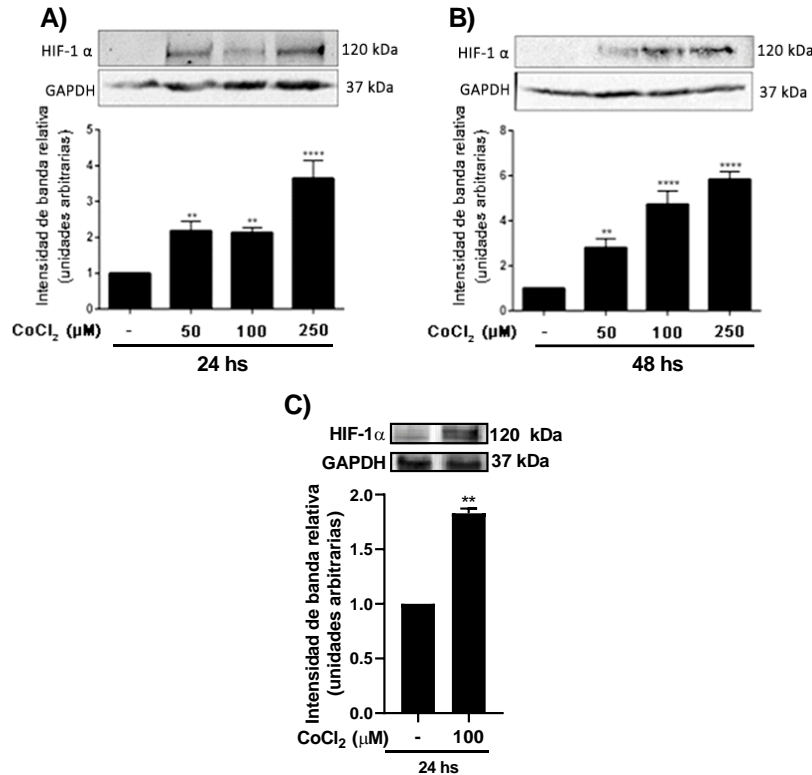


Figura R1: Estabilización de HIF-1α en presencia del CoCl₂ en células trofoblásticas. Se trataron células Swan-71 con 50 (C50), 100 (C100) o 250 (C250) μM de CoCl₂ durante 24 h (A) o 48h (B). Células BeWo se incubaron en presencia de 100 μM de CoCl₂ durante 24 h (C). Se determinó por Western blot la expresión de HIF-1α. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. **p<0,01 y ****p<0,00001 respecto al control no tratado (-).

Por lo tanto, el tratamiento con CoCl₂ induce la estabilización del factor HIF-1α en ambas líneas celulares.

Localización subcelular de HIF-1α

Es totalmente aceptado que para que un factor de transcripción ejerza sus efectos a nivel genómico debe translocarse al núcleo, por lo que se estudió la expresión y localización subcelular del factor de transcripción HIF-1α en presencia de CoCl₂ a las 24 y 48 h de tratamiento. La expresión de HIF-1α se determinó por inmunofluorescencia mientras que los núcleos fueron teñidos con DAPI.

Como se muestra en la **Figura R2**, este factor de transcripción posee una localización nuclear. La intensidad de la señal de HIF-1 α nuclear aumentó significativamente en células Swan-71 (**Figura R2 A y B**) y en células BeWo (**Figura R2 C**) después del tratamiento de hipoxia química de manera dosis dependiente, observando una mayor presencia de este factor a las 24 horas de tratamiento con CoCl₂.

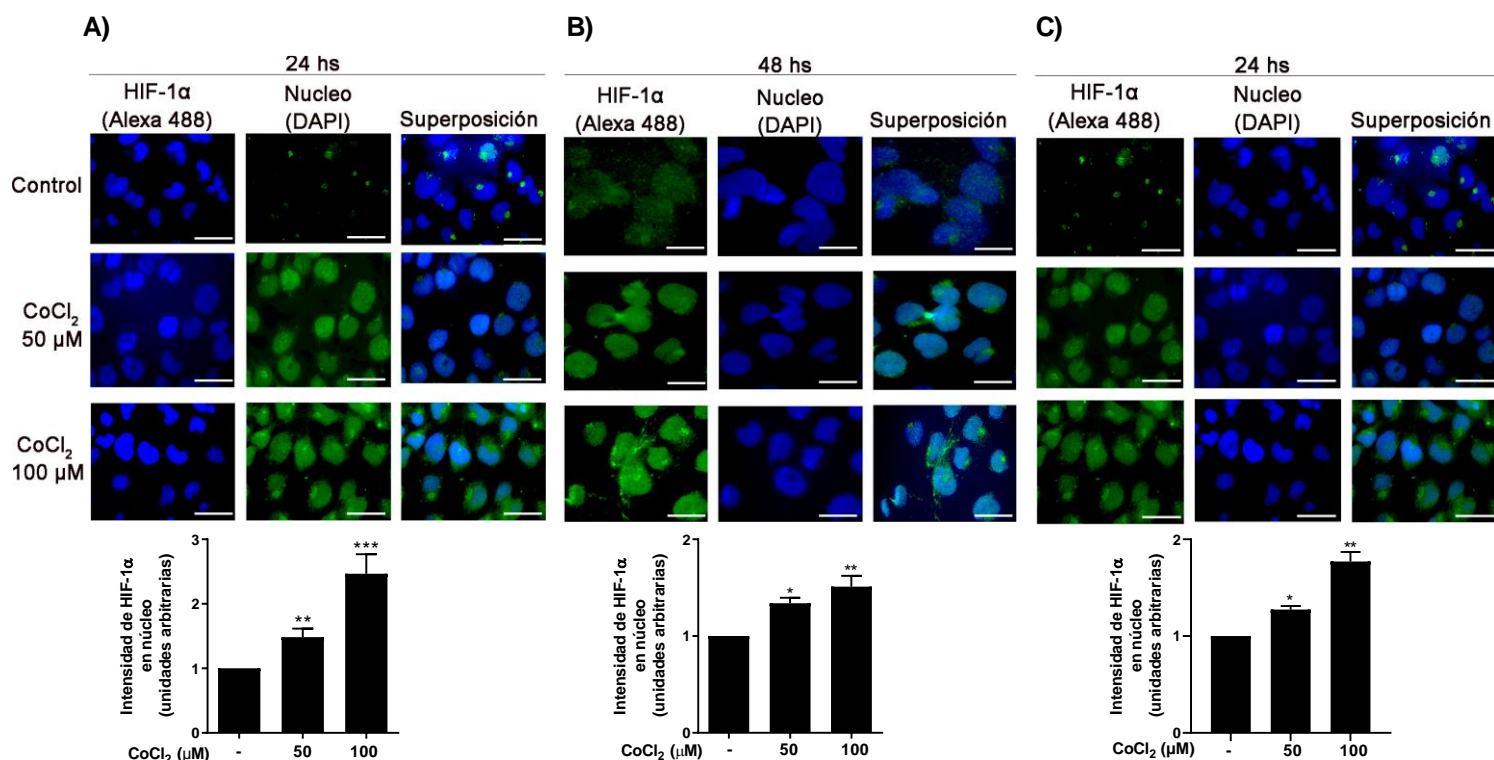


Figura R2: El tratamiento con CoCl₂ induce la expresión y localización de HIF-1 α en el núcleo. Células Swan-71 (A) (B) o BeWo (C) se trataron con 50 o 100 μ M de CoCl₂ durante 24 h (A)(C) o 48h (B). La expresión y localización de HIF-1 α fue evaluada por Inmunofluorescencia (Alexa-488, verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Aumento: 60x. Escala: 8 μ m. Se muestran los gráficos de cuantificación de la expresión nuclear de HIF-1 α (n=4). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 respecto al control no tratado (-).

Estudio de marcadores apoptóticos luego de la estabilización de HIF-1 α en células trofoblásticas

La estabilización de HIF-1 α induce el clivaje de Caspasa-3

Las caspasas son proteasas sintetizadas como zimógenos inactivos, conocidas como procaspasas, que se activan mediante clivaje. Diferentes vías apoptóticas convergen en la activación tardía de un efector apoptótico clave, como lo es la Caspasa-3. [298]. La Caspasa-3 una vez que se activa, desempeña un papel central en la proteólisis de proteínas específicas y en la activación del proceso de apoptosis. Actúa como un "interruptor de ejecución", llevando a cabo los eventos finales que conducen a la morfología característica de la apoptosis, como la fragmentación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos. Para comenzar a estudiar el proceso apoptótico bajo condiciones de hipoxia química en células trofoblásticas, se realizaron experimentos a distintas concentraciones y tiempos de incubación con CoCl₂. Para ello, se trató a las células Swan-71 y explantos placentarios en presencia de 50, 100 o 250 μ M de CoCl₂ durante 4, 7 y 24 horas, y luego determinamos la expresión de Caspasa-3 mediante Western blot.

El tratamiento con 50 o 100 μ M de CoCl₂ en células trofoblásticas Swan-71 induce la aparición del fragmento p17, péptido observado luego del clivaje de la Caspasa-3 (**Figura R3 A**) a partir de las 7 horas de tratamiento. El incremento en la aparición del fragmento p17 fue evidente desde la mínima concentración de CoCl₂ (50 μ M) luego de 24 horas de incubación. También estudiamos la activación de Caspasa-3 en placentas humanas a término, que representan un modelo más fisiológico. Para ello, explantos placentarios fueron incubados durante 24 horas en ausencia de suero fetal bovino con concentraciones crecientes de CoCl₂. Evidenciamos un patrón similar a lo observado en células Swan-71, al determinar la aparición de Caspasa-3 p17 en explantos placentarios empleando la concentración máxima de CoCl₂ (250 μ M) (**Figura R3 B**).

Cuantificamos la expresión de Procaspasa-3 en ambos modelos celulares y se puede evidenciar en los gráficos **C** y **D** que la intensidad de banda no varió significativamente luego de la exposición al CoCl₂ en los tiempos evaluados.

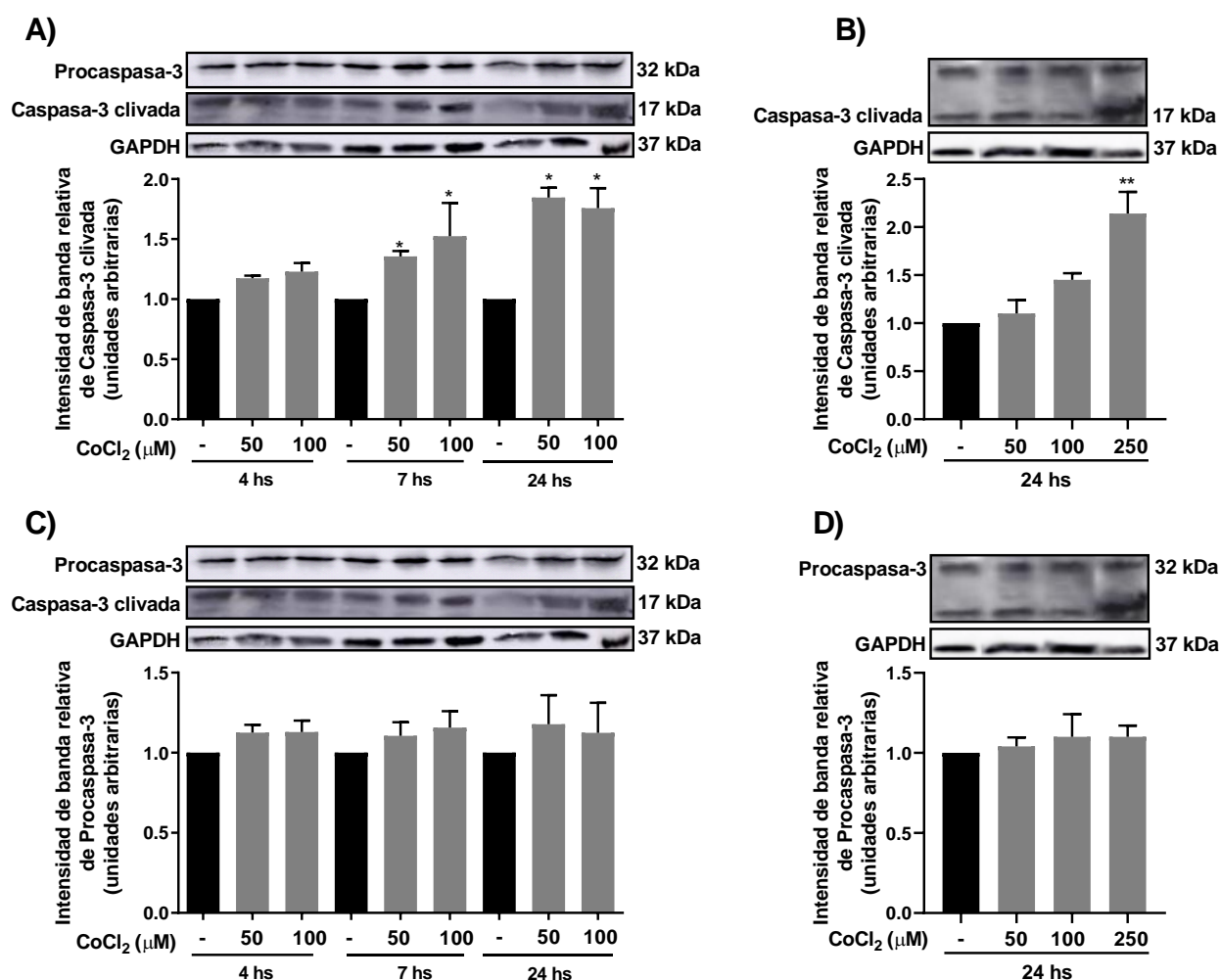


Figura R3: La estabilización de HIF-1 α induce el clivaje de Caspasa-3 en células trofoblásticas. Células Swan-71 (A) (C) o explantos placentarios (B) (D) se trataron con 50, 100 o 250 μ M de CoCl₂ durante 4, 7 y 24 h. Se determinó por Western blot la la expresión del clivaje de Caspasa-3 (A) (B) o de Procaspasa-3 (C) (D). Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=4). *p<0,05 **p<0,01 respecto al control no tratado (-).

Estos resultados indican que la estabilización de HIF-1 α mediante el tratamiento con CoCl₂ induce el clivaje de la Caspasa-3 efectora en células trofoblásticas Swan-71 y en explantos placentarios.

La estabilización de HIF-1 α induce el clivaje de PARP-1

Por otro lado, PARP-1 es una proteína encargada de regular la reparación del ADN, uniéndose a los sitios dañados del genoma. La activación de la Caspasa-3 conduce a la escisión de PARP-1, lo que inhibe el proceso de reparación del ADN mediados por esta proteína. Luego de realizar la curva de concentración de CoCl₂ en células Swan-71, encontramos que a las 7 horas de tratamiento sólo la concentración máxima indujo un incremento en el fragmento escindido de PARP-1, p89. A las 24 horas de tratamiento la mínima concentración de CoCl₂ (50 μ M), mostró una modulación positiva en el clivaje de esta proteína (**Figura R4 A**).

Por otro lado, nos propusimos evaluar si la estabilización de HIF-1 α modulaba la expresión de PARP-1, encontramos que dicho tratamiento no afectó su expresión de manera significativa en los tiempos y concentraciones de CoCl₂ estudiados en células Swan-71 (**Figura R4 C**).

Con el propósito de evaluar si los resultados obtenidos podrían replicarse en explantos de placentas humanas normales a término, se encontró que, en estas muestras de tejido placentario, la exposición a 250 μ M de CoCl₂ indujo un incremento en el clivaje de PARP-1 (**Figura R4 B**).

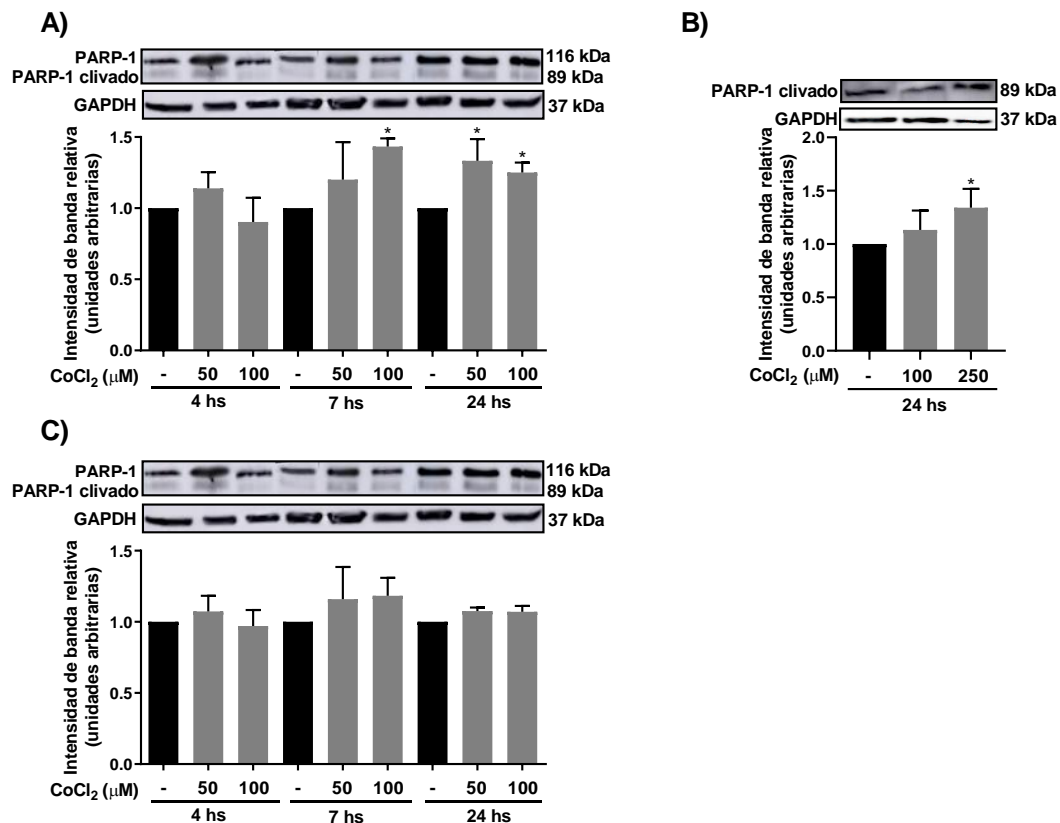


Figura R4: La estabilización de HIF-1 α induce el clivaje de PARP-1 en células trofoblásticas. Células Swan-71 (A) (C) se trataron con 50, 100 o 250 μ M de CoCl_2 durante 4, 7 y 24 h o explantos placentarios (B) durante 24 hs. Se determinó por Western blot la expresión del clivaje de PARP-1 (A) y (B) o de PARP-1 (C). Los paneles inferiores muestran la cuantificación de la intensidad de banda. (n=4). * $p < 0.05$ respecto al control no tratado (-).

En consecuencia, estos resultados sugieren que la estabilización de HIF-1 α mediante el tratamiento con CoCl_2 induce el clivaje de PARP-1 en células trofoblásticas Swan-71 y explantos placentarios.

Rol de la leptina sobre la apoptosis de células trofoblásticas

La apoptosis es un proceso esencial en el desarrollo normal de la placenta, pero su aumento desproporcionado se asocia con diversas enfermedades placentarias. El desarrollo placentario depende de la implantación efectiva y la invasión de la decidua materna por el trofoblasto. En un embarazo normal, la apoptosis del trofoblasto se incrementa a medida que la placenta crece y la gestación avanza. Esta apoptosis placentaria es inducida por varios estímulos, incluidos la hipoxia y el estrés oxidativo.

Se ha demostrado que la leptina tiene efectos tróficos en una variedad de células y tejidos, incluidos el sistema nervioso central, el sistema cardiovascular, el sistema inmunitario, los huesos y los músculos [299, 300]. En muchos de estos tejidos, la leptina actúa como un factor antiapoptótico, protegiendo las células de la muerte celular programada. Por ejemplo, en el cerebro, la leptina ha demostrado ser neuroprotectora al prevenir la apoptosis de las neuronas, lo que sugiere un papel importante en la salud neuronal y la función cognitiva [228]. Del mismo modo, en el sistema reproductivo, la leptina puede influir en la supervivencia de las células germinales y en la función ovárica [301].

Dado que los procesos de proliferación y muerte están íntimamente relacionados, se investigó el efecto de la leptina sobre la apoptosis celular en el contexto de hipoxia química.

Leptina disminuye la apoptosis de células trofoblásticas luego de la estabilización de HIF-1 α

Durante la apoptosis se generan cambios morfológicos y bioquímicos, los cuales pueden ser útiles para su detección. Los cambios morfológicos durante la apoptosis incluyen la contracción de la célula, condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo seguida de la fragmentación del ADN. En última instancia, se producen expansiones y plegamientos de la membrana, dividiéndose en porciones independientes denominados, cuerpos apoptóticos.

Para evaluar el efecto de la hipoxia química en la apoptosis de células Swan-71, se llevaron a cabo diferentes enfoques. Los cambios en las características morfológicas durante la apoptosis fueron identificados bajo un microscopio de fluorescencia después de la tinción con DAPI.

El tratamiento con 50 o 100 μM de CoCl_2 aumentó significativamente el número de núcleos apoptóticos medido por tinción con DAPI (**Figura R5 A y cuantificación B**). La apoptosis tardía se determinó en un modelo más fisiológico utilizando un enfoque experimental diferente, el ensayo de fragmentación del ADN. El tratamiento con 50, 100 o 250 μM de CoCl_2 indujo la generación de pequeños fragmentos de ADN separados por electroforesis en gel de agarosa (**Figura R5 C y cuantificación debajo**) siendo mayor, luego de utilizar la máxima concentración de CoCl_2 . Se realizó un tratamiento con 0.4% de DMSO durante 24 h como control positivo de apoptosis (**Figura R5 A y B**), el cual generó un incremento de más de diez veces en el número de células apoptóticas.

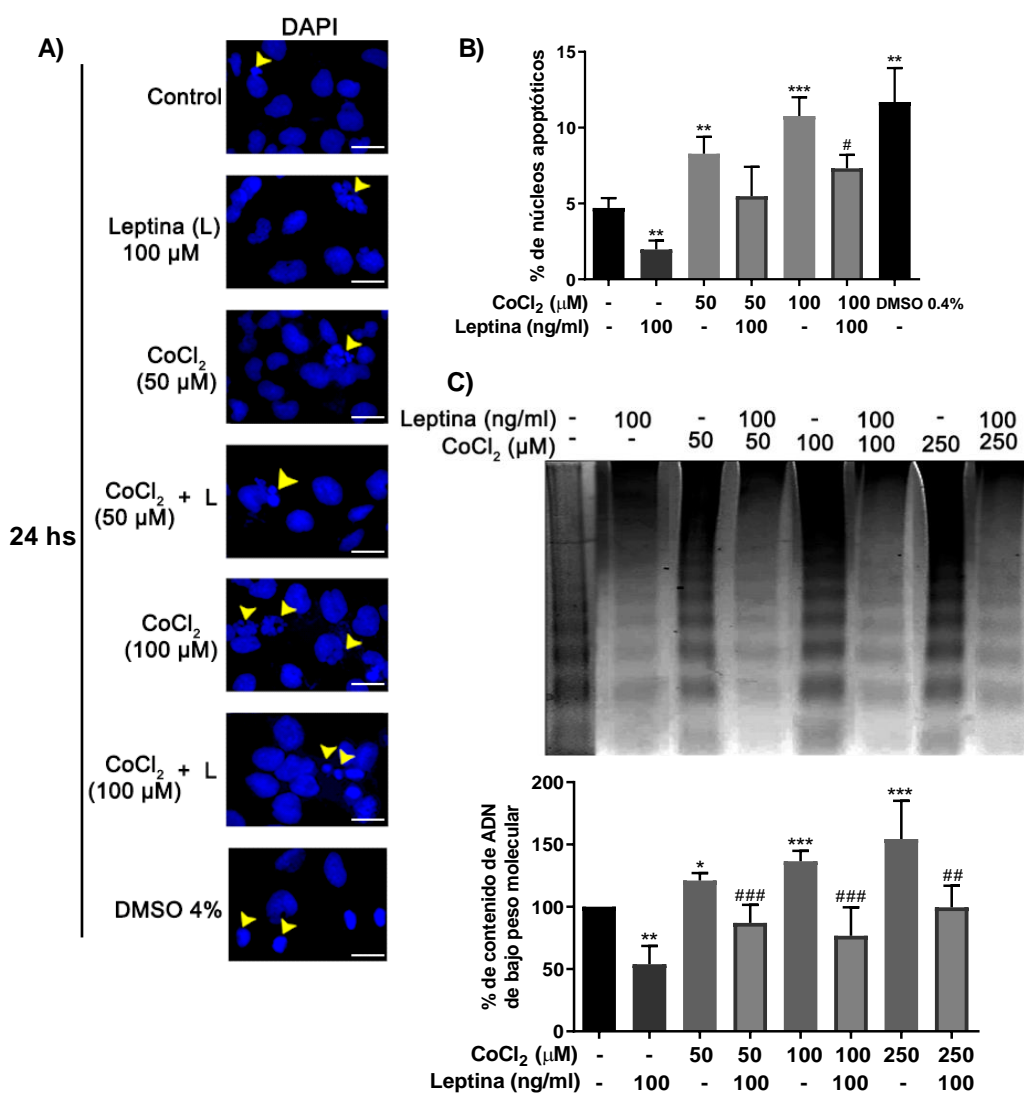


Figura R5: Leptina contrarresta efecto del CoCl₂ sobre la inducción de la apoptosis de células trofoblásticas. Las células Swan-71 (A) o explantos placentarios (C) fueron tratados en presencia o ausencia de 50 o 100 o 250 μ M de CoCl₂, estimuladas o no con leptina (100 ng/ml) durante 24 h. (A) Se determinaron los cuerpos apoptóticos mediante tinción con DAPI. Se muestran fotografías representativas para cada tratamiento. Aumento: 60x. Escala: 8 μ m. (B) Se muestra el gráfico del porcentaje de núcleos apoptóticos (n=4). (C) Se muestra el panel representativo del ensayo de fragmentación del ADN. Debajo se muestra el gráfico de cuantificación de porcentaje de contenido de ADN de bajo peso molecular correspondiente a las últimas 5 bandas (n=4). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001 respecto del control no tratado (-). #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0,001 respecto de cada tratamiento con CoCl₂.

Como hemos reportado previamente, la leptina tiene un efecto trófico en las células trofoblásticas JEG-3 y BeWo, previniendo la apoptosis aumentada por la privación de suero [229]. Por lo tanto, continuamos por determinar el efecto de la leptina sobre la apoptosis inducida en células Swan-71 luego de la hipoxia química. Como se puede ver en la **Figura R5**, la leptina no sólo disminuyó la apoptosis determinada por tinción con DAPI y fragmentación del ADN en condiciones de privación de suero, sino que también redujo los parámetros de apoptosis en células tratadas con 100 y 250 μM de CoCl_2 .

Vías de señalización involucradas en el efecto antiapoptótico de la leptina luego de la estabilización de HIF-1 α

En el apartado anterior observamos que la leptina redujo los parámetros de apoptosis determinados en células tratadas con 50, 100 o 250 μM de CoCl_2 (**ver Figura R5**).

En este sentido trabajos previos de nuestro grupo de investigación demostraron que leptina al unirse a su receptor estimula las vías de señalización de MAPK (ERK 1/2) y PI3K/Akt en células placentarias [85, 285]. Por esta razón nos propusimos profundizar las vías de señalización que modulan el efecto de leptina sobre la apoptosis en este modelo de hipoxia química inducido por el CoCl_2 . Para tal fin se utilizó el inhibidor farmacológico específico para MEK (quinasa de ERK1/2), PD98059 (PD) y un inhibidor irreversible y no competitivo de la fosfatidilinositol-3-quinasa PI3K (quinasa de PIP2), Wortmanina.

Las células placentarias fueron pretratadas con 50 μM del inhibidor PD98059 y 50 nM de Wortmanina durante 30 minutos, se sometieron a 250 μM de CoCl_2 en presencia o ausencia de 100 ng/ml de leptina, pasadas las 24 horas se determinó la fragmentación del ADN.

En los explantos tratados con Wortmanina, el efecto inhibitorio de leptina sobre la aparición de pequeños fragmentos de ADN generados con 250 μM de CoCl_2 , fue bloqueado, sugiriendo que la señalización a través de la vía de PI3K estaría involucrada en el efecto antiapoptótico de leptina (**Figura R6 A**). Observamos resultados similares al inhibir la vía de MAPK (**Figura R15 B**).

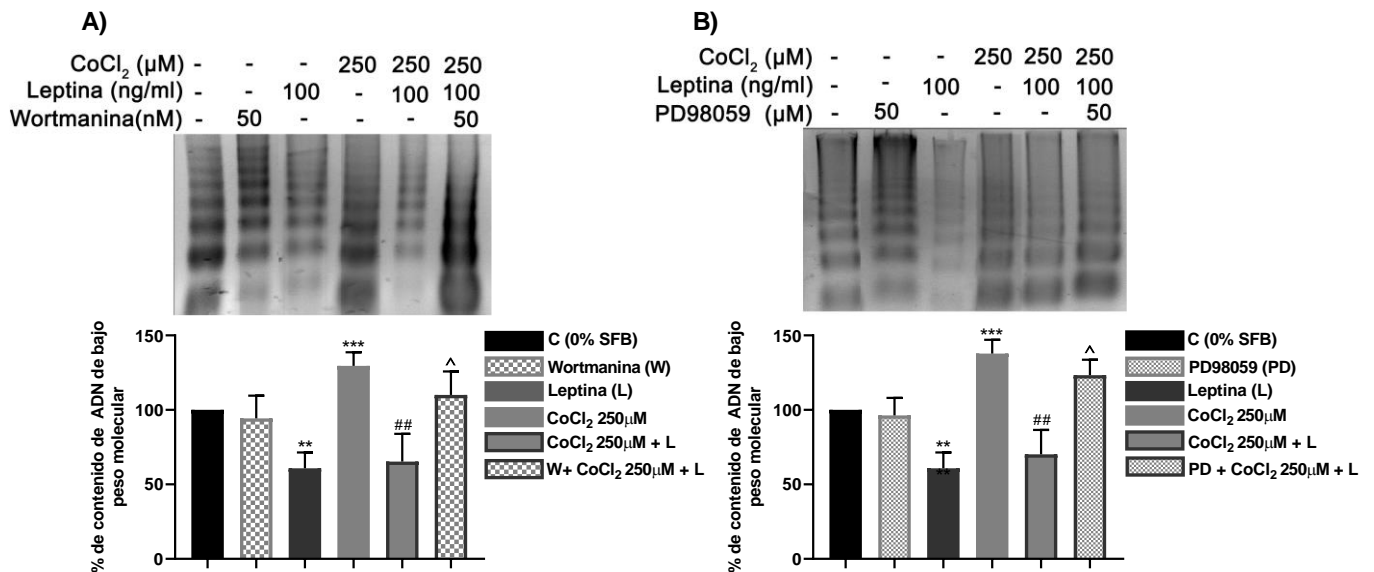


Figura R6: Leptina disminuye la fragmentación del ADN a través de las vías PI3K y MAPK luego de la estabilización de HIF-1α en explantos de placenta humana a término. Explantos placentarios fueron pretratados durante media hora con un inhibidor farmacológico de la vía PI3K (Wortmanina; 50 nM) (A) o de la vía de MAPK (PD98059; 50 μM) (B), en presencia o ausencia de 250μM de CoCl₂ y estimulados con leptina (100 ng/ml). Se muestra el panel representativo de un ensayo de fragmentación del ADN y debajo el gráfico de cuantificación del porcentaje de contenido de ADN de bajo peso molecular de las últimas 5 bandas (n=5). **p<0.01, ***p<0.001 respecto del control no tratado (-). ##p<0.01 respecto del tratamiento con CoCl₂, ^p<0,05 respecto del tratamiento de CoCl₂ con leptina.

Estos resultados sugieren que la leptina podría mediar su efecto antiapoptótico en condiciones de hipoxia química a través de las vías PI3K y MAPK.

Leptina disminuye el clivaje de Caspasa-3 luego de la estabilización de HIF-1α.

Dado que la leptina atenuaría la apoptosis en células trofoblásticas, decidimos analizar la modulación de leptina sobre la expresión de Caspasa-3 mediante qRT-PCR y Western blot.

Los resultados mostraron que la estabilización de HIF-1 α produjo un aumento en el nivel de ARNm de PROCASPASA-3 tanto con el tratamiento con 50 o 100 μ M de CoCl₂ a las 7 horas de incubación (**Figura R7 A**). A su vez luego de 24 h de tratamiento, encontramos que la estabilización de HIF-1 α con ambas concentraciones de CoCl₂ generó una inducción de PROCASPASA-3 más evidente, de hasta 7 veces más respecto del control sin tratar (**Figura R7 B**).

El tratamiento con 100 ng/ml de leptina no produce cambios en los niveles de PROCASPASA-3 respecto del control luego de 7 horas de tratamiento, sin embargo, es capaz de reducir dichos niveles, luego de 24 horas de incubación.

Para ambos tiempos evaluados evidenciamos una modulación negativa de la leptina sobre los niveles génicos de PROCASPASA-3 luego de exponer a las células Swan-71 a 100 μ M de CoCl₂. En este sentido, la leptina bloqueó el efecto de la estabilización del factor HIF-1 α , reduciendo casi a la mitad los niveles de PROCASPASA-3 total (**Figura R7 A y B**).

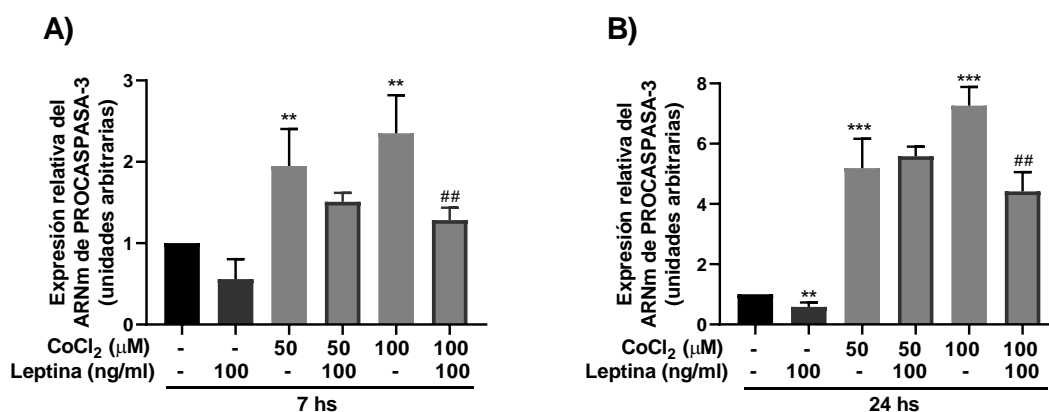


Figura R7: Leptina disminuye la expresión relativa de PROCASPASA-3 luego de la estabilización de HIF-1 α en células Swan-71. Se determinó mediante qRT-PCR la expresión de PROCASPASA-3 en células Swan-71 luego de ser incubadas con 50 o 100 μ M de CoCl₂ durante 7 (A) y 24 h (B) en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml). La expresión de PROCASPASA-3 se relativizó a la expresión de CICLOFILINA y de GAPDH. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 respecto al control no tratado. #p<0.05; ##p<0.01 respecto del tratamiento con CoCl₂.

En la **Figura R8** se muestra el análisis por Western blot de la presencia del fragmento activo de la Caspasa-3 clivada (p17 kDa) en células Swan-71. Se observó que el tratamiento con CoCl_2 incrementó la presencia del fragmento proteolizado en las concentraciones y tiempos analizados, siendo más pronunciado a las 24 horas de incubación con CoCl_2 . La leptina disminuyó significativamente los niveles del fragmento p17 de la Caspasa-3 en ambos tiempos evaluados (**Figura R8 A y B**). Asimismo, la inhibición de la leptina sobre el estímulo proapoptótico inducido por la estabilización de HIF-1 α fue más pronunciada a las 24h para ambas concentraciones utilizadas.

En la línea celular BeWo, derivada de un coriocarcinoma, detectamos que 100 ng/ml de leptina, disminuyó la aparición del fragmento p17, en comparación con el control 0 % SFB y del tratamiento con CoCl_2 (**Figura R8 C**). En la **Figura R8 D**, se observa que la leptina redujo a la casi a la mitad la intensidad de la banda p17 de la Caspasa-3 luego del tratamiento con la concentración más elevada de CoCl_2 (250 μM) (48%) en células trofoblásticas derivadas de explantos placentarios luego de 24 horas de incubación, lo cual refuerza los resultados obtenidos anteriormente.

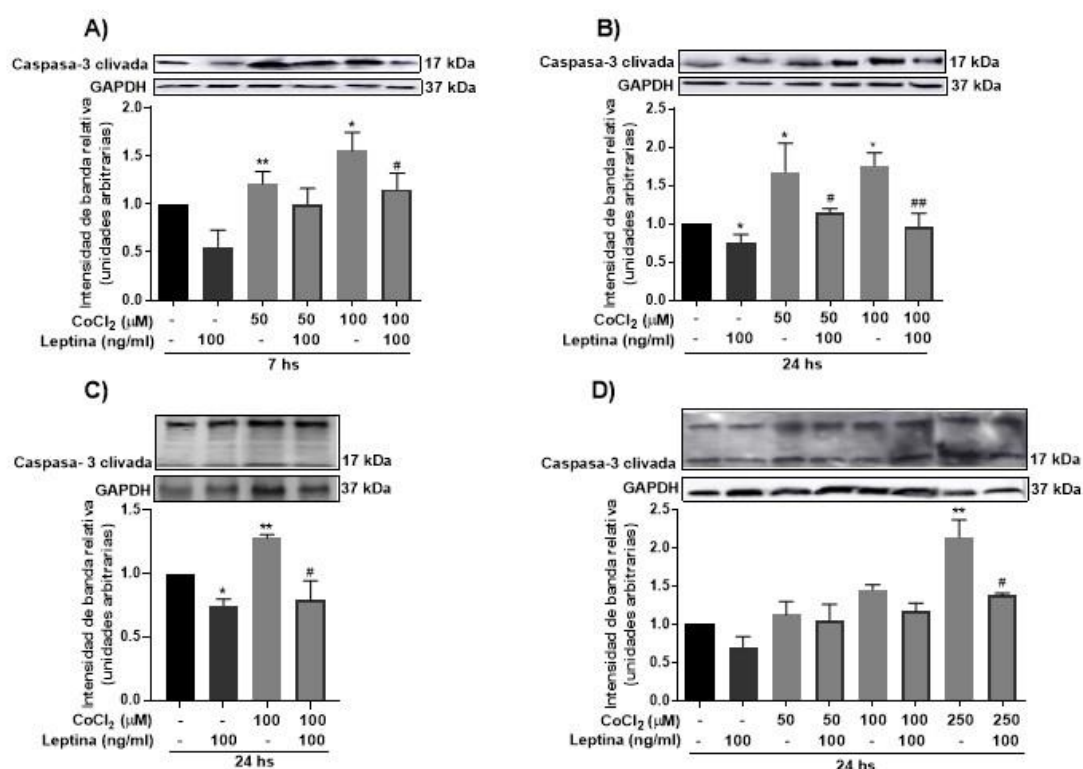


Figura R8: Leptina reduce el clivaje de Caspasa-3 luego de la estabilización de HIF-1α en células trofobásticas. Células Swan-71 (A) (B), BeWo (C) o explantos placentarios (D), se trataron con 50, 100 o 250 μM de CoCl₂ en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml) durante 7 o 24 h. Se determinó por Western blot la expresión del clivaje de Caspasa-3. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=4). *p<0.05, **p<0.01 respecto al control no tratado (-). #p<0.05; ##p<0.01 respecto del tratamiento con CoCl₂.

Vías de señalización involucradas en la regulación de la Caspasa-3 mediada por la leptina luego de la estabilización de HIF-1α.

La leptina ejerce sus efectos biológicos a través de la activación de diversas vías de señalización intracelular. La leptina estimula la activación de JAK2/STAT3 en células placentarias y línea celular JEG-3. También diversos estudios han sugerido que la respuesta al tratamiento con leptina se transmite a través de las vías MAPK y PI3K/Akt en las células de cáncer de ovario [302, 303]. En trabajos anteriores del grupo se ha evidenciado que ambas vías son necesarias para mediar el crecimiento celular estimulado por la leptina y la inhibición de la apoptosis en un modelo de privación de suero fetal bovino [285].

Con el objetivo de identificar los mecanismos que llevan a la modulación del clivaje y activación de Caspasa-3 y PARP-1, se decidió analizar las vías de señalización de PI3K/Akt y MAPK/ERK 1/2. Para tal fin se utilizaron los inhibidores farmacológicos mencionados anteriormente de las vías MAPK y PI3K, PD y Wortmanina, respectivamente. Las células Swan-71 y BeWo fueron pretratadas con 50 μ M del inhibidor PD98059 y 50 nM de Wortmanina durante 30 minutos, en presencia de 100 μ M de CoCl_2 y luego se estimularon con 100 ng/ml de leptina, pasadas las 24 horas se determinaron distintos parámetros.

El análisis de los extractos proteicos de ambas líneas celulares mediante Western blot reveló que, los niveles de Procaspasa-3, no se modificaron significativamente luego de los tratamientos mencionados (**Figura R9**)

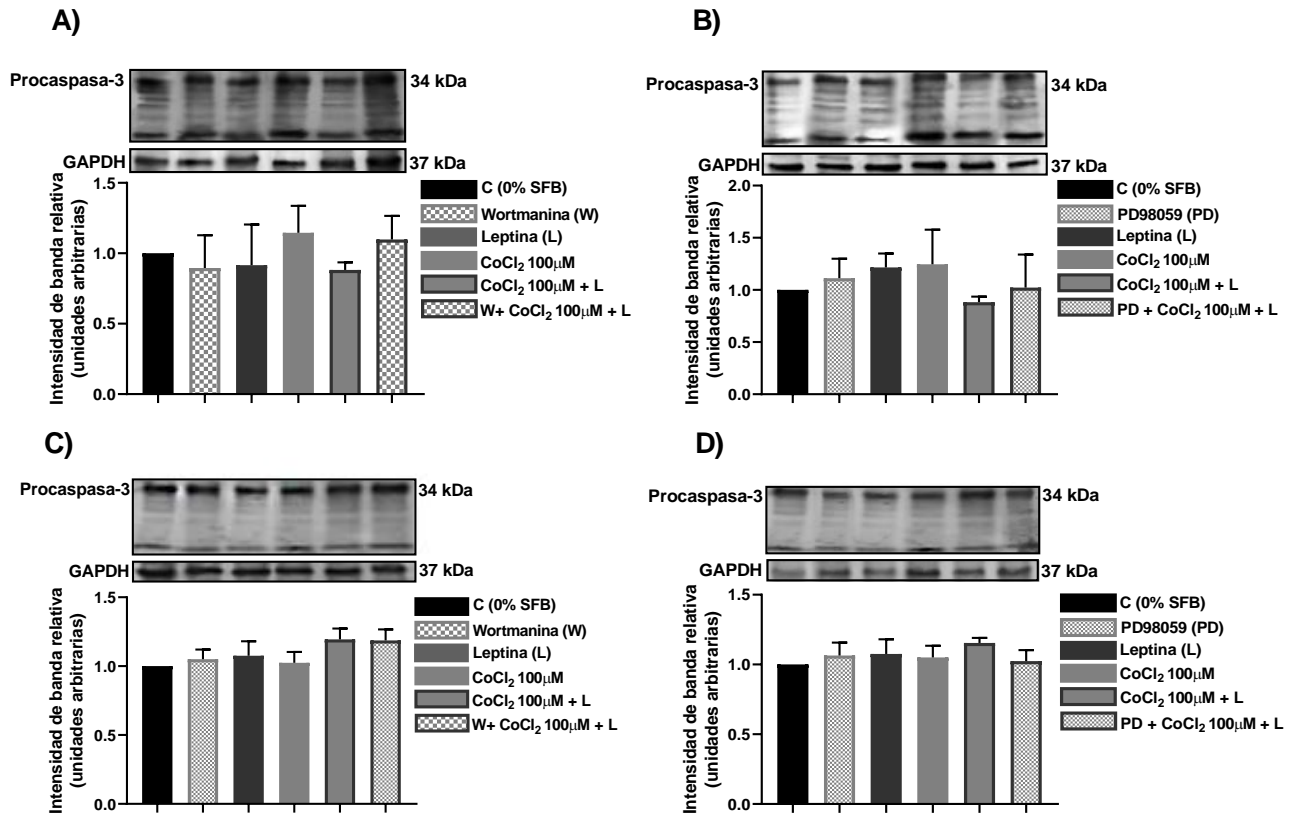


Figura R9: Participación de las vías PI3K y MAPK en la modulación de la leptina sobre expresión de Procaspasa-3 luego de la estabilización de HIF-1α en células trofoblásticas.

Células Swan-71 (A) (B) y BeWo (C) (D) fueron pretratadas durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A) (C) y MAPK (PD98059; 50 μM) (B) (D), en presencia o ausencia de 100 μM de CoCl₂ y estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Se determinó por Western blot la expresión de Procaspasa-3. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=3).

Por otro lado, se han analizado las variaciones en el clivaje de la Caspasa-3 en ambas células trofoblásticas, indicativo de activación de esta proteasa. Al pretratar a las células BeWo y Swan-71 con Wortmanina, observamos que, la modulación negativa de la leptina luego de la exposición con 100 μM de CoCl₂, no se vio alterada, indicando que la vía de señalización de PI3K no estaría involucrada en el efecto de leptina (**Figura R10 A y C**). Sin embargo, la inhibición farmacológica de la vía de MAPK/ERK 1/2 revirtió por completo la acción antiapoptótica de la leptina en ambos modelos utilizados, aumentando la presencia del fragmento clivaje de 17 kDa al nivel similar al observado con 100 μM de CoCl₂ (**Figura R10 B y D**).

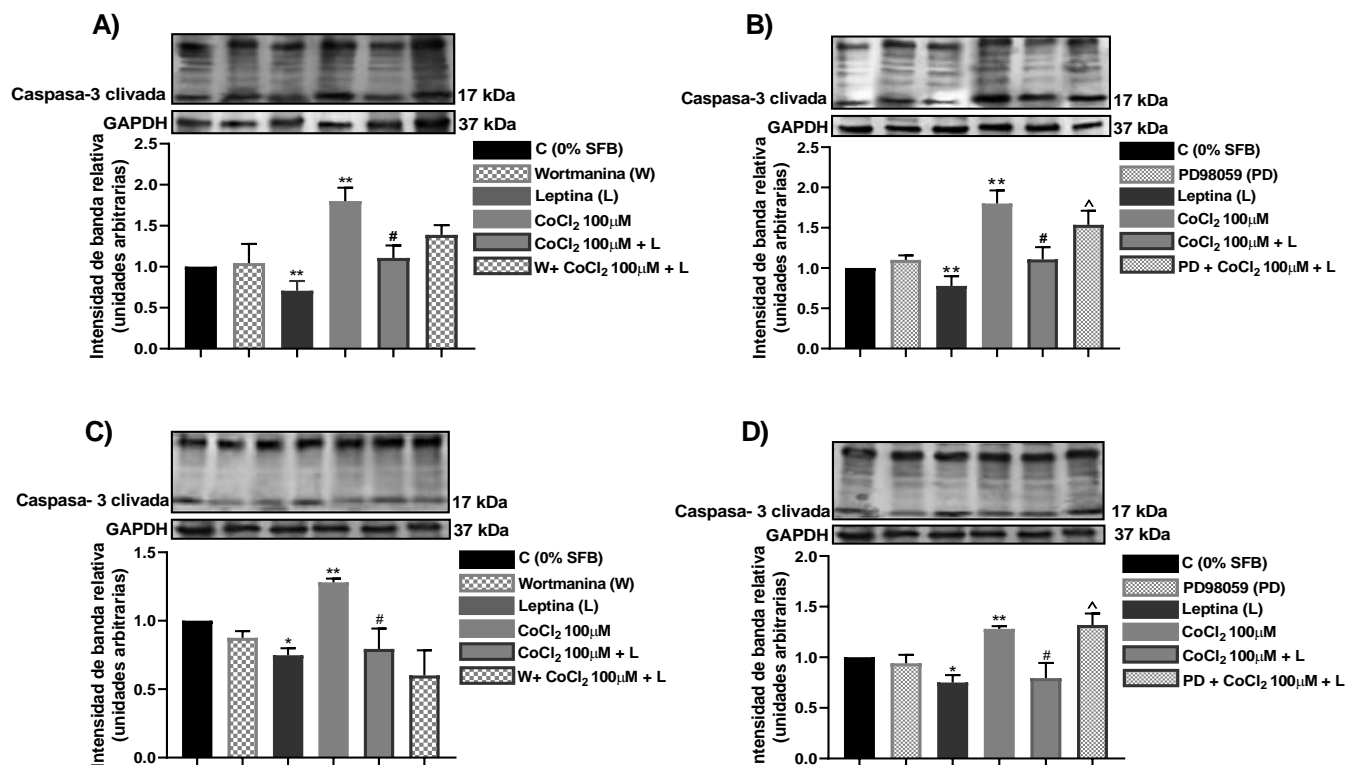


Figura R10: Participación de las vías PI3K y MAPK en la modulación de la leptina sobre el clivaje de Caspasa-3 luego de la estabilización de HIF-1α en células trofoblásticas.

Células Swan-71 (A) (B) y BeWo (C) (D) fueron pretratadas durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A) (C) y MAPK (PD98059; 50 μM) (B) (D), en presencia o ausencia de 100 μM de CoCl₂ y estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Se determinó por Western blot la expresión del clivaje de Caspasa-3. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=3). *p<0.05, **p<0.01 respecto del control no tratado (-). #p<0.05 respecto del tratamiento con CoCl₂. ^p<0,05 respecto del tratamiento de CoCl₂ más leptina.

Estos resultados sugieren que la leptina estimula la activación de la vía de MAPK/ERK 1/2 lo que resulta en una disminución de la apoptosis mediada, en parte, por la reducción en el clivaje de la Caspasa-3 efectora.

Leptina disminuye el clivaje de PARP-1 luego de la estabilización de HIF-1α

Como mencionamos previamente, PARP-1 es una enzima implicada en la reparación del ADN, desempeña un papel crucial en la detección y reparación de daños en el ADN. Para confirmar el efecto apoptótico mediado por el tratamiento de símil hipoxia y estudiar el rol de la leptina en este contexto, se determinó la escisión de la

proteína PARP-1. Antecedentes previos de nuestro laboratorio demostraron que el estrés ácido (pH 6.8) aumentaba la abundancia del fragmento p89 de PARP-1 en las células placentarias y la adición de leptina redujo fuertemente la presencia de p89 de PARP-1 [304].

En la línea Swan-71, la estabilización de HIF-1 α aumentó la presencia del fragmento p89 para ambos tiempos evaluados. Observamos que 100 ng/ml de leptina contrarrestó los niveles de PARP-1 clivaje en ambas concentraciones de CoCl₂ utilizadas tanto a las 7 como 24 horas de tratamiento (**Figura R11 A y B**). Mas aún, la leptina disminuyó significativamente el clivaje de PARP-1 en células Swan-71 luego de 24 horas de tratamiento, en comparación a las células no tratadas (**Figura R11 B**). En explantos placentarios, la estabilización de HIF-1 α utilizando la máxima concentración de CoCl₂ aumentó el clivaje de PARP-1. Como esperábamos, se evidenció una marcada reducción del fragmento de 86 kDa luego de exponerlos a 250 μ M de CoCl₂ y estimulación con leptina (**Figura R11 C**)

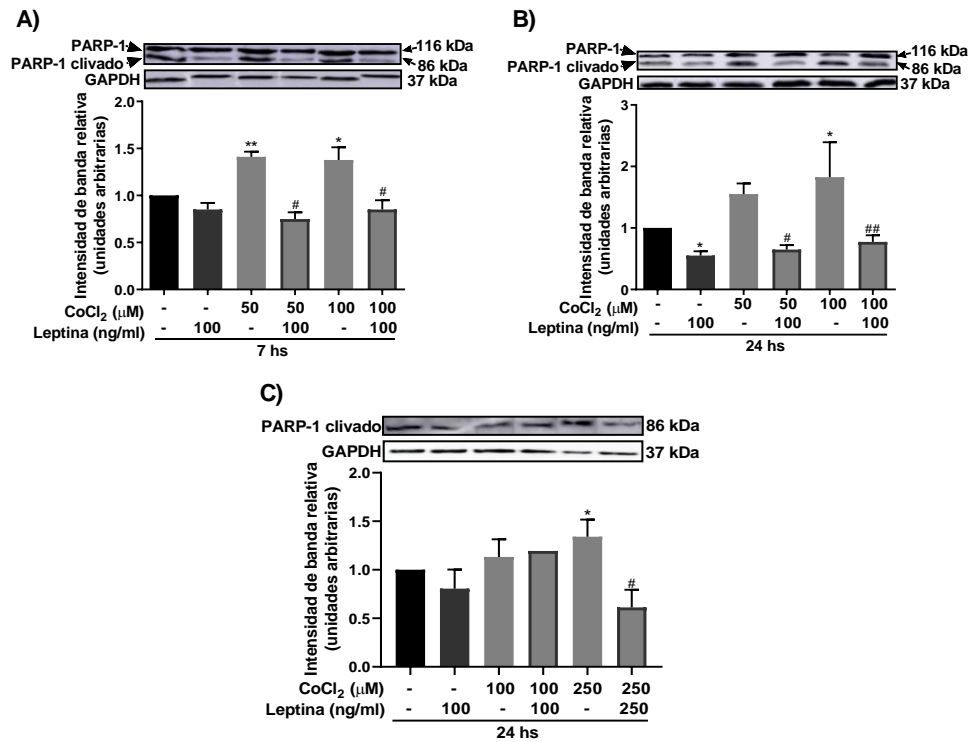


Figura R11: Leptina reduce el clivaje de PARP-1 luego de la estabilización de HIF-1α en células trofoblásticas. Células Swan-71 (A) (B), explantos placentarios (C) se trataron con 50, 100 o 250 μM de CoCl₂ en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml) durante 7 o 24 h. Se determinó por Western blot la expresión del clivaje de PARP-1. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=4). *p<0.05, **p<0.01 respecto al control no tratado (-). #p<0.05; ##p<0.01 respecto del tratamiento con CoCl₂.

En conjunto estos resultados sugieren un efecto protector de la leptina sobre el clivaje de PARP-1 en el estímulo apoptótico generado por la estabilización de HIF-1α.

Vías de señalización involucradas en la regulación de PARP-1 mediada por la leptina luego de la estabilización de HIF-1 α

Al examinar los posibles cambios en la expresión de PARP-1 no detectamos alteraciones en ninguna condición evaluada en células trofoblásticas Swan-71 (**Figura R12 A y B**).

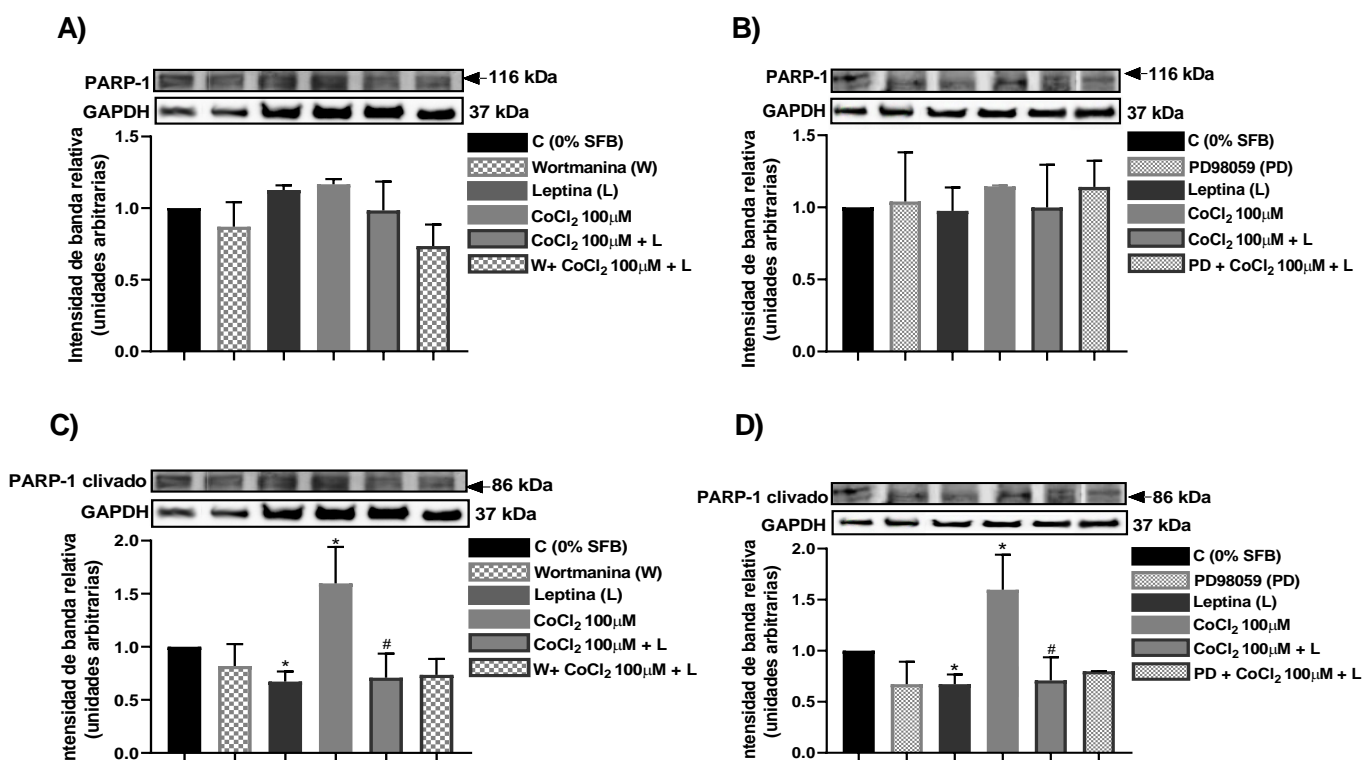


Figura R12: Participación de las vías PI3K y MAPK en la modulación de la leptina sobre la expresión y clivaje de PARP-1 luego de la estabilización de HIF-1 α en células Swan-71. Células Swan-71 fueron pretratadas durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A) (C) y MAPK (PD98059; 50 μ M) (B) (D), en presencia o ausencia de 100 μ M de CoCl₂ y estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Se determinó por Western blot la expresión del clivaje de PARP-1. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda para PARP-1 (A) (B) y PARP-1 clivada (C) (D) (n=3). *p<0.05, **p<0.01 respecto del control no tratado (-). ^p<0,05 respecto del tratamiento de CoCl₂ más leptina.

Si bien observamos que la vía de MAPK/ERK 1/2 estimulada por la leptina luego de la exposición al tratamiento con CoCl_2 regula el clivaje de Caspasa-3 (**Figura R10 B**), y PARP-1 es sustrato de Caspasa-3, en los resultados mostrados en la **Figura R12** no evidenciamos que la vía de MAPK esté involucrada en la acción de leptina sobre el clivaje de PARP-1 en condiciones de hipoxia química.

Al explorar los posibles cambios en el nivel de PARP-1 en explantos placentarios, no observamos cambio alguno luego de 24 horas para los tratamientos evaluados (**Figura 13 A**). A su vez, en la **Figura R13 B** no se observan diferencias significativas respecto de la disminución del fragmento p89 de PARP-1 generado por la leptina luego de estabilizar a HIF-1 α con 250 μM de CoCl_2 , al bloquear la vía de PI3K con Wortmanina.

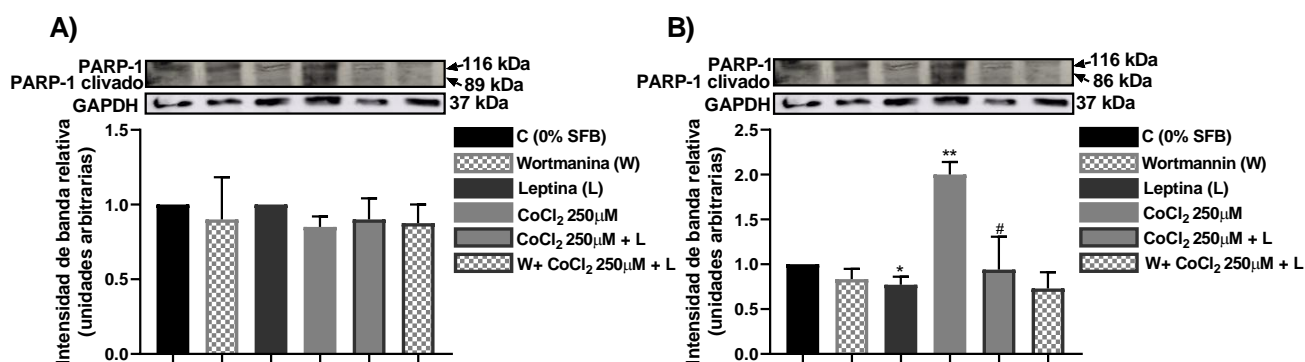


Figura R13: Participación de la vía PI3K en la modulación de la leptina sobre la expresión y clivaje de PARP-1 luego de la estabilización de HIF-1 α en explantos de placenta humana a término. Explantos placentarios fueron pretratados durante media hora con el inhibidor farmacológico Wortmanina (50 nM) e incubados en presencia o ausencia de 250 μM de CoCl_2 y estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Se determinó por Western blot la expresión PARP-1 (A) y PARP-1 clivada (B). Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda para PARP-1 (A) y PARP-1 clivada (B). (n=3). *p<0.05 respecto del control no tratado (-). #p<0.05 respecto al tratamiento con CoCl_2 .

Leptina modula el clivaje de PARP-1 a través de la señalización de HIF-1 α en condiciones de baja concentración de oxígeno (2%)

Para investigar con mayor profundidad el efecto de la leptina en la apoptosis de trofoblastos bajo condiciones de hipoxia en un modelo más fisiológico, se realizaron experimentos incubando células Swan-71 en una cámara hipóxica. Las células Swan-71 fueron tratadas con 100 ng/ml de leptina y se cultivaron durante 24 horas en una concentración de 2% de O₂ en una cámara de hipoxia. Como se muestra en la **Figura R14**, el tratamiento con 100 ng/ml de leptina disminuyó la escisión de PARP-1 durante la incubación a una concentración del 2% de O₂, en relación al control en condiciones de hipoxia.

Para evaluar si este efecto de la leptina es mediado por la estabilización fisiológica de HIF-1 α bajo condiciones hipóxicas, se analizó el efecto de 6-aminoflavona, un fármaco que inhibe la traducción de HIF-1 α . Es importante destacar que los resultados mostraron que el pretratamiento con 1 μ M de 6-aminoflavona durante 30 min y posterior incubación con 100 ng/ml de leptina, aumentó el nivel de PARP-1 clivaje en condiciones de hipoxia.

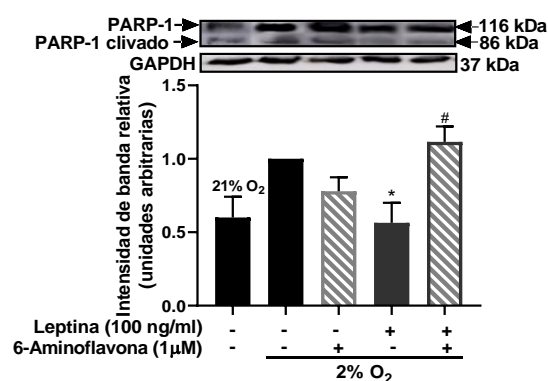


Figura R14: Leptina disminuye el clivaje de PARP-1 dependiente de la señalización de HIF-1 α durante la hipoxia en células Swan-71. Células Swan-71 se pretrataron con 6-aminoflavona (1 μ M) durante media hora, luego se las estimuló con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs expuestas a 2% O₂ en cámara de hipoxia. Se determinó por Western la expresión del clivaje de PARP-1. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=2). *p < 0.05 respecto al control no tratado (-) en hipoxia. #p < 0.05 respecto del tratamiento con leptina.

Estos resultados demuestran que el efecto antiapoptótico de la leptina sobre el clivaje de PARP-1 en condiciones de hipoxia, es dependiente de HIF-1 α .

Vías de señalización involucradas en la regulación de PARP-1 mediada por la leptina bajo condiciones de baja concentración de oxígeno (2%)

Varios estudios recientes, muestran que la vía PI3K/Akt está implicada en la regulación de HIF-1 α y la de su gen diana VEGF en el cerebro de rata en desarrollo durante la hipoxia producida por la isquemia [305, 306]. En distintos tipos de cáncer a su vez, HIF-1 α desempeña un papel importante en el crecimiento y la supervivencia de las células de tumores sólidos. En este contexto, se ha demostrado que HIF-1 α previene la muerte celular a través de la activación de Akt y ERK [307].

Dada la interconexión entre la vía de HIF-1 α y PI3K/Akt, decidimos evaluar si la leptina regula el clivaje de PARP-1 a través de la señalización de PI3K en el contexto de la hipoxia generada por incubación del cultivo celular Swan-71 en cámara de hipoxia. En la Figura R15 se puede observar una disminución del fragmento de 89 kDa en presencia de leptina 100 ng/ml luego de 24 horas de incubación en la cámara de hipoxia, al igual que lo observado en la **Figura R14**. Este efecto se anuló al pretratar a las células Swan-71 con un inhibidor de la señalización de PI3K/Akt.

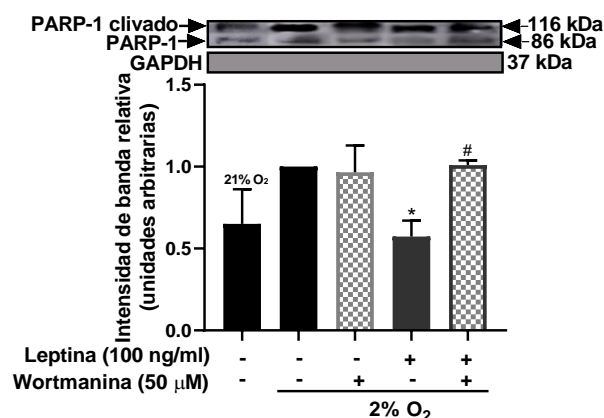


Figura R15: La leptina disminuye el clivaje de PARP-1 a través de la vía de PI3K en células Swan-71 incubadas en cámara de hipoxia con 2% de O₂. Células Swan-71 se pretrataron con el inhibidor farmacológico Wortmanina (50 nM) durante 30 minutos y luego se las estimuló con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs expuestas a una concentración de oxígeno del 2% en cámara de hipoxia. Se determinó por Western blot la expresión del clivaje de PARP-1. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=2).

En consecuencia, la regulación de la leptina sobre el clivaje de PARP-1 en condiciones de hipoxia, es dependiente de la vía de PI3K.

Rol de la leptina sobre la regulación de la expresión de Procaspasa-8 luego de la estabilización de HIF-1α

El exceso de especies reactivas del oxígeno (ROS) causa estrés oxidativo (OS) y afecta la función del tejido y puede estar implicada en enfermedades de origen placentario. Por ejemplo, los trastornos redox se asocian con la preeclampsia de aparición temprana [16]. La hipoxia resulta en estrés oxidativo debido a la generación de ROS. A su vez se ha reportado que, la leptina es una citoquina de supervivencia para los neutrófilos humanos, que retrasa la escisión de Bid, la liberación mitocondrial del Citocromo C, así como la activación de Caspasa-8 y Caspasa-3 en estas células [283]. La Caspasa-8 es una proteasa iniciadora que contribuye al compromiso de las células en continuar el proceso apoptótico y está regulada de manera dependiente e independiente del receptor de muerte durante la apoptosis [308].

Nos propusimos dilucidar la regulación sobre la expresión de la Procaspasa-8 en el contexto de hipoxia química generada por la estabilización de HIF-1 α . Para este propósito, células Swan-71 o explantos placentarios, fueron incubados con concentraciones crecientes de CoCl₂ en presencia o ausencia de leptina durante 24 horas, al finalizar el tratamiento, determinamos la expresión de Procaspasa-8 mediante el análisis de Western blot.

Se puede apreciar en la **Figura R16**, que la utilización de la máxima concentración de CoCl₂ en ambos modelos de células trofoblásticas, generó un incremento en los niveles de Procaspasa-8.

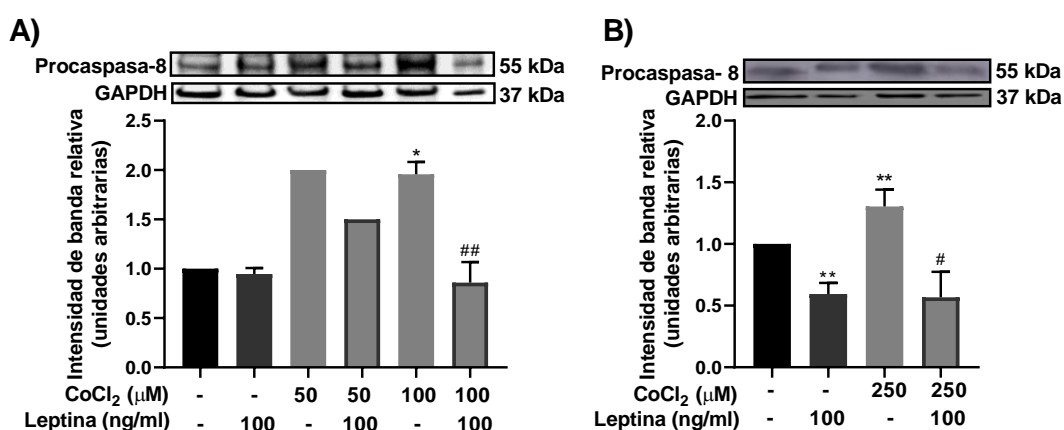


Figura R16: Modulación de la leptina en la expresión de Procaspasa-8 luego de la estabilización de HIF-1 α en células trofoblásticas. Células Swan-71 (A) o explantos placentarios (B) fueron incubadas con 50, 100 o 250 de CoCl₂ en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Se determinó por Western blot la expresión de Procaspasa-8. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=4). *p<0.05, **p<0.01 respecto del control no tratado (-). #p<0.05, ##p<0.01 respecto al tratamiento con CoCl₂.

Adicionalmente observamos que, el tratamiento con leptina disminuyó dicha expresión en explantos placentarios respecto del control 0% SFB (**Figura R16 B**). Por otro lado, se determinó que, luego de estabilizar a HIF-1 α mediante la exposición a 100 o 250 μM de CoCl₂, la leptina fue capaz de disminuir la expresión de la Procaspasa-8 iniciadora tanto en cultivos celulares de Swan-71 como en explantos placentarios.

Vías de señalización involucradas en la regulación de la Procaspasa-8 mediada por la leptina luego de la estabilización de HIF-1 α

Para investigar más a fondo los resultados obtenidos, estudiamos las vías de señalización involucradas en esta acción, para lo cual, pre incubamos a las células trofoblásticas con los inhibidores farmacológicos de las vías de PI3K y MAPK utilizados anteriormente.

En la **Figura R17**, evidenciamos que, en células Swan-71, el bloqueo de las vías de PI3K y MAPK, previene la acción antiapoptótica de la leptina en condiciones de estabilización de HIF-1 α , lo que resultó en un incremento de la expresión de Procaspasa-8 (últimas columnas **Figura R17 A y B**).

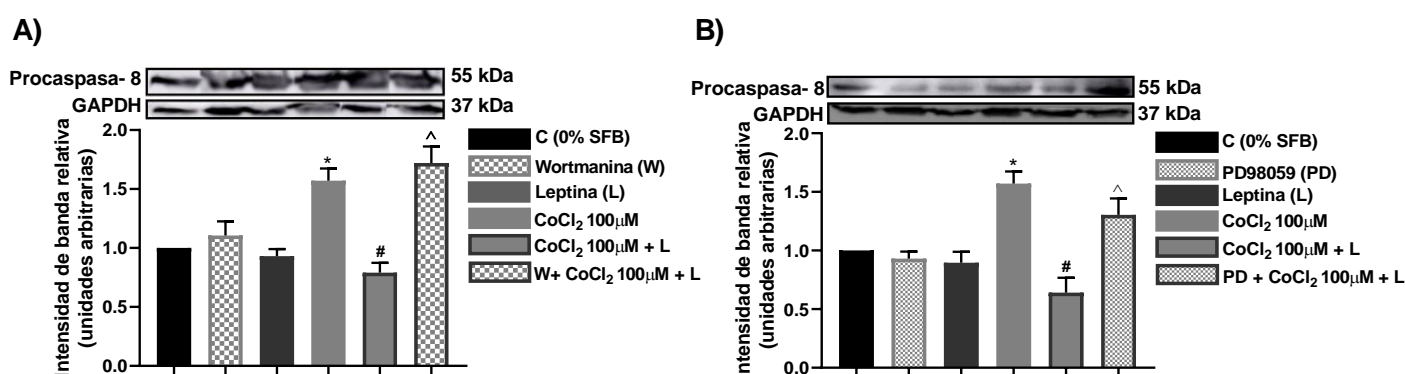


Figura R17: Participación de las vías PI3K y MAPK en la modulación de la leptina sobre la expresión de Procaspasa-8 luego de la estabilización de HIF-1 α en células Swan-71.

Células Swan-71 fueron pretratados durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A) o MAPK (PD98059 50 μM) (B) en presencia o ausencia de 100 μM de CoCl₂ y estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Se determinó por Western blot la expresión de Procaspasa-8. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=4). *p<0.05 respecto del control no tratado (-). #p<0.05 respecto al tratamiento con CoCl₂. ^p<0,05 respecto del tratamiento de CoCl₂ más leptina.

En relación a los explantos placentarios, se observó que la leptina reduce significativamente los niveles de la Procaspasa-8 iniciadora respecto del control en ausencia de tratamiento y suero fetal bovino. Sin embargo, luego de inhibir la vía de MAPK, pero no así la de PI3K, se perdió el efecto protector de la leptina, lo que se evidenció con un aumento en los niveles de la Procaspasa-8 (**Figura R18**).

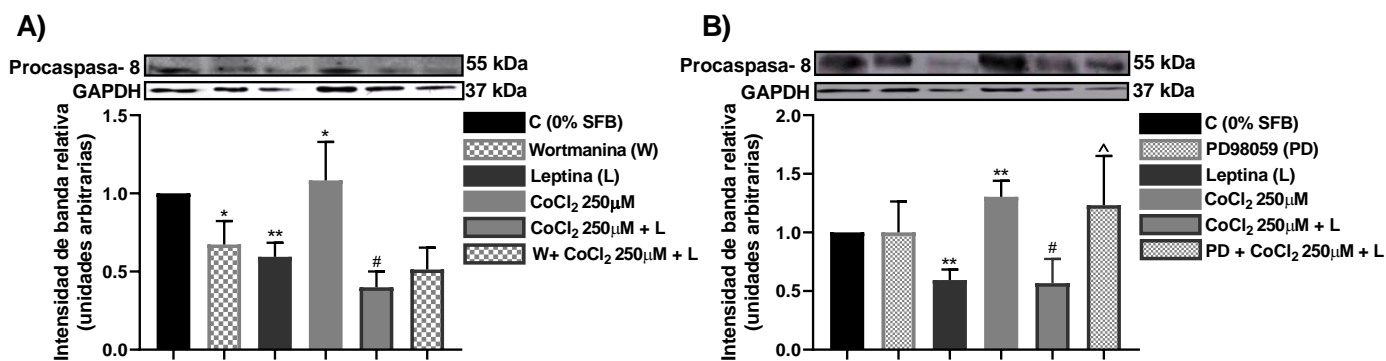


Figura R18: Participación de las vías PI3K y MAPK en la modulación de la leptina sobre la expresión de Procaspasa-8 luego de la estabilización de HIF-1α en explantos placentarios.

Explantos placentarios fueron pretratados durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A) o MAPK (PD98059 50 μM) (B) en presencia o ausencia de 250 μM de CoCl₂ y estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Se determinó por Western blot la expresión de Procaspasa-8. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=4). *p<0.05, **p<0.01 respecto del control no tratado (-). #p<0.05 respecto al tratamiento con CoCl₂. ^p<0,05 respecto del tratamiento de CoCl₂ más leptina.

En resumen, los resultados obtenidos sugieren que la estabilización de HIF-1α aumenta la expresión de la Procaspasa-8 después de 24 horas de tratamiento, tanto en células Swan-71 como en explantos placentarios. Además, en ambos modelos, la leptina tiene la capacidad de reducir dicha expresión después del tratamiento con CoCl₂. Por último, observamos una participación diferencial en las vías de señalización. Mientras que en las células trofoblásticas Swan-71, la leptina modula los niveles de la Procaspasa-8 mediante la activación de ambas vías de señalización estudiadas, en explantos placentarios sólo se evidencia la participación de la cascada de señalización de MAPK, la cual es modulada por la leptina para disminuir dichos niveles.

Rol de la leptina sobre la regulación de la expresión del Citocromo C mediada por la leptina luego de la estabilización de HIF-1 α

La apoptosis es inducida por la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, generada por los efectores proapoptóticos BAX y BAK. Junto con APAF, la señalización mitocondrial, incluida la liberación del Citocromo C en el citosol, promueve la activación de la cascada de caspasas, incluidas las Caspasas efectoras-3 y 7 [309]. Bajo estrés por hipoxia, los factores apoptóticos en las vías intracelulares se combinan con enzimas activadoras de proteínas apoptóticas para formar un complejo que activa a la Caspasa-9 en el citoplasma, y luego la activación subsiguiente de la Caspasa-3 efectora, que lleva a la apoptosis [310].

Dado que la hipoxia genera cambios sobre la liberación del Citocromo C, decidimos profundizar el efecto de la leptina de este factor desencadenante de la apoptosis. En la siguiente figura, se muestran los resultados del análisis de la expresión del Citocromo C, luego del tratamiento con 50 o 100 μ M de CoCl₂, estimuladas con 100 ng/ml de leptina durante 24 horas, determinado mediante Western blot.

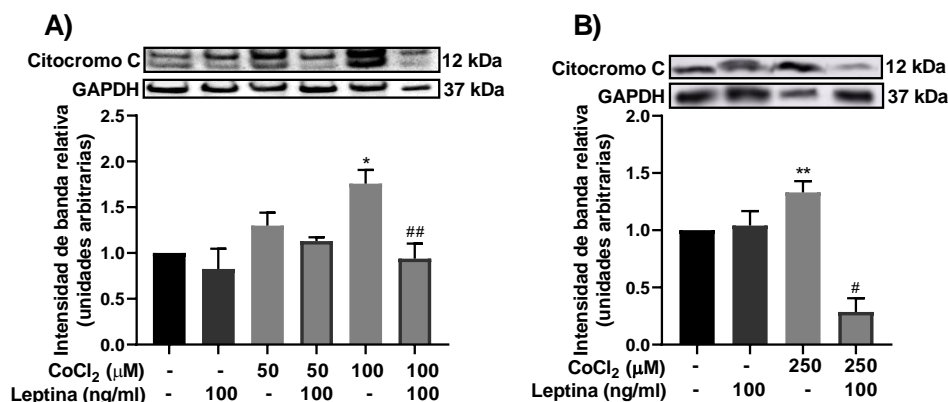


Figura R19: Modulación de la leptina en la expresión del Citocromo C luego de la estabilización de HIF-1 α en células trofoblásticas. Células Swan-71 (A) o explantos placentarios (B) fueron incubadas con 50, 100 o 250 de CoCl₂ en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Se determinó por Western blot la expresión del Citocromo C. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=4). *p<0.05, **p<0.01 respecto del control no tratado (-). #p<0.05, ##p<0.01 respecto al tratamiento con CoCl₂.

En la **Figura R19 A**, se puede observar que en células Swan-71, el tratamiento con 100 μM de CoCl_2 generó un incremento significativo en los niveles del Citocromo C, al igual que 250 μM de CoCl_2 en explantos placentarios (**Figura R19 B**). El co-tratamiento con leptina, redujo marcadamente los niveles del Citocromo C, en ambos modelos estudiados.

Vías de señalización involucradas en la regulación de la expresión del Citocromo C mediada por la leptina luego de la estabilización de HIF-1 α

Los resultados del estudio de las vías de señalización involucradas, se presentan a continuación. En células trofoblásticas Swan-71, el bloqueo de la señalización de PI3K, condujo a un aumento marcado en la presencia del Citocromo C, respecto de la disminución generada por la leptina luego de tratar a las células con 100 μM de CoCl_2 (**Figura R20 A**). Sin embargo, luego de pretratar a las células con el inhibidor PD, no observamos variación en la presencia del Citocromo C (**Figura R20 B**), indicando que el efecto de leptina sobre la expresión del Citocromo C estaría asociado a la vía de la PI3K.

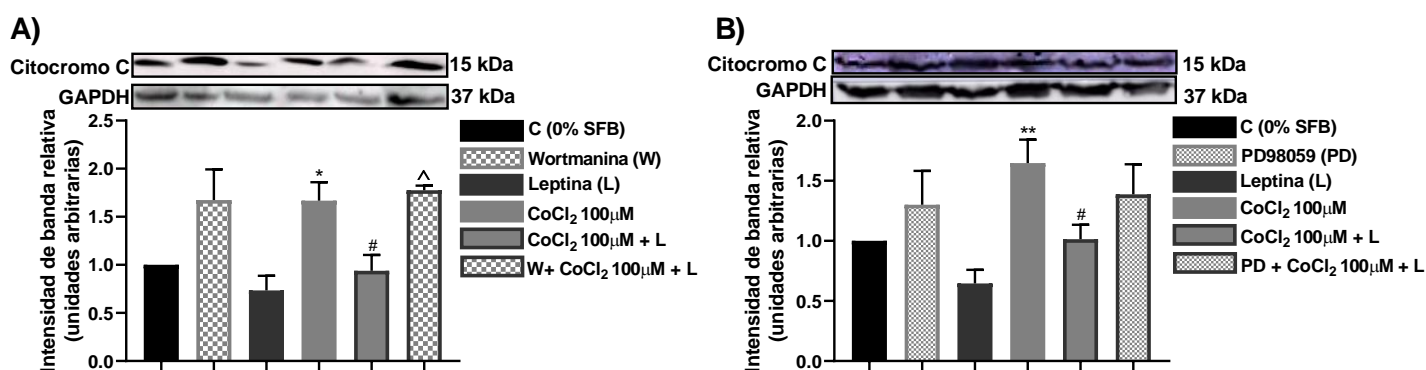


Figura R20: Participación de las vías PI3K y MAPK en la modulación de la leptina sobre los niveles del Citocromo C luego de la estabilización de HIF-1 α en células Swan-71.

Células Swan-71 fueron pretratadas durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A) o MAPK (PD98059 50 μM) (B) en presencia o ausencia de 100 μM de CoCl_2 y estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Se determinó por Western blot la expresión del Citocromo C. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=4). *p<0.05, **p<0.01 respecto del control no tratado (-). #p<0.05 respecto al tratamiento con CoCl_2 . ^p<0,05 respecto del tratamiento de CoCl_2 más leptina.

Resultados similares, obtuvimos al estudiar las vías de señalización involucradas en el efecto de la leptina sobre la expresión del Citocromo C en explantos placentarios, se observó que el bloqueo de la señalización de PI3K, luego de estabilizar a HIF-1 α , indujo un aumento en los niveles del Citocromo C por el tratamiento con leptina (**Figura R21 A**). En tanto, luego de pretratar explantos placentarios con el inhibidor PD, no observamos ninguna alteración significativa sobre los niveles del Citocromo C, generado por la leptina frente a la hipoxia química (**Figura R21 B**).

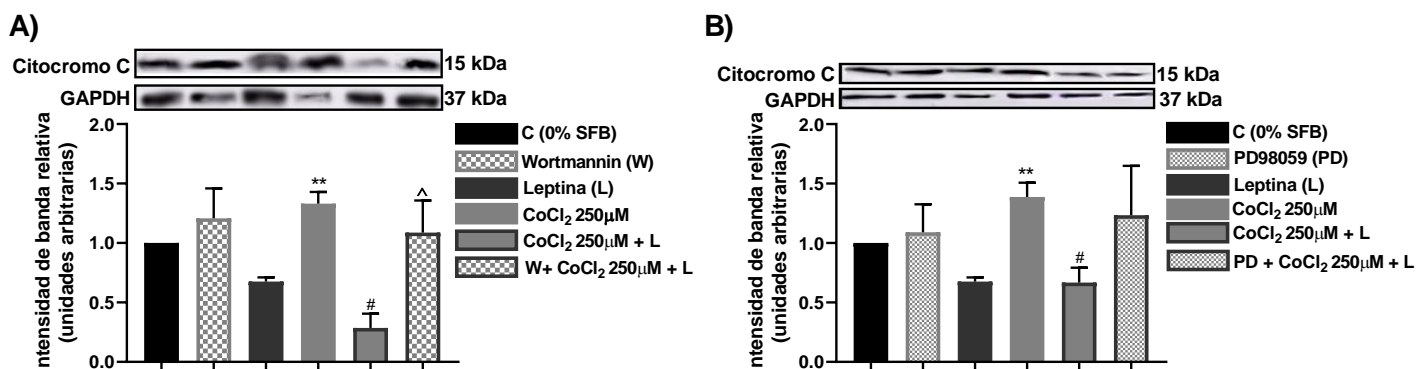


Figura R21: Participación de las vías PI3K y MAPK en la modulación de la leptina sobre los niveles del Citocromo C luego de la estabilización de HIF-1 α en explantos placentarios.

Explantos placentarios fueron pretratados durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A) o MAPK (PD98059 50 μ M) (B) en presencia o ausencia de 250 μ M de CoCl₂ y estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Se determinó por Western blot la expresión del Citocromo C. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=3). #p<0.05 respecto al tratamiento con CoCl₂. ^p<0,05 respecto del tratamiento de CoCl₂ más leptina.

Según estos resultados, la estabilización de HIF-1 α genera un incremento en la presencia del Citocromo C en células trofoblásticas Swan-71 y explantos placentarios. La leptina en este contexto de hipoxia química generado por el tratamiento con CoCl₂, disminuye la presencia del Citocromo C principalmente a través de la vía de señalización de PI3K.

Mecanismos de la leptina sobre la modulación de la apoptosis en células trofoblásticas

La leptina presenta un papel multifacético en la inhibición de la apoptosis y la promoción de la supervivencia celular en diferentes tejidos. Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron el rol antiapoptótico de la leptina sobre células trofoblásticas frente a la privación de suero regulando moduladores de la apoptosis como BCL-2, BAX y Bid [229]. En este capítulo nos propusimos estudiar los mecanismos de acción de la leptina sobre la apoptosis de células trofoblásticas luego de la exposición al CoCl_2 que estabiliza el factor de transcripción inducible por hipoxia, HIF-1 α .

Rol de la leptina sobre la regulación de BAX y BCL-2 luego de la estabilización de HIF-1 α

Durante la apoptosis los miembros de la familia de genes BCL-2 desempeñan un papel importante en su regulación. En la vía mitocondrial de la apoptosis, la membrana externa mitocondrial se permeabiliza para liberar proteínas como el Citocromo C en el citosol, siendo esta participación crucial para la muerte celular por apoptosis. Las interacciones entre los miembros de la familia de proteínas BCL-2 son fundamentales para revertir el proceso de muerte celular. La apoptosis intrínseca está controlada por el equilibrio de los diferentes miembros de esta familia, que pueden verse interrumpido por varios estímulos que conducen a la muerte celular [220].

La superfamilia Bcl-2 se puede dividir en tres categorías: las proteínas antiapoptóticas BCL-2, las proteínas proapoptóticas con un único dominio BH3 y los efectores de muerte BAX y Bak. El equilibrio entre la apoptosis y la proliferación del trofoblasto representa un mecanismo para controlar la invasión trofoblástica [311]. Se ha demostrado que la leptina regula positivamente la familia de BCL-2 con el objetivo de disminuir la apoptosis en distintos tejidos y contextos [220, 312].

Para estudiar los mecanismos de acción de la leptina sobre la apoptosis de células trofoblásticas durante la hipoxia química, se analizó la expresión de distintos miembros anti y proapoptóticos mediante qRT-PCR y Western blot.

Leptina disminuye la expresión de BAX luego de la estabilización de HIF-1 α

Para caracterizar el efecto antiapoptótico de la leptina en células trofoblásticas luego de la estabilización de HIF-1 α , comenzamos por determinar la expresión de BAX, un miembro proapoptótico de la familia BCL-2, en cultivos de células Swan-71 tratadas con 100 ng/ml de leptina en condiciones de hipoxia química durante 7 y 24 horas mediante qRT-PCR y Western Blot.

Como se puede apreciar en la **Figura R22 A**, 100 μ M de CoCl₂, aumentó al doble el nivel de BAX en células Swan-71, medido mediante PCR en tiempo real, luego de 7 horas de tratamiento, mientras que a nivel proteico la estabilización de HIF-1 α generó un incremento en la expresión de BAX desde la mínima concentración de CoCl₂ analizada (**Figura R22 C**). Si bien no evidenciamos una disminución de la expresión génica de BAX luego del tratamiento con leptina en DMEM 0% SFB respecto del control sin tratar, mediante el análisis de Western blot encontramos que el tratamiento con 100 ng/ml de leptina redujo significativamente los niveles de BAX a las 7 horas de tratamiento (**Figura R22 C**).

Luego de 24 horas de tratamiento, para ambas concentraciones evaluadas, la estabilización de HIF-1 α estimuló la expresión génica de este factor proapoptótico. Tal como esperábamos, en este contexto, leptina es capaz de reducir significativamente dichos niveles, lo cual sugiere una función inhibidora de la apoptosis (**Figura 22 B**). De manera preliminar observamos en la **Figura R22 D** una tendencia similar a la observada a las 7 horas, sin embargo, es necesario repetir el experimento para tener resultados representativos estadísticamente.

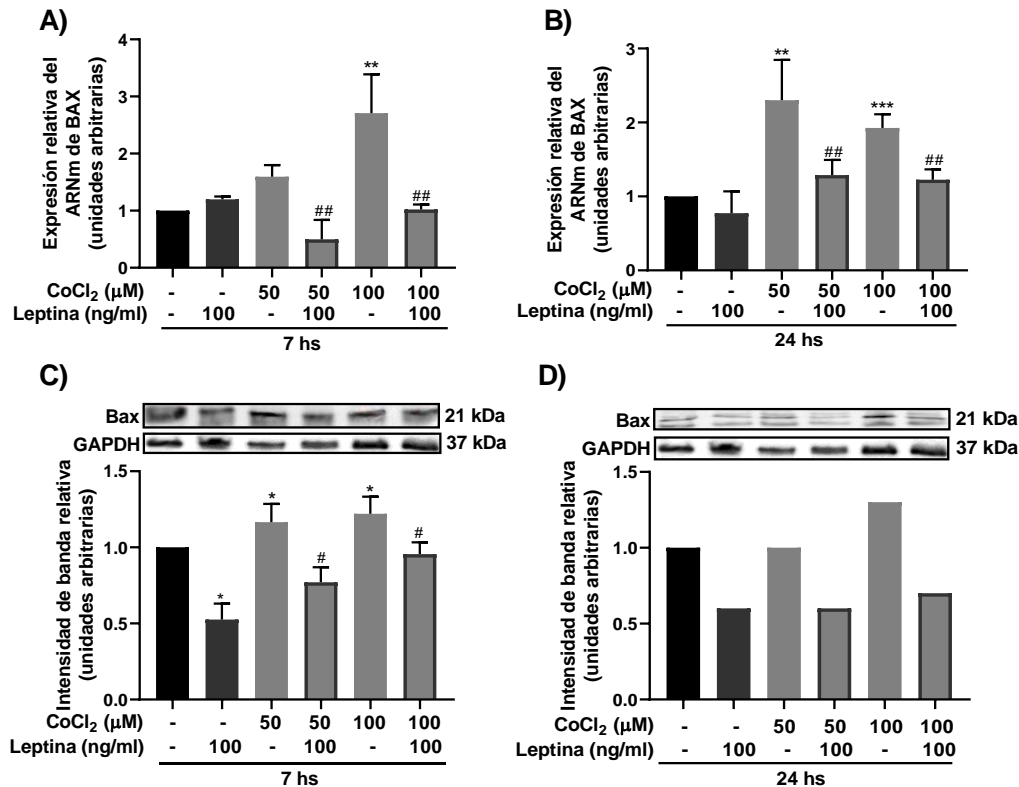


Figura R22: Leptina disminuye la expresión génica y proteica de BAX luego de la estabilización de HIF-1α en células Swan-71. Se determinó por qRT-PCR (A) (B) y Western blot (C) (D) la expresión de BAX en células Swan-71 luego de ser incubadas con 50 o 100 μM de CoCl₂ durante 7 (A) (C) o 24 h (B) (D) en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml). (A) (B) La expresión de BAX se relativizó a la expresión de CICLOFILINA y de GAPDH. (C) (D) Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=3) (n=1; D). *p<0.05, **p<0.01; ***p<0.001 respecto al control no tratado. #p<0.05, ##p<0.01 respecto del tratamiento con CoCl₂.

Leptina aumenta la expresión de BCL-2 luego de la estabilización de HIF-1α

Al analizar los niveles de BCL-2 se observó como contrapartida que, la hipoxia química generada por la presencia de CoCl₂ redujo los niveles de ARNm de BCL-2 en las células Swan-71, determinado mediante PCR en tiempo real luego de 24 horas de tratamiento, al utilizar la máxima concentración de CoCl₂ (**Figura R23 B**). Por otro lado, contrariamente a lo esperado, observamos que, a tiempos cortos de tratamiento, la estabilización de HIF-1α con 50 μM de CoCl₂ generó un aumento en la expresión relativa del gen de BCL-2 (**Figura R23 A**).

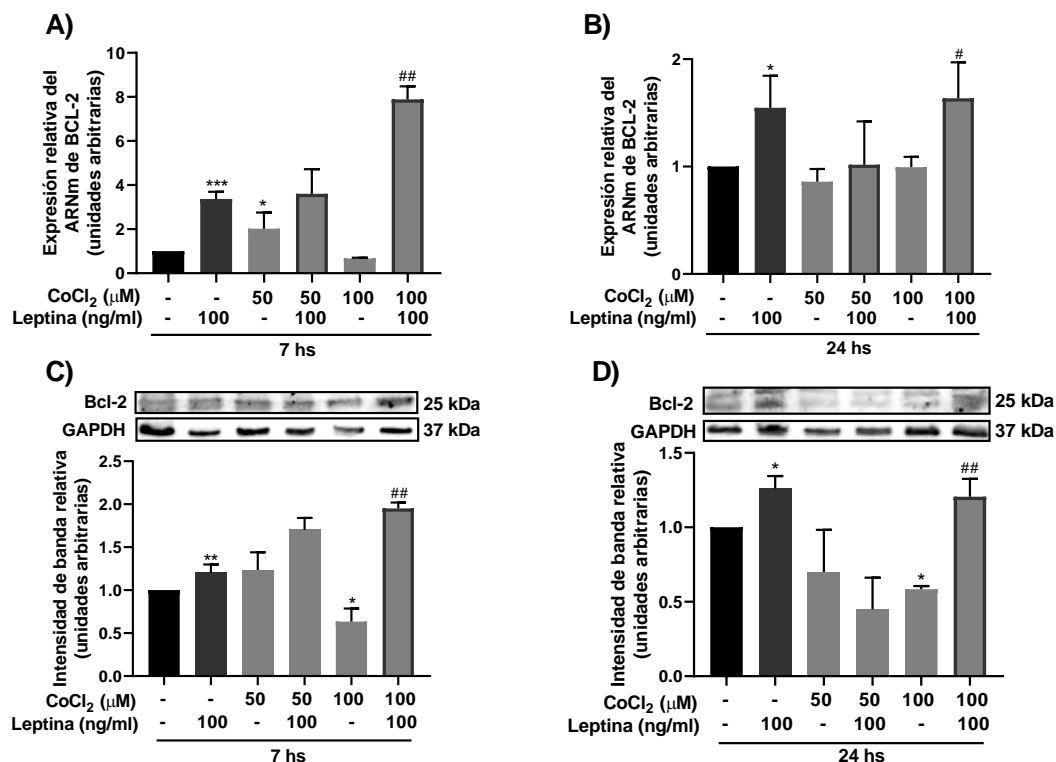


Figura R23: Leptina disminuye la expresión génica y proteica de BCL-2 luego de la estabilización de HIF-1α en células Swan-71. Se determinó por qRT-PCR (A) (B) y Western blot (C) (D) la expresión de BCL-2 en células Swan-71 luego de ser incubadas con 50 o 100 μM de CoCl₂ durante 7 (A) (C) o 24 h (B) (D) en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml). (A) (B) La expresión de BCL-2 se relativizó a la expresión de CICLOFILINA y de GAPDH. (C) (D) Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=3). *p<0.05, **p<0.01; ***p<0.001 respecto al control no tratado. ##p<0.01 respecto del tratamiento con CoCl₂.

El tratamiento con leptina aumentó la expresión relativa del ARNm de BCL-2 respecto del control 0% SFB en ambos tiempos estudiados. A su vez, la leptina incrementó significativamente la expresión relativa de BCL-2 en presencia de 100 μM de CoCl₂ de en ambos tiempos evaluados (**Figura R23 A y B**). Este aumento a su vez, se traduce a nivel proteico, tanto a las 7 como 24 horas de tratamiento (**Figura R23 C y D**).

Leptina disminuye la relación BAX/BCL-2 luego de la estabilización de HIF-1α

Como hemos mencionado previamente, los miembros de la familia de proteínas BCL-2 desempeñan un papel relevante como reguladores de la apoptosis, con actividades tanto proapoptóticas como antiapoptóticas.

La relación entre las proteínas BAX y BCL-2 proporciona información crucial sobre el equilibrio entre los factores que promueven y los que inhiben la apoptosis en una célula o tejido, lo cual afectará el umbral en el que se desencadena la apoptosis.

Dada la importancia fisiológica de estos miembros de la familia BCL-2, hemos decidido investigar la relación BAX/BCL-2 en células trofoblásticas después del tratamiento con CoCl_2 y el papel de la leptina en este contexto.

En la **Figura R24 A y B** se puede apreciar que, a las 7 y 24 horas de tratamiento, la leptina a una concentración de 100 ng/ml redujo la relación BAX/BCL-2 a nivel de ARNm cuando las células fueron tratadas con la máxima concentración de CoCl_2 (100 μM). A su vez la leptina disminuyó la relación BAX/BCL-2 respecto del control determinado mediante qRT-PCR (**Figura R24 B**).

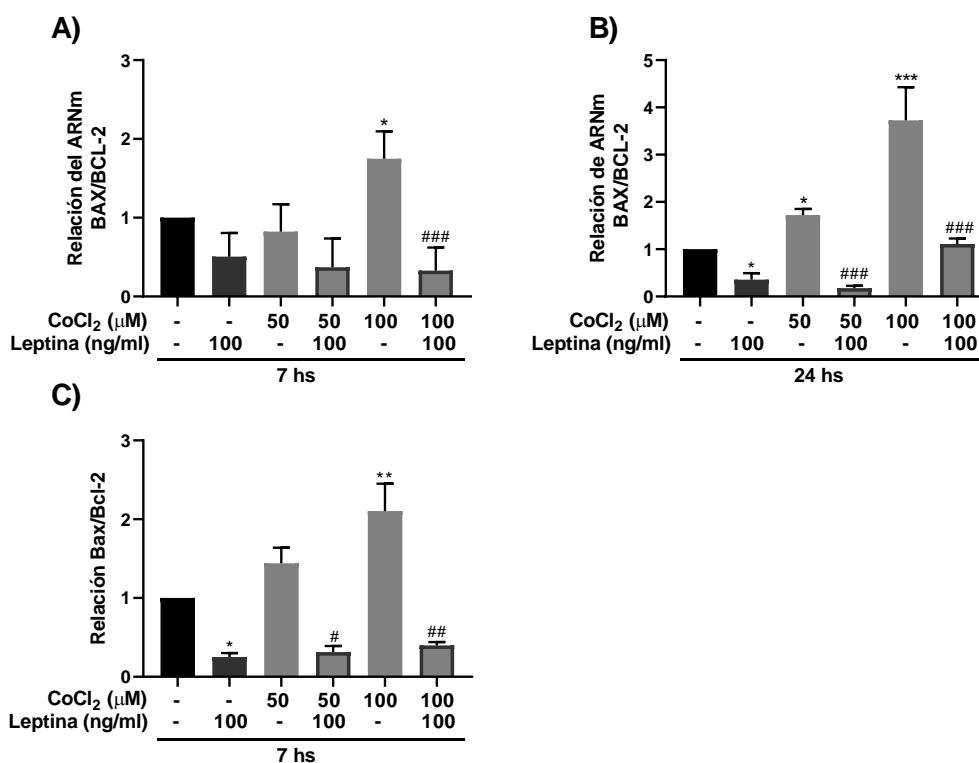


Figura R24: Leptina reduce la relación BAX/BCL-2 luego de la estabilización de HIF-1 α en células Swan-71. Se muestra la relación de BAX/BCL-2 determinado por qRT-PCR (A) (B) o Western blot (C). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto al control no tratado. ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ respecto del tratamiento con CoCl_2 .

A nivel proteico cuando las células fueron tratadas con 50 y 100 μM de CoCl_2 , observamos que la leptina reduce la relación BAX/BCL-2 al nivel observado con el tratamiento con leptina (**Figura R24 C**).

Dada las evidencias encontradas, se puede sugerir que la leptina modula el balance de las proteínas pro y anti apoptóticas en células trofoblásticas, BAX y BCL-2, en células Swan-71, disminuyendo esta relación, determinado tanto por qRT-PCR como por Western blot, ejerciendo un rol antiapoptótico luego de la estabilización del factor HIF-1 α .

Vías de señalización involucradas en la regulación de la expresión de BCL-2 mediada por la leptina luego de la estabilización HIF- α

Se ha reportado que la leptina actúa como una señal antiapoptótica en las células dendríticas humanas, monocitos y células T mediante la activación de la vía de señalización PI3K-Akt, modulando la expresión de factores antiapoptóticos como BCL-2 y Bcl-X_L [313, 314].

Resultados previos de nuestro grupo y colaboradores han propuesto que la activación de la vía MAPK por leptina es el mecanismo a través del cual promueve la supervivencia celular previniendo la apoptosis en células placentarias JEG-3 y monocitos [283, 285].

A su vez la leptina modula la expresión de BCL-2, disminuyendo la relación BAX/BCL-2 en células trofoblásticas Swan-71 en el contexto de hipoxia química como se discutió en el apartado anterior. Por lo tanto, decidimos investigar el papel de las vías de PI3K y MAPK en la regulación de la leptina sobre la expresión de BCL-2 frente a la estabilización de HIF-1 α mediante el análisis de Western blot.

Se visualiza en la **Figura R25**, que la leptina aumenta la expresión proteica de BCL-2 en ausencia o presencia del CoCl_2 y este efecto no se modificó al bloquear la vía de PI3K con Wortmanina. Por otro lado, encontramos que la inhibición de la vía MAPK, provocó a una reducción en la reversión de los niveles de BCL-2 inducida por la leptina, luego de tratar a las células Swan-71 con 100 μM de CoCl_2 (última barra **Figura R25 B**).

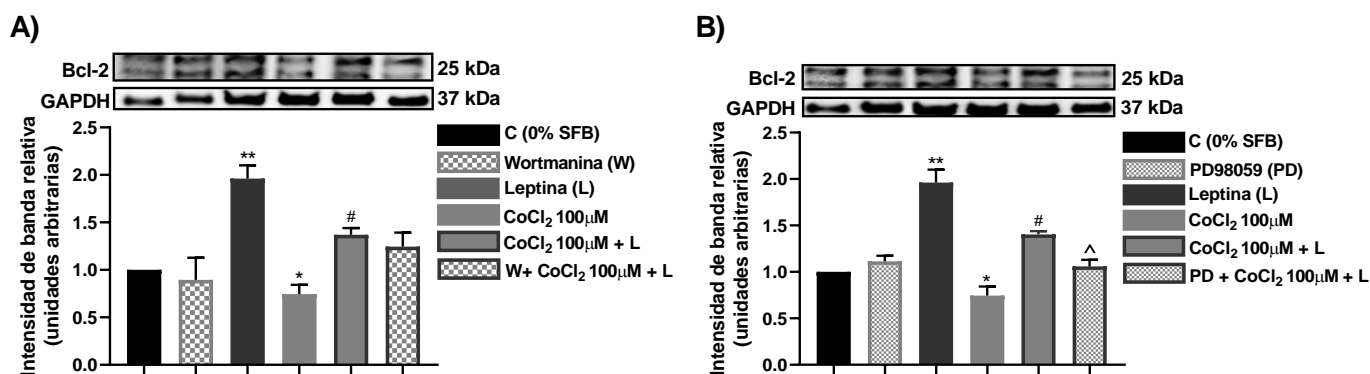


Figura R25: Participación de las vías PI3K y MAPK en la modulación de la leptina sobre la expresión de BCL-2 luego de la estabilización de HIF-1α en células Swan-71. Células Swan-71 fueron pretratados durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A) o MAPK (PD98059 50 μM) (B) en presencia o ausencia de 100 μM de CoCl₂ y estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Se determinó por Western blot la expresión BCL-2. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. n=3. *p<0.05, **p<0.01 respecto del control no tratado (-). #p<0.05 respecto al tratamiento con CoCl₂. ^p<0,05 respecto del tratamiento de CoCl₂ más leptina.

Rol de la leptina sobre otros reguladores de la apoptosis luego de la estabilización de HIF-1α

Como se mencionó previamente, las proteínas antiapoptóticas, como BCL-2 y Bcl-xL ejercen su función inhibiendo la muerte celular al interactuar con miembros proapoptóticos de la familia, bloqueando así la liberación del Citocromo C desde la mitocondria. Entre las proteínas proapoptóticas destacan BAX, Bid, Bad y Bak [315]. La interacción entre los ligandos BH3 proapoptóticos y las proteínas antiapoptóticas de la familia BCL-2 forma complejos que inactivan a las proteínas proapoptóticas, impidiendo su participación en la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, un evento crucial en la muerte celular. Bid es una de las proteínas BH3-only que regulan a Bak y BAX. Bid se activa tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional y es esencial para iniciar la señalización de apoptosis [316].

Leptina reduce la expresión de Bid luego de la estabilización de HIF-1 α

Para estudiar con mayor profundidad el estudio de la regulación de miembros de la familia BCL-2 por leptina, luego de la estabilización del HIF-1 α , decidimos evaluar la expresión de Bid en células trofoblásticas, Swan-71.

La estabilización de HIF-1 α durante 7 horas resultó en un aumento casi al doble de los niveles génicos de BID respecto del control, para ambas concentraciones de CoCl₂ utilizadas (**Figura R26 A**). Sin embargo, al evaluar la expresión proteica de Bid mediante el análisis de Western blot, observamos que el incremento en los niveles de Bid fue significativo al utilizar la concentración máxima de CoCl₂ (**Figura R26 C**). En la misma línea, evidenciamos que la leptina reduce los niveles proteicos de este marcador proapoptótico, pero no generó cambios a nivel de su ARNm respecto del control en ausencia de suero fetal bovino (**Figura R26 A y C**).

En la **Figura R26 B y D** se puede apreciar respectivamente, la variación en la expresión génica y proteica de Bid luego de 24 horas de tratamiento. Podemos observar que, la leptina disminuyó significativamente la expresión génica y proteica de Bid luego de 24 horas de tratamiento respecto del control. La máxima concentración de CoCl₂ evaluada incrementó los niveles de Bid, luego de 24 horas de tratamiento determinado mediante qRT-PCR y Western blot.

A su vez, evidenciamos que la leptina reduce la expresión proteica de Bid, en ambos tiempos evaluados, luego de estabilizar a HIF-1 α utilizando 100 μ M de CoCl₂ (**Figura R26 C y D**).

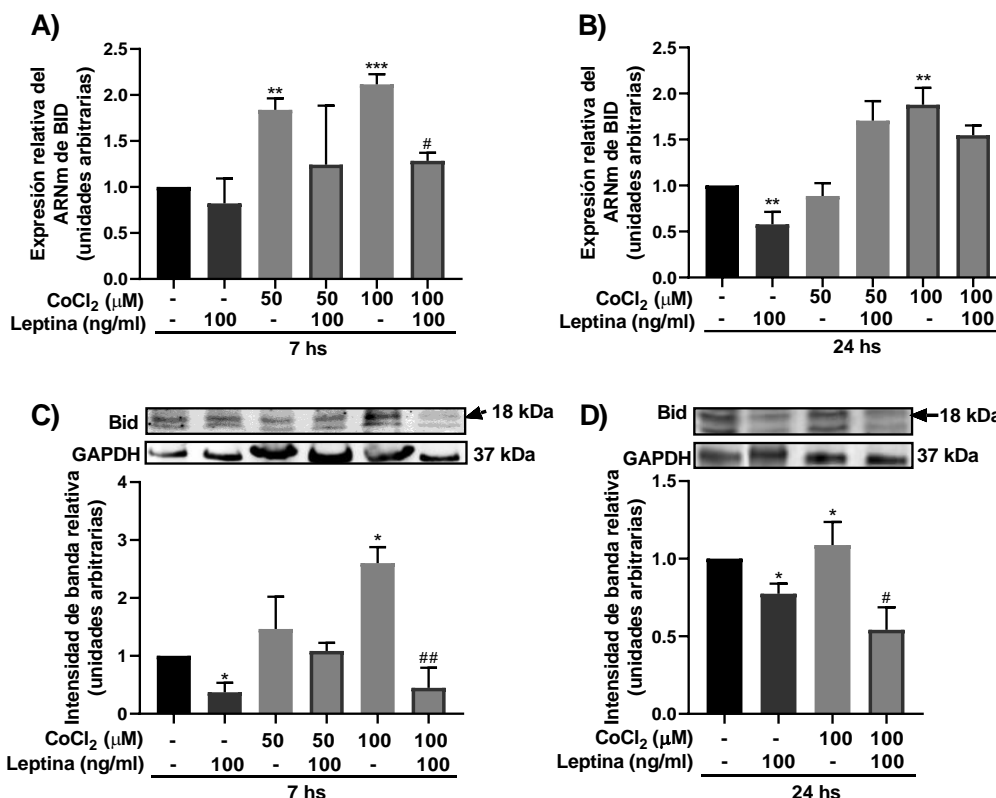


Figura R26: Leptina reduce los niveles génicos y proteicos de Bid luego de la estabilización de HIF-1α en células Swan-71. Células Swan-71 fueron incubadas con 50 o 100 μM de CoCl₂ en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml) durante 7 (A) (C) o 24 (B) (D) hs. La expresión de Bid se determinó mediante qRT-PCR (A) (B) y Western blot (C) (D). La expresión de BID se relativizó a la expresión de CICLOFILINA y de GAPDH (A) (B). Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda (C) (D). (n=3). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 respecto al control no tratado. #p<0.05 respecto del tratamiento con CoCl₂.

El Bid citosólico puede ser clivaje proteolíticamente por la Caspasa-8 activa, lo que resulta en dos fragmentos de 7 kDa (p7) y 15 kDa (p15) también conocido como t-Bid. Este fragmento (p15) se transloca a la membrana externa mitocondrial donde recluta y activa a BAX citosólico o media la permeabilización mitocondrial por sí mismo, lo que resulta en la liberación del Citocromo C [223]. Por lo tanto, determinamos la presencia de Bid truncado (t-Bid) bajo condiciones de hipoxia química.

Como se puede observar en la **Figura R27**, la presencia de t-Bid disminuyó significativamente después del tratamiento con 100 ng/ml de leptina en comparación al control a las 7 y 24 horas.

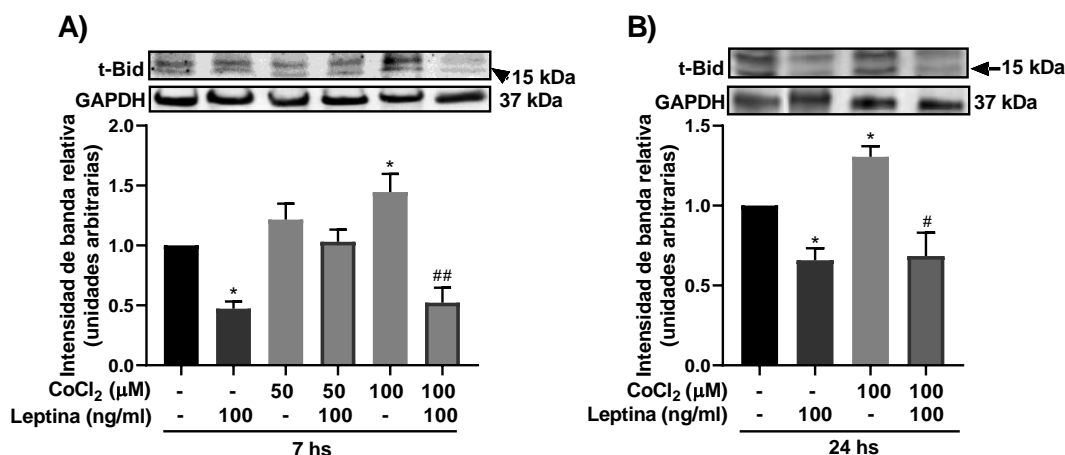


Figura R27: Leptina disminuye el clivaje de Bid (t-Bid) luego de la estabilización de HIF-1α en células Swan-71. Células Swan-71 fueron incubadas con 50 o 100 μM de CoCl₂ en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml) durante 7 (A) o 24 (B) hs. Se determinó por Western blot la presencia t-Bid. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=3). *p<0.05 respecto al control no tratado. #p<0.05, ##p<0.01 respecto del tratamiento con CoCl₂.

A su vez, la hipoxia química lograda con 100 μM de CoCl₂ aumentó la presencia del fragmento p15 y la leptina revirtió este efecto (última columna, **Figura R27**). De esta manera, encontramos que el tratamiento con leptina disminuiría la activación de Bid, traducido en una reducción de su clivaje frente a la estabilización de HIF-1α en células trofoblásticas Swan-71.

Vías de señalización involucradas en la regulación de la expresión de Bid mediada por la leptina luego de la estabilización HIF-1α

Nos planteamos investigar las vías antiapoptóticas activadas por la leptina en la hipoxia química vinculadas a la regulación del clivaje de Bid. Para tal fin las células Swan-71, se pretrataron con los inhibidores descritos anteriormente de las vías PI3K y MAPK en presencia o ausencia de 100 μM de CoCl₂, estimuladas con leptina durante 24 horas.

Al analizar la banda de Bid total (18 kDa), encontramos que la leptina en presencia de 100 μM de CoCl₂ es capaz de disminuir su expresión a la mitad a la determinada en el control 0% SFB. El bloqueo de la señalización de PI3K mediante la pre incubación con Wortmanina, revirtió el efecto de la leptina sobre esta proteína apoptótica. Lo que sugiere que, la vía PI3K/Akt participa en la regulación de la leptina sobre los niveles de Bid (**Figura R28 A**).

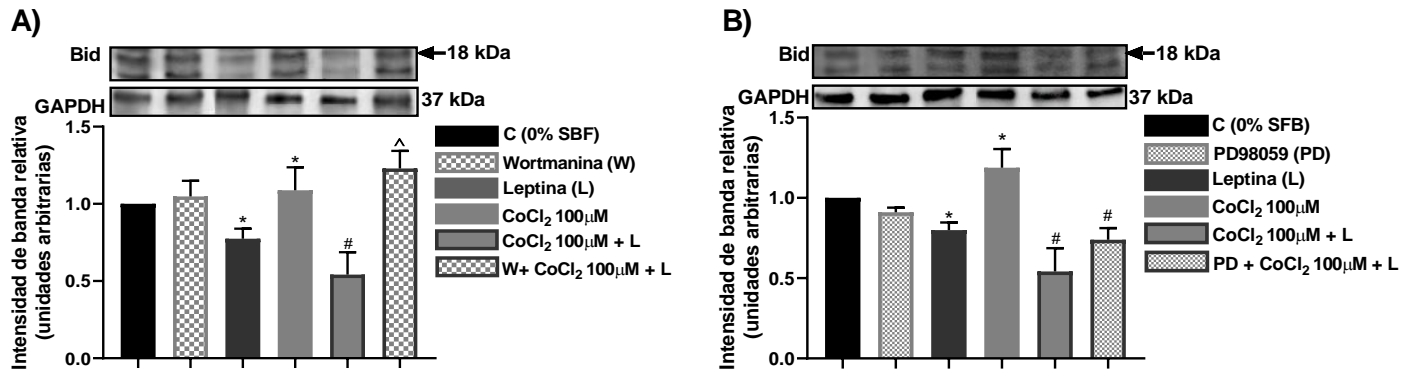


Figura R28: La señalización de PI3K/Akt modula la acción de la leptina sobre la expresión de Bid luego de la estabilización de HIF-1 α en células Swan-71. Células Swan-71 fueron pretratadas durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A) o MAPK (PD98059 50 μ M) (B) en presencia o ausencia de 100 μ M de CoCl₂ y estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Se determinó por Western blot la expresión de Bid. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=3). *p<0.05 respecto del control no tratado (-). #p<0.05 respecto al tratamiento con CoCl₂. ^p<0,05 respecto del tratamiento de CoCl₂ más leptina.

Por otro lado, la presencia o ausencia del inhibidor PD, que bloquea la vía de MAPK/ERK 1/2, no interfiere en la disminución de la leptina sobre Bid luego de estabilizar al factor HIF-1 α con 100 μ M de CoCl₂ (**Figura 28 B**).

Como se muestra en la **Figura R29 A**, la presencia del fragmento clivaje de Bid (p15) aumenta significativamente en células Swan-71 luego de la estabilización de HIF-1 α y tratadas con leptina y el inhibidor Wortmanina, con respecto al tratamiento de leptina + CoCl₂, transcurridas las 24 horas de incubación.

Estos resultados demuestran, que la vía de PI3K está mediando el efecto de leptina sobre el clivaje de Bid.

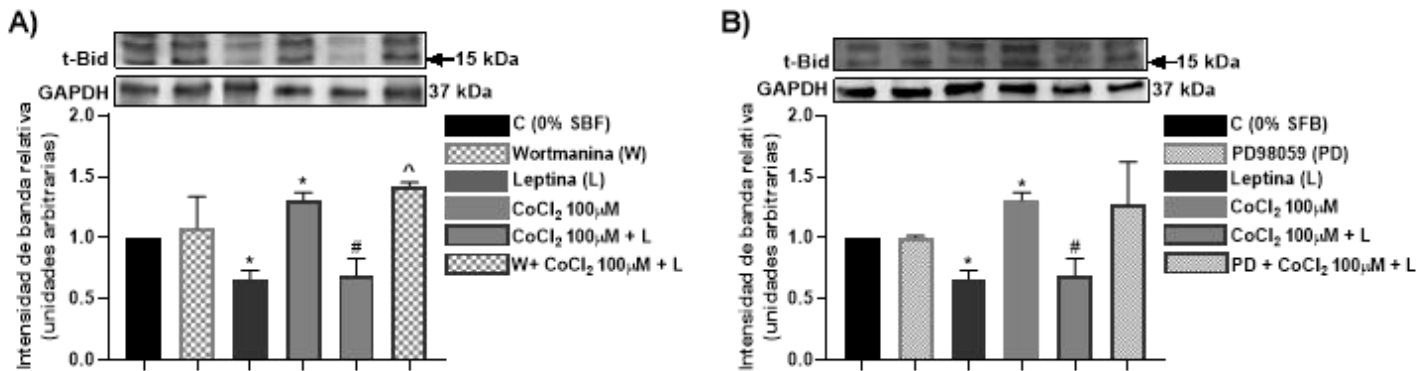


Figura R29: La señalización de PI3K/Akt está involucrada en la modulación de la leptina sobre los niveles de t-Bid luego de la estabilización de HIF-1α en células Swan-71. Células Swan-71 fueron pretratadas durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A) o MAPK (PD98059 50 μM) (B) en presencia o ausencia de 100 μM de CoCl₂ y estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Se determinó por Western blot la presencia de t-Bid. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda (n=3). *p<0.05 respecto del control no tratado (-). #p<0.05 respecto al tratamiento con CoCl₂. ^p<0,05 respecto del tratamiento de CoCl₂ más leptina.

Sin embargo, el bloqueo de la vía de MAPK, no afectó significativamente la regulación del clivaje de Bid mediado por leptina en presencia de 100 μM de CoCl₂.

Estos resultados sugieren que la leptina disminuye la activación de Bid, al reducir su clivaje y expresión mediante la señalización por PI3K/Akt en células trofoblásticas Swan-71 tratadas con CoCl₂.

Leptina reduce la expresión de Bad luego de la estabilización de HIF-1α

Un miembro fundamental dentro de la familia BCL-2, es el promotor de muerte asociado a BCL-2, Bad, que contiene solo el dominio de homología BH3. Su función principal es promover la apoptosis al bloquear la actividad de las proteínas antiapoptóticas de la familia BCL-2. Cuando Bad se encuentra en su forma no fosforilada, se une a estas proteínas antiapoptóticas y las inactiva, lo que desencadena la liberación de proteínas proapoptóticas como BAX y Bak. Se ha descrito que los niveles de Bad aumentan en tejidos placentarios con preeclampsia o explantos de placenta en condiciones de hipoxia-reoxigenación [317].

En la **Figura R30** se puede observar la cuantificación relativa del ARNm de BAD (**A y B**) y la de su proteína (**C y D**) en células Swan-71 a las 7 y 24 horas de tratamiento. Encontramos que, la hipoxia química lograda con 100 μM de CoCl_2 aumentó la expresión génica y proteica de Bad para ambos tiempos evaluados. El efecto de la hipoxia química lograda con 100 μM de CoCl_2 fue revertida completamente en presencia de leptina, la cual, contrarrestó el aumento en la expresión de Bad determinada mediante qRT-PCR y Western Blot, resultando en un efecto de promotor de la supervivencia.

A su vez, la leptina disminuyó el nivel génico de BAD, en comparación al control en ausencia de suero luego de 24 horas de incubación (**Figura R30 B**). Este efecto se observó a nivel proteico de Bad para ambos tiempos evaluados, respecto del control sin tratar (**Figura R30 C y D**).

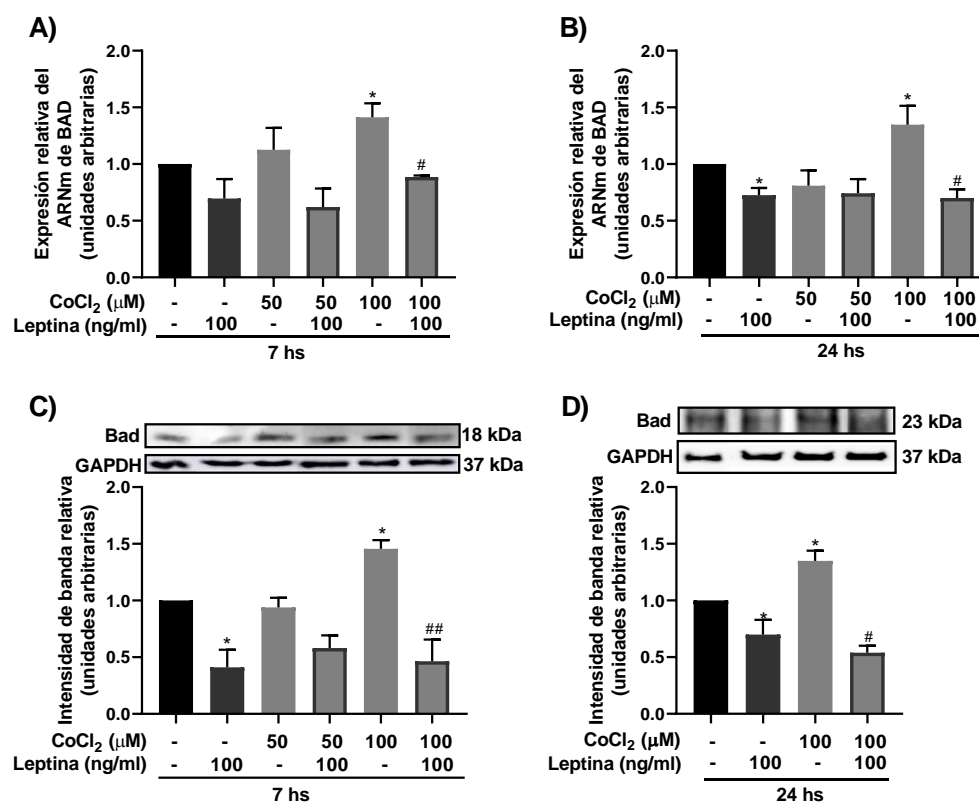


Figura R30: Leptina disminuye la expresión génica y proteica de Bad luego de la estabilización de HIF-1 α en células Swan-71. Se determinó por qRT-PCR (A) (B) y Western blot (C) (D) la expresión de Bad en células Swan-71 luego de ser incubadas con 50 o 100 μM de CoCl_2 durante 7 (A) (C) o 24 h (B) (D) en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml). La expresión génica de BAD se relativizó a la expresión de CICLOFILINA y de GAPDH (A) (B). Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda (C) (D). (n=3). *p<0.05 respecto al control no tratado. #p<0.05, ##p<0.01 respecto del tratamiento con CoCl_2 .

La actividad de Bad en la modulación de la apoptosis está regulada por mecanismos que regulan su estado de fosforilación. Bad es fosforilado en determinados residuos específicos, como serina 136, 112 y 155, en respuesta a señales de supervivencia y permanece inactivo en el citoplasma, al perder su capacidad para unirse a las proteínas antiapoptóticas. Cuando cesan las señales de supervivencia, Bad es desfosforilado y se transloca a las mitocondrias, donde interactúa con las proteínas antiapoptóticas BCL-2 o Bcl-xL neutralizando sus funciones antiapoptóticas.

Por este motivo para profundizar en el mecanismo asociado a la modulación de este factor determinamos los niveles de la fosforilación de Bad, en la serina 112 mediante Western Blot. En la **Figura R31**, se muestra, que la estabilización de HIF-1 α , reduce la fosforilación de Bad Ser 112, lo cual está asociado a una actividad promotora de la apoptosis, este efecto se bloquea significativamente en presencia de leptina.

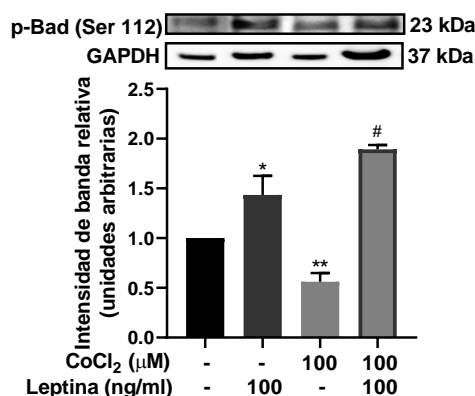


Figura R31: Leptina aumenta los niveles de p-Bad (Ser 112) luego de la estabilización de HIF-1 α en células Swan-71. Células Swan-71 fueron incubadas con 50 o 100 μ M de CoCl₂ en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Se determinó por Western blot la presencia de p-Bad (Ser 112). Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda (n=3). *p<0.05, **p<0.01 respecto al control no tratado. #p<0.05 respecto del tratamiento con CoCl₂.

Vías de señalización involucradas en la regulación de la expresión de Bad mediada por la leptina luego de la estabilización HIF- α

Se ha descrito que la activación de la vía de señalización PI3K conduce a la fosforilación de Akt, lo que resulta en la inhibición de Bad al mantenerlo fosforilado en el citosol. Esta modificación impide la translocación de Bad a la mitocondria, donde normalmente desempeñaría su función proapoptótica al interactuar con proteínas antiapoptóticas como BCL-2 y Bcl-xL [224].

Al igual que Akt, la vía de señalización por MAPK, conduce a la fosforilación de Bad, permitiendo así la supervivencia celular [318]. En nuestros estudios, hemos observado que la leptina reduce la expresión y fosforilación de Bad en células Swan-71, luego del tratamiento con CoCl_2 . En este sentido, evaluamos la participación de las vías mencionadas anteriormente en la acción de la leptina sobre la modulación de Bad.

Como se muestra en la **Figura R32 A**, la modulación negativa ejercida por la leptina luego de tratar a las células Swan-71 con CoCl_2 sobre la expresión de Bad, no fue afectada al inhibir la vía de PI3K.

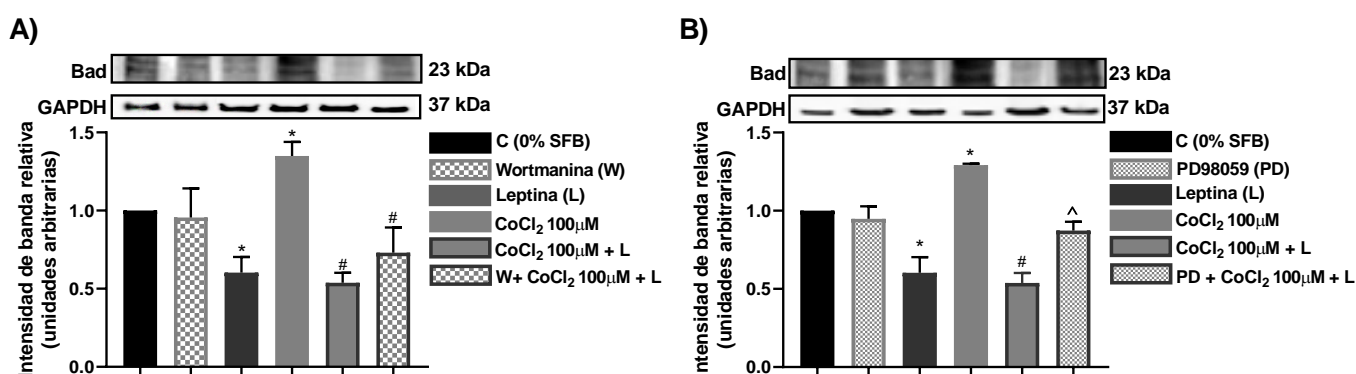


Figura R32: La señalización de MAPK está involucrada en la modulación de la leptina sobre los niveles de Bad luego de la estabilización de HIF-1 α en células Swan-71. Células Swan-71 fueron pretratados durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A) o MAPK (PD98059 50 μM) (B) en presencia o ausencia de 100 μM de CoCl_2 y estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Se determinó por Western blot la expresión de Bad. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=3). *p<0.05 respecto del control no tratado (-). #p<0.05 respecto al tratamiento con CoCl_2 . ^p<0,05 respecto del tratamiento de CoCl_2 más leptina.

Sin embargo, en la **Figura R32 B**, observamos que la disminución de Bad, llevada a cabo por 100 ng/ml de leptina luego de generar la hipoxia química en células Swan-71, se revierte al pretratar a las células con el inhibidor de la vía de MAPK, PD.

La modificación postraduccional de Bad, específicamente la fosforilación de la serina 112, es una señal de supervivencia. En sintonía con el resultado anteriormente descrito, evidenciamos que la leptina pierde la regulación ejercida sobre la fosforilación en la serina 112 de este factor proapoptótico, en la condición de hipoxia química, al inhibir alguna de las vías, con un bloqueo mayor al inhibir la vía de PI3K (**Figura R33**).

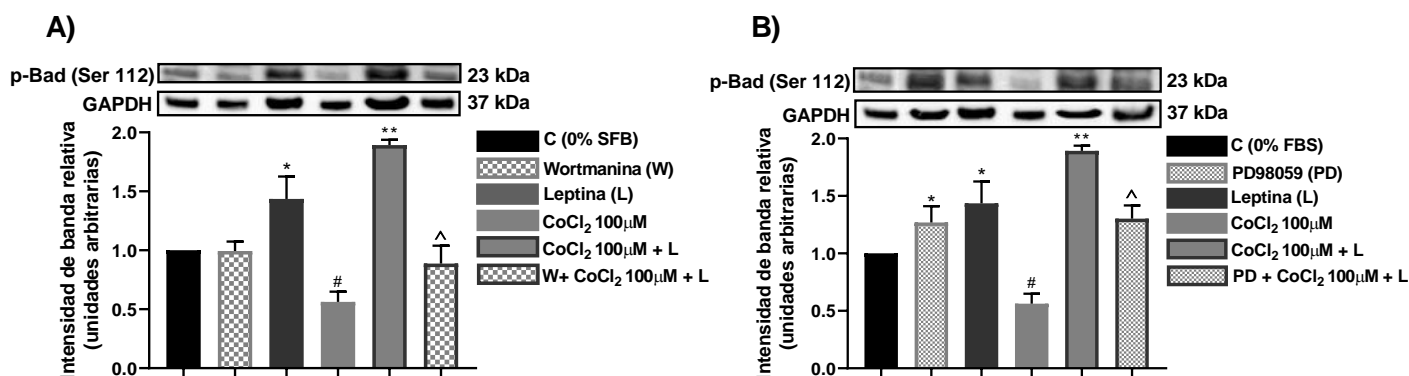


Figura R33: Las vías PI3K y MAPK participan en la modulación de la leptina sobre los niveles de p-Bad (Ser112) luego de la estabilización de HIF-1α en células Swan-71. Células Swan-71 fueron pretratados durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A) o MAPK (PD98059 50 μM) (B) en presencia o ausencia de 100 μM de CoCl₂ y estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Se determinó por *Western blot* la presencia de p-Bad. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=3). *p<0.05, **p<0.01 respecto del control no tratado (-). #p<0.05 respecto al tratamiento con CoCl₂. ^p<0,05 respecto del tratamiento de CoCl₂ más leptina.

En ambos casos, evidenciamos que la leptina genera una disminución en los niveles de pBad Ser112 a través de las vías PI3K y MAPK, frente a la estabilización de HIF-1α.

Moduladores de la apoptosis regulados por leptina luego de la estabilización de HIF-1α

Inclinar el equilibrio a favor de las proteínas proapoptóticas de la familia BCL-2 conduce a la activación de BAX y Bak y da como resultado la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. MCL-1 ha sido implicado en la regulación de Bak por su formación de complejos con Bak y su degradación temprana en la apoptosis. Bcl-xL se localiza en las mitocondrias y actúa como un regulador clave de la apoptosis, mientras que MCL-1 interactúa con proteínas pro-apoptóticas BH3 y efectores formadores de poros para modular la oligomerización y promover la supervivencia celular. A su vez se ha demostrado que Bak interacciona tanto con MCL-1 como con Bcl-xL y Bak está restringido por estas dos proteínas e induce la apoptosis si, y solo si, se libera de ambos [319, 320]. Por lo tanto, las proteínas que solo contienen BH3 pueden activar Bak liberándolo de las proteínas de supervivencia, que inhiben la capacidad de formación de poros de BAX y Bak.

Previamente determinamos la regulación de BAX por leptina durante la hipoxia química, por lo que decidimos evaluar la modulación de Bak, Bcl-xL y MCL-1 luego de la estabilización de HIF-1 α por la leptina mediante PCR en tiempo real.

Leptina modula la expresión de Bak luego de la estabilización de HIF-1 α

Iniciamos el estudio evaluando la expresión de Bak. Encontramos que, luego de 7 horas, el tratamiento con 50 o 100 μ M de CoCl₂ aumentó significativamente la expresión de ARNm de BAK en las células Swan-71. En ausencia de suero, la incubación con leptina (100 ng/ml) no produjo cambios en la expresión de este factor proapoptótico, sin embargo, disminuyó su expresión luego de 7 horas, al revertir el nivel del ARNm cuando se estabilizó HIF-1 α con ambas concentraciones de CoCl₂ evaluadas (**Figura R34 A**).

Por otro lado, leptina revirtió el aumento de BAK, tanto respecto del control (-) cómo en la hipoxia química generada con la máxima concentración de CoCl₂ utilizado a las 24 horas de tratamiento (**Figura R34 B**).

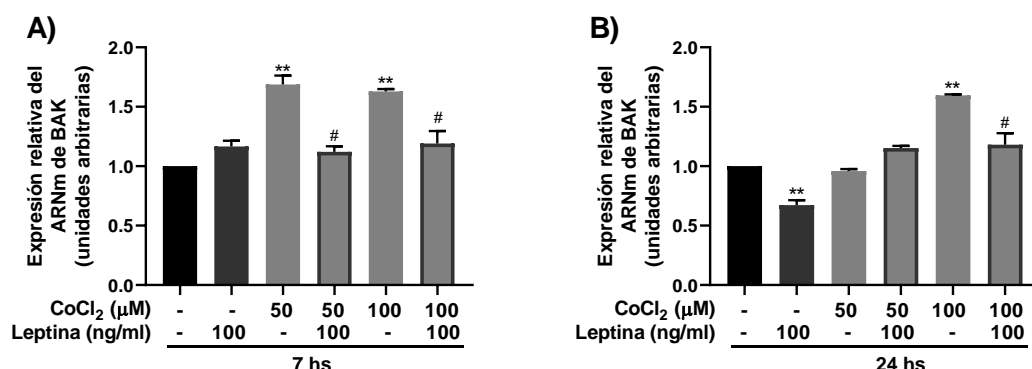


Figura R34: Leptina disminuye la expresión génica de BAK luego de la estabilización de HIF-1 α en células Swan-71. Se determinó por qRT-PCR la expresión de BAK en células Swan-71 luego de ser incubadas con de 50 o 100 μ M de CoCl₂ durante 7 (A) o 24 h (B) en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml). La expresión de BAK se relativizó a la expresión de CICLOFILINA y de GAPDH. (n=3) **p<0.01 respecto del control no tratado (-). #p<0.05 respecto del tratamiento con CoCl₂.

Leptina modula la expresión de MCL-1 luego de la estabilización de HIF-1 α

En cuanto al análisis del factor pro supervivencia, MCL-1, se observó que el tratamiento con 100 ng/ml de leptina aumentó significativamente la expresión del ARNm de MCL-1 en células Swan-71, en ambos tiempos evaluados (**Figura R35**).

En concordancia con los resultados previos, la estabilización de HIF-1 α (50 y 100 μ M de CoCl₂) luego de 7 horas de tratamiento disminuyó significativamente la expresión relativa del MCL-1, determinado por PCR en tiempo real. En este contexto de hipoxia química la leptina es capaz de aumentar dichos niveles, revirtiendo el efecto del CoCl₂ (**Figura R35 A**).

Sin embargo, para nuestra sorpresa, 24 horas de exposición a 100 μ M de CoCl₂ aumentó de manera marcada los niveles de ARNm de MCL-1 y el co-tratamiento con 100 ng/ml de leptina redujo este aumento observado (**Figura R35 B**). Estos efectos contrapuestos y duales, deberán ser abordados en futuras investigaciones, determinando el nivel proteico de este modulador apoptótico.

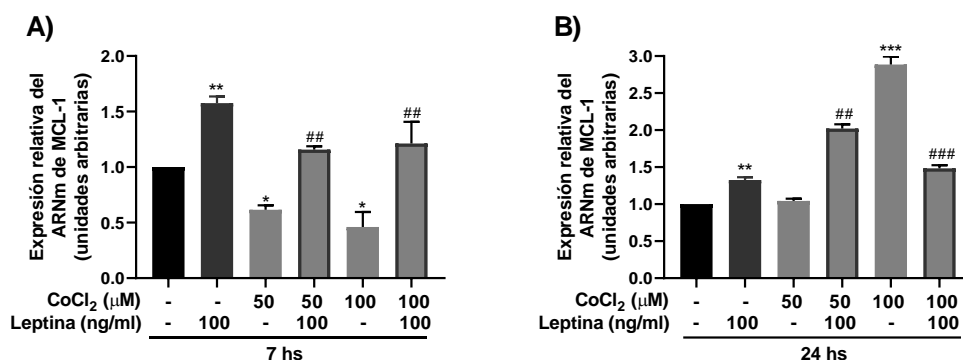


Figura R35: Leptina modula la expresión génica de MCL-1 luego de la estabilización de HIF-1 α en células Swan-71. Se determinó por qRT-PCR la expresión de MCL-1 en células Swan-71 luego de ser incubadas con de 50 o 100 μ M de CoCl₂ durante 7 (A) o 24 h (B) en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml). La expresión de MCL-1 se relativizó a la expresión de CICLOFILINA y de GAPDH. (n=3) *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 respecto del control no tratado (-), ##p<0.01, ###p<0.001 respecto del tratamiento con CoCl₂.

Leptina modula la expresión de BCL-xL luego de la estabilización de HIF-1 α

Por último, analizamos la expresión de BCL-xL y se observó que el tratamiento solo con 100 ng/ml de leptina aumentó significativamente la expresión del ARNm de BCL-xL a las 7 horas de tratamiento. La estabilización de HIF-1 α con 100 μ M de CoCl₂ redujo de manera marcada los niveles de ARNm de este efector antiapoptótico, y el co-tratamiento con 100 ng/ml de leptina revirtió el efecto de 100 μ M de CoCl₂ luego de 7 horas de tratamiento (**Figura R36 A**). Interesantemente, y análogo a lo determinado con el factor MCL-1, observamos un efecto antagónico de la leptina en condiciones de hipoxia química sobre BCL-xL. La estabilización de HIF-1 α luego de 24 horas de

incubación, aumentó la expresión génica de BCL-xL, mientras que la leptina contrarrestó este aumento luego exponer a las células con 50 μM de CoCl_2 . Sin embargo, no observamos modulación de la leptina sobre la expresión de este factor antiapoptótico luego de exponer a las células con 100 μM de CoCl_2 (**Figura R36 B**).

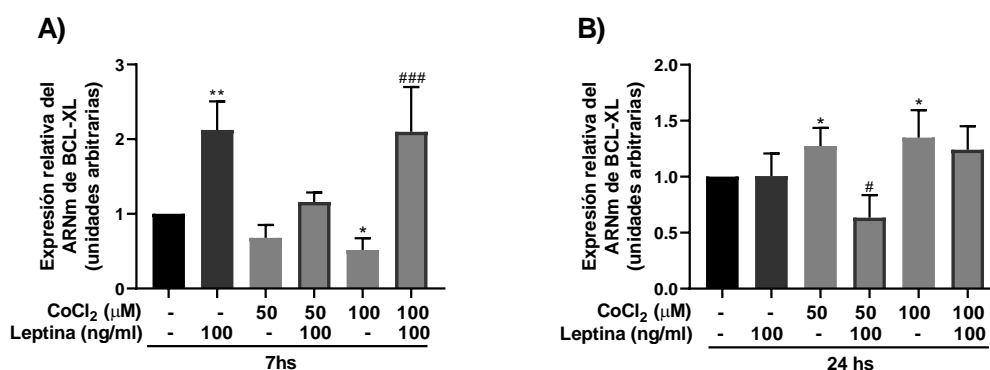


Figura R36: Leptina modula la expresión génica de BCL-xL luego de la estabilización de HIF-1 α en células Swan-71. Se determinó por qRT-PCR la expresión de BCL-xL en células Swan-71 luego de ser incubadas con de 50 o 100 μM de CoCl_2 durante 7 (A) o 24 h (B) en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml). La expresión de BCL-xL se relativizó a la expresión de CICLOFILINA y de GAPDH. (n=3) *p<0.05, **p<0.01 respecto del control no tratado (-), #p<0.05, ###p<0.001 respecto del tratamiento con CoCl_2 .

Rol de la leptina sobre la proliferación en células trofoblásticas

El mantenimiento de un equilibrio entre la proliferación y la muerte celular es necesario para el correcto funcionamiento de los diversos tejidos que componen un organismo. Particularmente durante el desarrollo placentario, el proceso de proliferación es restringido y está finamente regulado [260]. Durante las primeras etapas del embarazo, la placentación ocurre en un ambiente relativamente hipóxico, lo que resulta esencial para el correcto desarrollo embrionario. En este sentido la hipoxia puede tener efectos tanto estimulantes como inhibidores sobre la proliferación celular, dependiendo de la duración y la intensidad de la hipoxia. En situaciones de hipoxia crónica o patológica, la proliferación celular puede verse comprometida debido a la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la activación de vías de señalización asociadas con la inhibición del crecimiento celular. Alteraciones en la regulación de la proliferación celular por la hipoxia en células trofoblásticas pueden contribuir a la patogénesis de complicaciones del embarazo.

En la preeclampsia, por ejemplo, se ha observado una disminución en la proliferación celular trofoblástica en asociación con un entorno placentario hipóxico y disfunción de la invasión trofoblástica en la decidua [321]. Se ha demostrado que la leptina promueve la proliferación celular en varios tipos de células, incluidas las células trofoblásticas placentarias. Estudios in vitro han mostrado que la leptina puede estimular la proliferación de células trofoblásticas humanas, lo que sugiere un posible papel en el crecimiento y desarrollo placentario [274, 299, 322]. Además, antecedentes de nuestro grupo han evidenciado que la leptina induce la proliferación celular en líneas trofoblásticas humanas BeWo y JEG-3 [45].

Por estos motivos previamente mencionados hemos estudiado el efecto de la hipoxia química sobre la proliferación de células trofoblásticas y el rol de la leptina en este contexto.

La estabilización de HIF-1 α atenúa la proliferación de células Swan-71

Para este objetivo células Swan-71 fueron incubadas en presencia o ausencia de CoCl₂ durante 24 y 48 horas en medio DMEM 0% SFB. Luego del tratamiento determinamos la expresión de Ki-67, una proteína que se utiliza ampliamente como marcador de proliferación ya que, en las células mitóticas, Ki-67 se asocia a los cromosomas condensados como base de la capa pericromosómica en el núcleo de células en crecimiento activo y en división [323]. Por lo tanto, decidimos realizar experimentos de inmunofluorescencia para detectar la expresión nuclear de Ki-67 en células Swan-71 luego de la estabilización del factor inducible por hipoxia, HIF-1 α .

Determinamos que el tratamiento con CoCl₂ redujo casi un 50% el número de células positivas para Ki-67 nuclear en células Swan-71 tanto a las 24 como a las 48 h luego del tratamiento con CoCl₂ en comparación al tratamiento control, sin tratamiento (**Figura R37 A y B**).

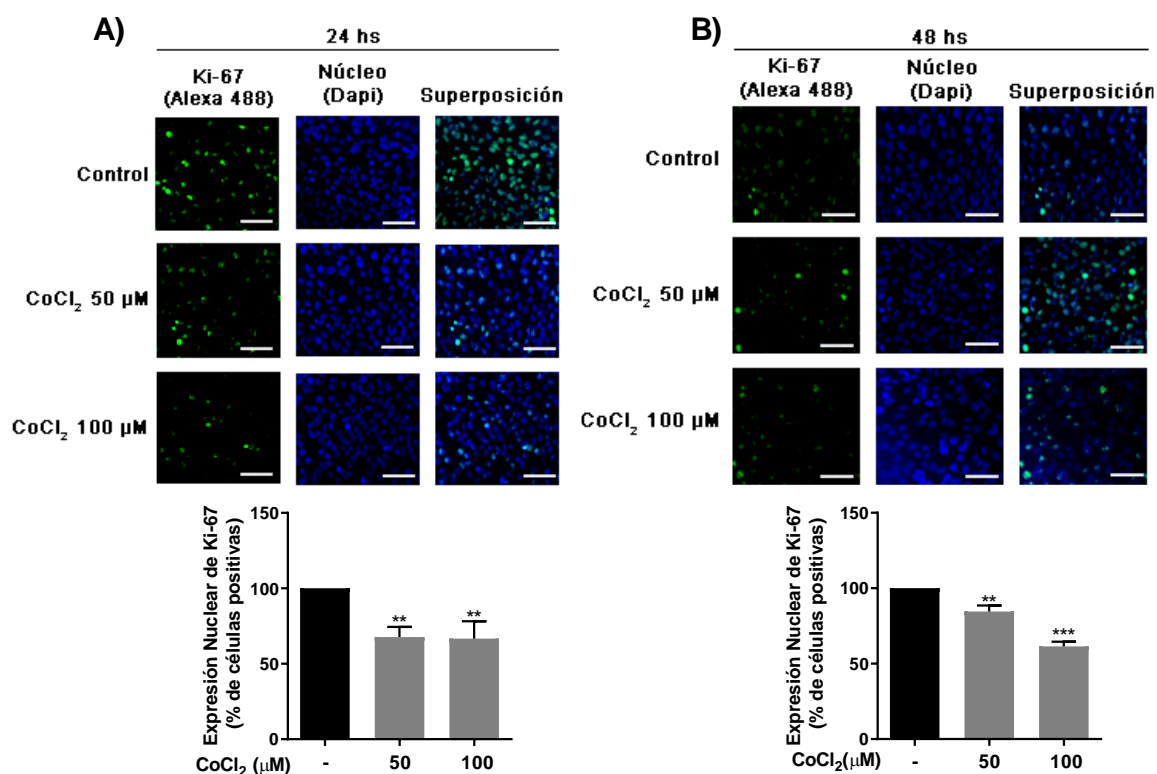


Figura R37: El tratamiento con CoCl₂ disminuye la expresión de Ki-67 en células Swan-71.

Se determinó la expresión de Ki-67 (Alexa-488, verde) por inmunofluorescencia en células Swan-71 incubadas con 50 o 100 μM de CoCl₂ durante 24 hs (A) o 48 (B) hs. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Aumento: 100x. Escala: 100μm. En los paneles inferiores, se muestran los gráficos de cuantificación de la expresión de Ki-67 (% de células positivas). (n=4). **p<0.01, ***p<0.001 respecto al control no tratado (-).

Resultados similares obtuvimos al analizar el efecto de la estabilización de HIF-1α sobre la proliferación de células Swan-71 determinada por recuento celular en cámara de Neubauer a las 24 y 48 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de CoCl₂.

Observamos que la inhibición en la degradación de HIF-1α desencadenó una merma en la proliferación de células Swan-71, dependiente de la dosis y tiempo de incubación. Al utilizar la concentración de 100 μM de CoCl₂, evidenciamos, una disminución del número de células de aproximadamente 60%, tanto a las 24 y 48 horas de tratamiento, en comparación al control no tratado (**Figura R38 A y B**).

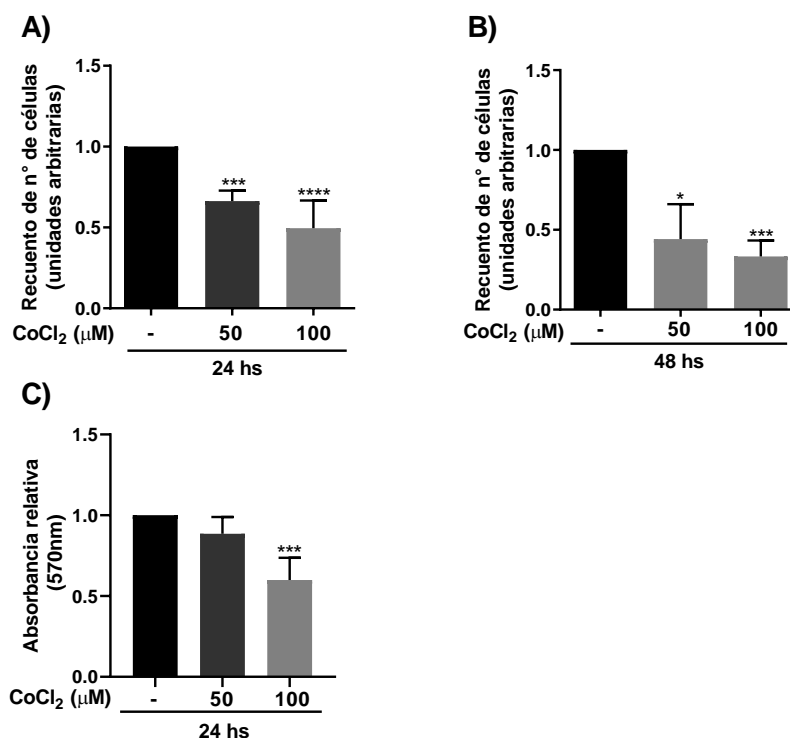


Figura R38: El tratamiento con CoCl₂ disminuye el número de células y supervivencia en células Swan-71. Se determinó el número de células en cámara de Neubauer (A) (B) o la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT (C), luego de incubar a células Swan-71 con 50 o 100 μM de CoCl₂ en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml) durante 24 hs (A) (C) o 48 (B) hs. Se muestran los gráficos de cuantificación del recuento de número de células en unidades arbitrarias o absorbancia relativa (n=4). *p<0.05, ***p<0,001 respecto al control no tratado.

Por último, estudiamos los cambios en la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT en condiciones similares para las determinaciones anteriores en células Swan-71. En la **Figura R38 C**, se puede apreciar que 100 μM de CoCl₂, redujo significativamente la supervivencia de células trofoblásticas Swan-71 (**Figura R38 C**).

De los resultados obtenidos concluimos que la estabilización de HIF-1α posee un efecto negativo sobre la proliferación y viabilidad de células trofoblásticas.

Leptina promueve la proliferación de células Swan-71 luego de la estabilización de HIF-1 α

Dada la capacidad de leptina de promover el crecimiento y la proliferación celular, nos propusimos estudiar el rol de la leptina sobre la proliferación y supervivencia de células Swan-71 bajo el estrés celular generado por hipoxia química.

Sobre la base de los experimentos anteriores, planteamos evaluar el efecto de la leptina recombinante (100 ng/ml) frente al tratamiento de células Swan-71 con CoCl₂ durante 24 y 48 horas de incubación.

En la **Figura R39 A y B** observamos que la leptina aumentó de manera significativa la proliferación de células Swan-71 tanto a las 24 como a las 48 horas, respecto del control con DMEM-F12 0% SFB.

Por otro lado, la presencia de leptina revirtió el efecto antiproliferativo generado por la estabilización de HIF-1 α para ambas concentraciones utilizadas, tanto a las 24 y 48 horas. Luego de 24 horas de tratamiento en presencia de 50 y 100 μ M de CoCl₂, la leptina incrementó la expresión de Ki-67 evaluado por inmunofluorescencia aumentando la expresión de este marcador a niveles similares al obtenido en el tratamiento con leptina (segunda barra **Figura R39 A**). Sin embargo, la reversión generada por la leptina fue menor a las 48 horas de incubación con ambas concentraciones de CoCl₂ utilizadas (**Figura R39 B**).

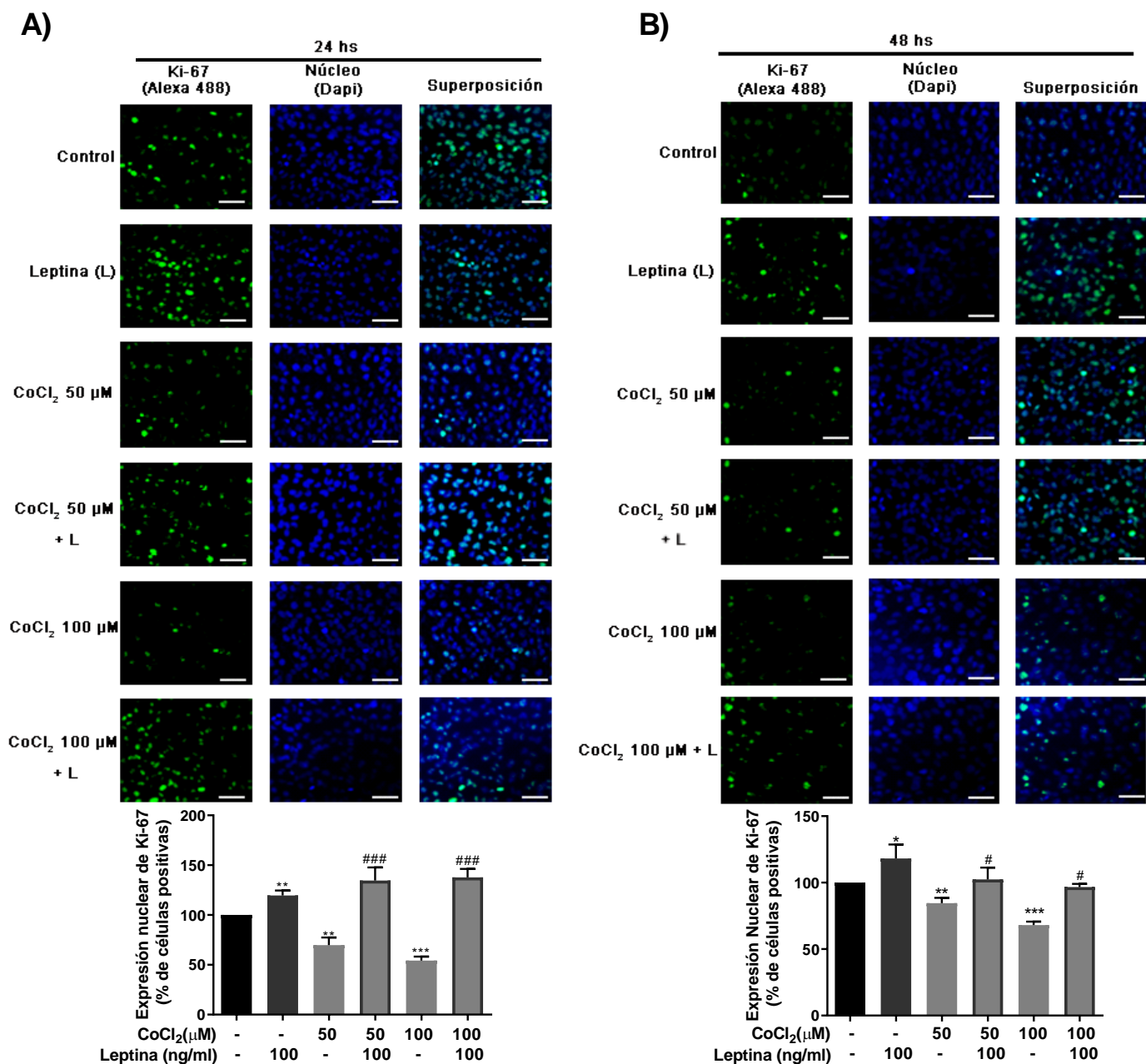


Figura R39: Leptina aumenta la expresión de Ki-67 luego del tratamiento con CoCl₂ en células Swan-71. Se determinó la expresión de Ki-67 (Alexa-488, verde) por inmunofluorescencia en células Swan-71 incubadas con 50 o 100 μ M de CoCl₂ en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml) durante 24 hs (A) o 48 (B) hs. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Aumento: 10x. Escala: 100 μ m. En los paneles inferiores, se muestran los gráficos de cuantificación de la expresión de Ki-67 (% de células positivas) (n=4). **p<0.01, ***p<0.001 respecto al control no tratado (-). #p<0.05, ###p<0.001 respecto del tratamiento con CoCl₂.

Por otro lado, en la **Figura R40**, se muestran los resultados que evidencian que la leptina incrementa el número de células Swan-71 determinado por recuento en cámara de Neubauer luego de 24 y 48 horas de incubación, respecto del control sin tratar. En concordancia con lo observado previamente, el agregado de leptina en condiciones de estabilización del factor HIF-1 α revirtió el efecto generado por 100 μ M de CoCl₂ a las 24 horas, aumentando la proliferación de células Swan-71.

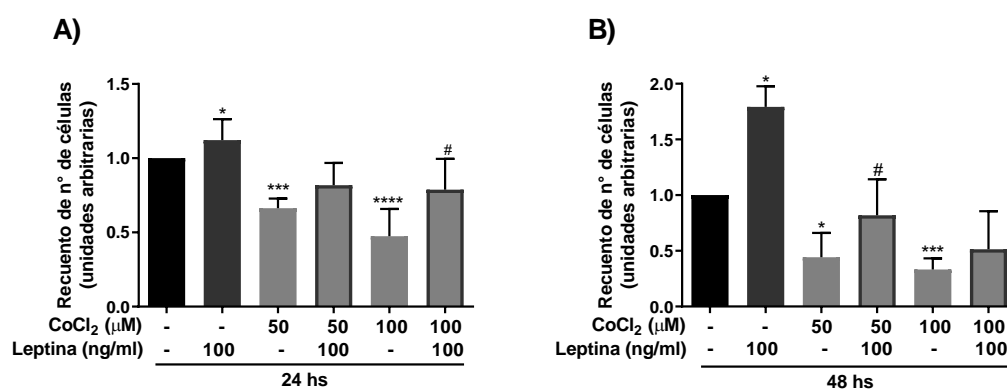


Figura R40: Leptina aumenta el número de células Swan-71 luego del tratamiento con CoCl₂. Se determinó el número de células en cámara de Neubauer, luego de incubar células Swan-71 con 50 o 100 μ M de CoCl₂ en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml) durante 24 hs (A) o 48 (B) hs. Se muestran los gráficos de cuantificación del número de células en unidades arbitrarias. (n=4). *p<0.05, ***p<0,001 respecto al control no tratado (-). #p<0.05 respecto del tratamiento con CoCl₂.

Luego de 48 horas de tratamiento, la leptina ocasionó un incremento significativo en el número de células luego de la estabilización de HIF-1 α con 50 μ M de CoCl₂. A las 48 h de tratamiento con la máxima concentración de CoCl₂ utilizada, leptina fue incapaz de revertir significativamente la disminución en el número de células, es probable que en estas condiciones prevalezca su efecto sobre la disminución en la muerte celular como describimos en apartados anteriores (**Figura R40**).

El antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) es un componente del ciclo celular que juega un rol esencial en el metabolismo de los ácidos nucleicos, como componente de la maquinaria de replicación y reparación [324]. Dado que es un indicador ampliamente utilizado de la proliferación celular, nos propusimos evaluar la expresión de PCNA en células trofoblásticas, luego de la estabilización de HIF-1 α y su modulación por leptina.

En estos experimentos observamos que, la expresión de PCNA, determinada por análisis de Western Blot, disminuyó significativamente comparado con el control en las células Swan-71 y BeWo tratadas con CoCl₂ durante 24 horas (**Figura R41**).

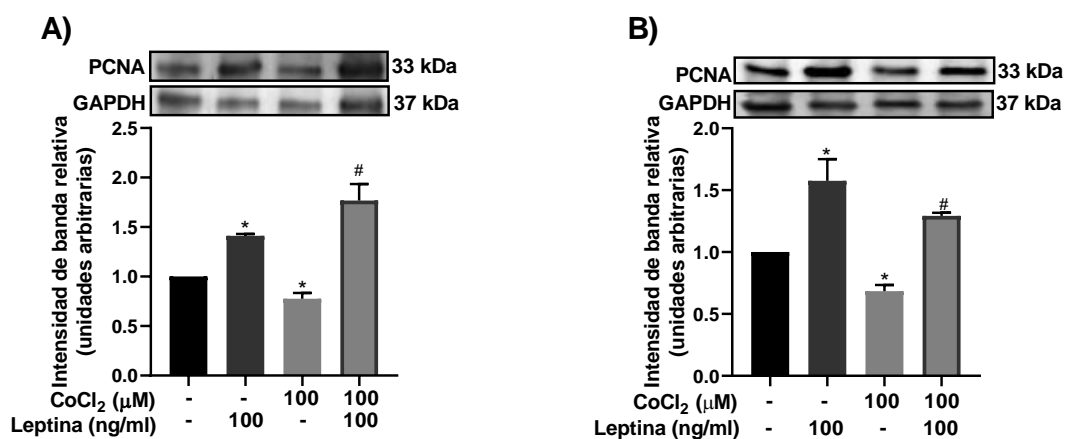


Figura R41: Leptina aumenta la expresión de PCNA luego de la estabilización de HIF-1 α en células trofoblásticas. Células Swan-71 (A) o BeWo (B) fueron incubadas con 100 μ M de CoCl₂ en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Se determinó por Western blot la expresión de PCNA. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=3). *p<0.05 respecto al control no tratado. #p<0.05 respecto del tratamiento con CoCl₂.

El tratamiento con 100 ng/ml de leptina aumentó la expresión de PCNA respecto del control y además revirtió el efecto generado por la estabilización de HIF-1 α .

Por último, determinamos la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT con el fin de evaluar el rol de la leptina sobre la supervivencia de células Swan-71 y en explantos placentarios en condiciones de estabilización de HIF-1 α . La exposición a 100 o 250 μ M de CoCl₂ disminuyó la supervivencia, evidenciado con una disminución en la absorbancia relativa de células Swan-71 o explantos placentarios respectivamente. La leptina, aumentó la viabilidad celular respecto del control sin tratar, en ambos modelos y revirtió el efecto producido por el tratamiento con CoCl₂ (**Figura R42**).

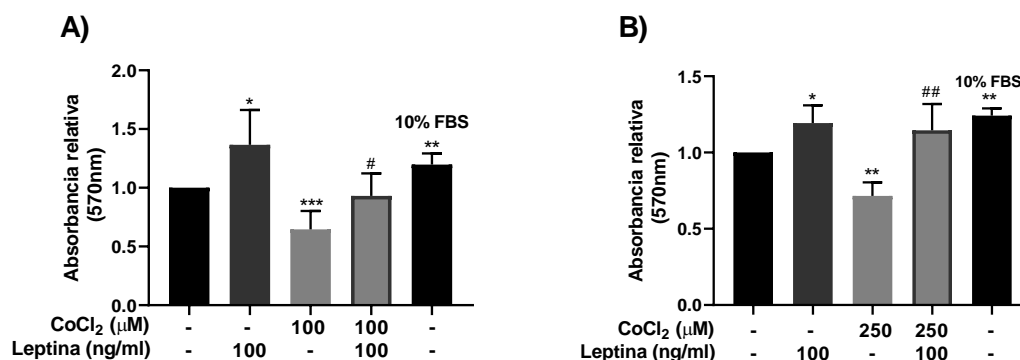


Figura R42: Leptina aumenta la supervivencia de células trofoblásticas luego de la estabilización de HIF-1 α . Células Swan-71 (A) o explantos placentarios (B) fueron incubados con 100 o 250 μ M de CoCl₂ en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Se utilizó el ensayo de MTT para determinar la viabilidad celular. Se muestra la absorbancia relativa a 570 nm. (n=4). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 respecto al control no tratado. #p<0.05, ##p<0.01 respecto del tratamiento con CoCl₂.

En conjunto estos resultados sugieren que la leptina es una hormona que promueve la proliferación y viabilidad de células Swan-71 *per se* y además revierte el efecto antiproliferativo en el contexto de hipoxia química generado por la estabilización de HIF-1 α .

Vías de señalización involucradas en la regulación de la proliferación mediada por la leptina luego de la estabilización de HIF-1 α

Tal como mencionamos anteriormente, las cascadas de señalización posteriores a la activación del receptor de leptina incluyen las vías JAK2/STAT3, MAPK/ERK 1/2 y PI3K/Akt desencadenando en distintos tejidos, incluidos el sistema nervioso central, el tejido adiposo y la placenta, la promoción de la proliferación celular. Estudios recientes han revelado que la activación de estas vías puede tener implicaciones significativas en la fisiología normal y en la patología de diversas enfermedades [77, 276, 325, 326].

En este sentido, al observar el efecto promotor de la leptina sobre la proliferación de células Swan-71 frente a la hipoxia química nos propusimos estudiar las vías de señalización involucradas en esta acción, particularmente sobre la participación de las vías de MAPK (ERK1/2) y PI3K/Akt. Para tal fin se utilizaron los inhibidores farmacológicos utilizados previamente, PD98059 (PD) y Wortmanina (W), inhibidores de las vías de MAPK y PI3K, respectivamente.

Para ello, se pretrataron las células con 50 μ M del inhibidor PD y 50 nM de Wortmanina durante 30 minutos, se sometieron a 100 μ M de CoCl₂ y luego se estimularon con 100 ng/ml de leptina, pasadas las 24 horas se determinaron los parámetros estudiados anteriormente.

Observamos en la **Figura R43 A** que, si bien el porcentaje de células positivas para la expresión de Ki-67 aumentó significativamente cuando las células son tratadas con Wortmanina, comparado con el control 0% SFB, la inhibición de la vía de PI3K no bloquea la acción de la leptina sobre la expresión de este marcador, por lo que no estaría involucrada en la acción promotora de la proliferación de la leptina en células Swan-71. Por otro lado, como se observa en la última barra de la **Figura R43 B**, el tratamiento con 50 μ M de PD impidió que la leptina estimule la proliferación de las células Swan-71 luego de la estabilización de HIF-1 α .

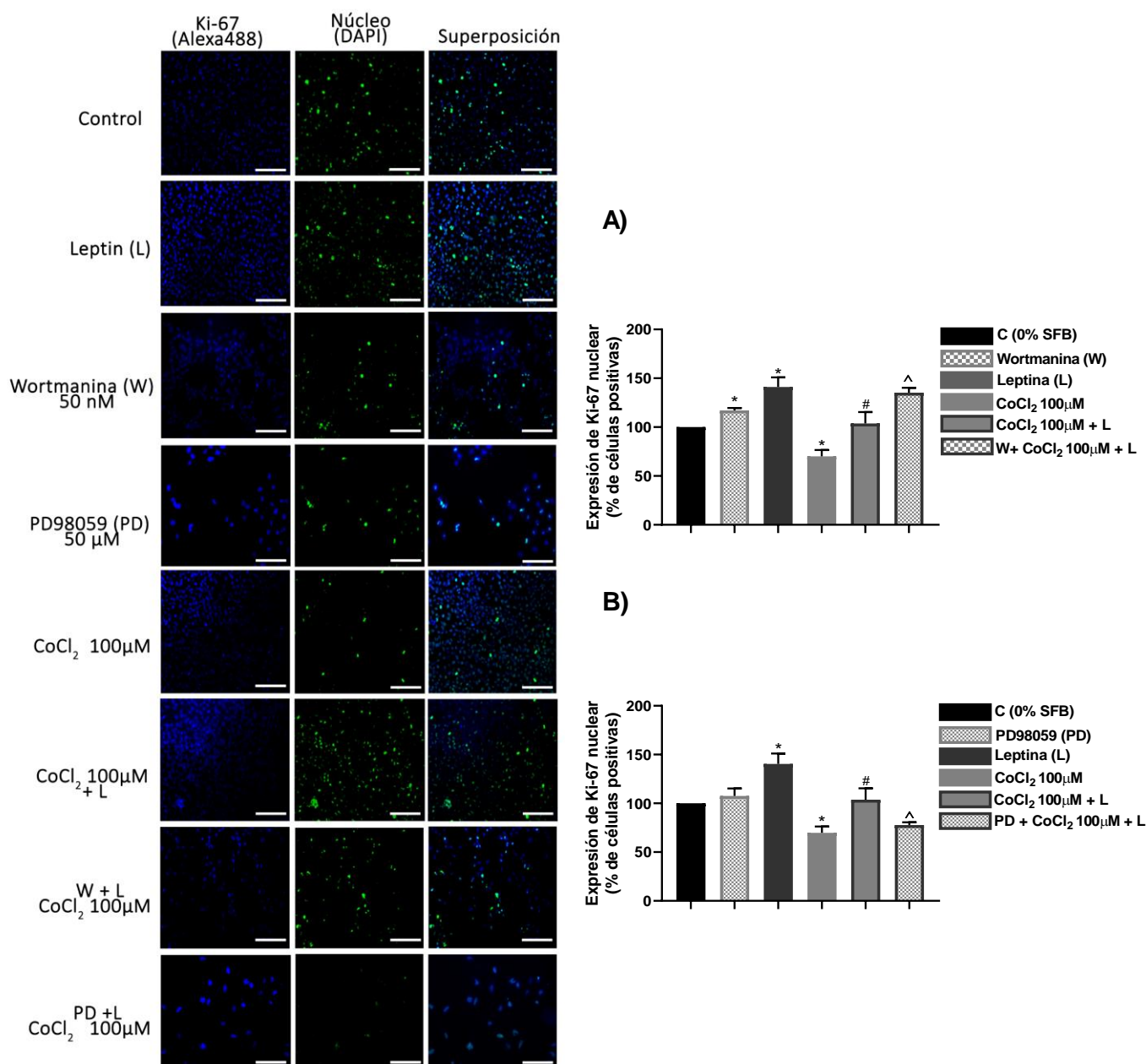


Figura R43: Participación de las vías PI3K y MAPK sobre la expresión de Ki-67 mediada por leptina en células Swan-71 luego de la estabilización de HIF-1α. Células Swan-71 fueron pretratados durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A) o MAPK (PD98059 50 μM) (B) en presencia o ausencia de 100 μM de CoCl₂ y estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 horas. Se determinó la expresión de Ki-67 (Alexa-488, verde) por Inmunofluorescencia. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Aumento: 10x. Escala: 100μm. En los paneles inferiores, se muestran los gráficos de cuantificación de la expresión de Ki-67 (% de células positivas). (n=4). *p<0.05 respecto al control no tratado #p<0.05 respecto al tratamiento con CoCl₂. ^p<0,05 respecto del tratamiento de CoCl₂ más leptina.

Resultados similares obtuvimos al analizar el recuento de células en cámara de Neubauer (**Figura R44**). La inhibición de la vía de PI3K no alteró el efecto de la leptina sobre la proliferación celular luego de tratar con 100 μ M CoCl₂ (**Figura R44A**). Como se observó previamente en relación a la expresión de Ki-67, la presencia del inhibidor de la vía de MAPK, revierte la acción proliferativa de la leptina en condiciones de hipoxia química inducida por la estabilización de HIF-1 α , disminuyendo el recuento de células Swan-71.

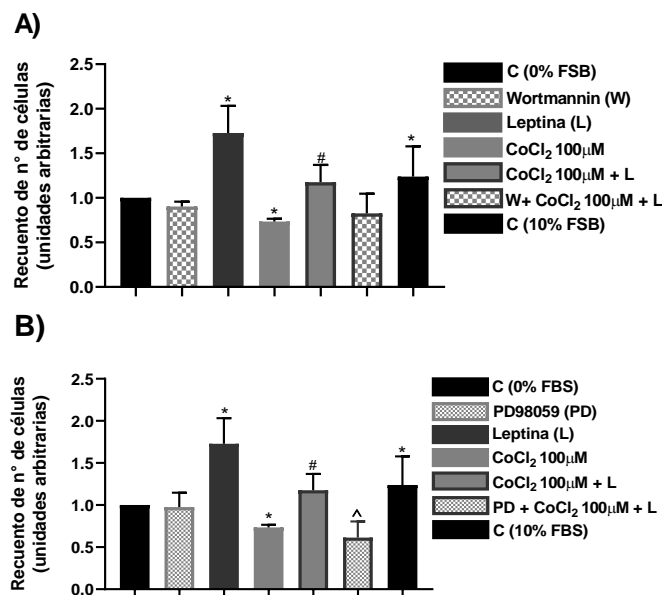


Figura R44: Participación de las vías PI3K y MAPK sobre la proliferación de células Swan-71 mediada por leptina luego de la estabilización de HIF-1 α . Células Swan-71 fueron pretratados durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A) o MAPK (PD98059 50 μ M) (B) en presencia o ausencia de 100 μ M de CoCl₂ y estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Se determinó el número de células en cámara de Neubauer. Se muestran los gráficos de cuantificación del número de células en unidades arbitrarias. (n=4). *p<0.05 respecto al control no tratado (-). #p<0.05 respecto del tratamiento con CoCl₂. ^p<0,05 respecto del tratamiento de CoCl₂ más leptina.

También, nos propusimos analizar si la inhibición de la vía de PI3K o MAPK interviene en la expresión de PCNA en las células Swan-71 o BeWo, cuando son tratadas con CoCl_2 y estimuladas con leptina durante 24 horas. En células Swan-71 la inhibición de las vías de PI3K y MAPK, no modifican el efecto de la leptina sobre la expresión de este marcador de proliferación (**Figura R45**).

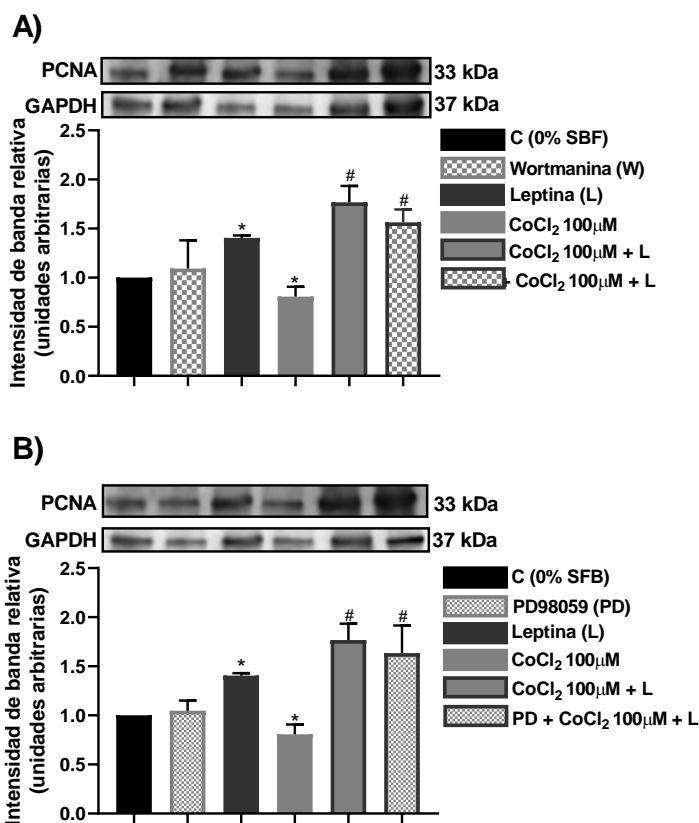


Figura R45: Participación de las vías PI3K y MAPK en la modulación de la leptina sobre la expresión de PCNA en células Swan-71 luego de la estabilización de HIF-1 α . Se determinó por Western blot la expresión de PCNA, luego de pretratar a células Swan-71 durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A) o MAPK (PD98059 50 μM) (B) en presencia o ausencia de 50 o 100 μM de CoCl_2 estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=3). * $p < 0.05$ con respecto al control. # $p < 0.05$ respecto del tratamiento con CoCl_2 .

Por otro lado, se realizaron experimentos similares en células BeWo. Observamos una disminución de la expresión de PCNA, respecto del aumento generado por la leptina luego de estabilizar a HIF-1 α , al pretratar las células trofoblásticas con Wortmanina (**Figura R46A**). Contrariamente, al inhibir la vía de MAPK, no se modificó la acción de la leptina sobre la expresión de este marcador (**Figura R46 B**).

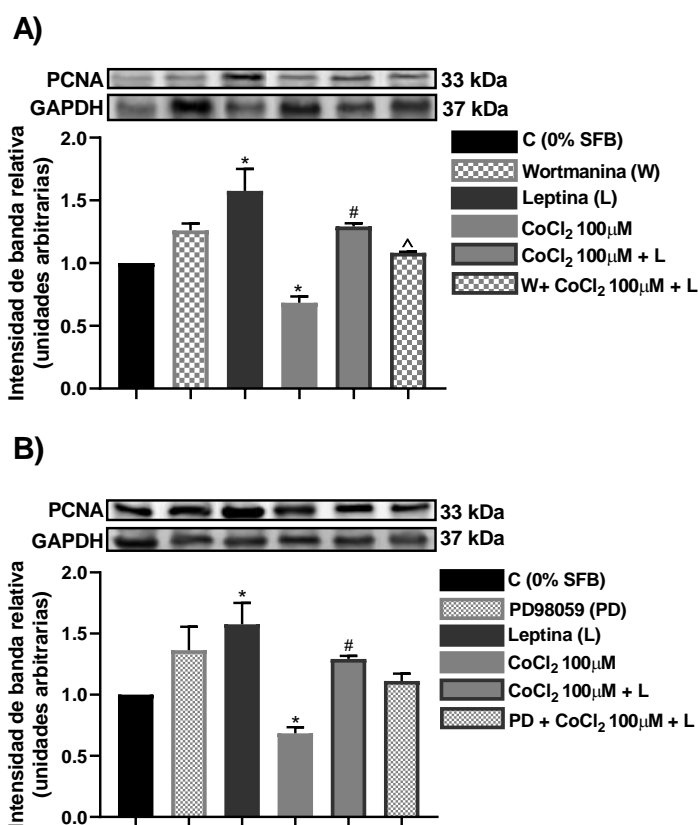


Figura R46: Participación de las vías PI3K y MAPK en la modulación de la leptina sobre la expresión de PCNA en células BeWo luego de la estabilización de HIF-1 α . Se determinó por Western blot la expresión de PCNA, luego de pretratar a células BeWo durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A) o MAPK (PD98059 50 μ M) (B) en presencia o ausencia de 50 o 100 μ M de CoCl₂ estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=3). *p<0.05 con respecto al control. #p<0.05 respecto del tratamiento con CoCl₂.

Por último, se determinó la viabilidad por el ensayo de MTT, para estudiar el efecto de la participación de las vías de señalización MAPK y PI3K en la viabilidad de células trofoblásticas Swan-71. Observamos una reducción significativa en la absorbancia de formazán cuándo se pretrató con los inhibidores Wortmanina o PD98059, respecto del efecto inducido por la leptina luego de estabilizar a HIF-1 α (Figura R47).

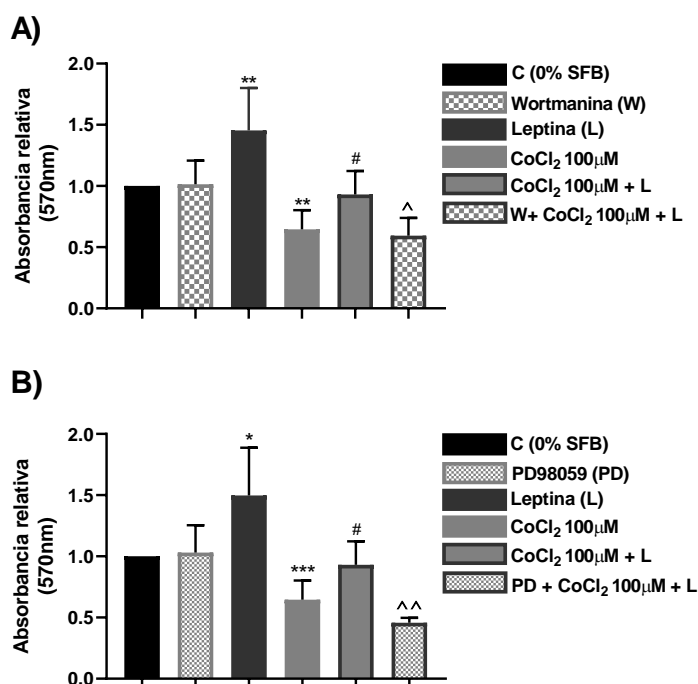


Figura R47: Estudio de la participación de las vías PI3K y MAPK en la modulación de la leptina sobre la viabilidad de células Swan-71 luego de la estabilización de HIF-1 α . Células Swan-71 fueron pre-incubadas durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A) o MAPK (PD98059 50 μ M) (B) en presencia o ausencia de con 50 o 100 μ M de CoCl₂ estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. (n=4). Se utilizó el ensayo de MTT para determinar la viabilidad celular. Se muestra la absorbancia relativa a 570 nm. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 con respecto al control. #p<0.05, ##p<0.01 respecto del tratamiento con CoCl₂. ^p<0,05, ^^p<0,01 respecto del tratamiento de CoCl₂ más leptina.

Todos estos resultados sugieren un papel importante de la leptina en la regulación de la viabilidad y proliferación de células trofoblásticas, en el contexto de estrés por hipoxia química involucrando la modulación de las vías MAPK y PI3K.

Rol del eje p53 en la supervivencia de células trofoblásticas mediada por la leptina

La apoptosis celular, es una muerte fisiológica que resulta en la eliminación de células no deseadas o dañadas. Particularmente durante la gestación, el proceso apoptótico está involucrado en diversos aspectos del desarrollo placentario como los son el crecimiento, el recambio celular y el parto. En este sentido, p53 es uno de los principales reguladores del ciclo celular ya que se encuentra implicada tanto en el arresto del ciclo celular como en la modulación de la muerte celular [327].

p53 es un factor de transcripción que se distribuye en el núcleo y el citoplasma, se une específicamente al ADN y regula la expresión de una diversidad de genes. En condiciones normales, los niveles celulares de la proteína p53 son muy bajos debido al estricto control de sus reguladores negativos y modificaciones postraduccionales de p53 [328]. Cuando las células están expuestas a señales de estrés, internas y externas, incluido el daño al ADN, hipoxia, privación de nutrientes, entre otras, la ubiquitinación de p53 se inhibe, lo que desencadena un rápido aumento en los niveles intracelulares de este factor de transcripción [329].

Estudios previos de nuestro laboratorio, demostraron que la leptina disminuye significativamente la expresión y la fosforilación de p53 en condiciones de estrés por privación de suero [229].

La estabilización de HIF-1 α aumenta la expresión de p53

Dada la función central del factor de transcripción p53 en la supervivencia celular, decidimos estudiar su expresión en el contexto de hipoxia química generada con CoCl₂. Para este objetivo células Swan-71 se incubaron con concentraciones crecientes de CoCl₂ durante 4, 7 y 24 horas, y se determinó mediante Western blot, la expresión de p53

Evidenciamos que la presencia de 100 μ M de CoCl₂ aumentó los niveles de p53 para todos los tiempos evaluados, siendo más evidente a las 7 y 24 h de tratamiento **(Figura R48)**.

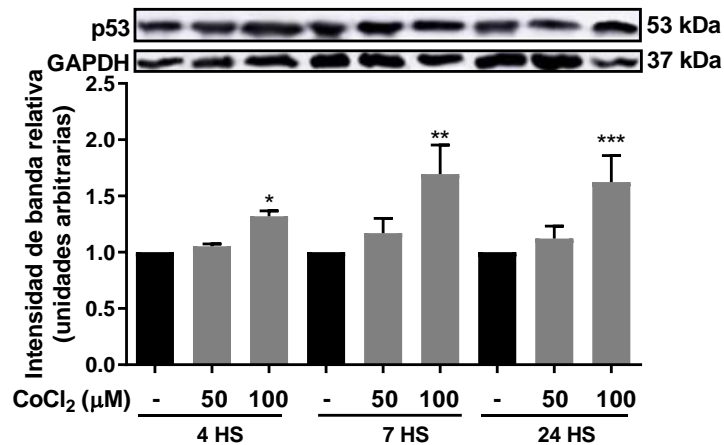


Figura R48: La estabilización de HIF-1α induce la expresión de p53 en células Swan-71.

Células Swan-71 se trataron con 50 o 100 μM de CoCl₂ durante 4, 7 y 24 hs. Se determinó por Western blot la expresión de p53. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=4). *p < 0.05, **p < 0.01 respecto al control no tratado (-).

Leptina disminuye la expresión de p53 luego de la estabilización de HIF-1α

Dentro del contexto de hipoxia química, nos propusimos estudiar el papel de la leptina sobre la expresión de p53, evaluada mediante PCR en tiempo real y Western blot.

Para nuestra sorpresa, la leptina indujo un aumento significativo de hasta 2 y 4 veces en los niveles de ARNm de p53 a las 7 y 24 horas de tratamiento respectivamente, en comparación con el control. A su vez, la mínima concentración analizada de CoCl₂ causó un aumento en p53 de 7 veces respecto del control a las 7 y 24 horas de tratamiento (**Figura R49 A y B**).

Por otro lado, se puede apreciar que 100 μM de CoCl₂, aumentó en menor medida los niveles de este factor de transcripción en ambos tiempos evaluados. Sin embargo, la leptina disminuyó significativamente la expresión relativa del ARNm de p53, luego de tratar a las células Swan-71 durante 24 horas con 50 μM de CoCl₂ (**Figura R49 B**).

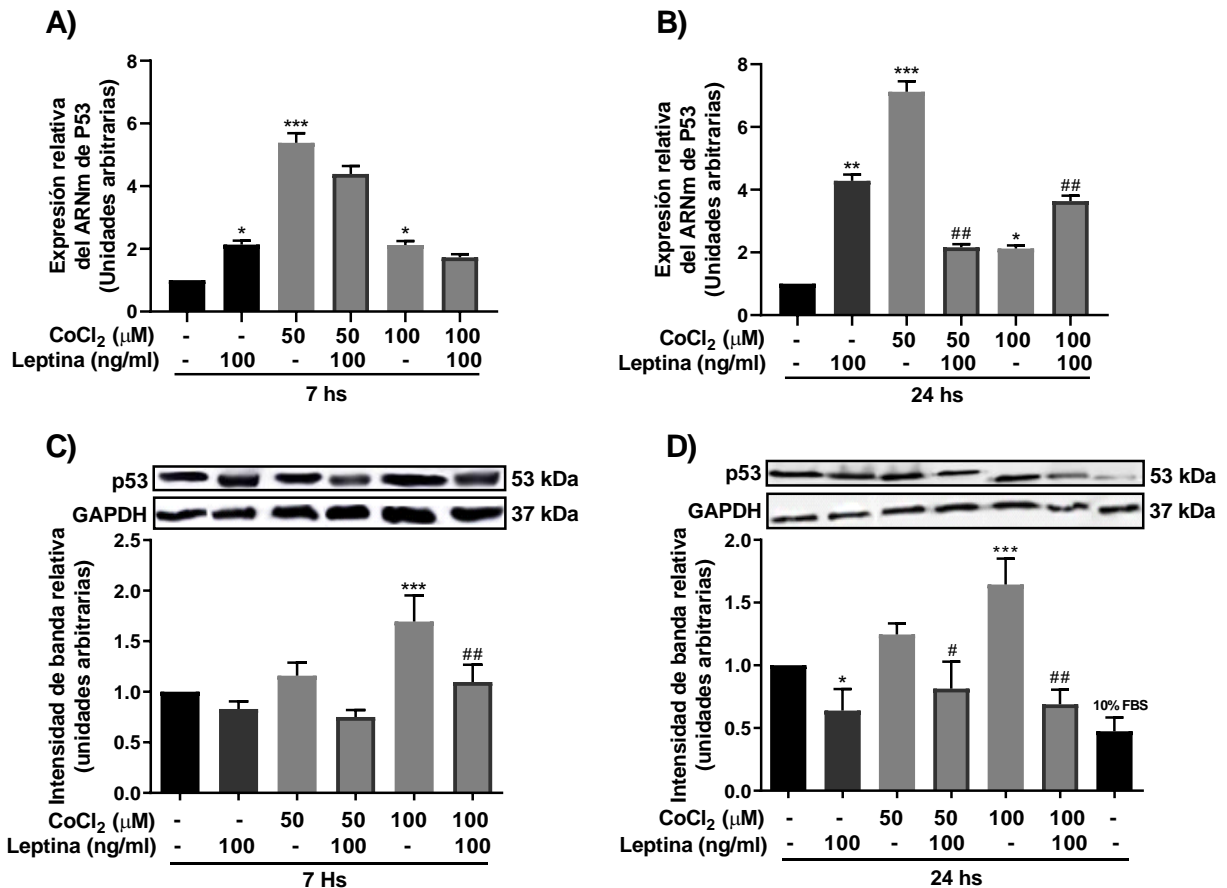


Figura R49: Leptina regula la expresión génica y proteica de p53 luego de la estabilización de HIF-1α en células Swan-71. Se determinó por qRT-PCR (A) (B) y Western Blot (C) (D) la expresión de p53 en células Swan-71 luego de ser incubadas con 50 o 100 μM de CoCl₂ durante 7 (A) (C) o 24 h (B) (D) en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml). La expresión de p53 se relativizó a la expresión de CICLOFILINA y de GAPDH (A) (B). Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda (C) (D). (n=4) *p<0.05, ***p<0.001 respecto al control no tratado. #p<0.05, ##p<0.01 respecto del tratamiento con CoCl₂.

Al determinar la expresión proteica de p53 en células Swan-71, encontramos que, el tratamiento con leptina no ejerce modificación del nivel de p53 A las 7 horas de tratamiento, sin embargo, disminuye su expresión a las 24 horas (**Figura R49 D**). La estabilización de HIF-1α utilizando la máxima concentración de CoCl₂ (100 μM) aumentó la expresión de p53 para ambos tiempos evaluados. Por otro lado, se observó que el co-tratamiento en condiciones de hipoxia química, la leptina, redujo a la mitad los niveles proteicos de p53 (**Figura R49 C y D**).

En la **Figura R50** se muestra el análisis de la expresión de p53 en células BeWo **(A)** y explantos de placenta humana a término **(B)**. En ambos tipos celulares, la hipoxia química lograda con 100 y 250 μM de CoCl_2 generó un aumento significativo en la expresión de p53. Luego de 24 horas de tratamiento observamos que, luego de la estabilización de HIF-1 α con 100 μM de CoCl_2 , la leptina contrarresta el efecto de la hipoxia química, disminuyendo los niveles de este factor de transcripción en ambos modelos celulares. A su vez, la leptina redujo los niveles proteicos de p53 respecto del control sin tratar en células trofoblásticas BeWo y en explantos placentarios.

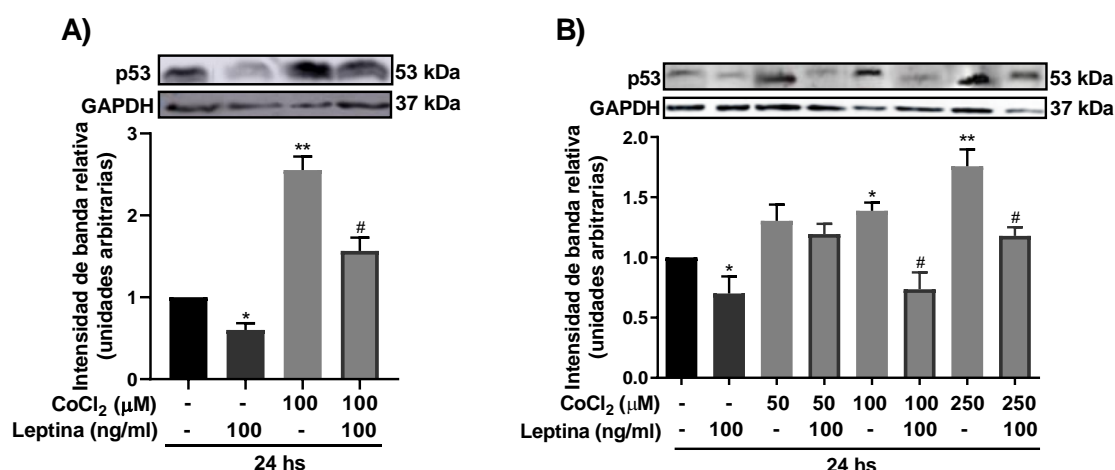


Figura R50: Leptina disminuye la expresión de p53 luego de la estabilización de HIF-1 α en células BeWo y explantos placentarios. Células BeWo (A) o explantos placentarios (B) fueron incubadas con 100 y/o 250 μM de CoCl_2 en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Se determinó por Western blot la expresión p53. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=4). *p<0.05, **p<0.01 respecto al control no tratado. #p<0.05 respecto del tratamiento con CoCl_2 .

Estos resultados indican que la acumulación del factor HIF-1 α produce un aumento en la expresión de p53 implicada en la supervivencia y la apoptosis. Por otro lado, si bien se observa que leptina incrementa el ARNm de p53, a nivel proteico disminuye la expresión de p53 y contrarresta el efecto producido por la estabilización de HIF-1 α .

El supresor tumoral p53, en su forma activa, se transloca al núcleo celular y estimula la expresión de diversos genes blanco implicados en la regulación del ciclo celular y la apoptosis. Para continuar nuestro estudio, examinamos su localización en células Swan-71 mediante inmunofluorescencia.

En la **Figura R51**, se aprecia que en células control sin CoCl_2 y sin suero fetal bovino, p53 se localiza predominantemente en el núcleo celular. Además, observamos un incremento en la intensidad de la expresión de esta proteína en el núcleo en presencia de CoCl_2 , a las 7 y 24 horas de tratamiento. Por otro lado, el tratamiento con leptina reduce significativamente la expresión de este factor de transcripción después de la exposición de las células a 100 μM de CoCl_2 para ambos tiempos evaluados.

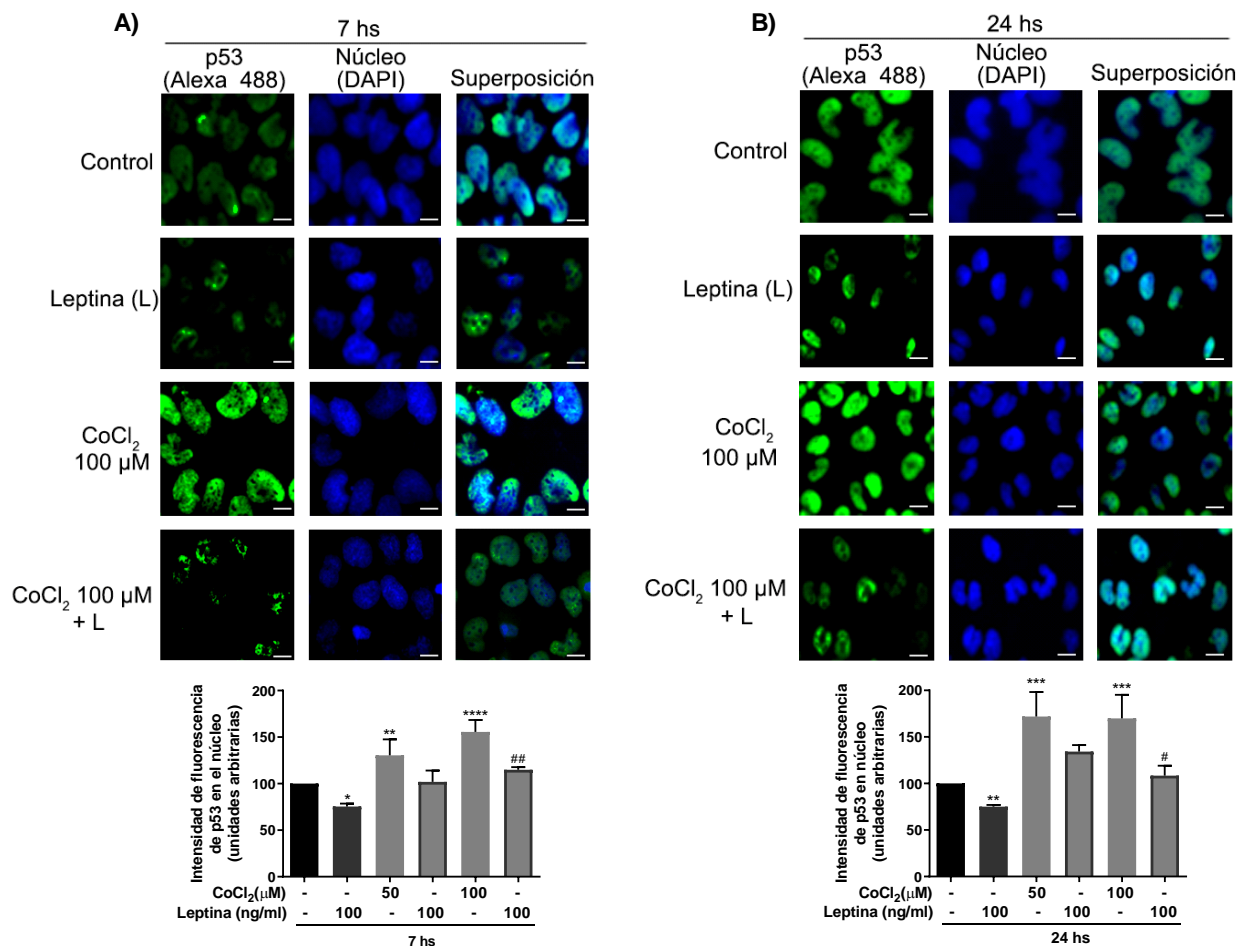


Figura R51: Leptina reduce la presencia de p53 en el núcleo luego de la estabilización de HIF-1 α en células Swan-71. Se determinó la expresión y localización de p53 (Alexa-488, verde) por inmunofluorescencia en células Swan-71 incubadas con 50 o 100 μM de CoCl_2 en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml) durante 7 hs (A) o 24 (B) hs. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Aumento: 40x. Escala: 43 μm . En los paneles inferiores, se muestran los gráficos de cuantificación de la expresión de p53 (% de intensidad de p53 en núcleo) (n=4). **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 respecto al control no tratado (-). #p<0.05, ##p<0.01 respecto del tratamiento con CoCl_2 .

Estos hallazgos sugieren de manera conjunta que la leptina podría estar inhibiendo la señalización de p53, promoviendo la supervivencia de las células trofoblásticas al disminuir la apoptosis. Además, estos resultados concuerdan con datos previos del laboratorio donde se observó, mediante Western blot y PCR en tiempo real, la reducción de la expresión de p53 debido al tratamiento con leptina en condiciones de estrés, como el estrés ácido y térmico [229, 304].

Vías de señalización involucradas en la regulación de la expresión de p53 mediada por la leptina luego de la estabilización HIF- α

La vía de señalización de Akt puede modular la función de p53 a través de la activación de modificaciones post-traduccionales y la regulación de su estabilidad mediante la expresión de Mdm-2 lo que puede tener implicaciones importantes en la respuesta celular al estrés y la supervivencia celular. Reportes previos postulan que la leptina secretada por células de cáncer de pulmón promueve la proliferación al regular la actividad de la vía de p53 a través de la señalización por PI3K/AKT [330, 331].

Trabajos previos de nuestro grupo, han demostrado que la leptina protege a los trofoblastos humanos de la muerte celular inducida por la privación de suero. Este efecto protector se asocia con una disminución de la expresión de p53, mediada por las vías de señalización MAPK y PI3K.

Abordamos el estudio de las vías de señalización activadas por la leptina luego de la estabilización de HIF-1 α , en la regulación de la expresión de p53.

Para ello, células trofoblásticas Swan-71, BeWo y explantos placentarios, fueron pretratados con los inhibidores de las vías PI3K y MAPK, en presencia de 100 μ M de CoCl₂ y estimulados con leptina. A las 24 horas la expresión de p53 fue evaluada mediante Western Blot.

En la **Figura R52**, podemos apreciar que la inhibición con Wortmanina de la vía de PI3K, bloqueó la disminución de p53 producida por leptina en células trofoblásticas. (**Figura R52 A y C**). Es relevante aclarar que la inhibición de la vía de PI3K en las células BeWo, aumentó significativamente la expresión de p53 respecto del control. Estos resultados podrían deberse al origen tumoral de esta línea celular.

Por otro lado, no observamos una alteración significativa de la acción de la leptina sobre p53, al bloquear la vía de MAPK mediante la utilización del inhibidor PD, en células Swan-71 (**Figura R52 B**).

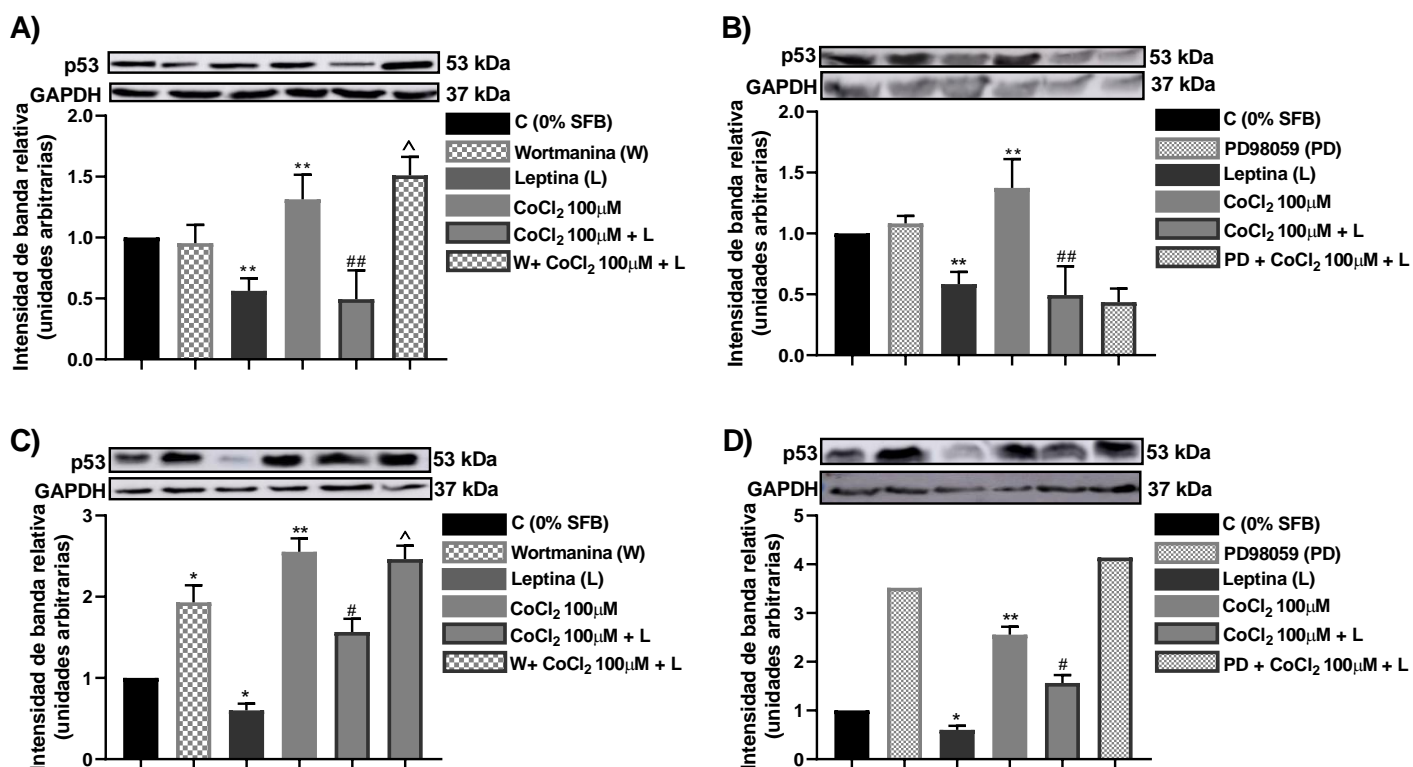


Figura R52: Leptina modula la expresión de p53 a través de la vía de PI3K luego de la estabilización de HIF-1α en células trofoblásticas. Se determinó por Western blot la expresión de p53, luego de pretratar a células Swan-71 (A) (B) o BeWo (C) (D) durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A) (C) o MAPK (PD98059 50 μM) (B) (D) en presencia o ausencia de 100 μM de CoCl₂ estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=3) (A) (B) (C), (n=1) (D). *p<0.05, **p<0.01 con respecto al control. #p<0.05, ##p<0.01 respecto del tratamiento con CoCl₂. ^p<0,05 respecto del tratamiento de CoCl₂ más leptina.

En la línea celular BeWo, de manera preliminar, luego de estabilizar al factor de transcripción HIF-1α y en presencia del inhibidor PD, observamos que la acción de la leptina se vería impedida, al no poder reducir los niveles de p53 (**Figura R52 D**). Estos resultados sugerirían que la vía de MAPK estaría implicada en el efecto de leptina sobre la expresión de p53.

Al evaluar las vías involucradas en la regulación de p53 mediada por la leptina luego del tratamiento con 250 μ M de CoCl₂ en explantos placentarios, encontramos que el bloqueo de la vía de PI3K con Wortmanina, revierte el efecto de la leptina sobre la presencia de p53 determinado por Western blot, igual a lo observado en las líneas celulares (**Figura R53 A**). A su vez la presencia o ausencia del inhibidor PD, no modificó la acción de la leptina sobre este supresor tumoral en células trofoblásticas derivadas de explantos placentarios (**Figura R53 B**).

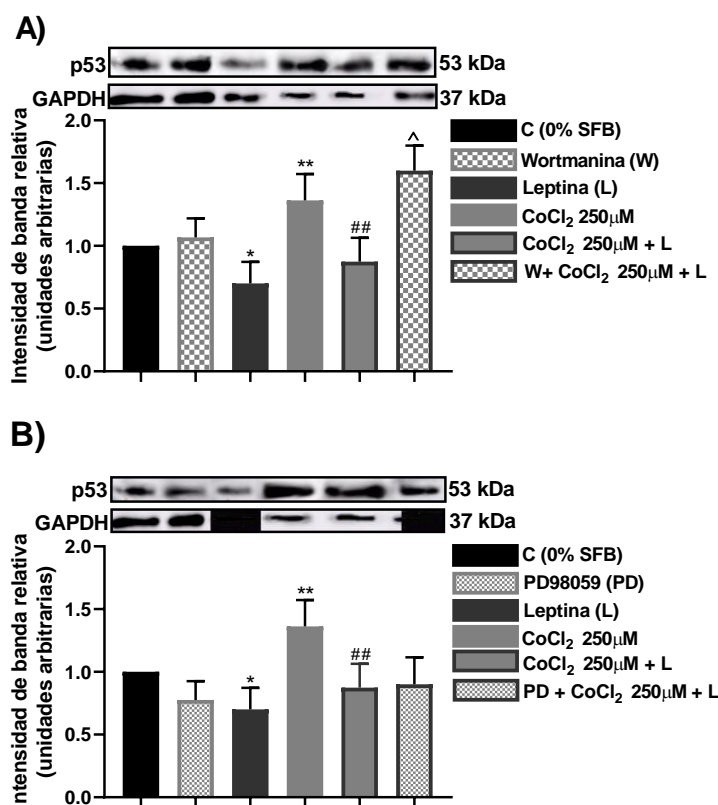


Figura R53: Leptina modula la expresión de p53 a través de la vía de PI3K luego de la estabilización de HIF-1 α en explantos de placenta humana a término. Se determinó por Western blot la expresión de p53, luego de pretratar a explantos placentarios durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A) o MAPK (PD98059 50 μ M) (B) en presencia o ausencia de 250 μ M de CoCl₂, estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=3). *p<0.05, **p<0.01 con respecto al control. ##p<0.01 respecto del tratamiento con CoCl₂. ^p<0,05 respecto del tratamiento de CoCl₂ más leptina.

Leptina regula la expresión de Mdm-2 luego de la estabilización de HIF-1 α

La expresión del supresor tumoral p53 es inhibida por Mdm-2, lo que presenta una regulación de retroalimentación negativa clásica que se regula en respuesta a condiciones de estrés como, por ejemplo, la hipoxia. Durante el desarrollo placentario, la expresión y la actividad de Mdm-2 y p53 están finamente reguladas para garantizar una proliferación celular adecuada y la eliminación de células dañadas o no deseadas [304]. Además, bajo privación de suero, la leptina aumenta los niveles de Mdm-2, en células trofoblásticas [332]. Por lo tanto, para comprender los mecanismos subyacentes que controlan la expresión y la actividad de p53 en la placenta, continuamos por estudiar su proteína regulatoria, Mdm-2.

En la **Figura R54**, se presentan los resultados derivados del tratamiento de células Swan-71 o BeWo con dosis crecientes de CoCl₂ durante 7 y 24 horas en presencia o ausencia de leptina.

Para ambas concentraciones evaluadas, la estabilización de HIF-1 α redujo la presencia de Mdm-2 determinado mediante Western Blot. Antagónicamente, la leptina no sólo aumentó los niveles de esta ubiquitina E3 ligasa en ausencia de suero (segunda barra) sino que también contrarrestó significativamente el efecto del CoCl₂, a las 7 y 24 horas de tratamiento para ambas concentraciones de CoCl₂ estudiadas (**Figura R54 A y B**). Resultados similares obtuvimos al analizar los niveles de Mdm-2 modulado por leptina en células trofoblásticas BeWo, luego de 24 horas de tratamiento con 100 μ M de CoCl₂ (**Figura R54 C**).

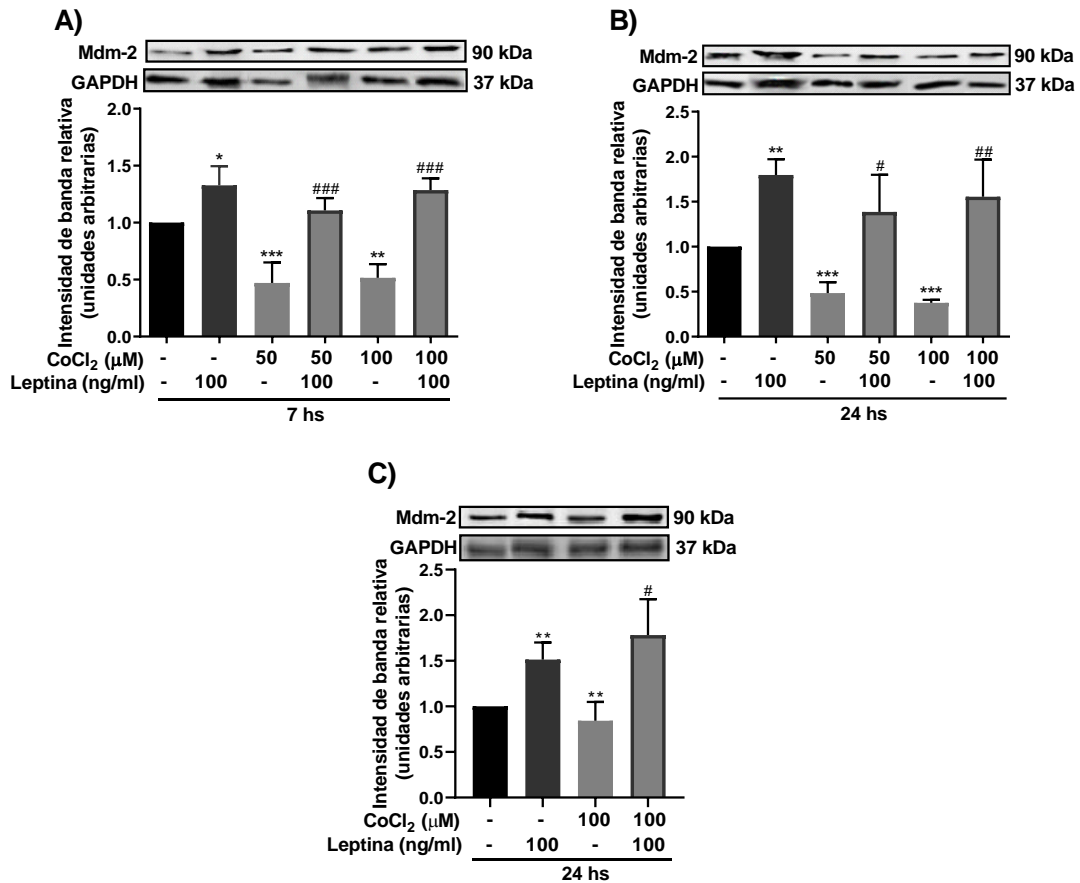


Figura R54: Leptina aumenta la expresión de Mdm-2 luego de la estabilización de HIF-1α en células trofoblásticas. Luego de la incubación con 50 o 100 μM de CoCl₂ en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml) durante 7 hs (A) o 24 hs (B y C) en células Swan-71 (A y B) o BeWo (C) se determinó por Western blot la expresión de Mdm-2. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades. (n=3). **p<0.01, ***p<0.01 respecto al control no tratado. #p<0.05, ##p<0.01, respecto del tratamiento con CoCl₂.

Vías de señalización involucradas en la regulación de la expresión de Mdm-2 por la leptina luego de la estabilización HIF-1 α

Distintas vías de señalización, en particular PI3K/Akt converge en la regulación positiva de Mdm-2 y en consecuencia la inhibición de p53 [333-335].

En la **Figura R55 A y B** se visualiza, que en células Swan-71, la inhibición de la vía de PI3K, no altera la regulación de la leptina sobre la expresión relativa de Mdm-2. Sin embargo, luego de la estabilización de HIF-1 α , en presencia del inhibidor PD, la leptina pierde su regulación al disminuir los niveles de Mdm-2. Caso contrario en células trofoblásticas BeWo, encontramos que respecto del aumento que generó la leptina sobre Mdm-2, luego de la exposición con 100 μ M de CoCl₂, se ve totalmente bloqueado al pretratar a las células con el inhibidor Wortmanina, mientras que no observamos diferencias significativas al bloquear la vía de MAPK (**Figura R55 C y D**).

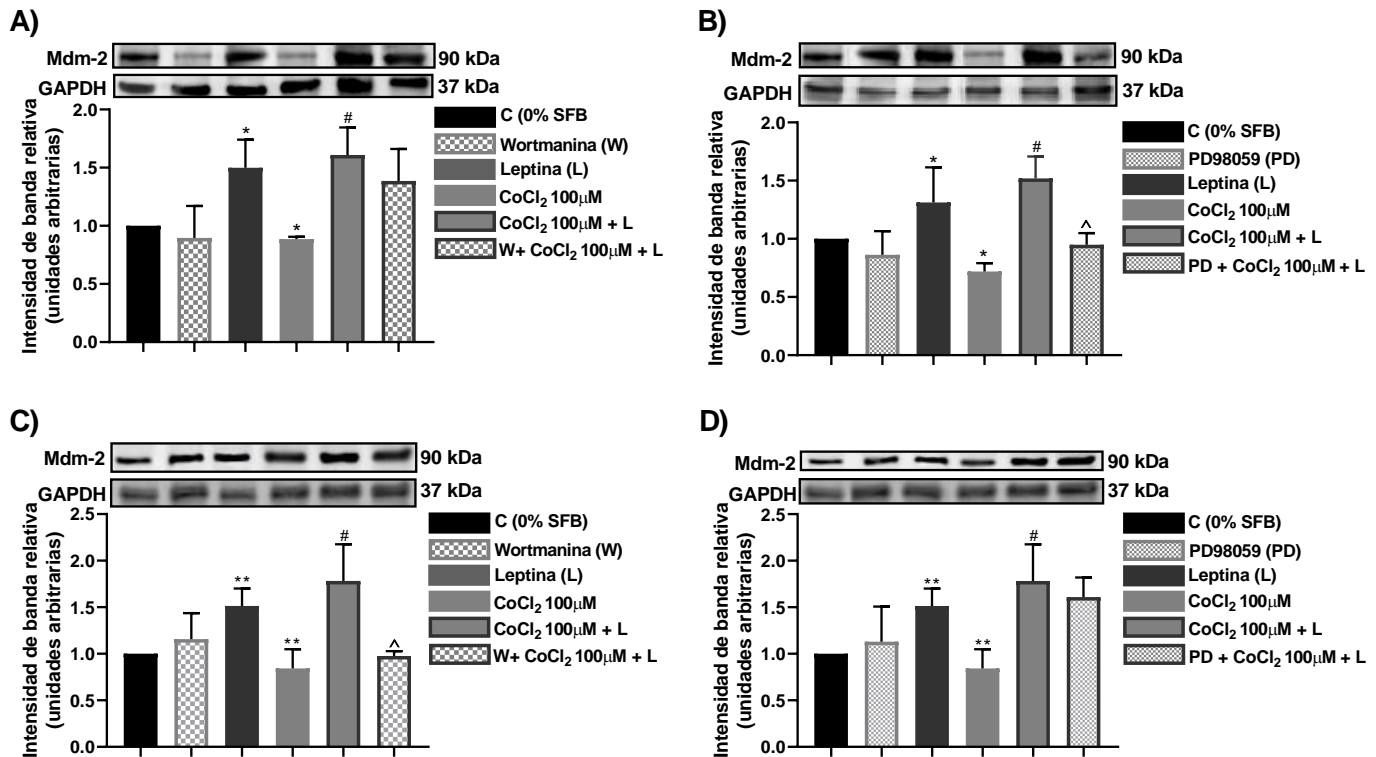


Figura R55: Leptina modula la expresión de Mdm-2 a través de la vía de PI3K y MAPK luego de la estabilización de HIF-1α en células trofoblásticas. Se determinó por Western blot la expresión Mdm-2, luego de pretratar a células Swan-71 (A)(B) o BeWo (C)(D) durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A)(C) o MAPK (PD98059 50 μM) (B)(D) en presencia o ausencia de con 100 μM de CoCl₂ estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=3). *p<0.05, **p<0.01 con respecto al control. #p<0.05 respecto del tratamiento con CoCl₂. ^p<0,05 respecto del tratamiento de CoCl₂ más leptina.

En conjunto los resultados presentados, sugieren que la leptina regula la vía de p53/Mdm-2 en células trofoblásticas en el contexto de hipoxia química modulando las vías de PI3K y MAPK.

Leptina regula la expresión de p53 bajo condiciones de baja concentración de oxígeno (2%).

Se ha demostrado que HIF-1 α promueve la vía de señalización apoptótica a través de p53 en células epiteliales de mucosa o en líneas celulares de carcinoma humano [336, 337]. Es bien sabido que la apoptosis juega un papel importante tanto en la morfogénesis como en la patogénesis placentaria normal. En las placentas humanas, la disfunción trofoblástica está asociada con la apoptosis inducida por la hipoxia patológica. Además, la hipoxia induce la expresión de p53 en la placenta. Sin embargo, el mecanismo subyacente que regula p53 por el estrés hipóxico sigue siendo desconocido.

Dado que la leptina regula la expresión de p53 y Mdm-2, decidimos abordar la modulación de la leptina sobre este supresor tumoral y su regulador negativo en el contexto de hipoxia fisiológica mediante de la incubación en una cámara regulada al 2 % de O₂ luego de 24 horas de tratamiento.

Análogamente a lo observado luego del tratamiento con 100 μ M de CoCl₂ (**Figura R50**), en la **Figura R56**, observamos que la leptina disminuyó la expresión relativa de p53, respecto de su expresión en el control 2% O₂ (**A**). El tratamiento con 6-Aminoflavona, que inhibe la estabilización de HIF-1 α durante la hipoxia, aumentó la expresión de p53 en comparación con el control. Por otro lado, en el co-tratamiento con 6-Aminoflavona, la leptina pierde su efecto sobre los niveles de p53 durante la hipoxia (**Figura R56 A**).

Dado que la leptina a través de la señalización de HIF-1 α durante la hipoxia modula la presencia de p53, decidimos abordar el estudio sobre su regulador negativo Mdm-2. En la **Figura R56 B**, se puede apreciar de que, luego de 24 horas de exposición a 2 % de O₂, la presencia de la 6-Aminoflavona, produce un aumento en la expresión de Mdm-2, al igual que la leptina. Este aumento generado por la leptina, se vería impedido al co-incubar a las células Swan-71 con el inhibidor de HIF-1, 6-aminoflavona, disminuyendo los niveles hasta alcanzar el observado en el control 2% de O₂.

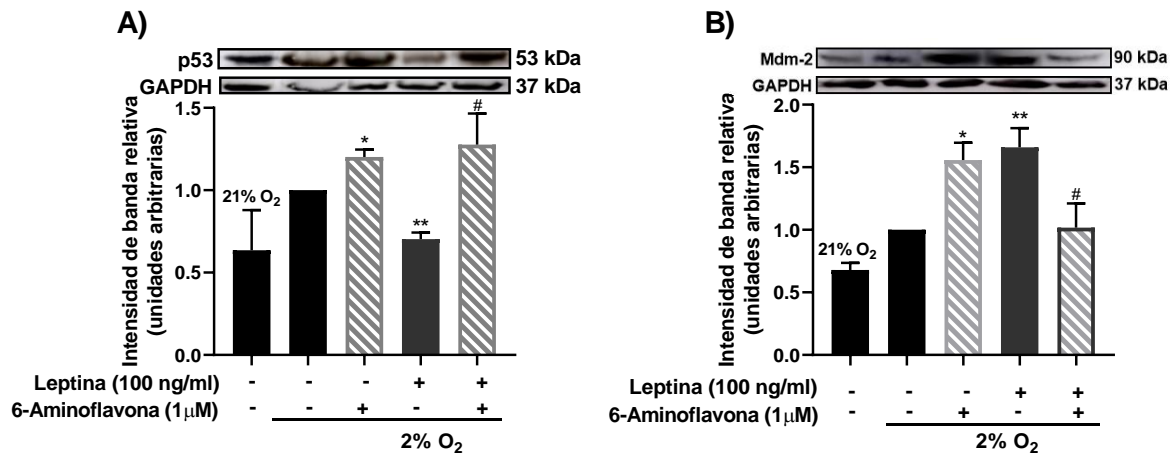


Figura R56: Modulación de la leptina sobre la vía p53 en hipoxia (2% O₂). Células Swan-71 se pretrataron con 6-aminoflavona (1 μM) durante 30 minutos, luego se las estimuló con leptina (100 ng/ml) durante 24 horas expuestas a 2% de O₂ en cámara de hipoxia. Se determinó por Western blot la expresión de p53 (A) o Mdm-2 (B). Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=2). *p<0.05, **p<0.01 respecto al control no tratado en hipoxia. #p<0.05, respecto del tratamiento con leptina.

Todos estos resultados sugieren que la regulación de la leptina sobre la vía de p53, es dependiente de HIF-1α.

Leptina regula la vía de p53 a través PI3K/Akt bajo condiciones de baja concentración de oxígeno (2%)

Al realizar los experimentos de determinación de las vías de señalización involucradas en el efecto de leptina luego de incubación durante 24 h en la cámara hipóxica, encontramos que la leptina disminuyó los niveles de p53, efecto que se vio impedido luego de bloquear la señalización de PI3K (**Figura R57 A**).

En concordancia, al analizar la expresión de la ubiquitina E3 ligasa Mdm-2, durante 24 horas de hipoxia, se puede ver en la **Figura R57 B** que durante la hipoxia la leptina incrementó los niveles de Mdm-2 y el bloqueo de la señalización a través de PI3K reduce su expresión, aún en presencia de leptina.

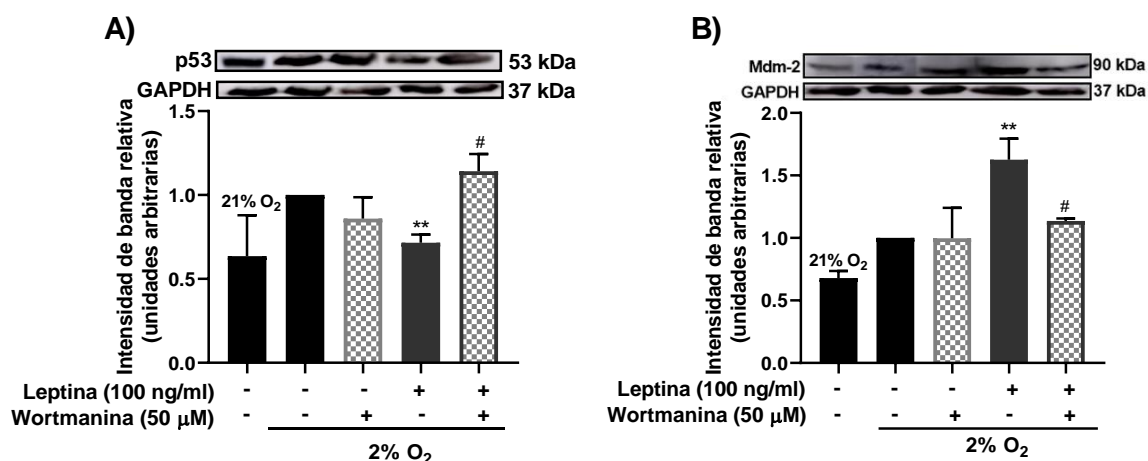


Figura R57: Participación de la vía de PI3K sobre la vía de p53 modulada por leptina en hipoxia (2% O₂). Células Swan-71 se pretrataron con el inhibidor farmacológico Wortmanina (50 nM) durante 30 minutos, luego se las estimuló con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs expuestas a 2% de O₂ en cámara de hipoxia. Se determinó por Western blot la expresión de p53 (A) o Mdm-2 (B). Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=2) (A), (n=1) (B). **p<0.01 respecto al control no tratado en hipoxia. #p<0.05, respecto del tratamiento con leptina.

En conjunto estos resultados sugieren que la leptina interviene en la señalización de HIF-1 α y PI3K para controlar la activación de Mdm-2 y en consecuencia los niveles y actividad del supresor tumoral p53.

Leptina estimula la migración de células trofoblásticas

Durante la placentación los trofoblastos penetran el endometrio hasta el estroma e invaden los vasos maternos. Los procesos de migración e invasión trofoblástica son críticos para el éxito de la implantación y la placentación y es por esta razón que son procesos altamente regulados [1]. Por consiguiente, distintas patologías asociadas al embarazo tienen como causa una invasión excesiva o deficiente [338]. Cuando hay una inadecuada remodelación de las arterias espirales se genera un ambiente hipóxico que provoca una compleja cascada de eventos que inducen a una función endotelial anormal característica de la preeclampsia [339].

En este contexto, este capítulo se centra en el estudio de leptina como una posible citoquina promotora de la invasión trofoblástica y su rol frente a la estabilización de HIF-1 α . Para responder dicho interrogante evaluamos la acción de leptina sobre la migración de células Swan-71.

Decidimos investigar si leptina era capaz de modular la capacidad migratoria de las células placentarias. Para dicho fin, llevamos a cabo ensayos de cierre de herida y encontramos que el tratamiento con CoCl_2 redujo la migración de células Swan-71 luego de 12 horas de tratamiento (**Figura R58**).

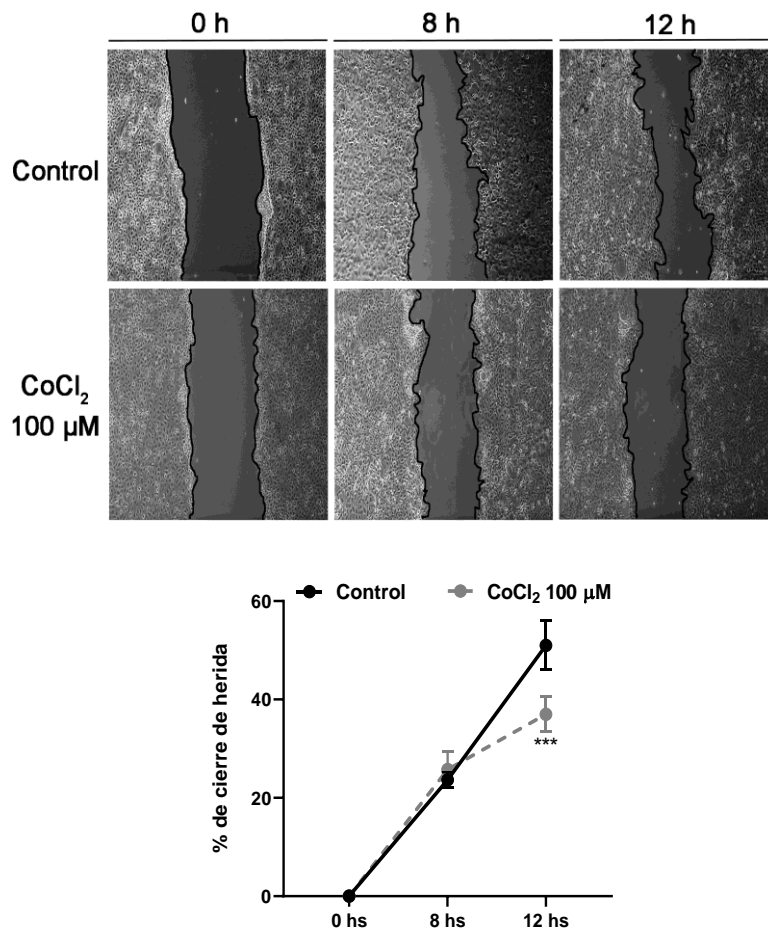


Figura R58: La estabilización de HIF-1 α reduce la migración de células Swan-71. Se evaluó la migración de células Swan-71 mediante el ensayo de cierre de herida. Las células se trataron con 100 μM de CoCl_2 durante 12 hs. Para poder realizar el análisis correspondiente se tomaron fotografías a los tiempos evaluados 0, 8 y 12 hs. En el panel superior se muestran fotografías representativas para cada tratamiento. El grafico muestra el porcentaje de cierre de herida obtenido en cada tratamiento en los tiempos correspondientes (n=5). ***p<0,001 con respecto al control.

Por otro lado, el tratamiento con 100 ng/ml de leptina promovió la migración celular, ya que aumentó en un 19% el porcentaje de cierre de la herida, en comparación al control. A su vez, luego de estabilizar a HIF-1 α observamos que la leptina fue aún capaz de estimular la migración de células Swan-71, de manera similar a lo encontrado en el tratamiento solo con leptina (**Figura R59 A**). De manera que, frente a la hipoxia química la leptina es capaz de promover la migración de células trofoblásticas.

Luego, nos interesó determinar si la vía de señalización de PI3K estaba involucrada en el efecto de leptina sobre la migración de células Swan-71. Para ello, previo al agregado de 100 ng/ml de leptina, las células fueron pre tratadas con el inhibidor farmacológico, Wortmanina y se expusieron a 100 μ M de CoCl₂. Luego, evaluamos la migración celular después de 8 y 12 horas de incubación.

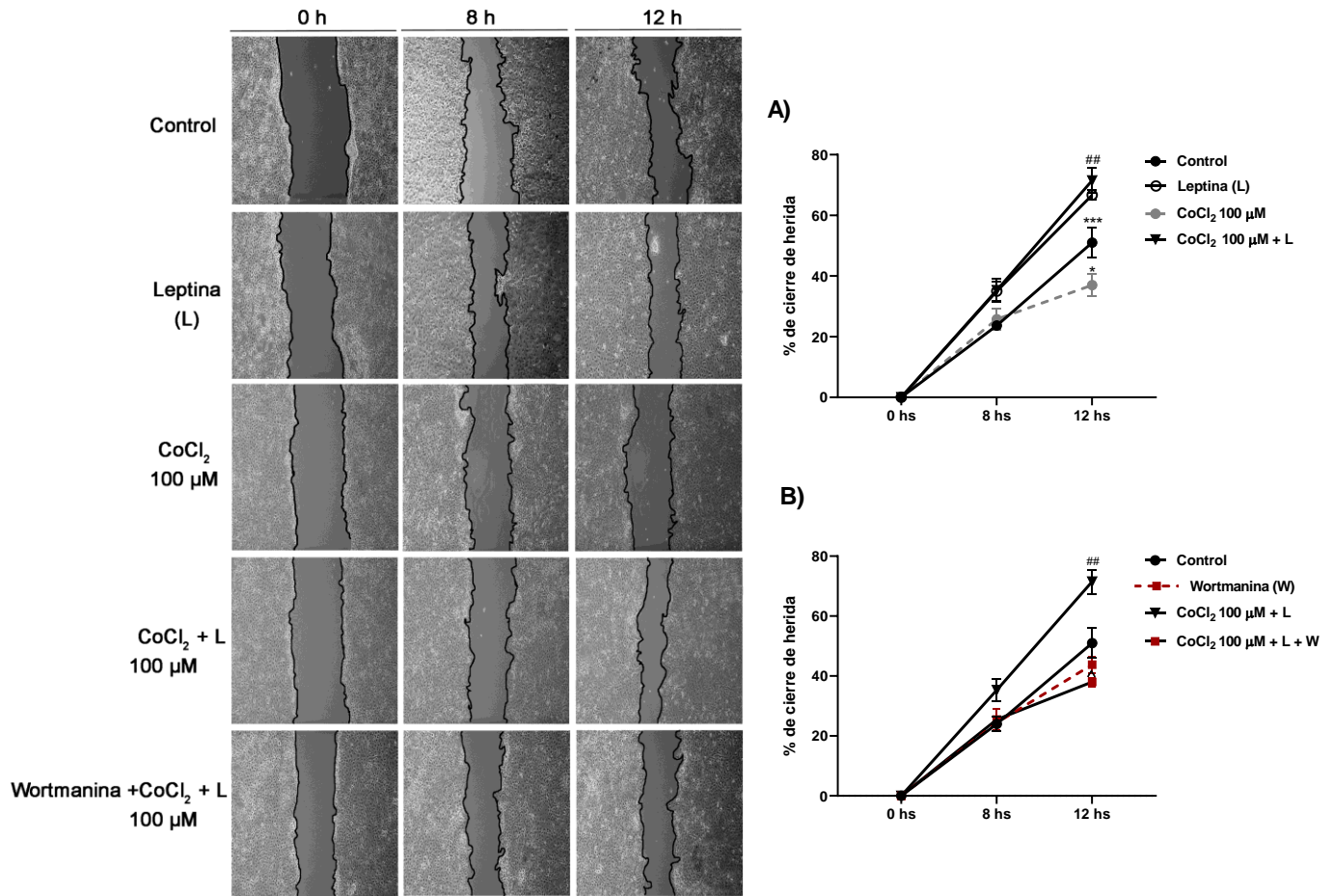


Figura R59: Leptina estimula la migración de células Swan-71 a través de la vía de PI3K luego de la estabilización de HIF-1 α . Se evaluó la migración de células Swan-71 mediante el ensayo de cierre de herida. (A) Las células fueron expuestas a 100 μ M de CoCl₂ y luego se agregó 100 ng/ml de leptina (Tiempo 0 hs) (B) Las células se pretrataron con el inhibidor farmacológico de la vía de PI3K (Wortmanina 50 nM) durante 30 minutos, en presencia o ausencia de 100 μ M de CoCl₂ y estimulados con leptina (100 ng/ml) (Tiempo 0 hs). Para poder realizar el análisis correspondiente se tomaron fotografías a los tiempos evaluados 0, 8 y 12 hs. En el panel superior se muestran fotografías representativas para cada tratamiento. El grafico muestra el porcentaje de cierre de herida obtenido en cada tratamiento en los tiempos correspondientes (n=5). *p<0,05, ***p<0,001 con respecto al control. ##p<0.01 respecto del tratamiento con CoCl₂. ^p<0,05 respecto del tratamiento de CoCl₂ más leptina.

En la **Figura R59 B** se puede observar, que el agregado de Wortmanina, no tuvo un efecto *per se* sobre la migración celular. Sin embargo, al pretratar a las células con el inhibidor, el CoCl_2 y luego estimuladas con leptina, evidenciamos una reducción significativa sobre el porcentaje de cierre de herida en comparación al determinado en el tratamiento con 100 μM de CoCl_2 más leptina. Estos resultados sugieren que, la hipoxia química retrasa la migración de células trofoblásticas y la leptina en este contexto estimula la capacidad migratoria de las células Swan-71 dependiente de la vía de PI3K.

Regulación de HIF-1 α mediado por leptina

Se ha propuesto que la disminución en la tensión del oxígeno estimula la producción de leptina en endometrio, células periodontales y preadipocitos y líneas celulares de trofoblasto [340-342]. A su vez, la acción fisiológica de la leptina al modular la adaptación metabólica de diferentes tejidos periféricos apoya la hipótesis de que también podría ejercer un efecto directo sobre las células cancerosas. Se ha propuesto que, el tratamiento con leptina induce la regulación de HIF-1 α y estimula la adhesión e invasión de células de cáncer de próstata cultivadas en hipoxia [343].

La leptina puede reducir la expresión de HIF-1 α , lo que resulta en una disminución de su disponibilidad como factor de transcripción, incluso en condiciones de hipoxia [344]. Además, la leptina puede acelerar la degradación de la proteína HIF-1 α , lo que facilita su eliminación y reduce su persistencia en el núcleo celular. Al disminuir los niveles de HIF-1 α o su estabilidad, la leptina puede interferir con la capacidad de este factor para activar la transcripción de genes relacionados con la respuesta a la hipoxia y otros procesos celulares [345]. Sin embargo, actualmente hay pocas evidencias acerca de la regulación de la leptina sobre la estabilidad o expresión de HIF-1 α .

Nuestro objetivo fue investigar acerca del rol de la leptina sobre HIF-1 α durante la hipoxia química generada luego del tratamiento de CoCl_2 en células trofoblásticas Swan-71 y BeWo.

Leptina modula la estabilidad de HIF-1 α

Comenzamos por estudiar el efecto de la leptina sobre la estabilidad de HIF-1 α , en condiciones de hipoxia química. Tal como fue observado previamente, 100 μ M de CoCl₂ indujo un incremento en los niveles de HIF-1 α después de 24 horas mediante el análisis de Western Blot (**ver Figura R1**). Sin embargo, en el contexto de hipoxia química, la leptina disminuyó la presencia de la banda de 120 kDa correspondiente a HIF-1 α en ambos tipos celulares (**Figura R60**).

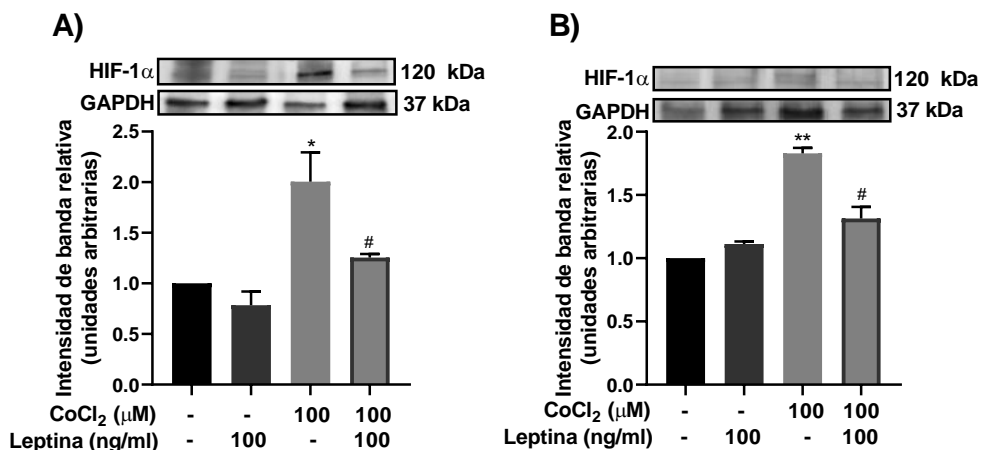


Figura R60: Leptina modula los niveles de HIF-1 α en células trofoblásticas. Se determinó por Western blot la expresión HIF-1 α , luego de pretratar a células Swan-71 (A) o BeWo (B) en presencia o ausencia de 100 μ M de CoCl₂ en presencia de leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=3). *p<0.05, **p<0.01 con respecto al control. #p<0.05 respecto del tratamiento con CoCl₂.

Además, para evaluar los mecanismos subyacentes, pretratamos las líneas celulares Swan-71 y BeWo con inhibidores específicos de las vías de señalización activadas por la leptina, como la Wortmanina y el PD, antes de exponerlas a CoCl₂ en presencia o ausencia de leptina (100 ng/ml).

Nuestros resultados, como se muestra en la **Figura R61 A y C**, la presencia o ausencia del inhibidor de la vía PI3K no modificó la estabilidad y presencia de HIF-1 α , luego de que las células Swan-71 o BeWo fueran estimuladas con 100 ng/ml de leptina.

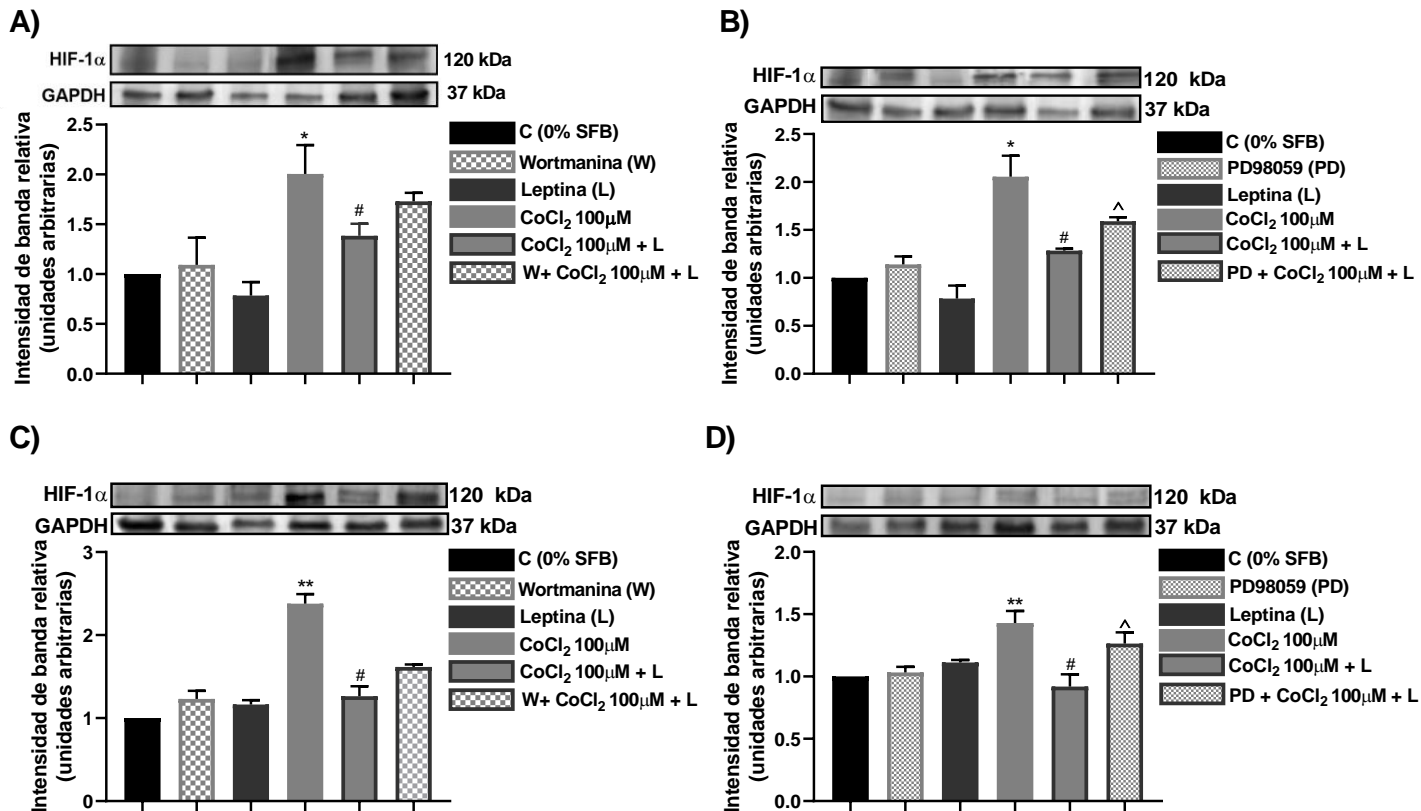


Figura R61: Leptina modula los niveles de HIF-1α a través de la vía de MAPK en células trofoblásticas. Se determinó por Western blot la expresión de HIF-1α, luego de pretratar las células Swan-71 (A) (B) o BeWo (C) (D) durante media hora con los inhibidores farmacológicos de las vías PI3K (Wortmanina 50 nM) (A) (C) o MAPK (PD98059 50 μM) (B) (D) en presencia o ausencia de 100 μM de CoCl₂ y estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=3). *p<0.05, **p<0.01 con respecto al control. #p<0.05 respecto del tratamiento con CoCl₂. ^p<0,05 respecto del tratamiento de CoCl₂ más leptina.

En contraste, el inhibidor de la vía MAPK, PD, aumentó los niveles de HIF-1α, respecto del co-tratamiento de leptina y CoCl₂ en ambos modelos celulares (**Figura 61 B y D**). Estos resultados sugieren, que la leptina durante la hipoxia química, luego de la estabilización del factor HIF-1α, modula mediante la activación de la vía de señalización de MAPK/ERK 1/2 la expresión o estabilidad de HIF-1α.

Efecto de la estabilización de HIF-1 α sobre la expresión de leptina

Como se ha mencionado anteriormente, la expresión de leptina es estimulada por el factor de transcripción HIF-1 α . En las células BeWo, derivadas de coriocarcinoma, la sobreexpresión de HIF-1 α activa el promotor de leptina. Más aún, en este trabajo, demostramos que el tratamiento con CoCl₂ (100 μ M) estimula la producción de leptina, lo cual respalda la idea de que la estabilización de este factor media los efectos sobre el promotor de leptina. El análisis de delección y la mutagénesis dirigida a sitios específicos implican al HRE más proximal del promotor de la leptina en la respuesta a HIF-1 α [199].

A su vez, en la línea celular de tejido adiposo PAZ6, encontraron que la exposición a 6% de O₂ o la hipoxia química inducida por CoCl₂, activa la expresión del gen de leptina con un incremento en su secreción. Resultados similares obtuvieron en células adiposas primarias [341]. Estas observaciones agregan a la leptina, a la lista de genes activados por la hipoxia a través de la vía de HIF-1 α .

Por ello, nos propusimos evaluar el efecto de la estabilización de HIF-1 α sobre la expresión de leptina evaluada mediante Western blot.

HIF-1 α modula los niveles de leptina

Comenzamos por evaluar el efecto de la estabilización de HIF-1 α luego del tratamiento con CoCl₂ sobre la expresión de la leptina en células BeWo.

En la **Figura R62 A**, observamos que en células trofoblásticas BeWo, el tratamiento con 100 μ M de CoCl₂ generó un aumento significativo en la expresión de leptina en comparación al control sin tratar. Este efecto no se modificó al estimular a las células BeWo con leptina.

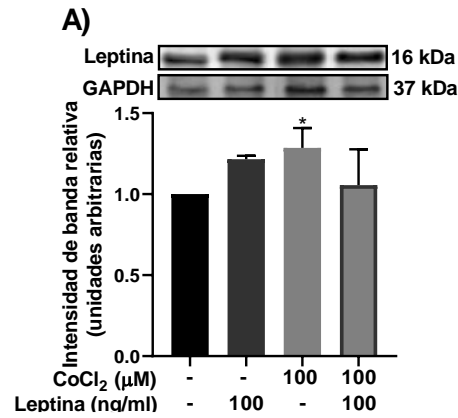


Figura R62: HIF-1 α modula la expresión de leptina en células BeWo. Se determinó por Western blot la expresión de leptina, luego de pretratar las células BeWo en presencia o ausencia de 100 μ M de CoCl₂ y estimulados con leptina (100 ng/ml) durante 24 hs. Los paneles inferiores muestran la cuantificación de las intensidades de banda. (n=3). *p<0.05, **p<0.01 con respecto al control.

DISCUSIÓN

La placenta, como órgano transitorio, sintetiza numerosas hormonas, factores de crecimiento y citoquinas que participan en el mantenimiento de la gestación y en el establecimiento de una adecuada interfaz materno-fetal [131]. Entre los numerosos mediadores moleculares, la leptina ha sido identificada como un posible factor en el crecimiento fetal y placentario [32]. De esta manera su función en regulación de la reserva energética se ha extendido a la reproducción, al establecimiento de la pubertad y a la gestación [107, 108]. Entre sus funciones reproductivas se pueden mencionar la regulación de la función ovárica y testicular, la implantación y el desarrollo embrionario [46, 346, 347].

La implantación hemocorial de la placenta está regulada mediante decisiones temporales y espaciales que controlan el destino de las células progenitoras del trofoblasto. La hipoxia es una señal importante que conduce al desarrollo placentario y los mecanismos moleculares que regulan las adaptaciones celulares a la baja tensión de oxígeno son inherentes a la diferenciación celular del trofoblasto y al desarrollo placentario. Las concentraciones de oxígeno en el sitio de implantación y durante la placentación son bajas. Las determinaciones de oxígeno placentario durante las primeras 10 semanas del embarazo humano se informan aproximadamente entre 1 a 2% de O_2 . Una vez que se establece la implantación hemocorial, la sangre oxigenada que fluye hacia el útero eleva la tensión de oxígeno dentro de la placenta [348]. Los factores inducibles por hipoxia (HIF) 1 y 2, son los principales factores de transcripción que regulan la homeostasis del oxígeno en mamíferos. Los HIF modulan varios mecanismos moleculares implicados en la supervivencia o muerte celular [197, 349, 350].

Particularmente los niveles de HIF-1 α en la placenta se encuentran aumentados hasta que la tensión de O_2 se normaliza [351]. Sin embargo, la hipoxia prolongada puede llevar a la restricción del crecimiento placentario y a una disminución de la invasión del trofoblasto, lo que produce patologías que pueden afectar adversamente el embarazo materno, la salud fetal y la susceptibilidad a enfermedades adultas. En la placenta preecláptica se evidencia una regulación positiva de la señalización de hipoxia mediada por el factor 1 α de transcripción inducible por hipoxia, HIF-1 α [352]. La preeclampsia es un trastorno placentario que incluye hipertensión materna, lesión glomerular renal, trastornos uteroplacentarios, entre otros [153].

El inicio temprano de la preeclampsia se caracteriza por un déficit en la invasión trofoblástica intrauterina y en la remodelación de las arterias espirales uterinas, lo que resulta en una mala perfusión placentaria, disfunción endotelial e hipoxia [321]. La capacidad de la placenta para adaptarse a contextos desfavorables muestra la importancia de su plasticidad para lograr un embarazo saludable.

Desde las primeras etapas del embarazo, los niveles plasmáticos de leptina aumentan, alcanzando valores máximos durante el segundo trimestre. Además, se ha descrito que tanto los niveles de leptina maternos como fetales están desregulados en distintas patologías asociadas a la gestación [138]. En particular, los niveles plasmáticos de leptina, así como la expresión de su ARNm en la placenta, son mayores en mujeres con preeclampsia [156, 157].

La placenta, es un sitio principal de producción y acción de la leptina e investigaciones de nuestro laboratorio han demostrado que la leptina estimula la proliferación celular e inhibe la apoptosis en células placentarias. En modelos de privación de suero o condiciones estrés ácido o térmico [64, 85, 229, 285].

En base a estos antecedentes nos propusimos estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la acción de la leptina en la supervivencia de células trofoblásticas en condiciones de hipoxia química.

Modelo de inducción de hipoxia química

Uno de los miméticos de hipoxia más comúnmente utilizados es la hipoxia química inducida por cloruro de cobalto (CoCl_2). El CoCl_2 estabiliza a los HIFs en normoxia. Varios estudios que han utilizado CoCl_2 como inductor de la estabilización de HIF-1 α , determinaron que puede inhibir la actividad de las prolin hidroxilasas (PHD) mediante la sustitución de Fe^{2+} por Co^{2+} , lo que hace que las enzimas sean incapaces de marcar a HIF-1 α para su degradación; como resultado, se estabiliza y se acumula. El CoCl_2 induce efectos similares a la hipoxia en varios estudios de cultivo celular in vitro [353]. Yong Yuan y col. propusieron que el Co^{2+} , independientemente del quelante de hierro, es capaz de unirse directamente a la región ODD de HIF-1 α inhibiendo no sólo la hidroxilación, sino también la interacción entre la forma hidroxilada de HIF-1 α y pVHL (proteína de Von Hippel-Lindau) [354].

Por otro lado, en este trabajo, también se utilizó una cámara de hipoxia regulada al 2% de oxígeno para evaluar ciertos parámetros en una condición de hipoxia más fisiológica. Esta técnica muy utilizada permite simular de manera más precisa las condiciones de disminución de oxígeno que las células pueden experimentar *in vivo*.

En el presente trabajo, comenzamos por evaluar la estabilización de HIF-1 α en el modelo de inducción de hipoxia química por el tratamiento con CoCl₂. El factor 1 inducible por hipoxia reacciona rápidamente a una baja tensión de oxígeno. En niveles normales de oxígeno, HIF-1 α se degrada y, en condiciones hipóxicas, se inhibe su degradación, lo que resulta en una rápida acumulación de la proteína [355]. A su vez, se emplearon como modelos experimentales las líneas celulares trofoblásticas Swan-71 y BeWo, además de explantos de placentas humanas normales a término.

La línea celular Swan-71 derivada de citotrofoblasto de una placenta humana de 7 semanas de gestación y la línea celular BeWo derivada de un coriocarcinoma humano exhiben un perfil de citoquinas y factores de crecimiento representativos del trofoblasto y conservan las características similares a las de las células trofoblásticas [287, 356, 357]. Por otro lado, al conservar la arquitectura tridimensional y la matriz extracelular del tejido placentario, los explantos placentarios proporcionan un contexto biológico relevante para estudiar diversos procesos fisiológicos y patológicos que ocurren en la placenta. Al mantener las interacciones entre las diferentes células y estructuras presentes en la placenta, los explantos permiten estudiar de manera más precisa la regulación molecular, la señalización celular y las respuestas funcionales que ocurren en este órgano vital durante el desarrollo fetal [358]. Sin embargo, al provenir de placentas a término, existen diferencias respecto a los mecanismos que se desarrollan en ella en comparación con las células derivadas del primer trimestre [46].

Luego del tratamiento con CoCl₂, se demostró la estabilización de HIF-1 α en células trofoblásticas mediante Western blot e Inmunofluorescencia. Evidenciamos que, en células Swan-71, el efecto del tratamiento con CoCl₂ fue dosis y tiempo dependiente. En células BeWo, encontramos que la estabilización de HIF-1 α luego de la exposición a 100 μ M de CoCl₂ incrementó significativamente tanto la expresión como localización nuclear de este factor de transcripción (**Figuras R1 y 2**), resultados similares se informaron en explantos placentarios humanos [359].

El efecto de la exposición a CoCl_2 fue observado por diferentes grupos de investigación [360-362]. Elovitz y col. han demostrado la estabilización de HIF-1 α en células Swan-71 y BeWo luego de 24 horas de tratamiento con 100 μM CoCl_2 [363]. En una reciente investigación, Wayne y col. han demostrado en células BeWo, la estabilización de HIF-1 α generado con 300 μM de CoCl_2 luego de 24 horas de tratamiento [364].

En nuestro estudio, hemos observado que el tratamiento con CoCl_2 induce la estabilización de HIF-1 α en células trofoblásticas. Esta estabilización muestra una dependencia tanto del tiempo como de la concentración utilizada.

Rol de la estabilización de HIF-1 α sobre la apoptosis de células trofoblásticas

Se ha demostrado que HIF-1 α es fundamental para el desarrollo placentario y la expresión prolongada de HIF-1 α provoca trastornos asociados al embarazo en los trofoblastos placentarios.

Es sabido que el nivel de oxígeno afecta el recambio celular del trofoblasto en explantos de placentas a término, particularmente en la apoptosis, proliferación y diferenciación de los citotrofoblastos. Aunque la apoptosis placentaria es un proceso normal durante el embarazo, puede ser desencadenada por diferentes estímulos, incluyendo la hipoxia y el estrés oxidativo [365]. Se ha observado que la apoptosis es mayor en citotrofoblastos y células estromales de explantos cultivados con 1% de O_2 en comparación con el tejido en normoxia [273]. En esta línea, la apoptosis del trofoblasto es esencial para el mantenimiento e integridad de la capa sincitial, donde el material desprendido de la superficie apical del STB se libera en la circulación materna como nodos sincitiales apoptóticos [366]. La apoptosis del STB en la preeclampsia también se asocia con un mayor número de nodos sincitiales y un mayor estrés oxidativo [365].

La Caspasa-3 es una proteasa clave en la ejecución de la apoptosis. Análogamente, PARP-1 es una enzima involucrada en la reparación del ADN y la respuesta a daños en el ADN. Durante la apoptosis, PARP-1 es clivada por caspasas, incluyendo la Caspasa-3, lo que resulta en su inactivación. Comenzamos por evaluar, la modulación en la expresión y clivaje de estos dos marcadores del proceso de apoptosis durante la estabilización de HIF-1 α en células trofoblásticas.

Evidenciamos que la hipoxia química lograda con el tratamiento con CoCl_2 generó un aumento en los niveles de ARNm de la Procaspasa-3 en ambos tiempos evaluados, traducido en un incremento significativo en el clivaje de Caspasa-3 mediante Western blot en las líneas celulares Swan-71 y BeWo. A su vez, la estabilización de HIF-1 α aumentó el clivaje del sustrato de Caspasa-3; PARP-1 tras el tratamiento con dosis de 50 y 100 μM de CoCl_2 , siendo evidente después de 7 horas y alcanzando su máximo tras 24 horas de tratamiento en células Swan-71. Resultados similares observamos en explantos de placenta humana a término, en donde la máxima concentración de CoCl_2 evaluada estimuló el clivaje de Caspasa-3 y PARP-1 (**Figuras R3 y 4**).

Estos resultados concuerdan con lo observado en células BV2, una línea celular de microglía, en la cual, la hipoxia inducida con CoCl_2 en células aumentó la activación de la Caspasa-3 y escisión de PARP-1, lo que llevo a una mayor tasa de apoptosis celular [367]. A su vez, un estudio reciente, aportó que en células BeWo, la exposición al CoCl_2 provocó la activación de la apoptosis, incrementando los niveles de las Caspasas efectoras 3 y 7 [368].

Rol de la leptina sobre la apoptosis de células trofoblásticas luego de la estabilización de HIF-1 α

El equilibrio entre la apoptosis y la proliferación del trofoblasto se considera un mecanismo para controlar la invasión trofoblástica normal. En este sentido, se informó a la leptina, como una citoquina importante que regula la supervivencia del trofoblasto, facilitando el crecimiento y previniendo la apoptosis [369]. Estos efectos cobran relevancia fisiológica ya que las células trofoblásticas producen leptina durante el embarazo. Además, los niveles de leptina aumentan bajo condiciones estresantes para las células placentarias, como la preeclampsia o la diabetes gestacional [108, 370].

Dada su importancia, evaluamos la acción de leptina sobre la apoptosis de células Swan-71 y explantos placentarios durante la hipoxia química. Decidimos iniciar nuestro estudio evaluando etapas tardías del proceso de apoptosis caracterizadas por una serie de procesos altamente organizados, acompañados de cambios estructurales en la arquitectura celular y subcelular con alteraciones morfológicas características y dependientes de la etapa. Estas alteraciones incluyen: la condensación de la cromatina

(picnosis), la contracción celular, la deformación nuclear, la cariorexis, seguida de fragmentación del ADN, la formación de cuerpos apoptóticos y la posterior degradación de los cuerpos apoptóticos por células adyacentes [371, 372].

Estudiamos la formación de núcleos apoptóticos mediante tinción con DAPI en células Swan-71 y el patrón de fragmentación del ADN en explantos placentarios luego del tratamiento con CoCl_2 en presencia o ausencia de leptina.

Hallamos que la estabilización de HIF-1 α incrementa la presencia de núcleos apoptóticos y la fragmentación del ADN, dependiente de la dosis de CoCl_2 utilizada a las 24 horas de tratamiento. En este contexto, la estimulación con leptina revierte ambos fenómenos (**Figura R5**).

Hemos estudiado las principales vías de señalización desencadenadas por el receptor de leptina y hemos investigado la importancia relativa de estas vías en el efecto de la leptina sobre la supervivencia de las células Swan-71, BeWo y explantos placentarios humanos bajo la estabilización de HIF-1 α , mediante el uso de inhibidores farmacológicos.

Encontramos que, la disminución en la cantidad de fragmentos de ADN de bajo peso molecular, involucra las vías de señalización PI3K y MAPK, ya que la inhibición farmacológica puede bloquear el efecto antiapoptótico de la leptina en explantos placentarios (**Figura R6**).

Resultados previos de nuestro grupo han demostrado que el tratamiento con leptina desencadena un efecto antiapoptótico en la placenta mediado por la vía de señalización MAPK y PI3K [229, 285]. Además, estudios en células endoteliales han demostrado que la leptina puede proteger estas células de la apoptosis inducida por diversos estímulos, incluyendo el estrés oxidativo. Este efecto protector de la leptina se observó principalmente a través de la activación de la vía MAPK, que resultó en la disminución del clivaje de Caspasa-3 y la promoción de la supervivencia celular [281].

De modo similar, el aumento del clivaje de Caspasa-3 y PARP-1 observado en presencia del CoCl_2 , disminuyen significativamente como consecuencia del tratamiento con leptina (**Figuras R8 y 11**). Así también, evidenciamos la disminución en los niveles del ARNm de Procaspasa-3 en células Swan-71 luego del tratamiento con 100 μM de CoCl_2 a las 7 y 24 horas de tratamiento (**Figura R7**).

Para reforzar los resultados obtenidos en condiciones de simil hipoxia, se utilizó como método alternativo a la estabilización de HIF-1 α , la incubación durante 24 horas en una cámara de hipoxia, establecida en una condición de 2% de O₂. Los resultados mostraron que la leptina disminuyó el clivaje de PARP-1, demostrando su función antiapoptótica durante la hipoxia. Además, observamos que el efecto de la leptina sobre PARP-1 fue abolido cuando las células fueron pretratadas con 6-aminoflavona, un inhibidor de la expresión de HIF-1 α , lo que sugiere que la disminución de PARP-1 por parte de la leptina puede estar mediada por HIF-1 α (**Figura R14**). Estos resultados fortalecen la noción de la leptina como un factor de supervivencia.

Anteriormente, informamos que la leptina disminuye la apoptosis en las células placentarias por una disminución en la activación de Caspasa-3, el clivaje de PARP-1 y la aparición de pequeños fragmentos de ADN tanto en las células BeWo como en los explantos placentarios humanos. Además, cuando se inhibió la expresión endógena de leptina utilizando un oligonucleótido complementario al ARNm de leptina, el péptido de Caspasa-3 clivaje aumentó [229, 304].

Nuestros resultados están respaldados por estudios que han evaluado el papel de la leptina en la expresión y activación de Caspasa-3 en diversos tejidos y modelos experimentales. Recientemente, se ha informado que en roedores, el tratamiento con leptina inhibe la expresión de Caspasa-3 en células epiteliales de los alvéolos pulmonares [373], en el músculo liso de las vías aéreas [374], en cardiomiocitos [375, 376] y en neuronas, donde leptina actúa tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico de dicha caspasa [377]. Más aún, en ratones deficientes para leptina se encontró que los ovarios tienen una mayor expresión de Caspasa-3 [378] y que una disminución de la expresión de la leptina endógena en células HepG2 se correlaciona con un aumento en su actividad [379], lo que concuerda con los resultados obtenidos en nuestro modelo. De modo que, la adición de leptina pudo revertir parcialmente la cantidad de núcleos apoptóticos y pequeños fragmentos de ADN, y la disminución del clivaje de Caspasa-3 y PARP-1.

Al estudiar las vías de señalización involucradas en la acción de la leptina, nuestros datos demostraron que el clivaje de Caspasa-3, mediado por el tratamiento con leptina luego de la estabilización con 100 μM de CoCl_2 , fue revertido por la presencia del inhibidor de la vía de MAPK, PD, en células Swan-71 y BeWo (**Figura R10**). Sin embargo, tras la inhibición de las vías de MAPK y PI3K, no observamos cambios en la disminución de la escisión de PARP-1 inducida por la leptina en presencia de CoCl_2 en células trofoblásticas (**Figura R12 y 13**).

Por otro lado, evaluamos la participación de la vía de PI3K en el efecto de la leptina sobre el clivaje de PARP-1 en hipoxia. Opuesto a lo determinado luego de la estabilización de HIF-1 con CoCl_2 , determinamos que el bloqueo farmacológico con Wortmanina, el inhibidor de la vía de PI3K, impidió la acción de la leptina sobre el clivaje de PARP-1, lo que sugiere que la disminución de PARP-1 por parte de la leptina puede estar mediada por esta vía (**Figura R15**).

En resumen, la sobreproducción de leptina podría ser beneficiosa para prevenir la apoptosis, actuando como un mecanismo compensatorio frente al daño causado por el estrés de la hipoxia. Esto es especialmente relevante debido a la hipoxia persistente en algunas patologías asociadas al embarazo que afecta a las células trofoblásticas.

Otra de las caspasas estudiadas fue la Caspasa-8, que si bien se encuentra fuertemente asociada a la activación de la vía extrínseca de la apoptosis, existe una interferencia con la vía intrínseca, ya que en ciertos contextos la Caspasa-8 puede desencadenar la vía intrínseca mediante la escisión de Bid y, por lo tanto, la activación posterior de BAX y permeabilización de la membrana externa mitocondrial [380].

En nuestro estudio determinamos que la estabilización de HIF-1 α incrementó significativamente la expresión de la Procaspasa-8 en células Swan-71 y explantos placentarios al utilizar la máxima concentración de CoCl_2 , que fue de 100 μM para las células Swan-71 y 250 μM para los explantos placentarios. El aumento en la expresión de la Procaspasa-8 fue revertido de manera efectiva por la presencia de leptina (**Figura R16**). En el caso específico de las células Swan-71, la capacidad de la leptina para revertir la expresión aumentada de la Procaspasa-8 fue bloqueada cuando se inhibieron las vías de señalización de MAPK y PI3K (**Figura R17**). Sin embargo, en los explantos placentarios, se observó que la reversión del efecto inducido por la leptina sólo se logró al bloquear la señalización de MAPK, lo que indica una diferencia en la dependencia de las vías de señalización entre las células Swan-71 y los explantos placentarios en

respuesta a la leptina. Además, al incubar a los explantos con el inhibidor de la vía de PI3K observamos un efecto basal de esta vía de señalización, respecto del control sin tratar, que aumentaría la expresión de Procaspasa-8, lo que sugiere un papel independiente de PI3K en la regulación de la expresión de esta caspasa iniciadora en los explantos placentarios (**Figura R18**).

Consecuentemente con el aumento del clivaje de Caspasa-3, PARP-1 y la expresión de Caspasa-8, observamos que la estabilización de HIF-1 α incrementó la presencia del Citocromo C, lo cual es coherente con su función en la apoptosis. La reversión de la leptina sobre este efecto observado tanto en las células Swan-71 como en los explantos placentarios parece estar mediado a través de la vía de señalización de PI3K (**Figura R19-21**). Se ha propuesto que, la señalización de leptina, limita la apoptosis cardíaca al disminuir la activación de las Caspasas-3 y 8 con una reducción en la liberación de Citocromo C después de una lesión isquémica crónica [376]. Por otro lado, leptina promueve la supervivencia de neutrófilos a través de la señalización de MAPK y PI3K, al disminuir la activación de la Caspasa-3 y 8 y la liberación del Citocromo C [283].

En conclusión, nuestro estudio muestra que la estabilización de HIF-1 α incrementa significativamente la expresión de la Procaspasa-8 en células trofoblásticas. La leptina revierte este aumento, y su capacidad de hacerlo depende de las vías de señalización MAPK y PI3K, en células Swan-71 y en los explantos placentarios. Además, la leptina reduce la liberación de Citocromo C, reforzando su función antiapoptótica.

Mecanismos de la leptina sobre la modulación de la apoptosis en células trofoblásticas

La familia BCL-2 es un grupo de proteínas cruciales en la regulación de la apoptosis celular. Las proteínas proapoptóticas de la familia BCL-2 que incluyen a BAX, Bak y Bid, entre otras, facilitan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), un evento clave que lleva a la liberación de factores proapoptóticos como el Citocromo C. Una vez liberado, conlleva a la activación de la Caspasa-9 y subsecuentemente a las caspasas efectoras como la Caspasa-3, culminando en la apoptosis celular [381]. En contrapartida, las proteínas antiapoptóticas, como BCL-2, Bcl-xL y MCL-1, actúan previniendo la permeabilización de la mitocondria, mediante la neutralización de las proteínas proapoptóticas BAX y Bak. Las afinidades y la abundancia relativa de las proteínas de la familia BCL-2 controlan las interacciones específicas entre las proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas, que culmina en la decisión celular entre la supervivencia y la apoptosis [220].

Decidimos evaluar la acción de leptina sobre los mediadores anti y proapoptóticos que ejercen su acción a nivel mitocondrial y que podrían estar participando en la apoptosis de las células placentarias bajo condiciones de hipoxia química, luego de la estabilización de HIF-1 α . BAX y BCL-2 son algunos de los miembros más representativos y opuestos de la familia de proteínas BCL-2. Es por esta razón que el análisis de la relación BAX/BCL-2 es importante para estimar la susceptibilidad a apoptosis por la vía intrínseca.

Anteriormente informamos que, bajo condiciones de privación de suero, la leptina disminuyó la relación BAX/BCL-2 tanto en las células Swan-71 como en los explantos placentarios humanos [229]. En los datos presentados aquí, mostramos que la estabilización de HIF-1 α aumentó la relación BAX/BCL-2, mientras que la leptina disminuyó esta relación debida tanto a una disminución de BAX como a un aumento de BCL-2 para ambos tiempos evaluados (**Figura R24**).

El efecto de la estabilización de HIF-1 α sobre la expresión de BAX y BCL-2 fue más evidente al utilizar la concentración de 100 μ M de CoCl₂, evaluado mediante qRT-PCR y Western blot. En este sentido, evidenciamos que la leptina logra revertir el efecto del CoCl₂ tanto a las 7 como a las 24 horas (**Figura R22 y 23**). Es importante destacar que observamos un efecto dual de la estabilización de HIF-1 α dependiente de la concentración de CoCl₂ utilizada luego de 7 horas de tratamiento en células Swan-71. Mientras que la mínima concentración de CoCl₂ (50 μ M) generó un aumento en la expresión génica y proteica de BCL-2, determinamos un efecto contrario e inhibitorio al utilizar la concentración de 100 μ M (**Figura R22**).

El rol de la leptina sobre los niveles de estas proteínas ha sido ampliamente documentado por distintos grupos de investigación. Estos estudios han evidenciado una regulación por parte de la leptina sobre la expresión de BCL-2 y BAX en diversos modelos experimentales, resultados que son compatibles con nuestros hallazgos. En particular, han demostrado que la leptina es capaz de incrementar la expresión de BCL-2 y disminuir la de BAX, contribuyendo a la supervivencia celular y a la inhibición de la apoptosis, en diferentes contextos celulares, incluyendo linfocitos B, células de cáncer de ovario, y otros tipos celulares, lo que subraya la relevancia de la leptina como un regulador clave en la vía apoptótica [120, 373, 382, 383], más aún en trofoblastos aislados y sometidos a hipoxia, se encontró que la disminución de la presión de oxígeno genera un aumento en los niveles de leptina que se asocian a una disminución tanto en los niveles de BAX como de la activación de Capasa-3 [384].

Encontramos que la expresión de BCL-2 aumentada por la estimulación de leptina tras la estabilización de HIF-1 α sería a través de la vía de señalización de MAPK/ERK 1/2, pero no por la vía PI3K (**Figura R25**). Se ha encontrado previamente que la activación de las vías PI3K y MAPK por la leptina es el mecanismo mediante el cual la leptina mejora la supervivencia celular, previniendo la apoptosis [283, 385]. Además, se observó que el efecto antiapoptótico de la leptina en monocitos de sangre es mediado por la activación de MAPK [276].

En este trabajo, parte de nuestro objetivo fue analizar la regulación de la leptina sobre los mediadores proapoptóticos alternativos Bid, Bad y Bak en la apoptosis inducida por la estabilización de HIF-1 α . Comenzamos por estudiar la modulación sobre Bid. Bid fue descubierto por su capacidad de unirse tanto a BCL-2 como a BAX. Puede ser clivaje (t-Bid) y activado por distintas proteasas, y una vez activado migra a la mitocondria e induce la permeabilización de la membrana externa mitocondrial [386]. La estabilización de HIF-1 α indujo la expresión génica y proteica de Bid en ambos tiempos evaluados, a su vez, generó un aumento en los niveles de t-Bid, lo que sugiere su activación. En este contexto la leptina redujo tanto el clivaje como la expresión de Bid, luego de estabilizar a HIF-1 α con 100 μ M de CoCl₂ en células trofoblásticas Swan-71 y BeWo (**Figura R26 y 27**). Se ha reportado que la hipoxia/reoxigenación induce la apoptosis en linfocitos humanos mediante la generación de ROS y la alteración de la membrana mitocondrial a través de la activación de Caspasa-8, Bid y BAX [308]. La leptina compensa este efecto a través de la señalización de PI3K (**Figura R28 y 29**). Un efecto similar mencionado anteriormente en neutrófilos humanos, describe el efecto antiapoptótico de la leptina, que retrasa la escisión de Bid a través de la activación de las vías MAPK y PI3K. La leptina, al activar estas vías, contribuye a la supervivencia celular y previene la apoptosis al inhibir el clivaje de Bid, manteniendo así la integridad de las mitocondrias y reduciendo la liberación de factores proapoptóticos [283].

Continuamos evaluando la expresión de Bad. Cuando se altera la homeostasis celular, Bad se heterodimeriza con Bcl-xL y BCL-2, lo que resulta en una mayor apoptosis porque neutraliza la función antiapoptótica de Bcl-xL y BCL-2. Observamos que la expresión de Bad aumentó luego de incubar las células Swan-71 con 100 μ M de CoCl₂ durante 7 y 24 horas, evaluada mediante qRT-PCR y Western blot (**Figura R30**).

Se ha demostrado que la estabilización de HIF-1 α por hipoxia promueve la apoptosis en células citotrofoblásticas, con un aumento de la expresión de Bad y la fosforilación en las serinas 136 y 155, asociadas al efecto promotor de la apoptosis. Sin embargo, cuando Bad está fosforilado en la serina 112 (p-Bad Ser112), se une a las proteínas 14-3-3, que funcionan principalmente como adaptadores moleculares, interactuando con una variedad de proteínas de señalización para influir en su actividad y localización subcelular, lo que impide su interacción con las proteínas antiapoptóticas, reduciendo así su capacidad para promover la apoptosis [224].

La leptina, al prevenir la apoptosis en células trofoblásticas Swan-71 bajo condiciones de hipoxia química y privación de suero, regula tanto la expresión como la fosforilación de Bad. Observamos que la leptina disminuye la expresión de Bad y promueve su fosforilación en la Ser112, asociado con su efecto promotor de la supervivencia celular (**Figura R31**). Al analizar las vías de señalización desencadenadas por la leptina asociadas a este efecto, en el contexto de hipoxia química encontramos que, la inhibición farmacológica de la vía de MAPK, reduce la expresión de Bad, mientras que el bloqueo de las vías PI3K y MAPK reducen la fosforilación en la Ser112 de Bad estimulada por leptina, lo que sugiere su participación en esta acción (**Figura R32 y 33**). Se ha propuesto que la leptina mediante la señalización de PI3K mejora el desarrollo pulmonar fetal, estimulando la supervivencia de células epiteliales alveolares de tipo II, involucradas en el desarrollo pulmonar. Un estudio llevado a cabo en un modelo de rata con restricción del crecimiento fetal, ha mostrado la acción de leptina en la regulación negativa de las Caspasas-3 y 9, la regulación positiva de las proteínas de supervivencia BCL-2 y p-Bad (Ser112) [387]. En linfocitos B, la leptina incrementa la homeostasis de las células B inhibiendo la apoptosis mediante la activación de la expresión de BCL-2 e inhibición de la expresión de las proteínas proapoptóticas de la familia BCL-2, BAX, Bim y Bad [388].

Un efecto similar, determinamos al evaluar la expresión génica de Bak mediante qRT-PCR. Los monómeros de Bak activados pueden formar homodímeros o heterodímeros con BAX que al oligomerizarse forman poros dentro de la bicapa mitocondrial, lo que resulta en la permeabilización de la membrana externa. La expresión de Bak aumentó en la condición con CoCl₂ a las 7 y 24 horas de tratamiento y leptina compensó este efecto (**Figura R34**). De esta manera, Bad, Bid y Bak colaboran con BAX para desencadenar la apoptosis en las células Swan-71. La leptina ha estado involucrada en la supresión de Bad, BAX, Bak1, Bid y Bok en células de cáncer de ovario [303].

Posteriormente, se estudiaron los mediadores antiapoptóticos BCL-xL y MCL-1. Ambos efectores mostraron una regulación negativa en sus niveles de ARNm atribuida a la estabilización de HIF-1 α luego de 7 horas de tratamiento (**Figuras R35 y 36**). Contrariamente a lo esperado según las evidencias de estudios previos, observamos que, a las 24 horas de tratamiento, el CoCl₂ aumentó significativamente la expresión de estos dos marcadores antiapoptóticos. Es posible que se activen mecanismos de respuesta al estrés o modificaciones postraduccionales de HIF-1 α , que conduzcan a una regulación positiva de BCL-xL y MCL-1 en esta fase tardía del tratamiento.

Por otro lado, la leptina reguló positivamente la expresión de estas proteínas, revirtiendo el efecto del CoCl₂ a las 7 horas de tratamiento, demostrando nuevamente la regulación de la supervivencia por parte de la leptina. Se ha observado una regulación positiva del gen BCL-xL en linfocitos tratados con leptina [389]. Interesantemente, se informó que MCL-1 es el único miembro de la BCL-2 cuyos ratones knock-out exhiben letalidad peri-implantación alrededor de E3.5. Estos hallazgos sugieren que MCL-1 es necesario para la implantación durante el desarrollo embrionario [390]. Se encontró que la leptina aumenta la expresión de Ciclina D1 y MCL-1 en células de cáncer de ovario, lo que sugiere el papel de la leptina en la promoción de la supervivencia en diferentes contextos celulares [303].

Rol de la leptina sobre la proliferación de células trofoblásticas

La supervivencia celular está determinada por los procesos de proliferación y muerte, siendo crucial para la homeostasis de un tejido. Aunque la placenta haya completado su desarrollo, sigue atravesando diversos estadios de proliferación y apoptosis, los cuales están relacionados con el crecimiento, el recambio celular y el parto [217, 391]. Durante el desarrollo placentario, el proceso de proliferación está finamente regulado y restringido. Como se describió previamente, el rol de HIF-1 puede estar asociado tanto a la proliferación como a la muerte celular.

En primer lugar, evaluamos la proliferación y supervivencia de células Swan-71 en condiciones de hipoxia química y estimulación con leptina. Desde la mínima concentración de CoCl_2 utilizada, la estabilización de HIF-1 α redujo significativamente la expresión de Ki-67, evaluada por inmunofluorescencia, así como el recuento celular, la expresión de PCNA, evaluado mediante Western blot, y la viabilidad determinada por el ensayo de MTT después de 24 o 48 horas de tratamiento (**Figura R37 y 38**). Tanto Ki-67 como PCNA son marcadores de proliferación. Ki-67 es una proteína nuclear que se expresa exclusivamente en las fases activas del ciclo celular, pero no en las células en fase G0. PCNA, es un cofactor asociado con la síntesis de ADN durante la fase S del ciclo celular. La hipoxia ha demostrado inhibir la proliferación celular en numerosos tipos celulares, incluidos fibroblastos embrionarios [392], células madre embrionarias [249], células madre hematopoyéticas [393] y una amplia variedad de líneas celulares cancerosas [394]. Además, la exposición a 150 μM de CoCl_2 , reduce la supervivencia en células del ligamento periodontal humano [395].

Diversos aspectos del rol de leptina en la reproducción y el embarazo han sido estudiados en distintos modelos experimentales, aunque poco se conoce sobre la capacidad de leptina de regular la supervivencia en la placenta humana. Trabajos de nuestro grupo de investigación demostraron que leptina promueve la proliferación como la supervivencia de células JEG-3, situándola como una hormona capaz de regular la homeostasis de células placentarias [45, 85, 285]. En este sentido, encontramos que la estimulación con 100 ng/ml de leptina aumentó todos los parámetros medidos, incrementando la proliferación y viabilidad de células trofoblásticas luego de la estabilización de HIF-1 α (**Figuras R39-42**).

Al evaluar las vías de señalización, encontramos un efecto antiproliferativo inherente de la vía de PI3K/Akt en comparación con el control no tratado, medido por el porcentaje de células positivas para Ki-67. El efecto de la leptina sobre la proliferación de células Swan-71 se vio inhibido al bloquear la activación de ERK1/2 (**Figuras R43-45**). Contrariamente, en células de coriocarcinoma BeWo, observamos que la leptina no pudo revertir el efecto del CoCl_2 sobre la expresión de PCNA al inhibir la vía de PI3K (**Figuras R46**). Las células Swan-71 provienen de citotrofoblastos de primer trimestre inmortalizados por la sobreexpresión de telomerasa. Esta línea celular representa un excelente modelo de citotrofoblastos extravellosos [287]. Las células BeWo, si bien son células ampliamente utilizadas como modelo de trofoblastos, provienen de un coriocarcinoma, pudiendo manifestar alteraciones en las vías de señalización celular y

mecanismos de proliferación y supervivencia [396]. Estas diferencias entre estos modelos podrían explicar algunas de las discrepancias en las vías de señalización activadas por la estabilización de HIF-1 α o leptina, reflejado en la expresión de PCNA. A su vez, la leptina promovió la supervivencia de células trofoblásticas Swan-71 expuestas a CoCl₂ a través de ambas vías de señalización evaluadas, PI3K y MAPK (**Figura R47**).

De esta manera demostramos que leptina promueve la proliferación de células Swan-71 en el contexto de hipoxia química, coincidente con otros trabajos donde se ha demostrado que leptina induce la proliferación de células endoteliales en cultivo [397], de linfocitos T [322] y de progenitores hematopoyéticos y osteoblastos [398]. Otros reportes señalan que leptina induce la proliferación de células hepáticas in vitro a través de la vía de PI3K/Akt [274] y de células humanas mononucleares periféricas de sangre a través de la activación de la vía de MAPK [279].

Rol del eje p53 en la supervivencia de células trofoblásticas mediada por la leptina

Como se ha mencionado previamente, la apoptosis es esencial y crucial en el desarrollo placentario durante la diferenciación y proliferación del trofoblasto. La apoptosis alterada está implicada en la patogénesis de la preeclampsia y se considera una de las influencias clave en la disfunción placentaria. En la preeclampsia, el trofoblasto de las vellosidades placentarias exhibe un recambio celular anormal, incluido un aumento de la apoptosis [399]. Este aumento de la actividad apoptótica afecta la capacidad de los trofoblastos para remodelar las arterias espirales [400].

La preeclampsia de aparición temprana y otras complicaciones obstétricas están asociadas con una remodelación deficiente de las arterias espirales [401]. En condiciones de estrés celular, la proteína p53, un factor de transcripción clave, regula la muerte celular, la detención del crecimiento y la reparación del ADN. El nivel de p53 en la placenta, se encuentra aumentado durante embarazos patológicos, lo que enfatiza su participación en la apoptosis del trofoblasto [402, 403].

En base a los antecedentes, comenzamos por estudiar el efecto de la condición de símil hipoxia sobre la expresión del factor de transcripción p53.

Encontramos que la estabilización de HIF- α afecta tanto la expresión como la localización nuclear de p53, determinadas mediante Western blot e inmunofluorescencia, respectivamente (**Figura R48 y 51**). Los resultados mostraron un aumento significativo en los niveles de p53 en células trofoblásticas Swan-71, BeWo y en explantos placentarios. Este incremento en p53 sugiere que la estabilización de HIF-1 α puede promover la acumulación y activación de p53 en respuesta a la hipoxia química inducida por CoCl₂. Se ha reportado que la acumulación de p53 se hace evidente en condiciones de hipoxia severa [176]. Además, Rony Levy y col. demostraron que la expresión de p53 está aumentada en cultivos primarios de CTB cultivados en cámara de hipoxia [207]. El aumento en la presencia de p53 podría tener implicaciones importantes en la regulación de la apoptosis y la proliferación celular en el contexto placentario.

Al evaluar los mecanismos ejercidos por la leptina, evidenciamos que reduce la expresión proteica de p53 en la condición de hipoxia química a través de la señalización de PI3K en los modelos estudiados. (**Figura R52-53**). Sin embargo, es importante destacar, que la leptina generó un aumento a nivel del ARNm de p53 en condiciones de privación de SFB, aunque este aumento fue menor que el inducido por 50 μ M de CoCl₂ luego de 7 o 24 horas de tratamiento. A su vez, tras 24 horas de incubación, la leptina reduce la expresión génica de p53 en presencia de 50 μ M de CoCl₂, pero aumenta en presencia de la concentración más alta de CoCl₂ (100 μ M) (**Figura R49**).

La observación de efectos divergentes de la leptina sobre los niveles de ARNm de p53 puede ser el resultado de una regulación compleja que involucra la transcripción o la estabilidad del ARNm, entre otros factores. Previamente resultados de nuestro grupo encontraron que la expresión y vida media de p53 en presencia de leptina frente a la privación de suero, disminuye significativa tanto en Swan-71 como en explantos de placenta humana, lo que demuestra que la leptina regula el nivel de p53 bajo en condiciones de estrés [404, 405].

Son escasos los trabajos que evalúan un posible efecto regulatorio de la leptina sobre los niveles de p53. En células de cáncer de mama, la leptina incrementa los niveles de Ciclina D1 mientras disminuye los de p53 y p21 [406]. La inyección de leptina recombinante en ratas genera hipertrofia en células de la granulosa, disminuye la apoptosis folicular y aumenta la expresión de BCL-2, sin cambios en la expresión de p53 ni Mdm-2 [407]. Sin embargo, está reportado que la leptina aumenta los niveles de p53 en células de la granulosa porcinas [240]. Como puede advertirse, la bibliografía no ofrece una tendencia establecida sobre el efecto de la leptina en la proteína supresora de tumores p53, ya que los resultados varían según el modelo estudiado. Sin embargo, creemos que nuestros resultados son contundentes y sugieren que la leptina posee un efecto inhibitorio sobre p53 en células placentarias expuestas a hipoxia química.

Con el fin de continuar avanzando en el estudio sobre la regulación de leptina en el efecto de la estabilización de HIF-1 α sobre p53, decidimos investigar si leptina es capaz de modular la expresión de Mdm-2, la principal proteína que regula negativamente a p53. En nuestro estudio, encontramos que en células BeWo y Swan-71, la leptina aumentó la expresión de Mdm-2 a las 7 y 24 horas de incubación luego de estabilizar a HIF-1 α con el tratamiento de 50 o 100 μ M de CoCl₂ (**Figura R54**). Más aún, determinamos que leptina modula la expresión de Mdm-2 a través de las vías MAPK y PI3K, en células Swan-71 y BeWo, respectivamente (**Figura R55**).

Mdm-2 es crucial en la regulación de la estabilidad de p53, ya que su función como E3 ligasa permite la ubiquitinación y posterior degradación de p53 en el proteasoma [235]. Se ha descrito que la hipoxia en fibroblastos, induce la acumulación de p53 regulando negativamente a Mdm-2 a través de su degradación [408]. Este hallazgo es particularmente relevante en el contexto placentario, donde la regulación de p53 es crucial para el desarrollo y la función adecuada de la placenta. La capacidad de la leptina de aumentar la expresión de Mdm-2 y, por ende, facilitar la degradación de p53, indica un posible mecanismo de regulación donde la leptina actuaría para equilibrar los efectos de la estabilización de HIF-1 α , modulando la respuesta celular en el contexto de hipoxia. Esto puede explicar en parte por qué observamos una disminución de los niveles proteicos de p53 a pesar del aumento en su ARNm en presencia de leptina. Además, determinamos que la leptina modula la expresión de Mdm-2 a través de diferentes vías de señalización en estas líneas celulares. En células Swan-71, el efecto de la leptina sobre la expresión de Mdm-2 se midió a través de la vía MAPK. Por otro lado, en células BeWo, la leptina modula la expresión de Mdm-2 mediante la vía PI3K

(Figura R55). Previamente nuestro grupo ha reportado que, en condiciones de estrés, la leptina regula a p53 por las vías ERK1/2 y Akt, tanto en células Swan-71 como en explantos placentarios. A su vez la fosforilación de p53 en serina 46, necesaria para la inducción de genes proapoptóticos, estaría mediada por la vía de PI3K [332].

La diferenciación en la activación de las vías de señalización MAPK en células Swan-71 y PI3K en células BeWo bajo la estimulación de la leptina y la hipoxia inducida por CoCl₂ podría estar relacionada con la naturaleza tumorigénica de las células BeWo. Las características intrínsecas de las células tumorales, juegan un papel crucial en cómo responden a estos estímulos. Estos hallazgos subrayan la importancia de considerar el tipo celular y su contexto tumoral al estudiar los efectos de factores como la leptina y la hipoxia en la regulación de p53 y Mdm-2.

Es realmente escasa la bibliografía disponible sobre una posible relación entre leptina y Mdm-2. Los factores de transcripción Sp1 y ER α son otras proteínas involucradas en la regulación de la transcripción de Mdm-2. Los estrógenos mediante la acción de ER α aumentan la afinidad de unión de Sp1 al gen de Mdm-2, provocando un aumento de su expresión [409]. Además se ha reportado que leptina aumenta la expresión de ER α en células de próstata [409], su localización nuclear de ER α en ovario [410] y la relación ER α /ER β en células MCF-7 [411]. Por otro lado, antecedentes previos de nuestro grupo de investigación demostraron que el 17 β -estradiol aumenta la expresión de leptina placentaria y que este efecto podría estar mediado por el ER α [412, 413]. Pensamos entonces que ER α podría ser un posible mediador de los efectos de leptina sobre Mdm-2. Aun así, creemos que el aumento de la expresión de Mdm-2 por leptina es un hecho de gran relevancia que podría explicar los efectos observados sobre p53.

Para validar nuestros hallazgos sobre la regulación de la señalización de p53 y Mdm-2 por leptina en el contexto de hipoxia, replicamos el estudio utilizando una cámara de hipoxia al 2% de O₂ en células Swan-71. Este enfoque experimental nos permitió comparar los efectos de la hipoxia química inducida por CoCl₂ con los efectos de una hipoxia más fisiológica.

Observamos que, bajo condiciones de hipoxia al 2% de O₂, la leptina incrementó significativamente la expresión de Mdm-2 en las células trofoblásticas Swan-71. El incremento de Mdm-2 se correlacionó con una disminución en los niveles proteicos de p53, similar a lo observado bajo hipoxia química con CoCl₂. La estabilización de HIF-1 α ,

ya sea por CoCl_2 o por hipoxia en la cámara, produjo un aumento en la expresión de p53 en ausencia de leptina. La adición de leptina, en ambos casos, resultó en un aumento de Mdm-2 y una subsecuente reducción de p53, confirmando que la regulación de p53 por leptina es consistente en ambos modelos evaluados. La exposición a la hipoxia de trofoblastos proveniente de placentas de embarazos humanos a término durante 24 horas aumentó considerablemente la apoptosis trofoblástica, que estuvo acompañada de una mayor expresión de p53 [414]. En otro estudio determinaron que los trofoblastos apoptóticos de embarazos asociados con restricción del crecimiento fetal causada por la preeclampsia exhiben una expresión aumentada de las proteínas proapoptóticas p53 y BAX y una expresión disminuida de BCL-2 [415].

En células Swan-71 expuestas a hipoxia, la leptina moduló la expresión de p53 y Mdm-2 a través de la vía de PI3K. Este efecto fue determinado al observar que la acción de la leptina disminuyó, en ambos casos, cuando pretratamos a las células con el inhibidor farmacológico Wortmanina (**Figura R57**). Además, para evaluar si los efectos que observamos en la regulación de p53 y Mdm-2 dependen de HIF-1 α se pretrataron a las células Swan-71 con AF, en el contexto de hipoxia al 2% de O_2 .

En presencia de AF, observamos un aumento significativo en los niveles de p53 y Mdm-2 respecto del control en hipoxia. Esto sugiere que la inhibición de HIF-1 α por AF promueve la acumulación de p53 y la expresión de Mdm-2. Contrariamente, la leptina modula negativamente la vía de p53, sin embargo, en presencia de AF, la leptina no pudo disminuir los niveles de p53 ni aumentar la expresión de Mdm-2 (**Figura R56**). Esto indica que la presencia de HIF-1 α es sería necesario para que la leptina ejerza su efecto modulador sobre p53 y Mdm-2. En este sentido, la presencia de HIF-1 α podría facilitar la señalización de leptina, posiblemente mediante la regulación de genes blanco o la modulación de otras proteínas que intervienen en la señalización de leptina. Dado que HIF-1 α es un regulador maestro en la respuesta a la hipoxia, su inhibición podría desregular otros procesos celulares que son necesarios para la acción de la leptina. Esta dependencia destaca la complejidad de las interacciones entre las vías de señalización involucradas en la respuesta a la hipoxia y la modulación por leptina.

En resumen, la estabilización de HIF-1 α aumenta los niveles de p53, sugiriendo una respuesta adaptativa a la hipoxia. La leptina, a su vez, redujo la expresión proteica de p53 en respuesta a la estabilización de HIF-1 α por CoCl_2 o hipoxia, lo cual se asoció con un incremento en la expresión de Mdm-2. La señalización de leptina a través de las

vías PI3K y MAPK fue esencial para estos efectos. Estos hallazgos indican que la leptina podría desempeñar un papel protector en el ambiente placentario bajo condiciones de estrés, modulando la respuesta apoptótica mediada por p53 y promoviendo la supervivencia celular.

Leptina estimula la migración de células trofoblásticas

El éxito del embarazo depende en gran medida del desarrollo de la circulación materno-fetal, lo cual es posible gracias a la invasión de las células trofoblásticas en el endometrio materno. El proceso comienza inmediatamente después de la implantación e implica una serie de eventos moleculares bien regulados, aunque no completamente comprendidos [416, 417].

La leptina posee diversas funciones reproductivas entre las que se encuentran la regulación del transporte de nutrientes y la angiogénesis de la placenta, la mitogénesis de los trofoblastos y la inmunomodulación, eventos cruciales para el correcto desarrollo del feto y la placenta [126]. Aunque numerosos estudios han establecido a la leptina como una hormona que promueve la migración e invasión de células tumorales [418-421], también se ha investigado su relación con la invasión trofoblástica durante la placentación [422-424].

En condiciones patológicas, como en la preeclampsia, la incorrecta regulación de HIF-1 α puede afectar negativamente la migración e invasión del trofoblasto. Un rasgo característico de la placenta preecláptica es la regulación positiva de la señalización de HIF [425]. En este contexto, decidimos examinar el efecto de la leptina en la migración de células trofoblásticas Swan-71 bajo hipoxia química mediante la realización de ensayos de cierre de herida.

En nuestro modelo, la estabilización de HIF-1 α por el tratamiento con CoCl₂ redujo la migración de células Swan-71 luego de 12 horas de tratamiento (**Figura R58**). Sin embargo, observamos que la leptina favorece la migración de las células trofoblásticas, sugiriendo su participación en la formación adecuada de la placenta (**Figura R59 A**).

Consideramos importante comenzar a ahondar en el estudio de los mecanismos que subyacen a esta acción de la leptina mediante el uso de inhibidores farmacológicos. Hallamos que la inhibición de la vía de señalización de PI3K disminuye el porcentaje de cierre de la herida, coherente con la participación de esta vía en la migración celular en el contexto de hipoxia química generada por 100 μM de CoCl_2 (**Figura R59 B**).

Se ha informado que en células trofoblásticas HTR8-SVneo, JAR y JEG3, la exposición a 2% de O_2 en cámara de hipoxia, o el tratamiento con 150 μM de CoCl_2 disminuye significativamente las capacidades de migración e invasión de estas células [426]. Estos efectos negativos de la hipoxia en la migración trofoblástica pueden tener implicaciones importantes para el desarrollo placentario y la salud materno-fetal.

Según un informe reciente de Albers et al. [273], la expresión prolongada específica de HIF-1 α en el trofoblasto, que simula condiciones hipóxicas prolongadas más allá del primer trimestre, puede tener efectos perjudiciales en el desarrollo vascular. Estos efectos incluyen una reducción en la morfogénesis ramificada, alteraciones en los espacios intervillosos y una falta de remodelación adecuada de las arterias espirales. Además, esta condición puede manifestarse con síntomas similares a la preeclampsia y al retraso del crecimiento fetal.

La discrepancia en cuanto al efecto de la hipoxia sobre la diferenciación del trofoblasto en el primer trimestre del embarazo humano se debe al hecho de que la respuesta celular a la hipoxia no es una vía aislada, sino una combinación de múltiples mecanismos de detección, adaptabilidad, factores de transcripción, respuestas al estrés oxidativo y producción de citoquinas. Debemos tener en cuenta que varias vías de señalización bioquímica y molecular son dependientes del oxígeno. El uso de CoCl_2 como inductor de la estabilización de HIF-1 α puede no solo regular genes dependientes de HIF, sino también modular otras respuestas celulares de manera independiente [181].

Es importante reconocer que las exposiciones fisiológicas al oxígeno in vivo no pueden replicarse completamente en sistemas estáticos de cultivo celular. Por lo tanto, los estudios in vitro sobre el rol de los niveles de oxígeno en el desarrollo trofoblástico son aproximaciones que requieren validación mediante investigaciones in vivo para una comprensión más precisa.

Regulación de HIF-1 α mediado por leptina

Dado que existe una estrecha relación entre los efectos ejercidos por la estabilización de HIF-1 α y la presencia de leptina, comenzamos a estudiar el rol de la leptina sobre la expresión de HIF-1 α en la hipoxia química sobre células trofoblásticas Swan-71 y BeWo. El tratamiento con CoCl₂ aumentó los niveles de HIF-1 α , determinado por Western blot en ambos tipos celulares. En este contexto encontramos que la leptina es capaz de reducir la expresión o estabilidad de HIF-1 α (**Figura R60**). Una posible explicación es que la leptina activa vías de señalización, que pueden influir en la degradación de HIF-1 α , modulando así la respuesta celular a la hipoxia. En diversos tipos celulares, se ha observado que las vías de señalización PI3K y MAPK modulan positivamente la estabilidad de HIF-1 α , aumentando su expresión y actividad, promoviendo la respuesta adaptativa celular a la baja disponibilidad de oxígeno [427]. Sin embargo, en nuestro modelo, determinamos que, en las células trofoblásticas estudiadas, la leptina disminuyó los niveles de HIF-1 α a través de la señalización de ERK 1/2 (**Figura R61**). Resultados similares se han obtenido en células estrelladas hepáticas de ratones, donde la activación de la vía MAPK puede llevar a una disminución de la estabilidad y la actividad de HIF-1 α durante la hipoxia inducida por cámara de hipoxia al 1% de O₂ [193]. Estos resultados subrayan la complejidad de las interacciones entre la leptina y HIF-1 α y sugieren posibles vías a través de las cuales la leptina podría modular la respuesta celular a la hipoxia, que nos permiten comprender la regulación de HIF-1 α en contextos patológicos.

Rol de la estabilización de HIF-1 α sobre leptina

La regulación de la expresión del gen de la leptina se ha estudiado ampliamente en las células adiposas, pero está menos caracterizada en las células de origen placentario. Como hemos mencionado previamente, la preeclampsia está asociada con un aumento de la leptina placentaria [321]. Dado que la preeclampsia se caracteriza por hipoxia placentaria, generó la hipótesis de que la falta de oxígeno podría ser un factor regulador de la expresión del gen de la leptina. En un estudio se informó que, el gen de la leptina está regulado transcripcionalmente por HIF-1 α en células BeWo y Jar luego de exponerlas a hipoxia 6% de O₂ o 50 μ M de CoCl₂ [428]. Además, en células de fibroblastos primarios, la estabilización de HIF-1 α generada por hipoxia o por el tratamiento con 150 μ M de CoCl₂, induce la expresión de leptina, a través de la unión

de HIF-1 heterodimérico a un elemento de respuesta a hipoxia ubicado en -116 dentro del promotor del gen de leptina [160, 199].

Consistentemente, en nuestro modelo encontramos que 100 μM de CoCl_2 aumentó la expresión de leptina en células BeWo, determinada mediante Western blot **(Figura R62)**. Sin embargo, a pesar de este hallazgo, aún queda por estudiar y profundizar cómo HIF modula específicamente la expresión de leptina en las células trofoblásticas. La investigación futura debería centrarse en esclarecer los mecanismos detallados mediante los cuales HIF regula la expresión del gen de leptina en estas células, así como explorar las posibles implicaciones para la función placentaria y la preeclampsia.

CONCLUSIONES

En la placenta, la leptina sintetizada desde etapas tempranas de la gestación no solo regula la implantación, sino que también es crucial para la función placentaria y el desarrollo fetal [137]. La hipoxia es un factor que contribuye a patologías placentarias como la preeclampsia, donde la disfunción en la regulación de HIF-1 α afecta negativamente la migración, invasión y supervivencia de las células trofoblásticas [203]. En este contexto, la leptina podría desempeñar un rol modulador en la respuesta a la hipoxia a través de HIF-1 α , afectando la función placentaria y el desarrollo fetal. Profundizar en el estudio de la leptina en células placentarias y su interacción con HIF-1 α puede mejorar nuestra comprensión del diálogo materno-fetal durante el embarazo y las implicaciones de la hipoxia en patologías placentarias.

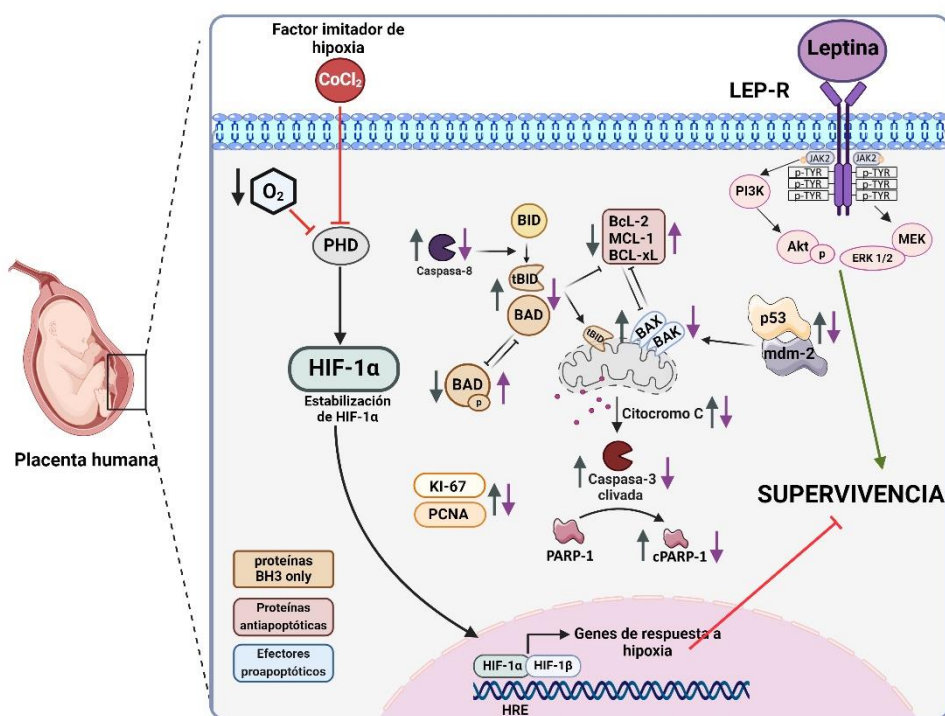
Nuestro estudio acerca del rol de la leptina en condiciones de hipoxia química, inducida por CoCl₂, ha demostrado que la estabilización de HIF-1 α en células trofoblásticas y explantos placentarios humanos incrementa la apoptosis, medida a través del clivaje de Caspasa-3, PARP-1, la presencia de núcleos apoptóticos y fragmentación del ADN. A través de las vías de señalización PI3K y MAPK, la leptina contrarresta los efectos apoptóticos producidos por la hipoxia química, reduciendo distintos marcadores apoptóticos tales como el clivaje de Caspasa-3, PARP-1 y el aumento en los niveles de la Procaspasa-8 y Citocromo C. Además, demostramos que la leptina disminuye la relación de BAX/BCL-2, regula negativamente la expresión de Bid y Bad, y promueve la fosforilación de Bad en la Ser112. Además, promueve la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-xL y MCL-1, contrarrestando la respuesta durante la hipoxia. Estos efectos se traducen en una disminución de la permeabilización de la membrana mitocondrial y, por ende, una reducción en la activación de caspasas, promoviendo así la supervivencia celular.

Al estudiar el efecto de la leptina sobre la supervivencia celular en células trofoblásticas en el contexto de hipoxia química, evidenciamos que la leptina aumenta significativamente la expresión de los marcadores Ki-67 y PCNA y la viabilidad celular a través de las vías de señalización PI3K y MAPK. Estos hallazgos sugieren que la leptina podría ser un modulador clave en la supervivencia celular placentaria bajo condiciones de hipoxia. La leptina puede regular la expresión de p53 y Mdm-2, promoviendo la expresión de Mdm-2 y degradación de p53, en ambos modelos de hipoxia evaluados.

El papel de la leptina sobre la migración de células trofoblásticas resalta su importancia en el desarrollo placentario y en la regulación de la respuesta a la hipoxia.

Nuestros resultados demuestran que la leptina no solo favorece la migración de células trofoblásticas, sino que también modula la expresión de HIF-1 α . Específicamente, hallamos que la leptina contrarresta el efecto inhibitor de la hipoxia química sobre la migración celular a través de la vía de señalización ERK 1/2.

Nuestra investigación ha proporcionado una visión integral de cómo la leptina modula la supervivencia en células trofoblásticas bajo condiciones de hipoxia, a través de la estabilización del factor de transcripción HIF-1 α . Nuestros hallazgos sugieren que la leptina, al revertir la apoptosis inducida por la hipoxia, podría actuar como un mecanismo compensatorio en el embarazo, ayudando a mantener el equilibrio entre la supervivencia y la muerte celular en el tejido placentario en condiciones de estrés.



Mecanismos involucrados en la acción de leptina en células placentarias

BIBLIOGRAFÍA

1. Gude, N.M., et al., *Growth and function of the normal human placenta*. Thromb Res, 2004. **114**(5-6): p. 397-407.
2. Red-Horse, K., et al., *Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface*. J Clin Invest, 2004. **114**(6): p. 744-54.
3. Johannes W.Rohen, E.L.-D., *Embriología funcional una perspectiva desde la biología del desarrollo*. 3 ed. 2006, España: E.M Panamericana. 24.
4. T.W. Sadler, P., *Langman Embriología Médica con Orientación Médica*. 10a ed. 1963, España: E.M. Panamericana. 41.
5. Helena Curtis (†), N.S.B., Adriana Schnek , Alicia Massarini, *Invitación a la Biología en contexto social*. 7 ed. 1993, Madrid: panamericana 800.
6. Dey, S., *Implantation*. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction-Elsevier, 2006. **3rd edition**.
7. Lunghi, L., M.E Ferretti, S. Medici, C. Biondi and F. Vesce, *Control of human trophoblast function* 5ed. 2007: Reprod Biol Endocrinol
8. Ashary, N., A. Tiwari, and D. Modi, *Embryo Implantation: War in Times of Love*. Endocrinology, 2018. **159**(2): p. 1188-1198.
9. Guibourdenche, J., et al., *Development and hormonal functions of the human placenta*. Folia Histochem Cytobiol, 2009. **47**(5): p. S35-40.
10. Goldman-Wohl, D. and S. Yagel, *Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia*. Mol Cell Endocrinol, 2002. **187**(1-2): p. 233-8.
11. del Mónaco, S.M., et al., *Preeclampsia, migración celular y canales iónicos*. Medicina (Buenos Aires), 2008. **68**(5): p. 405-410.
12. DaSilva-Arnold, S., et al., *Differentiation of first trimester cytotrophoblast to extravillous trophoblast involves an epithelial–mesenchymal transition*. Placenta, 2015. **36**(12): p. 1412-1418.
13. Ashton, S.V., et al., *Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(1): p. 102-8.
14. Lyall, F., *Development of the utero-placental circulation: The role of carbon monoxide and nitric oxide in trophoblast invasion and spiral artery transformation*. Microscopy research and technique, 2003. **60**(4): p. 402-411.
15. Wisner, K., *Gestational Hypertension and Preeclampsia*. MCN Am J Matern Child Nurs, 2019. **44**(3): p. 170.
16. Yang, X., et al., *The Roles of Uterine Natural Killer (NK) Cells and KIR/HLA-C Combination in the Development of Preeclampsia: A Systematic Review*. Biomed Res Int, 2020. **2020**: p. 4808072.
17. Zhou, Y., et al., *Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?* J Clin Invest, 1997. **99**(9): p. 2139-51.
18. Pijnenborg, R., L. Vercruysse, and M. Hanssens, *The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies*. Placenta, 2006. **27**(9-10): p. 939-58.
19. Jauniaux, E., B. Gulbis, and G.J. Burton, *Physiological implications of the materno-fetal oxygen gradient in human early pregnancy*. Reprod Biomed Online, 2003. **7**(2): p. 250-3.
20. Villasmil, E.R., C.B. Pérez, and J.S. Bolívar, *Invasión trofoblástica en el embarazo normal (II): Placentación profunda*. Avances en Biomedicina, 2014. **3**(2): p. 8.

21. Jose Botella LLusia, J.A.C.N., 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 Fisiologia y Patologia*. 1993, Madrid: Diaz de Santos
22. Chaddha, V., et al., *Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency*. Semin Fetal Neonatal Med, 2004. **9**(5): p. 357-69.
23. Kingdom, J., et al., *Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2000. **92**(1): p. 35-43.
24. Pardi, G., A.M. Marconi, and I. Cetin, *Placental-fetal interrelationship in IUGR fetuses--a review*. Placenta, 2002. **23 Suppl A**: p. S136-41.
25. Knofler, M., et al., *Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems*. Cell Mol Life Sci, 2019. **76**(18): p. 3479-3496.
26. Carlson, B.M., *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. 2005, Madrid
27. Sultana, Z., et al., *Oxidative stress, placental ageing-related pathologies and adverse pregnancy outcomes*. Am J Reprod Immunol, 2017. **77**(5).
28. Boyd, J.D., & Hamilton, W.J., ed. *The human placenta*. ed. C.W.H. Sons. 1970.
29. Roa, I., C. Smok, and R. Prieto, *Placenta: Anatomía e Histología Comparada*. International Journal of Morphology, 2012. **30**(4): p. 1490-1496.
30. Llusia, J.B., *La placenta. Fisiología y patología*. 1992: Ediciones Díaz De Santos.
31. Carter, A.M. and A.C. Enders, *The evolution of epitheliochorial placentation*. Annu Rev Anim Biosci, 2013. **1**: p. 443-67.
32. Masuzaki, H., et al., *Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans*. Nat Med, 1997. **3**(9): p. 1029-33.
33. Hoggard, N., et al., *Leptin expression in placental and fetal tissues: does leptin have a functional role?* Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 2): p. 57-63.
34. Goldenberg, D., et al., *[Novel physiological and therapeutic implications of leptin]*. Rev Med Chil, 2014. **142**(6): p. 738-47.
35. Zeng, F., et al., *Diffuse optical tomography based on a WKB approximation*. J Biomed Opt, 1997. **2**(4): p. 426-36.
36. Imagawa, K., et al., *Structure-function studies of human leptin*. J Biol Chem, 1998. **273**(52): p. 35245-9.
37. Fruhbeck, G., *Intracellular signalling pathways activated by leptin*. Biochem J, 2006. **393**(Pt 1): p. 7-20.
38. Boute, N., et al., *The formation of an intrachain disulfide bond in the leptin protein is necessary for efficient leptin secretion*. Biochimie, 2004. **86**(6): p. 351-6.
39. Houseknecht, K.L., et al., *Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity*. Diabetes, 1996. **45**(11): p. 1638-43.
40. Lee, G.H., et al., *Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice*. Nature, 1996. **379**(6566): p. 632-5.
41. Janeckova, R., *The role of leptin in human physiology and pathophysiology*. Physiol Res, 2001. **50**(5): p. 443-59.
42. Senaris, R., et al., *Synthesis of leptin in human placenta*. Endocrinology, 1997. **138**(10): p. 4501-4.
43. Bakshi, A., R. Singh, and U. Rai, *Trajectory of leptin and leptin receptor in vertebrates: Structure, function and their regulation*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2022. **257**: p. 110652.
44. Dos Santos E, D.F., 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**: p. 47-63.

45. Magarinos, M.P., et al., *Leptin promotes cell proliferation and survival of trophoblastic cells*. Biol Reprod, 2007. **76**(2): p. 203-10.
46. Henson, M.C. and V.D. Castracane, *Leptin in pregnancy: an update*. Biol Reprod, 2006. **74**(2): p. 218-29.
47. Hardie, L., et al., *Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy*. Clin Endocrinol (Oxf), 1997. **47**(1): p. 101-6.
48. Wang, M.Y., et al., *A novel leptin receptor isoform in rat*. FEBS Lett, 1996. **392**(2): p. 87-90.
49. Munzberg, H. and C.D. Morrison, *Structure, production and signaling of leptin*. Metabolism, 2015. **64**(1): p. 13-23.
50. Hegyi, K., et al., *Leptin-induced signal transduction pathways*. Cell Biol Int, 2004. **28**(3): p. 159-69.
51. Sweeney, G., *Leptin signalling*. Cell Signal, 2002. **14**(8): p. 655-63.
52. Barr, V.A., K. Lane, and S.I. Taylor, *Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms*. J Biol Chem, 1999. **274**(30): p. 21416-24.
53. Henson, M.C. and V.D. Castracane, *Leptin in pregnancy*. Biol Reprod, 2000. **63**(5): p. 1219-28.
54. Karmazyn, M. and X.T. Gan, *Molecular and Cellular Mechanisms Underlying the Cardiac Hypertrophic and Pro-Remodelling Effects of Leptin*. Int J Mol Sci, 2024. **25**(2).
55. Myers, M.G., Jr., *Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology*. Recent Prog Horm Res, 2004. **59**: p. 287-304.
56. Lammert, A., et al., *Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **283**(4): p. 982-8.
57. Tu, H., et al., *Convergent trafficking pattern of leptin after endocytosis mediated by ObRa-ObRd*. J Cell Physiol, 2007. **212**(1): p. 215-22.
58. Cauzac, M., et al., *Transduction of leptin growth signals in placental cells is independent of JAK-STAT activation*. Placenta, 2003. **24**(4): p. 378-84.
59. Bjorbaek, C., et al., *Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 4747-55.
60. Goiot, H., et al., *Antral mucosa expresses functional leptin receptors coupled to STAT-3 signaling, which is involved in the control of gastric secretions in the rat*. Gastroenterology, 2001. **121**(6): p. 1417-27.
61. Akerman, F., Z.M. Lei, and C.V. Rao, *Human umbilical cord and fetal membranes co-express leptin and its receptor genes*. Gynecol Endocrinol, 2002. **16**(4): p. 299-306.
62. Challier, J., et al., *Placental leptin receptor isoforms in normal and pathological pregnancies*. Placenta, 2003. **24**(1): p. 92-9.
63. Cervero, A., et al., *The leptin system during human endometrial receptivity and preimplantation development*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(5): p. 2442-51.
64. Maymo, J.L., et al., *Review: Leptin gene expression in the placenta--regulation of a key hormone in trophoblast proliferation and survival*. Placenta, 2011. **32 Suppl 2**: p. S146-53.
65. Baumann, H., et al., *The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8374-8.
66. Bjorbaek, C. and B.B. Kahn, *Leptin signaling in the central nervous system and the periphery*. Recent Prog Horm Res, 2004. **59**: p. 305-31.
67. Eulendorf, R., et al., *Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs*. Eur J Cell Biol, 2012. **91**(6-7): p. 486-95.
68. Nakashima, K., M. Narazaki, and T. Taga, *Leptin receptor (OB-R) oligomerizes with itself but not with its closely related cytokine signal transducer gp130*. FEBS Lett, 1997. **403**(1): p. 79-82.

69. White, D.W. and L.A. Tartaglia, *Evidence for ligand-independent homo-oligomerization of leptin receptor (OB-R) isoforms: a proposed mechanism permitting productive long-form signaling in the presence of excess short-form expression*. J Cell Biochem, 1999. **73**(2): p. 278-88.
70. Hargarten, J.C., et al., *JAK/STAT Signaling Predominates in Human and Murine Fungal Post-infectious Inflammatory Response Syndrome*. medRxiv, 2024.
71. Perez-Perez, A., et al., *Role of leptin in female reproduction*. Clin Chem Lab Med, 2015. **53**(1): p. 15-28.
72. Corvinus, F.M., et al., *Evidence for a correlation between trophoblast invasiveness and STAT3 activity*. Am J Reprod Immunol, 2003. **50**(4): p. 316-21.
73. Patterson, C.M., et al., *Leptin action via LepR-b Tyr1077 contributes to the control of energy balance and female reproduction*. Mol Metab, 2012. **1**(1-2): p. 61-9.
74. Banks, A.S., et al., *Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14563-72.
75. Salinas-Sanchez, A.S., et al., *[Role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in the sporadic renal cell carcinoma]*. Actas Urol Esp, 2012. **36**(2): p. 99-103.
76. Wu, J. and D.J. Zou, *[Progress in the study of leptin receptor]*. Sheng Li Ke Xue Jin Zhan, 2000. **31**(2): p. 143-6.
77. Ghilardi, N. and R.C. Skoda, *The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(4): p. 393-9.
78. Combettes-Souverein, M. and T. Issad, *Molecular basis of insulin action*. Diabetes Metab, 1998. **24**(6): p. 477-89.
79. Bjorbaek, C., et al., *Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor*. J Biol Chem, 1997. **272**(51): p. 32686-95.
80. Mehebig, N., et al., *Leptin-induced nitric oxide production in white adipocytes is mediated through PKA and MAP kinase activation*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(2): p. C379-87.
81. Fruhbeck, G. and J. Salvador, *Is leptin involved in the signaling cascade after myocardial ischemia and reperfusion?* Circulation, 2000. **101**(18): p. E194.
82. Kita, N., et al., *Expression and activation of MAP kinases, ERK1/2, in the human villous trophoblasts*. Placenta, 2003. **24**(2-3): p. 164-72.
83. Daoud, G., et al., *ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta*. J Physiol, 2005. **566**(Pt 2): p. 409-23.
84. Sanchez-Margalet, V., et al., *Role of phosphatidylinositol-3-kinase in insulin receptor signaling: studies with inhibitor, LY294002*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **204**(2): p. 446-52.
85. Perez-Perez, A., et al., *MAPK and PI3K activities are required for leptin stimulation of protein synthesis in human trophoblastic cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(4): p. 956-60.
86. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
87. Perez-Perez, A., et al., *Insulin enhances leptin expression in human trophoblastic cells*. Biol Reprod, 2013. **89**(1): p. 20.
88. Savage, D. and S. O Rahilly, *Leptin: a novel therapeutic role in lipodystrophy*. Journal of Clinical Investigation, 2002. **109**(10): p. 1285-1286.
89. Maruna, P., R. Gurlich, and R. Frasko, *[Leptin--a new acute phase reactant]*. Vnitr Lek, 2001. **47**(7): p. 478-83.
90. Houseknecht, K.L., et al., *The biology of leptin: a review*. J Anim Sci, 1998. **76**(5): p. 1405-20.

91. Bouloumie, A., et al., *Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis*. Circ Res, 1998. **83**(10): p. 1059-66.
92. Farr, O.M., M.A. Tsoukas, and C.S. Mantzoros, *Leptin and the brain: Influences on brain development, cognitive functioning and psychiatric disorders*. Metabolism, 2015. **64**(1): p. 114-130.
93. Cervero, A., et al., *Embryonic adhesion is not affected by endometrial leptin receptor gene silencing*. Fertil Steril, 2007. **88**(4 Suppl): p. 1086-92.
94. Lu, X.P., B. Wang, and H.F. Huang, *[Expression of leptin mRNA in luteinized granulosa cells and leptin levels in serum and follicular fluid of non-obese infertile patients with polycystic ovary syndrome]*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2005. **85**(2): p. 88-91.
95. Tessier, D.R., Z.M. Ferraro, and A. Gruslin, *Role of leptin in pregnancy: consequences of maternal obesity*. Placenta, 2013. **34**(3): p. 205-11.
96. Lea, R.G., et al., *Placental leptin in normal, diabetic and fetal growth-retarded pregnancies*. Mol Hum Reprod, 2000. **6**(8): p. 763-9.
97. Houseknecht, K.L. and C.P. Portocarrero, *Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis*. Domest Anim Endocrinol, 1998. **15**(6): p. 457-75.
98. Münzberg, H. and C.D. Morrison, *Structure, production and signaling of leptin*. Metabolism, 2015. **64**(1): p. 13-23.
99. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
100. Allison, M.B. and M.G. Myers, *20 YEARS OF LEPTIN: Connecting leptin signaling to biological function*. Journal of Endocrinology, 2014. **223**(1): p. T25-T35.
101. Sinha, M.K., et al., *Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting*. J Clin Invest, 1996. **98**(6): p. 1277-82.
102. Wauters, M., R.V. Considine, and L.F. Van Gaal, *Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator*. European journal of endocrinology, 2000. **143**(3): p. 293-311.
103. Ahima, R.S., *Central actions of adipocyte hormones*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2005. **16**(7): p. 307-313.
104. Chen, H., et al., *Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice*. Cell, 1996. **84**(3): p. 491-5.
105. Chehab, F.F., M.E. Lim, and R. Lu, *Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin*. Nat Genet, 1996. **12**(3): p. 318-20.
106. Moschos, S., J.L. Chan, and C.S. Mantzoros, *Leptin and reproduction: a review*. Fertil Steril, 2002. **77**(3): p. 433-44.
107. Reitman, M.L., et al., *Leptin and its role in pregnancy and fetal development--an overview*. Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 2): p. 68-72.
108. Bajoria, R., et al., *Prospective function of placental leptin at maternal-fetal interface*. Placenta, 2002. **23**(2-3): p. 103-15.
109. Herrid, M., et al., *An updated view of leptin on implantation and pregnancy: a review*. Physiol Res, 2014. **63**(5): p. 543-57.
110. Yu, W.H., et al., *Role of leptin in hypothalamic-pituitary function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(3): p. 1023-8.
111. Casabiell, X., et al., *Leptin, reproduction and sex steroids*. Pituitary, 2001. **4**(1-2): p. 93-9.
112. Ahima, R.S., et al., *Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice*. J Clin Invest, 1997. **99**(3): p. 391-5.

113. Almog, B., et al., *Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **183**(1-2): p. 179-91.
114. Barkan, D., et al., *Leptin induces ovulation in GnRH-deficient mice*. FASEB J, 2005. **19**(1): p. 133-5.
115. Duggal, P.S., et al., *The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat*. Endocrinology, 2000. **141**(6): p. 1971-6.
116. Lin, Q., et al., *Leptin interferes with 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling to inhibit steroidogenesis in human granulosa cells*. Reprod Biol Endocrinol, 2009. **7**: p. 115.
117. Lin, Q., et al., *Leptin interferes with 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling to inhibit steroidogenesis in human granulosa cells*. Reprod Biol Endocrinol, 2009. **7**(115.2009).
118. Spicer, L.J. and C.C. Francisco, *The Adipose Obese Gene Product, Leptin: Evidence of a Direct Inhibitory Role in Ovarian Function 1*. Endocrinology, 1997. **138**(8): p. 3374-3379.
119. Joo, J.-K., et al., *Role of leptin in improvement of oocyte quality by regulation of ovarian angiogenesis*. Animal reproduction science, 2010. **119**(3): p. 329-334.
120. Bilbao, M.G., et al., *Regulation of the ovarian oxidative status by leptin during the ovulatory process in rats*. Reproduction, 2015. **149**(4): p. 357-366.
121. Di Yorio, M.P., et al., *Ovarian signalling pathways regulated by leptin during the ovulatory process*. Reproduction, 2013. **146**(6): p. 647-658.
122. Karlsson, C., et al., *Expression of functional leptin receptors in the human ovary*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(12): p. 4144-8.
123. Laughlin, G., A. Morales, and S. Yen, *Serum Leptin Levels in Women with Polycystic Ovary Syndrome: The Role of Insulin Resistance/Hyperinsulinemia 1*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1997. **82**(6): p. 1692-1696.
124. Lappas, M., et al., *Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies*. J Endocrinol, 2005. **186**(3): p. 457-65.
125. Holness, M.J., M.J. Munns, and M.C. Sugden, *Current concepts concerning the role of leptin in reproductive function*. Mol Cell Endocrinol, 1999. **157**(1-2): p. 11-20.
126. Tessier, D., Z. Ferraro, and A. Gruslin, *Role of leptin in pregnancy: consequences of maternal obesity*. Placenta, 2013. **34**(3): p. 205-211.
127. Ashworth, C.J., et al., *Placental leptin*. Rev Reprod, 2000. **5**(1): p. 18-24.
128. Gonzalez, R.R., et al., *Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(12): p. 4883-8.
129. Islami, D., P. Bischof, and D. Chardonens, *Possible interactions between leptin, gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-I and II) and human chorionic gonadotrophin (hCG)*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2003. **110**(2): p. 169-75.
130. Aplin, J.D., *The cell biological basis of human implantation*. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2000. **14**(5): p. 757-64.
131. Achache, H. and A. Revel, *Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation*. Hum Reprod Update, 2006. **12**(6): p. 731-46.
132. Alfer, J., et al., *The endometrium as a novel target for leptin: differences in fertility and subfertility*. Molecular Human Reproduction, 2000. **6**(7): p. 595-601.
133. Cervero, A., et al., *Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function*. Reprod Biomed Online, 2005. **10**(2): p. 217-23.
134. Herrid, M., et al., *An updated view of leptin on implantation and pregnancy: a review*. Physiol Res, 2014. **63**: p. 543-57.

135. Perez-Perez, A., et al., *Leptin stimulates protein synthesis-activating translation machinery in human trophoblastic cells*. Biol Reprod, 2009. **81**(5): p. 826-32.
136. Castellucci, M., et al., *Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion*. Mol Hum Reprod, 2000. **6**(10): p. 951-8.
137. Dos Santos, E., et al., *The roles of leptin and adiponectin at the fetal-maternal interface in humans*. Hormone molecular biology and clinical investigation, 2015.
138. Linnemann, K., et al., *Physiological and pathological regulation of feto/placento/maternal leptin expression*. Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 2): p. 86-90.
139. Perez-Perez, A., et al., *Leptin action in normal and pathological pregnancies*. J Cell Mol Med, 2018. **22**(2): p. 716-727.
140. Ural, S.H. and J.T. Repke, *Gestational diabetes mellitus*. Reviews in Obstetrics and Gynecology, 2008. **1**(3): p. 129.
141. Fan, X., et al., *Recent progress in leptin signaling from a structural perspective and its implications for diseases*. Biochimie, 2023. **212**: p. 60-75.
142. Desoye, G. and S. Hauguel-de Mouzon, *The human placenta in gestational diabetes mellitus. The insulin and cytokine network*. Diabetes Care, 2007. **30 Suppl 2**: p. S120-6.
143. Araujo, J.R., E. Keating, and F. Martel, *Impact of gestational diabetes mellitus in the maternal-to-fetal transport of nutrients*. Curr Diab Rep, 2015. **15**(2): p. 569.
144. Iciek, R., et al., *Placental leptin and its receptor genes expression in pregnancies complicated by type 1 diabetes*. J Physiol Pharmacol, 2013. **64**(5): p. 579-85.
145. Powe, C.E., *Early Pregnancy Biochemical Predictors of Gestational Diabetes Mellitus*. Curr Diab Rep, 2017. **17**(2): p. 12.
146. Al-Badri, M.R., M.S. Zantout, and S.T. Azar, *The role of adipokines in gestational diabetes mellitus*. Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism, 2015: p. 2042018815577039.
147. Miehle, K., H. Stepan, and M. Fasshauer, *Leptin, adiponectin and other adipokines in gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia*. Clin Endocrinol (Oxf), 2012. **76**(1): p. 2-11.
148. Chang, K.J., K.M. Seow, and K.H. Chen, *Preeclampsia: Recent Advances in Predicting, Preventing, and Managing the Maternal and Fetal Life-Threatening Condition*. Int J Environ Res Public Health, 2023. **20**(4).
149. Chaiworapongsa, T., et al., *Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology*. Nat Rev Nephrol, 2014. **10**(8): p. 466-80.
150. Mutter, W.P. and S.A. Karumanchi, *Molecular mechanisms of preeclampsia*. Microvascular research, 2008. **75**(1): p. 1-8.
151. Redman, C.W., *Current topic: pre-eclampsia and the placenta*. Placenta, 1991. **12**(4): p. 301-8.
152. Redman, C.W., I.L. Sargent, and A.C. Staff, *IFPA Senior Award Lecture: making sense of pre-eclampsia - two placental causes of preeclampsia?* Placenta, 2014. **35 Suppl**: p. S20-5.
153. Staff, A.C., *The two-stage placental model of preeclampsia: An update*. J Reprod Immunol, 2019. **134-135**: p. 1-10.
154. Dos Santos, E., et al., *The roles of leptin and adiponectin at the fetal-maternal interface in humans*. Horm Mol Biol Clin Investig, 2015. **24**(1): p. 47-63.
155. Lepercq, J., et al., *Leptin: a potential marker of placental insufficiency*. Gynecol Obstet Invest, 2003. **55**(3): p. 151-5.
156. Michael, A., et al., *Increased leptin levels in preeclampsia: associations with BMI, estrogen and SHBG levels*. HORMONES-ATHENS-, 2004. **3**: p. 46-52.

157. Grisaru-Granovsky, S., A. Samueloff, and D. Elstein, *The role of leptin in fetal growth: a short review from conception to delivery*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2008. **136**(2): p. 146-150.
158. Mise, H., et al., *Augmented Placental Production of Leptin in Preeclampsia: Possible Involvement of Placental Hypoxia 1*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1998. **83**(9): p. 3225-3229.
159. Chrelias, G., et al., *Serum inhibin and leptin: Risk factors for pre-eclampsia?* Clin Chim Acta, 2016. **463**: p. 84-87.
160. de Knecht, V.E., et al., *The Role of Leptin in Fetal Growth during Pre-Eclampsia*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(9).
161. Chen, S., et al., *Association of the LEP gene with immune infiltration as a diagnostic biomarker in preeclampsia*. Front Mol Biosci, 2023. **10**: p. 1209144.
162. Mohamad, M.A., et al., *A Review of Candidate Genes and Pathways in Preeclampsia-An Integrated Bioinformatical Analysis*. Biology (Basel), 2020. **9**(4).
163. Kaufmann, P., S. Black, and B. Huppertz, *Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia*. Biol Reprod, 2003. **69**(1): p. 1-7.
164. Zhang, S., et al., *Placental adaptations in growth restriction*. Nutrients, 2015. **7**(1): p. 360-89.
165. Aydin, H.I., et al., *Adipokine, adiponectin and endothelin-1 levels in intrauterine growth restricted neonates and their mothers*. Journal of perinatal medicine, 2015.
166. Heazell, A.E., et al., *Intra-uterine growth restriction is associated with increased apoptosis and altered expression of proteins in the p53 pathway in villous trophoblast*. Apoptosis, 2011. **16**(2): p. 135-44.
167. Kyriakakou, M., et al., *Leptin and adiponectin concentrations in intrauterine growth restricted and appropriate for gestational age fetuses, neonates, and their mothers*. European Journal of Endocrinology, 2008. **158**(3): p. 343-348.
168. Wu, D. and P. Yotnda, *Induction and testing of hypoxia in cell culture*. J Vis Exp, 2011(54).
169. Semenza, G.L., *Perspectives on oxygen sensing*. Cell, 1999. **98**(3): p. 281-4.
170. Brahimi-Horn, C., N. Mazure, and J. Pouyssegur, *Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications*. Cell Signal, 2005. **17**(1): p. 1-9.
171. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): p. 4304-8.
172. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1995. **270**(3): p. 1230-7.
173. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(12): p. 5510-5514.
174. Jiang, B.H., et al., *Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17771-8.
175. Martin, A.R., et al., *Hypoxia inducible factor down-regulation, cancer and cancer stem cells (CSCs): ongoing success stories*. Medchemcomm, 2017. **8**(1): p. 21-52.
176. Schmid, T., J. Zhou, and B. Brune, *HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia*. J Cell Mol Med, 2004. **8**(4): p. 423-31.
177. Yang, J., et al., *Functions of the Per/ARNT/Sim domains of the hypoxia-inducible factor*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(43): p. 36047-36054.
178. Yang, C., et al., *HIF-1: structure, biology and natural modulators*. Chin J Nat Med, 2021. **19**(7): p. 521-527.

179. Yu, F., et al., *HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9630-5.
180. Salceda, S. and J. Caro, *Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes*. J Biol Chem, 1997. **272**(36): p. 22642-7.
181. Munoz-Sanchez, J. and M.E. Chanez-Cardenas, *The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model*. J Appl Toxicol, 2019. **39**(4): p. 556-570.
182. Choudhry, H. and A.L. Harris, *Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology*. Cell Metab, 2018. **27**(2): p. 281-298.
183. Semenza, G.L., *HIF-1 and human disease: one highly involved factor*. Genes & development, 2000. **14**(16): p. 1983-1991.
184. Semenza, G.L., *Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level*. Physiology (Bethesda), 2004. **19**: p. 176-82.
185. Jeong, J.W., et al., *Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation*. Cell, 2002. **111**(5): p. 709-20.
186. Wang, G.L., B.H. Jiang, and G.L. Semenza, *Effect of altered redox states on expression and DNA-binding activity of hypoxia-inducible factor 1*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **212**(2): p. 550-6.
187. Haddad, J.J. and S.C. Land, *A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF-alpha-dependent regulation of HIF-1alpha*. FEBS Lett, 2001. **505**(2): p. 269-74.
188. Haddad, J.J., *Recombinant human interleukin (IL)-1 beta-mediated regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) stabilization, nuclear translocation and activation requires an antioxidant/reactive oxygen species (ROS)-sensitive mechanism*. Eur Cytokine Netw, 2002. **13**(2): p. 250-60.
189. Chandel, N.S., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11715-20.
190. Agani, F. and B.H. Jiang, *Oxygen-independent regulation of HIF-1: novel involvement of PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer*. Curr Cancer Drug Targets, 2013. **13**(3): p. 245-51.
191. Jiang, B.H., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1*. Cell Growth Differ, 2001. **12**(7): p. 363-9.
192. Zhong, H., et al., *Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics*. Cancer Res, 2000. **60**(6): p. 1541-5.
193. Wang, Y., et al., *Hypoxia-inducible factor-1alpha and MAPK co-regulate activation of hepatic stellate cells upon hypoxia stimulation*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e74051.
194. Minet, E., et al., *ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation*. FEBS Lett, 2000. **468**(1): p. 53-8.
195. Kietzmann, T. and A. Gorkach, *Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression*. Semin Cell Dev Biol, 2005. **16**(4-5): p. 474-86.
196. Yeung, S.J., J. Pan, and M.H. Lee, *Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(24): p. 3981-99.
197. Semenza, G.L., *HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics*. Trends Mol Med, 2002. **8**(4 Suppl): p. S62-7.
198. Maxwell, P.H., et al., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. Nature, 1999. **399**(6733): p. 271-5.
199. Grosfeld, A., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 transactivates the human leptin gene promoter*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42953-7.

200. M Reslan, O. and R. A Khalil, *Molecular and vascular targets in the pathogenesis and management of the hypertension associated with preeclampsia*. Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Cardiovascular & Hematological Agents), 2010. **8**(4): p. 204-226.
201. Benítez, J.G.S., et al., *La leptina en la carcinogénesis mamaria vías de señalización*. Química Viva, 2012. **11**(2): p. 91-111.
202. Jauniaux, E., B. Gulbis, and G.J. Burton, *The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the foetus--a review*. Placenta, 2003. **24 Suppl A**: p. S86-93.
203. Genbacev, O., et al., *Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia*. Journal of Clinical Investigation, 1996. **97**(2): p. 540.
204. Rath, G., et al., *HIF-1 Alpha and Placental Growth Factor in Pregnancies Complicated With Preeclampsia: A Qualitative and Quantitative Analysis*. J Clin Lab Anal, 2016. **30**(1): p. 75-83.
205. Fryer, B.H. and M.C. Simon, *Hypoxia, HIF and the placenta*. Cell Cycle, 2006. **5**(5): p. 495-8.
206. Chen, B., et al., *Hypoxia downregulates p53 but induces apoptosis and enhances expression of BAD in cultures of human syncytiotrophoblasts*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2010. **299**(5): p. C968-C976.
207. Levy, R., et al., *Apoptosis in human cultured trophoblasts is enhanced by hypoxia and diminished by epidermal growth factor*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2000. **278**(5): p. C982-C988.
208. Patel, J., et al., *Regulation of hypoxia inducible factors (HIF) in hypoxia and normoxia during placental development*. Placenta, 2010. **31**(11): p. 951-7.
209. Caniggia, I., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFβ 3*. The Journal of clinical investigation, 2000. **105**(5): p. 577-587.
210. Caniggia, I., et al., *Inhibition of TGF-β 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies*. The Journal of clinical investigation, 1999. **103**(12): p. 1641-1650.
211. Tazuke, S.I., et al., *Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(17): p. 10188-10193.
212. Capela, E.S.F. and C.M.P. Rodrigues, *Apoptosis-50 Years after Its Discovery*. Biomedicines, 2023. **11**(4).
213. Jordán, J., *Apoptosis: muerte celular programada*. Offarm, 2003. **22**(6): p. 100-106.
214. Torres, L.E.S. and F.D. Vargas, *Apoptosis: el fenómeno y su determinación*. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 2012. **41**(1).
215. Martínez, S., *Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud*. Colombiana de Biotecnología, 2009. **2**: p. 152-166.
216. Reed, J.C., *Proapoptotic multidomain BCL-2/BAX-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities*. Cell Death Differ, 2006. **13**(8): p. 1378-86.
217. Heazell, A.E. and I.P. Crocker, *Live and let die - regulation of villous trophoblast apoptosis in normal and abnormal pregnancies*. Placenta, 2008. **29**(9): p. 772-83.
218. Wani, A.K., et al., *Targeting Apoptotic Pathway of Cancer Cells with Phytochemicals and Plant-Based Nanomaterials*. Biomolecules, 2023. **13**(2).

219. Qian, S., et al., *The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy*. Front Oncol, 2022. **12**: p. 985363.
220. Kale, J., E.J. Osterlund, and D.W. Andrews, *BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death*. Cell Death Differ, 2018. **25**(1): p. 65-80.
221. Arbab, I.A., et al., *Dentatin Induces Apoptosis in Prostate Cancer Cells via BCL-2, Bcl-xL, Survivin Downregulation, Caspase-9, -3/7 Activation, and NF-kappaB Inhibition*. Evid Based Complement Alternat Med, 2012. **2012**: p. 856029.
222. Hockings, C., et al., *Mcl-1 and Bcl-x(L) sequestration of Bak confers differential resistance to BH3-only proteins*. Cell Death Differ, 2018. **25**(4): p. 721-734.
223. Ma, Z.W. and D.X. Liu, *Humanin decreases mitochondrial membrane permeability by inhibiting the membrane association and oligomerization of BAX and Bid proteins*. Acta Pharmacol Sin, 2018. **39**(6): p. 1012-1021.
224. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell, 1997. **91**(2): p. 231-41.
225. Hung, T.H., et al., *BAX, Bak and mitochondrial oxidants are involved in hypoxia-reoxygenation-induced apoptosis in human placenta*. Placenta, 2008. **29**(7): p. 565-83.
226. Ratts, V.S., et al., *Expression of BCL-2, BAX and BAK in the trophoblast layer of the term human placenta: a unique model of apoptosis within a syncytium*. Placenta, 2000. **21**(4): p. 361-6.
227. Humphrey, R.G., et al., *Epidermal growth factor abrogates hypoxia-induced apoptosis in cultured human trophoblasts through phosphorylation of BAD Serine 112*. Endocrinology, 2008. **149**(5): p. 2131-7.
228. Zhang, W., et al., *Neuroprotective effects of leptin on cerebral ischemia through JAK2/STAT3/PGC-1-mediated mitochondrial function modulation*. Brain Res Bull, 2020. **156**: p. 118-130.
229. Toro, A.R., et al., *Leptin is an anti-apoptotic effector in placental cells involving p53 downregulation*. PLoS One, 2014 **9**(6): p. e99187.
230. Hernandez Borrero, L.J. and W.S. El-Deiry, *Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting*. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2021. **1876**(1): p. 188556.
231. Jain, A.K. and M.C. Barton, *p53: emerging roles in stem cells, development and beyond*. Development, 2018. **145**(8).
232. Yamauchi, H., et al., *Essential role of p53 in trophoblastic apoptosis induced in the developing rodent placenta by treatment with a DNA-damaging agent*. Apoptosis, 2007. **12**(10): p. 1743-1754.
233. Harris, C.C., *Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies*. J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(20): p. 1442-55.
234. Brady, C.A., et al., *Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression*. Cell, 2011. **145**(4): p. 571-83.
235. Eischen, C.M. and G. Lozano, *The Mdm network and its regulation of p53 activities: a rheostat of cancer risk*. Hum Mutat, 2014. **35**(6): p. 728-37.
236. Dai, C. and W. Gu, *p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis*. Trends in molecular medicine, 2010. **16**(11): p. 528-536.
237. Toledo, F., et al., *A mouse p53 mutant lacking the proline-rich domain rescues Mdm4 deficiency and provides insight into the Mdm2-Mdm4-p53 regulatory network*. Cancer Cell, 2006. **9**(4): p. 273-85.
238. Heazell, A.E., et al., *Intra-uterine growth restriction is associated with increased apoptosis and altered expression of proteins in the p53 pathway in villous trophoblast*. Apoptosis, 2011. **16**(2): p. 135-144.

239. Olsson, A., et al., *How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression?* Cell Death & Differentiation, 2007. **14**(9): p. 1561-1575.
240. Sirotkin, A., et al., *Involvement of transcription factor p53 and leptin in control of porcine ovarian granulosa cell functions.* Cell proliferation, 2012. **45**(1): p. 9-14.
241. Brown, L., et al., *Transcriptional targets of p53 that regulate cellular proliferation.* Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression, 2007. **17**(1).
242. Mole, D.R., et al., *Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing.* IUBMB Life, 2001. **52**(1-2): p. 43-7.
243. Hammond, E.M. and A.J. Giaccia, *The role of p53 in hypoxia-induced apoptosis.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **331**(3): p. 718-25.
244. Nieminen, A.L., et al., *Mdm2 and HIF-1alpha interaction in tumor cells during hypoxia.* J Cell Physiol, 2005. **204**(2): p. 364-9.
245. Wu, X., et al., *The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop.* Genes Dev, 1993. **7**(7A): p. 1126-32.
246. Kamat, C.D., et al., *Mutant p53 facilitates pro-angiogenic, hyperproliferative phenotype in response to chronic relative hypoxia.* Cancer Lett, 2007. **249**(2): p. 209-19.
247. Schmid, T., et al., *p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1).* Biochem J, 2004. **380**(Pt 1): p. 289-95.
248. An, W.G., et al., *Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha.* Nature, 1998. **392**(6674): p. 405-8.
249. Carmeliet, P., et al., *Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis.* Nature, 1998. **394**(6692): p. 485-90.
250. Choy, M.K., et al., *PKB/Akt activation inhibits p53-mediated HIF1A degradation that is independent of MDM2.* J Cell Physiol, 2010. **222**(3): p. 635-9.
251. Chen, D., et al., *Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function.* J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 13595-8.
252. Roe, J.S., et al., *p53 stabilization and transactivation by a von Hippel-Lindau protein.* Mol Cell, 2006. **22**(3): p. 395-405.
253. Sermeus, A. and C. Michiels, *Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways.* Cell Death Dis, 2011. **2**: p. e164.
254. Piret, J.P., et al., *Is HIF-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein?* Biochem Pharmacol, 2002. **64**(5-6): p. 889-92.
255. Levy, R., et al., *Apoptosis in human cultured trophoblasts is enhanced by hypoxia and diminished by epidermal growth factor.* Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **278**(5): p. C982-8.
256. Roberts, R.M., et al., *Syncytins expressed in human placental trophoblast.* Placenta, 2021. **113**: p. 8-14.
257. Huppertz, B., *Apoptosis in the trophoblast—role of apoptosis in placental morphogenesis.* Journal of the Society for Gynecologic Investigation, 2004. **11**(6): p. 353-362.
258. Baczyk, D., et al., *Bi-potential behaviour of cytotrophoblasts in first trimester chorionic villi.* Placenta, 2006. **27**(4-5): p. 367-74.
259. Huppertz, B., M. Kadyrov, and J.C. Kingdom, *Apoptosis and its role in the trophoblast.* American journal of obstetrics and gynecology, 2006. **195**(1): p. 29-39.
260. Genbacev, O. and R.K. Miller, *Post-implantation differentiation and proliferation of cytotrophoblast cells: in vitro models--a review.* Placenta, 2000. **21 Suppl A**: p. S45-9.
261. Korkmaz, C., et al., *Location of proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in human first trimester and term placenta.* Analytical and quantitative cytopathology and histopathology, 2013. **35**(6): p. 335-343.

262. Kale, A., F. Söylemez, and A. Ensari, *Expressions of proliferation markers (Ki-67, proliferating cell nuclear antigen, and silver-staining nucleolar organizer regions) and of p53 tumor protein in gestational trophoblastic disease*. American journal of obstetrics and gynecology, 2001. **184**(4): p. 567-574.
263. Cervar-Zivkovic, M., et al., *Endothelin-1 attenuates apoptosis in cultured trophoblasts from term human placentas*. Reproductive Sciences, 2007. **14**(5): p. 430-439.
264. Shang, W., et al., *Elevated expressions of p53, CDKNA1, and BAX in placental villi from patients with recurrent spontaneous abortion*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013. **17**(24): p. 3376-3380.
265. Sharp, A.N., et al., *Preeclampsia is associated with alterations in the p53-pathway in villous trophoblast*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e87621.
266. Korgun, E.T., et al., *Location of cell cycle regulators cyclin B1, cyclin A, PCNA, Ki67 and cell cycle inhibitors p21, p27 and p57 in human first trimester placenta and deciduas*. Histochem Cell Biol, 2006. **125**(6): p. 615-24.
267. Crocker, I.P., D.M. Tansinda, and P.N. Baker, *Altered cell kinetics in cultured placental villous explants in pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction*. J Pathol, 2004. **204**(1): p. 11-8.
268. Heazell, A.E., et al., *Altered expression of regulators of caspase activity within trophoblast of normal pregnancies and pregnancies complicated by preeclampsia*. Reprod Sci, 2008. **15**(10): p. 1034-43.
269. Rodriguez-Colman, M.J., T.B. Dansen, and B.M.T. Burgering, *FOXO transcription factors as mediators of stress adaptation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2024. **25**(1): p. 46-64.
270. Zhang, Z., et al., *HIF-1alpha affects trophoblastic apoptosis involved in the onset of preeclampsia by regulating FOXO3a under hypoxic conditions*. Mol Med Rep, 2020. **21**(6): p. 2484-2492.
271. Hung, T.H., J.N. Skepper, and G.J. Burton, *In vitro ischemia-reperfusion injury in term human placenta as a model for oxidative stress in pathological pregnancies*. Am J Pathol, 2001. **159**(3): p. 1031-43.
272. Smith, S.C., P.N. Baker, and E.M. Symonds, *Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction*. American journal of obstetrics and gynecology, 1997. **177**(6): p. 1395-1401.
273. Albers, R.E., et al., *Trophoblast-Specific Expression of Hif-1alpha Results in Preeclampsia-Like Symptoms and Fetal Growth Restriction*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 2742.
274. Santos-Alvarez, J., R. Goberna, and V. Sanchez-Margalet, *Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes*. Cell Immunol, 1999. **194**(1): p. 6-11.
275. Sanchez-Margalet, V., et al., *Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**(1): p. 11-9.
276. Najib, S. and V. Sanchez-Margalet, *Human leptin promotes survival of human circulating blood monocytes prone to apoptosis by activation of p42/44 MAPK pathway*. Cell Immunol, 2002. **220**(2): p. 143-9.
277. Rouet-Benzineb, P., et al., *Leptin counteracts sodium butyrate-induced apoptosis in human colon cancer HT-29 cells via NF-kappaB signaling*. J Biol Chem, 2004. **279**(16): p. 16495-502.
278. Sirotkin, A.V., et al., *Leptin directly controls secretory activity of human ovarian granulosa cells: possible inter-relationship with the IGF/IGFBP system*. Horm Res, 2005. **64**(4): p. 198-202.
279. Lang, T., et al., *Leptin facilitates proliferation of hepatic stellate cells through up-regulation of platelet-derived growth factor receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **323**(3): p. 1091-5.

280. Tan, R., et al., *Leptin Promotes the Proliferation and Neuronal Differentiation of Neural Stem Cells through the Cooperative Action of MAPK/ERK1/2, JAK2/STAT3 and PI3K/AKT Signaling Pathways*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(20).
281. Artwohl, M., et al., *Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2002. **26**(4): p. 577-80.
282. Conus, S., A. Bruno, and H.U. Simon, *Leptin is an eosinophil survival factor*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(6): p. 1228-34.
283. Bruno, A., et al., *Apoptotic pathways are inhibited by leptin receptor activation in neutrophils*. J Immunol, 2005. **174**(12): p. 8090-6.
284. Boelhaue, M., et al., *Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts*. Biol Reprod, 2005. **73**(4): p. 737-44.
285. Perez-Perez, A., et al., *Leptin prevents apoptosis of trophoblastic cells by activation of MAPK pathway*. Arch Biochem Biophys, 2008. **477**(2): p. 390-5.
286. Bifulco, G., et al., *Leptin induces mitogenic effect on human choriocarcinoma cell line (JAR) via MAP kinase activation in a glucose-dependent fashion*. Placenta, 2003. **24**(4): p. 385-91.
287. Shawn, L., et al., *The isolation and characterization of a novel telomerase immortalized first trimester trophoblast cell line, Swan 71*. Placenta, 2009. **30**(11): p. 939-48.
288. Liu, F., M.J. Soares, and K.L. Audus, *Permeability properties of monolayers of the human trophoblast cell line BeWo*. Am J Physiol, 1997. **273**(5): p. C1596-604.
289. Wyrwoll, C.S., P.J. Mark, and B.J. Waddell, *Directional secretion and transport of leptin and expression of leptin receptor isoforms in human placental BeWo cells*. Mol Cell Endocrinol, 2005. **241**(1-2): p. 73-9.
290. Ebihara, K., et al., *Identification of the human leptin 5'-flanking sequences involved in the trophoblast-specific transcription*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **241**(3): p. 658-63.
291. Miller, R.K., et al., *Human placental explants in culture: approaches and assessments*. Placenta, 2005. **26**(6): p. 439-48.
292. Avagliano, L., C. Garò, and A.M. Marconi, *Placental Amino Acids Transport in Intrauterine Growth Restriction*. Journal of Pregnancy, 2012. **2012**: p. 972562.
293. Dusza, H.M., et al., *Experimental human placental models for studying uptake, transport and toxicity of micro- and nanoplastics*. Sci Total Environ, 2023. **860**: p. 160403.
294. Millonig, G., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 alpha under rapid enzymatic hypoxia: cells sense decrements of oxygen but not hypoxia per se*. Free Radic Biol Med, 2009. **46**(2): p. 182-91.
295. van Meerloo, J., G.J. Kaspers, and J. Cloos, *Cell sensitivity assays: the MTT assay*. Methods Mol Biol, 2011. **731**: p. 237-45.
296. Geback, T., et al., *TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays*. Biotechniques, 2009. **46**(4): p. 265-74.
297. Acconcia, F. and R. Kumar, *Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors*. Cancer Lett, 2006. **238**(1): p. 1-14.
298. Sharp, A.N., et al., *Placental apoptosis in health and disease*. Am J Reprod Immunol, 2010. **64**(3): p. 159-69.
299. Reschke, L., et al., *Leptin induces leiomyoma cell proliferation and extracellular matrix deposition via JAK2/STAT3 and MAPK/ERK pathways*. F S Sci, 2022. **3**(4): p. 383-391.
300. Xu, C.J., et al., *Leptin promotes proliferation and inhibits apoptosis of prostate cancer cells by regulating ERK1/2 signaling pathway*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020. **24**(16): p. 8341-8348.

301. Choi, J.H., et al., *Expression of leptin receptors and potential effects of leptin on the cell growth and activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian cancer cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(1): p. 207-10.
302. Chen, C., et al., *Leptin induces proliferation and anti-apoptosis in human hepatocarcinoma cells by up-regulating cyclin D1 and down-regulating BAX via a Janus kinase 2-linked pathway*. Endocr Relat Cancer, 2007. **14**(2): p. 513-29.
303. Chen, C., et al., [Corrigendum] *Leptin stimulates ovarian cancer cell growth and inhibits apoptosis by increasing cyclin D1 and Mcl-1 expression via the activation of the MEK/ERK1/2 and PI3K/Akt signaling pathways*. Int J Oncol, 2016. **49**(2): p. 847.
304. Perez-Perez, A., et al., *Leptin protects placental cells from apoptosis induced by acidic stress*. Cell Tissue Res, 2019. **375**(3): p. 733-742.
305. Li, L., et al., *The involvement of phosphoinositid 3-kinase/Akt pathway in the activation of hypoxia-inducible factor-1alpha in the developing rat brain after hypoxia-ischemia*. Brain Res, 2008. **1197**: p. 152-8.
306. Li, L., Y. Qu, and M. Mao, [Relationship between hypoxia inducible factor 1alpha: expression and neuron apoptosis during hypoxia ischemia brain damage in neonatal rats]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2007. **21**(12): p. 1326-9.
307. Sasabe, E., et al., *Mechanism of HIF-1alpha-dependent suppression of hypoxia-induced apoptosis in squamous cell carcinoma cells*. Cancer Sci, 2005. **96**(7): p. 394-402.
308. Kim, B.M. and H.W. Chung, *Hypoxia/reoxygenation induces apoptosis through a ROS-mediated caspase-8/Bid/BAX pathway in human lymphocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **363**(3): p. 745-50.
309. Saikumar, P., et al., *Role of hypoxia-induced BAX translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury*. Oncogene, 1998. **17**(26): p. 3401-15.
310. Al Rahim, M., S. Thatipamula, and M.A. Hossain, *Critical role of neuronal pentraxin 1 in mitochondria-mediated hypoxic-ischemic neuronal injury*. Neurobiol Dis, 2013. **50**: p. 59-68.
311. Huppertz, B., et al., *Extravillous trophoblast apoptosis--a workshop report*. Placenta, 2005. **26 Suppl A**: p. S46-8.
312. Xin, S., et al., *Leptin promotes proliferation of human undifferentiated spermatogonia by activating the PI3K/AKT/mTOR pathway*. Am J Reprod Immunol, 2024. **91**(1): p. e13811.
313. Mattioli, B., et al., *Leptin exerts an anti-apoptotic effect on human dendritic cells via the PI3K-Akt signaling pathway*. FEBS Lett, 2009. **583**(7): p. 1102-6.
314. Guo, Z., et al., *Leptin-mediated cell survival signaling in hippocampal neurons mediated by JAK STAT3 and mitochondrial stabilization*. J Biol Chem, 2008. **283**(3): p. 1754-1763.
315. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
316. Voss, A.K. and A. Strasser, *The essentials of developmental apoptosis*. F1000Res, 2020. **9**.
317. Chen, B., et al., *Hypoxia downregulates p53 but induces apoptosis and enhances expression of BAD in cultures of human syncytiotrophoblasts*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **299**(5): p. C968-76.
318. Bonni, A., et al., *Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms*. Science, 1999. **286**(5443): p. 1358-62.
319. Li, M., et al., *Bcl-X(L): A multifunctional anti-apoptotic protein*. Pharmacol Res, 2020. **151**: p. 104547.
320. Widden, H. and W.J. Placzek, *The multiple mechanisms of MCL1 in the regulation of cell fate*. Commun Biol, 2021. **4**(1): p. 1029.

321. Zeng, S., et al., *Role of leptin in the pathophysiology of preeclampsia*. Placenta, 2023. **142**: p. 128-134.
322. Martin-Romero, C., et al., *Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes*. Cell Immunol, 2000. **199**(1): p. 15-24.
323. Sales Gil, R. and P. Vagnarelli, *Ki-67: More Hidden behind a 'Classic Proliferation Marker'*. Trends Biochem Sci, 2018. **43**(10): p. 747-748.
324. Mailand, N., I. Gibbs-Seymour, and S. Bekker-Jensen, *Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(5): p. 269-82.
325. Zhang, F. and J. Chen, *Leptin protects hippocampal CA1 neurons against ischemic injury*. J Neurochem, 2008. **107**(2): p. 578-87.
326. Fu, R., et al., *The Effects of Leptin on the Proliferation and Differentiation of Primary Chondrocytes in Vitro and Cartilage Regeneration in Vivo*. ACS Biomater Sci Eng, 2019. **5**(4): p. 1907-1919.
327. Green, D.R. and G. Kroemer, *Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53*. Nature, 2009. **458**(7242): p. 1127-30.
328. Wang, H., et al., *Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy*. Signal Transduct Target Ther, 2023. **8**(1): p. 92.
329. Aubrey, B.J., et al., *How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?* Cell Death Differ, 2018. **25**(1): p. 104-113.
330. Wang, J., et al., *Autocrined leptin promotes proliferation of non-small cell lung cancer (NSCLC) via PI3K/AKT and p53 pathways*. Ann Transl Med, 2021. **9**(7): p. 568.
331. Li, X., et al., *The codon 47 polymorphism in p53 is functionally significant*. J Biol Chem, 2005. **280**(25): p. 24245-51.
332. Toro, A.R., et al., *Mechanisms involved in p53 downregulation by leptin in trophoblastic cells*. Placenta, 2015. **36**(11): p. 1266-75.
333. Mayo, L.D. and D.B. Donner, *A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11598-603.
334. Singh, S., et al., *Human oncoprotein MDM2 activates the Akt signaling pathway through an interaction with the repressor element-1 silencing transcription factor conferring a survival advantage to cancer cells*. Cell Death Differ, 2013. **20**(4): p. 558-66.
335. Ogawara, Y., et al., *Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21843-50.
336. Koumenis, C., et al., *Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(4): p. 1297-310.
337. Rana, N.K., P. Singh, and B. Koch, *CoCl(2) simulated hypoxia induce cell proliferation and alter the expression pattern of hypoxia associated genes involved in angiogenesis and apoptosis*. Biol Res, 2019. **52**(1): p. 12.
338. Bischof, P. and A. Campana, *Molecular mediators of implantation*. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2000. **14**(5): p. 801-14.
339. Chen, C., et al., *miR-4443/MMP2 suppresses the migration and invasion of trophoblasts through the HB-EGF/EGFR pathway in preeclampsia*. Cell Cycle, 2022. **21**(23): p. 2517-2532.
340. Polotsky, V.Y., et al., *Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice*. J Physiol, 2003. **552**(Pt 1): p. 253-64.
341. Wang, B., I.S. Wood, and P. Trayhurn, *Hypoxia induces leptin gene expression and secretion in human preadipocytes: differential effects of hypoxia on adipokine expression by preadipocytes*. J Endocrinol, 2008. **198**(1): p. 127-34.

342. Gao, J., et al., *Leptin attenuates hypoxia-induced apoptosis in human periodontal ligament cells via the reactive oxygen species-hypoxia-inducible factor-1alpha pathway*. Exp Physiol, 2021. **106**(8): p. 1752-1761.
343. Calgani, A., et al., *Leptin contributes to long-term stabilization of HIF-1alpha in cancer cells subjected to oxygen limiting conditions*. Cancer Lett, 2016. **376**(1): p. 1-9.
344. Fukui, A., et al., *Role of leptin signaling in the pathogenesis of angiotensin II-mediated atrial fibrosis and fibrillation*. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2013. **6**(2): p. 402-9.
345. Bouloumie, A., et al., *Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells*. FASEB J, 1999. **13**(10): p. 1231-8.
346. Rago, V., et al., *Leptin and its receptor are expressed in the testis and in the epididymis of young and adult pigs*. The Anatomical Record, 2009. **292**(5): p. 736-745.
347. Hatami-Baroogh, L., et al., *Evaluation of the leptin receptor in human spermatozoa*. Reproductive Biology and Endocrinology, 2010. **8**(1): p. 1.
348. Jauniaux, E., A. Watson, and G. Burton, *Evaluation of respiratory gases and acid-base gradients in human fetal fluids and uteroplacental tissue between 7 and 16 weeks' gestation*. Am J Obstet Gynecol, 2001. **184**(5): p. 998-1003.
349. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine*. Cell, 2012. **148**(3): p. 399-408.
350. Ramirez Zegarra, R., A. Dall'Asta, and T. Ghi, *Mechanisms of Fetal Adaptation to Chronic Hypoxia following Placental Insufficiency: A Review*. Fetal Diagn Ther, 2022. **49**(5-6): p. 279-292.
351. Gathiram, P. and J. Moodley, *Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology*. Cardiovasc J Afr, 2016. **27**(2): p. 71-8.
352. Korkes, H.A., et al., *Relationship between hypoxia and downstream pathogenic pathways in preeclampsia*. Hypertens Pregnancy, 2017. **36**(2): p. 145-150.
353. Shweta, et al., *A comparative immunological analysis of CoCl₂ treated cells with in vitro hypoxic exposure*. Biometals, 2015. **28**(1): p. 175-85.
354. Yuan, Y., et al., *Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- α* . Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(18): p. 15911-15916.
355. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease*. Pediatr Res, 2001. **49**(5): p. 614-7.
356. Abbas, Y., et al., *Investigation of human trophoblast invasion in vitro*. Hum Reprod Update, 2020. **26**(4): p. 501-513.
357. Vidal, M.S., Jr., et al., *Establishment and comparison of human term placenta-derived trophoblast cells*. Biol Reprod, 2024. **110**(5): p. 950-970.
358. Lappas, M., M. Permezel, and G.E. Rice, *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): p. 3334-42.
359. Aban, C., et al., *Endocannabinoids participate in placental apoptosis induced by hypoxia inducible factor-1*. Apoptosis, 2016. **21**(10): p. 1094-105.
360. Hayashi, M., et al., *Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1 α under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells*. Journal of Endocrinology, 2004. **183**(1): p. 145-154.
361. Vengellur, A. and J.J. LaPres, *The role of hypoxia inducible factor 1alpha in cobalt chloride induced cell death in mouse embryonic fibroblasts*. Toxicol Sci, 2004. **82**(2): p. 638-46.

362. Tripathi, V.K., S.A. Subramaniyan, and I. Hwang, *Molecular and Cellular Response of Co-cultured Cells toward Cobalt Chloride (CoCl₂)-Induced Hypoxia*. ACS Omega, 2019. **4**(25): p. 20882-20893.
363. Anton, L., et al., *HIF-1alpha Stabilization Increases miR-210 Eliciting First Trimester Extravillous Trophoblast Mitochondrial Dysfunction*. Front Physiol, 2019. **10**: p. 699.
364. Zhao, Y.Q., et al., *Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells Improve Neurological Function in Rats with Intrauterine Hypoxic-Ischaemic Encephalopathy by Reducing Apoptosis and Inflammatory Reactions*. Front Biosci (Landmark Ed), 2024. **29**(4): p. 139.
365. Kadyrov, M., J.C. Kingdom, and B. Huppertz, *Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction*. Am J Obstet Gynecol, 2006. **194**(2): p. 557-63.
366. Huppertz, B. and A. Herrler, *Regulation of proliferation and apoptosis during development of the preimplantation embryo and the placenta*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2005. **75**(4): p. 249-61.
367. Kim, S.R., et al., *Epigallocatechin Gallate Protects against Hypoxia-Induced Inflammation in Microglia via NF-kappaB Suppression and Nrf-2/HO-1 Activation*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(7).
368. Knyazev, E.N., S.Y. Paul, and A.G. Tonevitsky, *Chemical Induction of Trophoblast Hypoxia by Cobalt Chloride Leads to Increased Expression of DDIT3*. Dokl Biochem Biophys, 2021. **499**(1): p. 251-256.
369. Cockell, A.P., et al., *Human placental syncytiotrophoblast microvillous membranes impair maternal vascular endothelial function*. Br J Obstet Gynaecol, 1997. **104**(2): p. 235-40.
370. Iwagaki, S., et al., *Augmentation of leptin and hypoxia-inducible factor 1alpha mRNAs in the pre-eclamptic placenta*. Gynecol Endocrinol, 2004. **18**(5): p. 263-8.
371. Salazar, M.M., *Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud*. Revista Colombiana de Biotecnología, 2009. **11**(2): p. 152-166.
372. Mandelkow, R., et al., *Detection and Quantification of Nuclear Morphology Changes in Apoptotic Cells by Fluorescence Microscopy and Subsequent Analysis of Visualized Fluorescent Signals*. Anticancer Res, 2017. **37**(5): p. 2239-2244.
373. Chen, H., et al., *Akt Activation and Inhibition of Cytochrome c Release: Mechanistic Insights Into Leptin-Promoted Survival of Type II Alveolar Epithelial Cells*. Journal of cellular biochemistry, 2015.
374. Liu, W., et al., *[The effects of leptin on apoptosis of airway smooth muscle cells via the PI3K/Akt signaling pathway]*. Zhonghua jie he he hu xi za zhi= Zhonghua jiehe he huxi zazhi= Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases, 2012. **35**(12): p. 915-918.
375. Yu, L., et al., *Leptin confers protection against TNF- α -induced apoptosis in rat cardiomyocytes*. Biochemical and biophysical research communications, 2014. **455**(1): p. 126-132.
376. McGaffin, K.R., et al., *Leptin attenuates cardiac apoptosis after chronic ischemic injury*. Cardiovascular research, 2009.
377. Yan, G., et al., *[The role of Leptin on neuron apoptosis in mice with cerebral ischemia/reperfusion injury]*. Zhongguo wei zhong bing ji jiu yi xue= Chinese critical care medicine= Zhongguo weizhongbing jijiuyixue, 2011. **23**(6): p. 345-348.

378. Serke, H., et al., *Leptin-deficient (ob/ob) mouse ovaries show fatty degeneration, enhanced apoptosis and decreased expression of steroidogenic acute regulatory enzyme*. International journal of obesity, 2012. **36**(8): p. 1047-1053.
379. Al-Suhaimi, E., *Molecular mechanisms of leptin and pro-apoptotic signals induced by menadione in HepG2 cells*. Saudi journal of biological sciences, 2014. **21**(6): p. 582-588.
380. Kantari, C. and H. Walczak, *Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(4): p. 558-63.
381. Kim, M., et al., *Hypoxia inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by blocking BAX translocation*. Cancer Res, 2004. **64**(12): p. 4078-81.
382. Bruno, A., et al., *Apoptotic pathways are inhibited by leptin receptor activation in neutrophils*. The Journal of Immunology, 2005. **174**(12): p. 8090-8096.
383. Brown, J.E. and S.J. Dunmore, *Leptin decreases apoptosis and alters BCL-2: BAX ratio in clonal rodent pancreatic beta-cells*. Diabetes/metabolism research and reviews, 2007. **23**(6): p. 497-502.
384. Nüsken, E., et al., *Strong hypoxia reduces leptin synthesis in purified primary human trophoblasts*. Placenta, 2015. **36**(4): p. 427-432.
385. Saxena, N.K., et al., *Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation*. FASEB J, 2004. **18**(13): p. 1612-4.
386. Billen, L., A. Shamas-Din, and D. Andrews, *Bid: a BAX-like BH3 protein*. Oncogene, 2008. **27**: p. S93-S104.
387. Chen, H., et al., *Akt Activation and Inhibition of Cytochrome C Release: Mechanistic Insights into Leptin-promoted Survival of Type II Alveolar Epithelial Cells*. J Cell Biochem, 2015. **116**(10): p. 2313-24.
388. Lam, Q.L., et al., *Leptin signaling maintains B-cell homeostasis via induction of BCL-2 and Cyclin D1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(31): p. 13812-7.
389. Fujita, Y., et al., *Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes*. Clin Exp Immunol, 2002. **128**(1): p. 21-6.
390. Rinkenberger, J.L., et al., *Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality*. Genes Dev, 2000. **14**(1): p. 23-7.
391. Genbacev, O. and R. Miller, *Post-implantation differentiation and proliferation of cytotrophoblast cells: in vitro models—a review*. Placenta, 2000. **21**: p. S45-S49.
392. Gardner, L.B., et al., *Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 7919-26.
393. Eliasson, P. and J.I. Jonsson, *The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be*. J Cell Physiol, 2010. **222**(1): p. 17-22.
394. Takubo, K., et al., *Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(3): p. 391-402.
395. Song, Z.C., et al., *[Influence of cobalt chloride-induced hypoxia on the proliferation and apoptosis of periodontal ligament cells]*. Shanghai Kou Qiang Yi Xue, 2009. **18**(5): p. 489-92.
396. Pattillo, R.A. and G.O. Gey, *The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro*. Cancer Res, 1968. **28**(7): p. 1231-6.
397. Misztal-Dethloff, B., H. Stepien, and J. Komorowski, *Effect of leptin on proliferative activity and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from cultured endothelial cells HECa10 in vitro*. Endocr Regul, 2004. **38**(4): p. 161-6.
398. Gainsford, T., et al., *Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14564-8.
399. Allaire, A.D., et al., *Placental apoptosis in preeclampsia*. Obstet Gynecol, 2000. **96**(2): p. 271-6.

400. Raguema, N., S. Moustadraf, and M. Bertagnolli, *Immune and Apoptosis Mechanisms Regulating Placental Development and Vascularization in Preeclampsia*. Front Physiol, 2020. **11**: p. 98.
401. Staff, A.C., et al., *Failure of physiological transformation and spiral artery atherosclerosis: their roles in preeclampsia*. Am J Obstet Gynecol, 2022. **226**(2S): p. S895-S906.
402. Harati-Sadegh, M., et al., *Analysis of polymorphisms, promoter methylation, and mRNA expression profile of maternal and placental P53 and P21 genes in preeclamptic and normotensive pregnant women*. J Biomed Sci, 2019. **26**(1): p. 92.
403. Gao, Q., et al., *Upregulation of P53 promoted G1 arrest and apoptosis in human umbilical cord vein endothelial cells from preeclampsia*. J Hypertens, 2016. **34**(7): p. 1380-8.
404. Toro, A.R., et al., *Leptin Is an Anti-Apoptotic Effector in Placental Cells Involving p53 Downregulation*. PLoS One, 2014.
405. Toro, A.R., et al., *Mechanisms involved in p53 downregulation by leptin in trophoblastic cells*. Placenta, 2015. **36**(11): p. 1266-1275.
406. Chen, C., et al., *Leptin-induced growth of human ZR-75-1 breast cancer cells is associated with up-regulation of cyclin D1 and c-Myc and down-regulation of tumor suppressor p53 and p21WAF1/CIP1*. Breast cancer research and treatment, 2006. **98**(2): p. 121-132.
407. Almog, B., et al., *Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats*. Molecular and cellular endocrinology, 2001. **183**(1): p. 179-191.
408. Alarcon, R., et al., *Hypoxia induces p53 accumulation through MDM2 down-regulation and inhibition of E6-mediated degradation*. Cancer Res, 1999. **59**(24): p. 6046-51.
409. Habib, C.N., et al., *Leptin influences estrogen metabolism and accelerates prostate cell proliferation*. Life Sci, 2015. **121**: p. 10-5.
410. Choi, J.-H., K.-T. Lee, and P.C. Leung, *Estrogen receptor alpha pathway is involved in leptin-induced ovarian cancer cell growth*. Carcinogenesis, 2011. **32**(4): p. 589-596.
411. Valle, A., et al., *Chronic leptin treatment sensitizes MCF-7 breast cancer cells to estrogen*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2011. **28**(5): p. 823-832.
412. Gambino, Y.P., et al., *17Beta-Estradiol Enhances Leptin Expression in Human Placental Cells Through Genomic and Nongenomic Actions*. Biol Reprod, 2010.
413. Gambino, Y.P., et al., *Regulation of leptin expression by 17beta-estradiol in human placental cells involves membrane associated estrogen receptor alpha*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(4): p. 900-10.
414. Heazell, A.E., et al., *Effects of oxygen on cell turnover and expression of regulators of apoptosis in human placental trophoblast*. Placenta, 2008. **29**(2): p. 175-86.
415. Levy, R., et al., *Trophoblast apoptosis from pregnancies complicated by fetal growth restriction is associated with enhanced p53 expression*. Am J Obstet Gynecol, 2002. **186**(5): p. 1056-61.
416. Zhu, J.-Y., Z.-J. Pang, and Y.-h. Yu, *Regulation of trophoblast invasion: the role of matrix metalloproteinases*. Reviews in obstetrics and gynecology, 2012. **5**(3-4): p. e137.
417. Knöfler, M. and J. Pollheimer, *Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling*. Front Genet, 2013. **4**: p. 190.
418. Fan, Y., et al., *Leptin signaling enhances cell invasion and promotes the metastasis of human pancreatic cancer via increasing MMP-13 production*. Oncotarget, 2015. **6**(18): p. 16120.
419. Yoon, K.-W., et al., *Leptin-induced adhesion and invasion in colorectal cancer cell lines*. Oncology reports, 2014. **31**(6): p. 2493-2498.

420. Kato, S., et al., *Leptin stimulates migration and invasion and maintains cancer stem-like properties in ovarian cancer cells: an explanation for poor outcomes in obese women*. *Oncotarget*, 2015. **6**(25): p. 21100-21119.
421. Yan, D., et al., *Leptin-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells requires β -catenin activation via Akt/GSK3-and MTA1/Wnt1 protein-dependent pathways*. *Journal of Biological Chemistry*, 2012. **287**(11): p. 8598-8612.
422. Wang, H., et al., *Leptin-promoted human extravillous trophoblast invasion is MMP14 dependent and requires the cross talk between Notch1 and PI3K/Akt signaling*. *Biology of reproduction*, 2014. **90**(4): p. 78.
423. Jo, Y.S., et al., *Progesterone Inhibits Leptin-Induced Invasiveness of BeWo Cells*. *International journal of medical sciences*, 2015. **12**(10): p. 773.
424. Liu, H., et al., *Effect of leptin on cytotrophoblast proliferation and invasion*. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2009. **29**(5): p. 631-6.
425. De Marco, C.S. and I. Caniggia, *Mechanisms of oxygen sensing in human trophoblast cells*. *Placenta*, 2002. **23 Suppl A**: p. S58-68.
426. James, J.L., P.R. Stone, and L.W. Chamley, *The regulation of trophoblast differentiation by oxygen in the first trimester of pregnancy*. *Hum Reprod Update*, 2006. **12**(2): p. 137-44.
427. Bardos, J.I. and M. Ashcroft, *Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling*. *Bioessays*, 2004. **26**(3): p. 262-9.
428. Grosfeld, A., et al., *Transcriptional effect of hypoxia on placental leptin*. *FEBS Lett*, 2001. **502**(3): p. 122-6.