



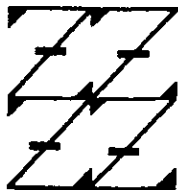
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

VALORACION DE LA ACTIVIDAD Y EXPRESION GENICA DE LA 25-HIDROXIVITAMINA D-1 ALFA HIDROXILASA EN CELULAS TROFOBLASTICAS HUMANA NORMALES Y PREECLAMPTICAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
IRENE SANCHEZ MORENO

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO ES.
DE NUESTRA REFLEXIÓN

DIRECTOR: DR. FERNANDO LARREA GALLO.

284492

MEXICO, D. F.,

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

TÍTULO DE LA TESIS

**VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN GÉNICA
DE LA 25-HIDROXIVITAMINA D-1 ALFA HIDROXILASA
EN CÉLULAS TROFBLÁSTICAS HUMANAS NORMALES Y
PREECLÁMPTICAS**

ALUMNA: IRENE SÁNCHEZ MORENO

**Dr. Fernando Larrea Gallo
Director de Tesis**

**Dr. María Elena Ayala Escobar
Asesor interno de Tesis**

El presente trabajo se llevó a cabo bajo la supervisión y dirección del Dr. Fernando Larrea Gallo, en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ).

Agradecimientos:

Al Instituto Nacional de la Nutrición " Salvador Zubirán" y en particular al departamento de Biología de la Reproducción por permitir la realización de este trabajo.

Agradezco especialmente a FUNDACION UNAM, por el apoyo a lo largo de mis estudios.

Al Dr. Fernando Larrea Gallo por brindarme la valiosa oportunidad de trabajar en su equipo.

Al Dr. Ali Halhali Baghdad por haber compartido sus conocimientos y experiencia para enriquecer mi trabajo.

A la Dra. Lorenza Díaz Nieto por permitirme conocer a una magnífica investigadora y una gran mujer.

A mis compañeras de trabajo: Lore, Ceci, Rocío e Isa, por la valiosa guía que me proporcionaron y por ser objeto de inspiración en mi formación profesional y personal.

A mis amigos: Cocotzin Luna, Gerardo Cerezo, Euclides Ávila y Teresa Zariñan por brindarme sinceramente su valiosa amistad.

A mis compañeros del departamento de Biología de la Reproducción y en especial a: Eulises, Sergio, Mara, Luis, Celeste, Aleida y José Juan.

A mis padres:

Rosa María, que para fortuna mía soy recipiente para sus perlas de afecto

Juán, por enseñarme lo que es tesón, constancia y gusto por el trabajo.

Los amo.

A mi tía Angelina, por el derroche de amor hacia mi y mis primos y hermanos.

A mis hermanos: Abuelo, Toty, Mago, Blanca, Maty y Jorge, por los bellos momento que hemos pasado juntos.

A Carlos Díaz.

Con todo mi amor, por el inmenso complemento de los
buenos y malos momentos, por ser el amor de mi vida.

Un agradecimiento muy especial a mis profesores de la FES-Z
y en particular a:

Enrique Gil.

Enrique Laguna.

Judith Villavicencio.

Alejandro Tecpa.

Gilberto Matamoros.

Ramiro Ríos.

Germán Calva.

Por cimentar mi carrera profesional.

A mis compañeros de la FES-Z

Juanita.

Elvira

Roberto

José

Javier

Laura

Por acompañarme en una de las etapas más preciadas de mi vida.

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	III
Índice de tablas	IV
Índice de anexos	V
Resumen	VI

Introducción

Vitamina D

Síntesis cutánea de la vitamina D ₃	1
--	---

Metabolismo de la Vitamina D₃

25-hidroxivitamina D ₃	3
---	---

24,25-dihidroxivitamina D ₃	4
--	---

1,25-dihidroxivitamina D ₃	6
---	---

25-hidroxivitamina D ₃ -1 alfa hidroxilasa.....	7
--	---

Metabolismo de la Vitamina D₃ en el embarazo

Síntesis placentaria de la 1 α ,25-(OH) ₂ D ₃	11
--	----

Síntesis placentaria de la 1 α ,25-(OH) ₂ D ₃	13
--	----

Preeclampsia

Cambios en la placenta preecláptica.....	14
--	----

Cambios en la placenta preecláptica.....	16
--	----

Preeclampsia y Vitamina D ₃	17
--	----

Justificación.....

Objetivos.....

Hipótesis

Materiales y Métodos

a) Materiales	22
---------------------	----

b) Cultivos celulares	23
-----------------------------	----

c) Cuantificación de 1,25-(OH) ₂ D ₃	
--	--

Extracción clorofórmica	26
-------------------------------	----

Cromatografía líquida de alta presión	26
---	----

1 ^o HPLC	27
---------------------------	----

2 ^o HPLC	27
---------------------------	----

d) Cuantificación de proteínas.....	28
-------------------------------------	----

e) Determinación de la hormona gonadotropina coriónica (hCG)	28
--	----

f) Extracción de ARN total.....	31
---------------------------------	----

g) Síntesis de la sonda	32
-------------------------------	----

Amplificación del ADNc.....	33
-----------------------------	----

Identificación de la sonda.....	35
---------------------------------	----

h) Hibridación ARN:ADN (Northern Blot).....	35
---	----

Transferencia de ARN a membranas de nylon	
---	--

Marcaje de la sonda	
---------------------	--

Prehibridación	
----------------	--

Hibridación	
-------------	--

i) Hibridación ADN:ADN (Southern Blot)	38
--	----

Transferencia del ADN a membranas de nylon	
--	--

Prehibridación	
----------------	--

Análisis estadístico de los resultados.....	40
---	----

Resultados

1. Estudio clínico	41
--------------------------	----

2. Caracterización del cultivo primario de trofoblastos.....	42
--	----

Aspecto morfológico	42
3. Secreción de hCG en cultivos de trofoblastos	45
Secreción de hCG en cultivos de placentas con preeclampsia	47
4. Producción de metabolitos de la [³ H]25-(OH)D ₃ en cultivos de trofoblastos ..	48
5. Estudio de la expresión del gen de la 1 α -(OH)asa en los trofoblastos	51
Obtención de la sonda de ADNc de la 1 α -(OH)asa	51
Identidad de la sonda	52
Northern blot	53
Southern blot	53
Discusión	56
Conclusiones	63
Bibliografía	64
Anexos	76

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de la vitamina D.....	1
Figura 2. Síntesis cutánea de la vitamina D y derivados inertes	2
Figura 3. Regulación del metabolismo de la 1,25-(OH) ₂ D ₃	8
Figura 4. Mapa del gen estructural de la 1α-(OH)asa.....	34
Figura 5. Vista microscópica de los trofoblastos NT	43
Figura 6. Vista microscópica de los trofoblastos PE.....	44
Figura 7. Secreción de hCG en trofoblastos NT vs PE	45
Figura 8. Secreción de hCG de placentas normotensas.....	46
Figura 9. Secreción de hCG de placentas preeclámpticas.....	48
Figura 10. Perfiles de elución de los metabolitos de la vitamina D ₃	49
Figura 11. Producción de 24,25-(OH) ₂ D ₃ en trofoblastos NT vs PE	50
Figura 12. Producción de 1,25-(OH) ₂ D ₃ en trofoblastos NT vs PE	51
Figura 13. Sonda de la 1α-(OH)asa amplificada por RT-PCR	52
Figura 14. Secuencia de nucleótidos de los productos de RT-PCR	53
Figura 15. Southern blot de los productos de RT-PCR, NT vs PE	54
Figura 16. Expresión relativa de la 1α-(OH)asa en tejido placentario NT vs PE	55

Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de anomalías histológicas de los trofoblastos PE	17
Tabla 2. Condiciones de digestión enzimática	24
Tabla 3. Protocolo general de las determinaciones de hCG	30
Tabla 4. Características clínicas de la población	41

Índice de anexos

Anexo 1. Gradiente de percoll para las separaciones de trofoblastos	76
Anexo 2. Curva de calibración de albúmina de suero bovino.....	77
Anexo 3. Curva de yodación.....	78
Anexo 4. Curva de calibración de la hCG para RIA.....	79

RESUMEN

La vitamina D₃ realiza sus funciones mediante la transformación de su estructura química. Gracias a las reacciones de hidroxilación sucesivas, en el carbono 25, 24 y 1 α , la vitamina D₃ se biotransforma en sus derivados activos y en otras formas químicas cuyas funciones se desconocen.

Estos compuestos participan principalmente en la regulación del metabolismo del calcio y en otros procesos igualmente importantes como en la diferenciación y proliferación celular. La transformación de la vitamina D₃ en su metabolito más activo, también llamado calcitriol, requiere de la participación de dos enzimas, que catalizan las reacciones de hidroxilación: la vitamina D₃-25hidroxilasa localizada en el hígado y la 25-hidroxivitamina D₃-1 α hidroxilasa (1 α -(OH)asa) en el riñón. Adicionalmente se ha informado de la hidroxilación en la posición 1 α en macrófagos y keratinocitos.

Durante el embarazo surgen cambios fisiológicos importantes sobre todo durante el último trimestre, tanto en el organismo materno como el fetal, entre ellos está el aumento de la demanda del calcio, ya que este mineral es requerido para funciones vitales como: la osificación del feto y el transporte de mensajes intracelulares.

Adicionalmente, durante este periodo final del embarazo las concentraciones circulantes en sangre materna de la 1,25-(OH)₂D₃ aumentan considerablemente, ocasionando un incremento en la absorción de calcio en el intestino y un aumento en la movilización del mismo mineral en el hueso.

En el embarazo se pueden presentar complicaciones relacionadas con el metabolismo del calcio como la preeclampsia (PE), que es un síndrome del embarazo que consiste de hipertensión arterial, proteinuria y/o edema, además de alteraciones en el metabolismo del calcio. A esta complicación del embarazo se han asociado bajas concentraciones circulantes de calcitriol, situación que se normaliza en el postparto. Otras moléculas también se encuentran alteradas durante la PE, tales como el factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-I) y la hormona paratiroidea (PTH).

Por lo tanto, el presente trabajo tiene como propósito estudiar la producción de la hormona 1,25-(OH)₂D₃ en la placenta a término provenientes de embarazadas normales y complicadas con preeclampsia. Para conseguirlo se realizaron cultivos primarios de trofoblastos de placentas provenientes de ambos grupos (NT) y PE, los cuales fueron

incubados en presencia de precursores de la síntesis del calcitriol. Los metabolitos producidos contenidos en los medios cultivos fueron separados e identificados por medio de cromatografía líquida de alta resolución. Por último se estudió la presencia de productos de transcripción de la enzima 1α -(OH)asa en células trofoblásticas.

En el seguimiento del presente trabajo, se observó que de manera consistente se encuentra disminuida la producción de la $1,25$ -(OH) $_2$ D $_3$ en los cultivos de placentas provenientes de embarazos complicados con PE, reflejando una menor actividad de la enzima 1α -(OH)asa y también una menor expresión del gen correspondiente a esta enzima. Aunado a esto se encontró menor concentración de la Gonadotropina Coriónica humana (hCG) en los cultivos PE en comparación con el grupo control, aunque esta diferencia no es significativa. Las determinaciones de la hCG se emplearon para analizar la capacidad de respuesta de los trofoblastos mantenidos en cultivo a un estímulo con el 8-Bromo-adenosin monofosfato cíclico (8-Br-AMPC). En los trofoblastos de placentas PE se observó una menor capacidad de respuesta al estímulo en contraste con los de placentas NT.

Así mismo, se observó que las concentraciones de hCG alcanzan un máximo al tercer día de incubación, situación que coincide con la citodiferenciación de los trofoblastos a sinciotrofoblastos, observada durante el análisis del fenotipo celular.

Finalmente en este trabajo se concluye que: La actividad de la enzima 1α -(OH)asa así como su expresión génica se encuentran disminuidas significativamente en los trofoblastos de placentas provenientes de embarazos que cursaron con preeclampsia mantenidos en cultivo.

INTRODUCCIÓN

VITAMINA D

El nombre genérico de la vitamina D abarca dos grupos de esteroides que incluyen a la vitamina D₂, de origen vegetal y la vitamina D₃, de origen animal (De Luca, 1997).

El ergosterol es convertido en la vitamina D₂ por vía fotosintética, de igual manera que el 7-dehidrocolesterol es biotransformado en la vitamina D₃ en la piel humana (figura 1).

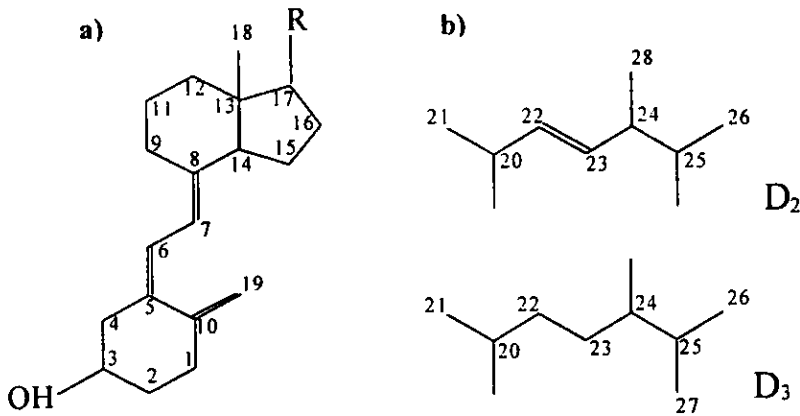


Figura 1. Estructura química de la vitamina D, formada por dos partes: la fórmula aromática a) y el grupo alifático (R-) b) que caracteriza a cada una de sus dos formas D₂ y D₃ (Tomado de: Glenville 1992).

Síntesis cutánea de la vitamina D₃

Durante la exposición a la luz solar, las radiaciones ultravioleta (UV) inciden sobre los depósitos cutáneos del precursor 7-dehidrocolesterol, ocasionando la ruptura en el anillo B (figura 2) entre los carbonos 9 y 10, formándose el 6,7,19 cis-conjugado del trieno-9,10 secosterioides conocido como la vitamina D₃ (Holick, 1986).

Aproximadamente del 80 al 90% de la vitamina D₃ es sintetizada en las capas de crecimiento activo de la epidermis, es decir, el llamado estrato basal y espinoso, el restante 20 % ocurre en la dermis (Holick, 1980).

Por otra parte, además de la síntesis endógena, la vitamina D₃ puede obtenerse de la dieta, ya que existen alimentos con cantidades considerables de ella como la yema de huevo y los aceites de hígado de pescado (Glowacki, 1982).

El principal proceso de regulación de las concentraciones circulantes de la vitamina D₃ se realiza mediante isomerización térmica. Una vez formada la vitamina D₃ en la epidermis y la dermis, se continúa una termoisomerización, generando productos biológicamente inertes como el lumisterol y el taquisterol (figura 2).

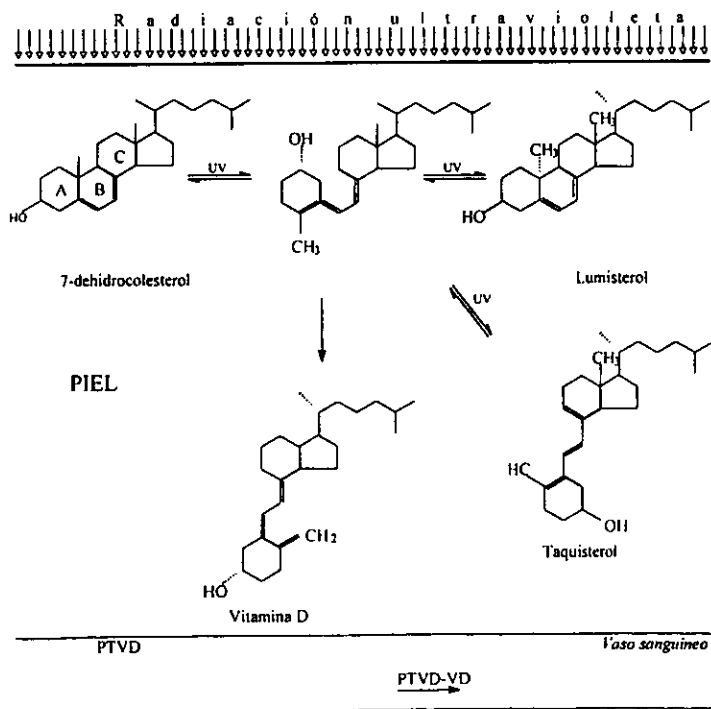


Figura 2. Síntesis cutánea de la vitamina D₃ y derivados inertes, propiciada por la irradiación con luz ultravioleta (UV). Esta es transportada en la circulación sanguínea por la proteína transportadora de la vitamina D (PTVD) (Tomado de Morii, 1987).

Existen otros procesos de regulación de la vitamina D₃, el porcentaje de conversión del 7-dehidrocolesterol a 6,7,19 cis-conjugado del trieno-9.10 secosteroide esta influenciado por el ángulo del zenit que afecta la incidencia de los rayos solares y por otros cromóforos presentes en la piel que también absorben las radiaciones UV como la melanina, el ácido urocánico, proteínas, ácido ribonucleico (ARN) y el ácido desoxirribonucleico (ADN), que entran en competencia por dichas radiaciones (MacLaughlin, 1983).

La función de la vitamina D₃ es la de ser el sustrato para la obtención del subproducto activo, al cual se le atribuye la cura y prevención del raquitismo (Sniadecki, 1982), la osteoporosis (Lips, 1995) entre otras enfermedades.

La cuantificación de la vitamina D₃ y sus metabolitos provee un importante conocimiento sobre la etiología, patogenia y tratamiento de las enfermedades relacionadas con el metabolismo del calcio y fósforo (Bouillon, 1995).

METABOLISMO DE LA VITAMINA D₃

La vitamina D₃ adquiere su funcionalidad biológica después de haber transformado su estructura química. La principal transformación constituye la hidroxilación en diferentes posiciones de la molécula, así existen metabolitos hidroxilados preferentemente en los carbonos 24, 25, 26 y 27 de su cadena alifática (Wichman, 1981).

25-HIDROXIVITAMINA D₃

La vitamina D₃ sintetizada en la piel, es llevada a la circulación sanguínea por la proteína transportadora de la vitamina D₃ (PTVD). En el hígado se hidroxila en el carbono 25, generando la forma más abundante de la vitamina D₃, la 25-hidroxivitamina D₃ (25-(OH)D₃), ya que se encuentra presente en la circulación sanguínea en una concentración de 30 a 50 ng por mL de sangre (Napoli, 1984).

La 25-(OH)D₃ es conocida como prehormona, ya que es el precursor de la forma hormonal más activa de la vitamina D₃, conocido como calcitriol. La reacción de hidroxilación en el carbono 25 es catalizada por la vitamina D₃-25 hidroxilasa (25-(OH)asa), la cual se localiza en los microsomas y mitocondrias de los hepatocitos (Sareem, 1984).

La enzima microsomal fue descrita como una enzima de baja capacidad y alta afinidad; es por ello que se le considera de gran importancia fisiológica. Además, la actividad de esta enzima es regulada por las concentraciones del sustrato (Horst, 1997).

Por otro lado, su homóloga mitocondrial, es una enzima de alta capacidad y baja afinidad, por lo que toma importancia en cuadros clínicos de intoxicación por vitamina D₃ (Bjorkhem, 1980).

La hidroxilación del carbono 25 de la vitamina D₃ constituye el primer paso de la ruta de activación de la vitamina D₃; además las evaluaciones en sangre de las concentraciones de la 25-(OH)D₃ son de gran importancia ya que se usan como indicador del grado de desnutrición general de la vitamina D₃ (Okuda, 1994).

24,25-DIHIDROXIVITAMINA D₃

La 25-(OH)D₃ sintetizada en el hígado es transportada por la PTVD en la circulación: al llegar al riñón es hidroxilada en el carbono 24 convirtiéndose en la 24,25-dihidroxitamina D₃ (24,25-(OH)₂D₃). Éste es el metabolito dihidroxilado más abundante en la circulación y se encuentra en concentraciones de 2 a 4 ng/mL de sangre (Glowacki, 1982).

La reacción de hidroxilación en el carbono 24 de la 25-(OH)D₃ es catalizada por la 25-hidroxitamina D₃-24 hidroxilasa (24-(OH)asa), la cual se encuentra principalmente en la membrana mitocondrial interna de los tubulos renales (Iwata, 1995), y puede estar presente en todas las células que contengan el receptor de la vitamina D₃ (RVD), como el intestino y el hueso.

En la rata, el gen que expresa la 24-(OH)asa ha sido aislado (Ohyama, 1991) y clonado (Chen, 1995), su estructura primaria muestra un 90 % de homología con la enzima humana. Presenta 12 exones distribuidos en un espacio de 15 kilobases (kb) (Ohyama, 1993).

Los principales reguladores de la actividad de la 24-(OH)asa son la hormona paratiroidea (PTH por sus siglas en inglés) y la 1,25-dihidroxitamina D_3 ($1,25-(OH)_2D_3$ o calcitriol) (Reinhardt, 1990). La PTH bloquea total o parcialmente la expresión del mensaje codificado en el ARN (ARNm) de la enzima, así como su actividad. En el intestino su principal regulador es la $1,25-(OH)_2D_3$. La administración *in vivo* del calcitriol induce la actividad de ésta enzima (Goff, 1992).

Los animales con dieta deficiente en calcio presentan concentraciones elevadas de la $1,25(OH)_2D_3$, acompañadas de una actividad suprimida o no detectable de la 24-(OH)asa (Shinki, 1992), así como de la disminución en el número del receptor de la vitamina D_3 (RVD). El ARNm y la actividad de la 24-(OH)asa cambian con la edad, aumentando su expresión en edades avanzadas (Jhonson, 1995).

La calcitonina es capaz de suprimir la expresión de dicha enzima, Beckman y colaboradores (Beckman, 1994) encontraron que esta hormona suprime la síntesis de la 24-(OH)asa en el intestino de la rata. Por otro lado, este mismo grupo (Beckman, 1994), demostraron que la intoxicación con vitamina D_3 provoca la inducción de la expresión de su ARNm en el intestino y el riñón.

Las funciones biológicas de la $24,25-(OH)_2D_3$ han generado controversias. por un lado, este metabolito estimula la mineralización del hueso, suprime la secreción de la PTH y participa en el mantenimiento del desarrollo fetal (Yamamoto, 1998), ya que se ha informado que la capacidad mineralizante tanto del calcitriol como de este metabolito de la vitamina D_3 se optimiza cuando se encuentran juntos y no así cuando esta presente solo alguno de los dos.

optimiza cuando se encuentran juntos y no así cuando esta presente solo alguno de los dos. Por otro lado, se considera a esta dihidroxivitamina como el primer paso hacia la cascada catabólica del metabolismo de la vitamina D_3 (Horst, 1997).

Existen otros metabolitos hidroxilados en el carbono 24 como son la 23,24,25 trihidroxivitamina D_3 (23,24,25-(OH) $_3D_3$), la 24,25,26-trihidroxivitamina D_3 (24,25,26-(OH) $_3D_3$) y la 24-hidroxivitamina D_3 (24-(OH) D_3) cuyas funciones biológicas permanecen aún desconocidas (Tanaka, 1981).

1,25 DIHIDROXIVITAMINA D_3

La 25-(OH) D_3 en el riñón es también hidroxilada en la posición alfa del carbono 1 convirtiéndose en la 1α .25-dihidroxivitamina D_3 (1,25-(OH) $_2D_3$) conocida como la forma hormonal más activa de la vitamina D_3 y como calcitriol (Suda, 1993; Tilyard, 1992). Las concentraciones circulantes de este metabolito son mil veces menores a las de la 25-(OH) D_3 y se deben a que la prehormona puede ser metabolizada en una variedad de productos. cuyas funciones se desconoce todavía (Holick, 1980).

La síntesis de la 1,25-(OH) $_2D_3$ es catalizada por la enzima 25-hidroxivitamina D_3 1α hidroxilasa (1α -(OH)asa).

La transformación de la 25-(OH) D_3 a 1,25-(OH) $_2D_3$ ocurre principalmente en el riñón, adicionalmente en la piel, macrófagos y en la placenta (Delvin, 1987). Al principio de la década de los 80's se informó que preparados de células deciduales placentarias producían 1,25-(OH) $_2D_3$ (Delvin, 1987; Glorieux, 1995); sin embargo, la producción trofoblástica aún esta en discusión (Hollis, 1989).

La biotransformación a calcitriol también se realiza en los nódulos alveolares pulmonares en pacientes con sarcoidosis (Adams, 1985; Mason, 1985). Por otro lado se sabe que ciertos

tipos de linfomas inductores de calcemia son capaces de sintetizar la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ (Reichel, 1985).

25- Hidroxivitamina D_3 -1 alfa hidroxilasa

La $1\alpha\text{-(OH)asa}$ es miembro de la superfamilia de enzimas conocidas como citocromos P_{450} y se localiza principalmente en las mitocondrias de las células renales (Armbrech, 1984; Henry, 1989; Omdhal, 1988).

Monkawa y colaboradores (Monkawa, 1997) identificaron y clonaron el gen de esta enzima obtenida de riñón humano. El código contenido en el ADN consiste de 2469 pares de bases y codifica para una proteína de 508 aminoácidos, que muestra un 82.5 % de homología con la secuencia de la $1\alpha\text{-(OH)asa}$ de rata.

El gen humano de la enzima consiste de 6 kilobases aproximadamente, está compuesto de 9 exones y presenta una sola copia, la cual se localiza en el cromosoma 12 (Fu, 1997).

Se ha demostrado que un gran número de factores iónicos y endocrinos regulan la actividad de la $1\alpha\text{-(OH)asa}$ y por lo tanto en la producción de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. Estos factores incluyen a la PTH, prolactina, hormona de crecimiento (GH), glucocorticoides, esteroides sexuales, latógeno placentario (Kumar, 1980), factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-1) (Halhali, 1999), calcio, fósforo, iones hidrógeno, potasio y el mismo calcitriol (Frasser, 1980). La expresión génica de la $1\alpha\text{-(OH)asa}$ es modulada por su propio producto, ya que a partir de ciertas concentraciones (10^{-7} M) la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ suprime la expresión de esta enzima (Horst, 1997).

Como se puede ver en la figura 3, la PTH es el factor regulador más importante en la formación de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ en el riñón (Wasserman, 1997). Estas hormonas y la calcitonina median la homeostasis del calcio (Justin, 1997). Cuando las concentraciones

extracelulares de calcio disminuyen, hay un incremento en la secreción de la PTH, la cual eleva las concentraciones de la $1,25-(OH)_2D_3$ activando la producción renal de la enzima $1\alpha-(OH)asa$ y así se inicia un círculo de regulación, ya que si bien la $1,25-(OH)_2D_3$ producida por el efecto de la PTH aumenta la absorción del calcio en el intestino, también es capaz de suprimir la expresión del gen de la PTH (Pols, 1988).

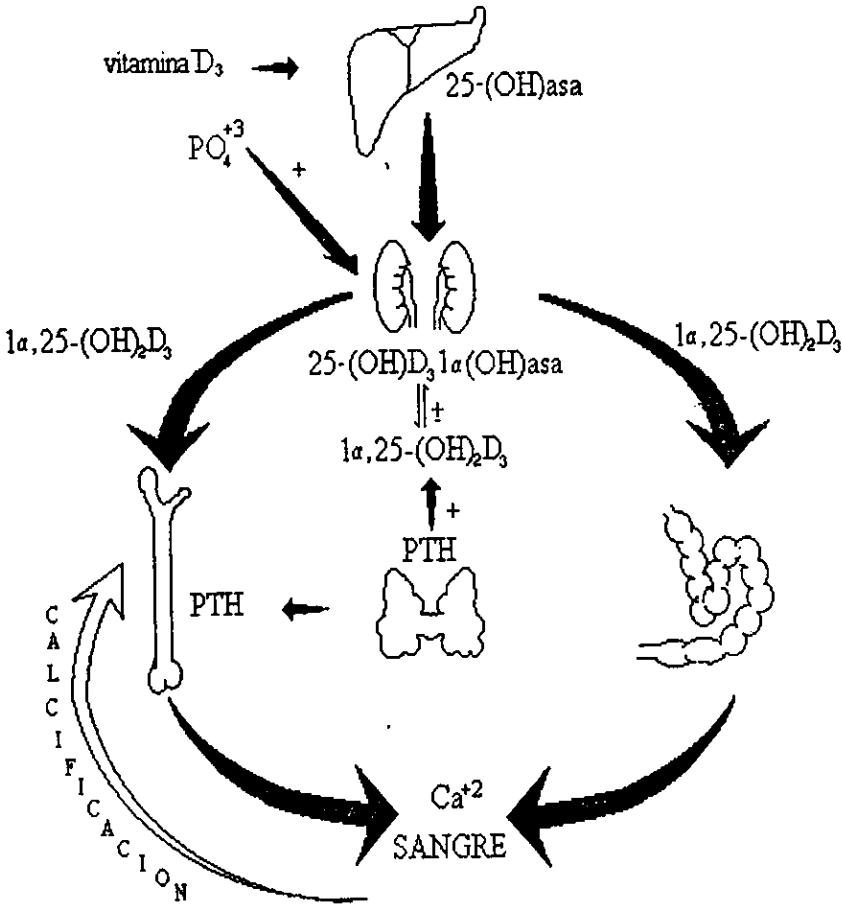


Figura 3. Regulación del metabolismo de la $1\alpha,25$ dihidroxivitamina D_3 ($1,25-(OH)_2D_3$) En la biotransformación de la vitamina D_3 a su forma activa la $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ participan la enzima vitamina D_3 -25 hidroxilasa ($25-(OH)asa$) situada en el hígado y la 25 hidroxivitamina D_3 1alfa-hidroxilasa ($1\alpha(OH)asa$) en el riñón. La función clásica de la $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ es la fijación y movilización del calcio en el intestino y la mineralización del hueso con la participación de la PTH. (Tomado de Holick, 1980).

Cantley y colaboradores (Cantley, 1985) correlacionaron el efecto del calcitriol con la secreción de la PTH y los niveles de ARNm de la misma, en cultivos de células paratiroides de borrego. En este estudio las concentraciones de la PTH y la expresión del ARNm disminuyen de forma dosis dependiente con respecto al calcitriol.

El calcio participa en muchos procesos fisiológicos como: la función muscular y nerviosa, la coagulación de la sangre, como segundo y tercer mensajero en la acción biológica de hormonas y neurotransmisores y en la mineralización de huesos y dientes. Aunque el calcio se moviliza principalmente a través de un transporte pasivo, las hormonas calcitropicas, PTH, calcitonina y $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ se encargan de optimizar la fijación y movilización de este importante mineral (Frasser, 1995).

El fósforo participa activamente en reacciones anabólicas y catabólicas, en la formación de trifosfato de adenosina y sirve de precursor en la síntesis de importantes moléculas como los fosfolípidos, el ARN y ADN, además contribuye a la capacidad amortiguadora del pH en los fluidos corporales y junto con el calcio representa el principal constituyente de los huesos y dientes (Harrison, 1961).

Harrison y Harrison (Harrison, 1963) demostraron que la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ participa en el transporte del fósforo a través del intestino, está incrementa la transferencia del fósforo y dicho incremento es dependiente de energía. El efecto de ésta hormona sobre el fósforo es dual, por un lado fija el mineral en las mucosas intestinales y por otro lo transporta dentro del mismo y a otros tejidos. Otros autores sugieren que la forma activa de la vitamina D_3 incrementa la expresión intestinal de los cotransportadores del sodio y fósforo y que además *in vivo* (Harrison, 1963; Henry, 1984) e *in vitro* (Pols, 1988; Lohnes, 1987) el fósforo regula directamente la producción de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$.

El factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) es el único factor de crecimiento que estimula la producción de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ y dicho proceso es dependiente de calcio (Menna, 1995). Así mismo se señala que el IGF-I puede tener una doble función durante el crecimiento, no sólo acelerándolo, sino también incrementando la mineralización del hueso a través de la regulación en la producción del calcitriol (Miyuara, 1981).

Este metabolito dihidroxilado de la vitamina D_3 participa en la homeostasis del calcio y del fósforo, así como en la resorción del calcio en el hueso e induce la maduración y diferenciación de los monocitos a osteoclastos. El efecto de diferenciación celular se probó en monocitos de médula ósea humana, los que se diferenciaron *in vitro* hacia macrófagos multinucleados en presencia de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ (Miyuara, 1981).

La capacidad antiproliferativa del calcitriol se ha probado en todos los animales experimentales y en el hombre, en células malignas y sanas. Homna y colaboradores (Homna, 1983) reportaron que el tiempo de vida de ratas inoculadas con células leucémicas se puede prolongar si se les administra $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. Además ésta dihidroxivitamina inhibe la proliferación celular en tumores y promueve la diferenciación celular.

Se ha encontrado que este metabolito de la vitamina D_3 tiene efectos inmunoinhibidores, aunque no se han examinado cuidadosamente (Adams, 1986).

Finalmente es importante destacar el efecto terapéutico del calcitriol en padecimientos como la psoriasis y otras enfermedades hiperproliferativas de la epidermis, además del raquitismo y la osteoporosis (Holick, 1986).

METABOLISMO DE LA VITAMINA D₃ EN EL EMBÁRAZO

Durante la gestación, el metabolismo de la madre cambia para satisfacer las demandas fetales y de ella misma; uno de los ajustes más importantes es el relacionado con la homeostasis del calcio (Gray, 1981), que incluye su balance positivo, el incremento en su absorción intestinal, así como la elevación de la PTH y 1,25-(OH)₂D₃ en suero, sobre todo en las últimas etapas del embarazo (Care, 1997), como respuesta a la demanda de calcio para la osificación.

En el feto humano ocurren cambios considerables en el esqueleto entre el segundo y tercer trimestre de gestación, cuando el crecimiento alcanza su máxima aceleración, en este periodo el feto acopia un total de 25 a 30 g de calcio, con una tasa de acumulación de 150 mg/kg de peso fetal total por día (Gray, 1983). El incremento de calcio fetal de 100 mg en los primeros cuatro meses hasta los 30 g en el embarazo a término indica un mayor transporte placentario de calcio en el último trimestre de gestación.

El calcio total en el suero de la madre es menor que en el feto, este gradiente de calcio total y ionizado del feto a la madre es atribuido al transporte placentario de calcio. La 1,25-(OH)₂D₃ está considerada como factor regulador en el transporte placentario de calcio en presencia de la proteína ligadora de calcio dependiente de la vitamina D₃ (PLCa) y de los receptores citoplasmáticos de la misma (Gray, 1983).

En el embarazo la vitamina D₃ juega un papel muy importante en el desarrollo del feto. En la mujer embarazada la síntesis del calcitriol se realiza en el riñón y alternativamente en la placenta. En el feto se sintetiza en los riñones (Tynarayama, 1983).

Es generalmente aceptado que las concentraciones circulantes de la 25-(OH)D₃ en el plasma fetal son más bajas con respecto a las concentraciones circulantes de la madre

(Haddad, 1991), ya que los componentes del citocromo P₄₅₀ microsomal hepático aparecen sólo después del nacimiento.

Las concentraciones de la 24,25-(OH)₂D₃ en suero, no presentan cambios significativos en las primeras 28 semanas de embarazo en comparación con mujeres no gestantes, pero durante las últimas 8 semanas éstas son menores que en las mujeres no gestantes, debido al mayor crecimiento fetal. Ya que, la 24,25-(OH)₂D₃ modula la función calcificante del calcitriol (Tynarayama, 1983) y hacia la duodécima semana de desarrollo del feto existen centros de calcificación en los huesos largos de la extremidades.

El metabolito dihidroxilado de la vitamina D₃ más abundante en la madre es la 1,25-(OH)₂D₃ y en el feto es la 24,25-(OH)₂D₃ (Lester, 1988), debido a que el proceso dominante en el feto es la osificación.

Las concentraciones elevadas de la vitamina D₃ están relacionadas con el síndrome infantil de hipercalcemia (Heany, 1997). Ya que estudios en animales experimentales se demostró la existencia de una asociación entre lesiones cardiovasculares fetales y la ingesta excesiva materna de vitamina D₃; probablemente por esta razón la 24,25-(OH)₂D₃ sea el metabolito más importante de la vitamina D₃ en el feto.

La 1,25-(OH)₂D₃ aumenta gradualmente durante el embarazo como respuesta a la demanda adicional de calcio del feto, esto significa un incremento en la conversión de 25-(OH)D₃ a 1,25-(OH)₂D₃ para responder a la tendencia hipocalcémica e hipofosfatémica, asociada con la transferencia de estos iones, calcio y fósforo, al feto. Este incremento en la concentración de 1,25-(OH)₂D₃ provoca el aumento de la PTVD y un incremento en la eficiencia de la absorción intestinal de calcio y fósforo (Friedman, 1986).

Por otro lado, la PTH es un regulador de la producción de 1,25-(OH)₂D₃ y su concentración sanguínea materna es más baja en el primer trimestre de embarazo en comparación con el

posparto; en el segundo trimestre las concentraciones de la PTH son similares a las del posparto. Las concentraciones circulantes de la PTH son más altas durante el tercer trimestre cuando se compara con el puerperio, en embarazadas en otros periodos y no gestantes (Gray, 1981).

La calcitonina, un factor regulador de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, se encuentra elevada en el embarazo en la sangre materna y en el cordón umbilical.

Síntesis placentaria de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$

La placenta es un órgano feto-materno cuyos componentes son: la porción fetal que se desarrolla a partir del saco coriónico y la porción materna que deriva del endometrio (Moore, 1995). En ella se realizan las funciones de protección, respiración, excreción y producción de hormonas necesarias para el embarazo.

Las partes constitutivas de la placenta son: la decidua y el trofoblasto. Las células deciduales participan en la nutrición fetal y en la protección del tejido materno ante la invasión del sinciotrofoblasto, así como en la producción de hormonas.

Los elementos fetales de la placenta son: el amnios, el corion liso y rugoso, los cuales son membranas placentarias de importancia por la secreción de hormonas (Sadler, 1993).

Las células que forman el trofoblasto dan origen a tipos celulares con funciones diversas. algunas células por su capacidad invasora determinan la fijación del blastocisto al útero, otras alimentan al óvulo fecundado mediando el transporte de nutrientes entre la circulación sanguínea materno-fetal y finalmente las células que funcionan como órgano endocrino.

Morfológicamente, el trofoblasto puede ser mononuclear o polinuclear en forma de sincicio. En los trofoblastos se sintetizan diversas hormonas, en donde participan precursores tanto de la madre como del feto. Algunas de estas hormonas son: la

somatotrópica coriónica conocida también como lactógeno placentario, la hormona de crecimiento (GH), la tirotropina coriónica (TCH), la adrenocorticotropina coriónica (ACTH), además de progesterona, estradiol y la misma $1.25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ (Moore, 1995).

El sitio específico de la biotransformación del calcitriol en la placenta es controversial. Existen informes que indican la incapacidad de la placenta para sintetizar esta hormona (Glorieux, 1995). Sin embargo estudios recientes afirman que el origen de la $1.25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ está en la porción decidua de la placenta (Whitsett, 1981). Por otro lado, Zerwekh (Zerwekh, 1986) y Hollis (Hollis, 1989) señalan que de igual manera, la biotransformación ocurre en el trofoblasto, aunque este último sugiere que es a través de un procesos químico. Finalmente en 1999 Halhali y colaboradores (Halhali, 1999), demostraron que en la porción fetal de la placenta se produce esta hormona y no obstante, este es un proceso que involucra la síntesis de proteínas.

PREECLAMPSIA

La preeclampsia (PE) es una enfermedad hipertensiva que puede presentarse en el embarazo y además una de las causas más significativas de retraso en el crecimiento fetal, parto prematuro, morbilidad y mortalidad materno-fetal (Pritchard, 1990). Esta enfermedad ocurre en 6-8 % de todos los embarazos, 14-20 % de las gestaciones múltiples, 30 % en pacientes con anomalías uterinas y el 25 % en pacientes con hipertensión y daño crónico renal (Burrow, 1996).

Ésta es una afección muy frecuente en la mujer primigesta y afecta con mayor frecuencia a madres adolescentes y mayores de 35 años de edad; sin embargo, también se presenta en mujeres multiparas con: gestación múltiple e hidropesía fetal, afecciones vasculares, incluidas la hipertensión crónica, la diabetes mellitus y afecciones renales coexistentes (Pritchard, 1990).

La PE es un síndrome complejo que afecta muchos órganos, incluyendo al riñón, el sistema cardiovascular materno, la placenta e indirectamente al feto.

La sintomatología clínica consiste en hipertensión, proteinuria y/o edema, definidas estas como ≥ 140 y/o ≥ 90 mm Hg y proteinuria por ≥ 100 mg/dL ó 3000 mg de proteína urinaria en una sola prueba en 24 h (Pritchard, 1990).

Una de las consecuencias de este padecimiento es la mortalidad fetal, la cual se incrementa en los casos donde solo se presenta hipertensión y no así con únicamente proteinuria.

El edema gestacional consiste en la acumulación generalizada de líquido que se origina después de 12 horas de reposo en cama. Además de otras características patológicas, como incremento en la resistencia vascular, hipertensión materna, disminución en el riego sanguíneo útero-placentario, anomalías de la coagulación, como el aumento en la agregación de plaquetas, generación de trombina y formación de trombos (Pritchard, 1990).

Otras características que cabe destacar son: la ganancia de peso acelerado (≥ 900 g en una sola semana o bien 2700 g al mes), cefaleas que pueden ser en la parte frontal u occipital de la cabeza, aunque éste es un indicativo de una situación agravada, ya que en los inicios de la enfermedad no es muy frecuente; dolor epigástrico o en el cuadrante superior derecho, éste es otro signo tardío de la enfermedad y al parecer causa de edema hepático (Burrow, 1996).

Adicionalmente se pueden presentar convulsiones no causadas por enfermedad neurológica, aunque éstas son una condición extrema. En este padecimiento se encuentran alterada la producción de muchos compuestos con efectos potenciales en las funciones vasculares maternas, como la trombina, tromboxanos y angiotensina entre otras.

Aunque la causa de la PE se desconoce, se señalan la obesidad, la hipertensión congénita y a menudo la altitud geográfica como factores de riesgo.

Paradójicamente, la posibilidad de padecer esta alteración aumenta con embarazos subsecuentes con diferentes padres, lo que sugiere un papel del sistema inmune en la patogénesis de esta enfermedad (Pritchard, 1990).

En un estudio se analizó el estado de mujeres adultas cuyas madres habían presentado embarazos complicados con PE y eclampsia; de 187 mujeres estudiadas que lograron embarazos viables, el 26% presentó esta complicación en el primer embarazo, además 1 de 47 mujeres de la segunda generación igualmente la padecieron, por lo que se puede adicionar el factor genético a la incidencia del padecimiento de ésta (Duran, 1999).

Cambios en la placenta preecláptica

Aunque la placenta de embarazos complicados con preeclampsia al término no difiere significativamente en peso y apariencia con respecto a las normales, existen marcados cambios morfológicos tanto en los trofoblastos como en los sinciotrofoblastos.

El sinciotrofoblasto presenta áreas de necrosis localizada y una disminución en las microvellosidades, lo cual se traduce como reducción de la invasión a la decidua y al miometrio, generando problemas de implantación del feto y esto a su vez, está relacionado con el bajo flujo sanguíneo uterino (Tabla 1). La invasión trofoblástica en las arterias no es uniforme, en general el reacondo de los segmentos del miometrio en las arterias uterinas es inadecuado, esto se relaciona con el desarrollo anormal de las arterias uterinas (Cress, 1996).

La falla en la invasión de las extravellosidades citotrofoblásticas al miometrio y la remodelación deficiente de las arterias placentarias trae como consecuencia un decremento en el riego sanguíneo útero-placentario, dicha reducción puede causar hipoxia placentaria

con la resultante producción de factores que activan a las células endoteliales. De esta forma el desarrollo anormal de la placenta inicia una cascada de eventos que llevan a la hipoxia y contribuyen al desarrollo de enfermedades endoteliales (Genbacev, 1996).

Tabla 1. Resumen de anomalías histológicas de los trofoblastos en el padecimiento de la preeclampsia. (Adaptado de Cress CJ, 1996).

TIPO CELULAR	ANORMALIDAD	CONSECUENCIAS
Sinciciotrofoblasto	<i>Necrosis local, disminución en las microvellosidades</i>	<i>Insuficiencia placentaria.</i>
Citotrofoblasto	<i>Mitosis incrementada</i>	<i>Inmadurez celular.</i>
Extravellósidades citotrofoblásticas	<i>Invasión reducida de la decidua y miometrio</i>	<i>Disminución en el riego utero-placentario.</i>

Determinaciones directas han demostrado que las concentraciones de oxígeno son mucho más bajas en la placenta en comparación con el endometrio. El oxígeno es un factor que regula la diferenciación y los patrones de invasión de los sinciciotrofoblastos (Cress, 1996). Los signos clínicos de la PE desaparecen rápidamente después de remover la placenta, esto apoya la idea de que la placenta juega un papel importante en la patogénesis del padecimiento, por lo tanto el estudio de la placenta es crítico en el entendimiento de todas las fases de esta complicación del embarazo.

Preeclampsia y vitamina D₃

En el embarazo complicado con preeclampsia existen anomalías en las concentraciones circulantes de algunas hormonas, citocinas, factores paracrinos y autocrinos (Seely, 1992). Algunos estudios indican bajas concentraciones en suero del IGF-1 y de la 1.25-(OH)₂D₃ (August, 1992) en comparación con mujeres embarazadas normales. lo que ocasiona una anomalía en el metabolismo del calcio, (Yumping, 1997).

Las concentraciones del calcitriol libre y PTVd maternos incrementan durante el tercer trimestre del embarazo normal, situación que es inversa en la PE. Ésta hormona se

encuentra en una concentración en suero de 37.8 ± 15.5 pg/mL en embarazos complicados. en los respectivos controles normotensos de 65 ± 10 pg/mL y en las embarazadas con hipertensión 75 ± 15 pg/mL. De manera similar, las concentraciones de IGF-1 en mujeres con PE fueron significativamente menores a las normotensas (NT). Además se sabe que existe una correlación significativa entre el IGF-1 y la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ (Halhali, 1995).

La terapia con sulfato de magnesio es ampliamente usada en la clínica, ya que el magnesio es un importante componente en la homeostasis del calcio junto con el calcitriol, la PTH, la calcitonina y el fósforo (Cruiskshank, 1993).

La causa de la reducción de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ en la PE es desconocida y puede ser adjudicada a un daño renal y/o placentario en la producción de la hormona (Cruiskshank, 1993).

Las concentraciones subnormales de esta hormona en sangre fetal humana están asociadas con una bajo peso del producto al nacer y bajo contenido mineral en los huesos, también con disminución en la fertilidad del recién nacido .

El estudio de la vitamina D_3 se encuentra en auge, ahora se sabe que la biotransformación de los precursores al calcitriol en el trofoblasto se ve incrementada significativamente con el estímulo del IGF-1 y que esta producción es un proceso que requiere de la síntesis de proteínas; sin embargo, resta conocer la importancia de la síntesis de esta hormona en la placenta y específicamente en el trofoblasto.

El conocimiento del papel que juega el calcitriol en la placenta es de gran importancia para el estudio del padecimiento de la PE, complicación del embarazo en la que posiblemente este comprometido el metabolismo de la vitamina D_3 .

JUSTIFICACIÓN

La preeclampsia es una enfermedad hipertensiva que afecta al 10 % de las mujeres embarazadas en el mundo (Burrow, 1996) y el 1.5 % en México (Duran, 1999). Es la principal causa de talla baja en el recién nacido, la que está relacionada con el padecimiento de enfermedades crónico degenerativas además de ser una de las primeras causas de mortalidad y morbilidad tanto materna como fetal, así como de parto prematuro (Pritchard, 1990).

En este padecimiento se encuentra alterado el metabolismo del calcio y los factores de su regulación, destacando el papel de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, cuya concentración en el suero materno es significativamente menor que en las madres gestantes normales.

La enzima 1α -(OH)asa, responsable de la síntesis de la forma hormonal más activa de la vitamina D_3 en el riñón, ha sido caracterizada a nivel bioquímico y molecular; sin embargo, los estudios realizados para demostrar la presencia de la enzima en los trofoblastos placentarios han producido resultados controversiales.

La contribución en el conocimiento sobre dicha enzima en el trofoblasto placentario es importante para el entendimiento de la regulación del calcio tanto en el embarazo normal como en el complicado con PE.

El presente trabajo contribuirá en el conocimiento por una parte, de la capacidad del trofoblasto proveniente de placentas de embarazadas sanas para producir la forma hormonal activa de la vitamina D_3 y por otro lado, la alteración de dicha síntesis en la PE.

OBJETIVOS

General

Evaluar la actividad y expresión génica de la 1α -(OH)asa en trofoblastos humanos *in vitro* provenientes de placentas normales y de embarazos complicados con preeclampsia.

Particulares

- ⇒ Valorar las concentraciones de la $1,25$ -(OH) $_2$ D $_3$ en cultivos primarios de trofoblastos humanos normales y de embarazos complicados con preeclampsia.
- ⇒ Evaluar la expresión del ARNm de la 1α -(OH)asa en cultivos de trofoblastos humanos normales y de mujeres con preeclampsia.

HIPÓTESIS

Las células del trofoblasto mantenidas en cultivo, provenientes de mujeres preeclámpicas biotransforman la 25-(OH)D₃ a 1,25-(OH)₂D₃ en menor proporción que los trofoblastos de mujeres con embarazos normales.

La disminución en la síntesis de ésta hormona es secundaria a la menor expresión del gen de la 1 α -(OH)asa en las placentas provenientes de embarazos complicados con preeclampsia.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Materiales

Las placentas utilizadas en este estudio fueron proporcionadas por el Hospital General Manuel Gea González y el Hospital Angeles del Pedregal, previa autorización del protocolo por los comités de ética e investigaciones en humanos correspondientes. La línea celular de riñón humano HEK 293, (ATCC CRL-1573) se compró de Microbix Biosystems, Ontario, Canada.

La solución salina de HANK, suero fetal de ternera (SFT) y el medio de cultivo Dulbecco-Eagle modificado F-12 (DMEM-F12) empleados en la realización del cultivo se obtuvieron de Gibco brl (Grand Island, NY, EUA), de SIGMA Chemical Co. (St Louis MO, EUA) se utilizaron: Percoll, tripsina y enzima degradadora del ADN (por sus siglas en inglés DNasa), el 8-Bromo-adenosin trifosfato cíclico (8-Br-AMPC), el sephadex G100 y la mezcla antibiótica penicilina-estreptomicina-fungizone. De In Vitro (México, D. F.) se obtuvo el medio de cultivo Dulbecco-Eagle modificado (DMEM). La gonadotropina coriónica humana (hCG), así como el anticuerpo anti-hCG utilizados en los radioinmunoensayos fueron donados por el National Institute of Diabetes and Digestive and kidney diseases (Rockville, MD, EUA). El sustrato, [3 H]25-(OH)D₃, se compró de Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, Inglaterra). finalmente los estándares de 25-(OH)D₃, 1,25-(OH)₂D₃ y 24.25-(OH)₂D₃ empleados en las separaciones cromatográficas de los metabolitos fueron donados por Hoffman La Roche (Basel, Suiza). Los disolventes utilizados en este estudio se obtuvieron de Mallinckrodt Baker, INC (Kentucky, EUA).

En el estudio de la expresión del gen de la enzima 1α -(OH)asa se usaron de Gibco (Grand Island, NY, EUA) los siguientes reactivos: trizol (tiocianato de guanidina), ácido-3-[N-morfolino]propanosulfónico (MOPS), sulfato dodecílico de sodio (SDS), el sistema de marcaje por hexanucleótidos al azar (The random primer DNA labeling system), los iniciadores, transcriptasa reversa (*ampliTaq* DNA polimerase) utilizada en las amplificaciones mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La membrana de nylon de Bio Rad (Richmond, California, EUA), las placas de rayos X y el material fotográfico de Kodak. Finalmente el equipo utilizado en el presente estudio fue: Incubador Steri cult 200, Forma Scientific (Ohio, EUA), equipo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) Beckman 110 (Ohio, EUA), contador de centelleo líquido Wallac 1411 (Finlandia, EUA), espectrofotómetro Beckman DU 600 (EUA), entrecruzador ultravioleta, (EUA), termociclador Perkin-Elmer 9600, (EUA), analizador de imágenes Eagle Eye Stratagene (EUA), centrifuga Sorvall TC, (Dupont, EUA) y microscopio Olympus CK2 (Stratagene, Japón).

b) Cultivos celulares

Las placentas se colectaron al momento del parto, se transportaron a temperatura ambiente e inmediatamente fueron procesadas de acuerdo a la metodología descrita por Kliman y colaboradores (Kliman, 1986).

Se disecaron 30 g de cada placenta correspondiente a los cotiledones, separando las membranas y conductos vasculares. El tejido se sometió a dos lavados con solución salina y posteriormente se retiró el exceso de líquido sobre gasas para obtener el peso húmedo exacto. El tejido se cortó en pequeños fragmentos y se procedió a la primera

digestión (ver tabla 2); al finalizar, se colectó el sobrenadante en 6 tubos de 15 mL con 1.5 mL de SFT.

El tejido restante se sometió a la segunda digestión (ver tabla 2). El sobrenadante se colectó de igual manera que en la primera digestión y el tejido restante se sometió a la tercera y última digestión (ver tabla 2). Al finalizar, el sobrenadante se colectó en 10 tubos de 15 mL sobre 1.5 mL de SFT.

Tabla 2. Condiciones de las digestiones enzimáticas en el cultivo primario de trofoblastos.

Digestión	Sol HANK'S IX (mL)	Tripsina (mg)	Dnasa (mg)	Tiempo (min)	Agitación
1ª	150	190	30	30	Suave
2ª	100	125	20	30	Suave
3ª	75	100	15	30	Suave

Al término de cada digestión, los tubos con el sobrenadante se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm), el sobrenadante se eliminó por aspiración. El botón celular se suspendió en 0.1 mL de medio DMEM con la ayuda de una pipeta de transferencia. Las células en suspensión se concentraron en un tubo mantenido en un baño a 37°C. Una vez que se obtuvieron las células de las tres digestiones, se procedió a la separación de los tipos celulares.

El medio con las células en suspensión se depositó suavemente sobre el gradiente de Percoll (ver anexo 1) y se centrifugó a 3000 rpm por 20 minutos.

Las capas superiores del gradiente que contenía los detritos celulares de color blanco, se removieron por succión, la región clara del gradiente correspondiente a los trofoblastos fue removida cuidadosamente con pipeta Pasteur en un tubo de 50 mL, y la parte inferior del gradiente que contenía a los eritrocitos se desechó.

Los trofoblastos colectados se lavaron con 40 mL de medio DMEM y se concentraron por centrifugación durante 10 minutos a 3000 rpm, posteriormente se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 4 mL de medio DMEM y se procedió al conteo de las células. Finalmente las células fueron cultivadas a razón de 2×10^6 por pozo en 2 mL de medio DMEM suplementado en cajas de cultivo de 6 pozos e incubadas a 37°C en atmósfera humidificada y 5 % de CO₂.

Los medios de cultivo fueron reemplazados por 2 mL de medio fresco cada 24 h. Las células destinadas al estudio de la vitamina D se mantuvieron en medio de cultivo F12, 24 h antes de la aplicación del sustrato. A las 72 h se adicionaron 0.020 mL de [³H] 25(OH)D₃ 3 nM como sustrato a los pozos asignados al estudio de la enzima y se incubó por una hora, posteriormente se realizó la separación con cloroformo del medio de cultivo y la fracción celular. En los pozos controles al término de las incubaciones se separó el medio de cultivo de los trofoblastos.

Los medios de cultivo de los diferentes días fueron colectados para analizarlos en estudios posteriores.

A los cultivos realizados se les cuantificó de la gonadotropina coriónica humana (hCG) por radioinmunoanálisis, bajo condiciones normales y de estímulo con el 8-Br-AMPC.

Las células HEK 293 fueron descongeladas y mantenidas en cultivo con medio DMEM con 5 % de SFT, de igual manera los medios de cultivo fueron cambiados cada 24 h por la misma cantidad de medio fresco. Estas células fueron procesadas en el momento en el que presentaron un 80-90 % de confluencia.

c) Cuantificación de 1,25-(OH)₂D₃**Extracción clorofórmica**

La extracción en cloroformo se llevó a cabo según el método de Bligh y Dyer (Bligh, 1959).

Los medio incubados con el sustrato se transfirieron a tubos de vidrio de 20 x 150 mm con la ayuda de una pipeta Pasteur. Cada pozo fue enjuagado con 1 mL de metanol mismo que fue transferido al tubo inicial. Se adicionaron 0.5 mL de NaOH 1N a cada pozo y se despegaron las células con un raspador estéril, se separaron 0.1 mL de la suspensión para la cuantificación de proteínas. El resto se transfirió al tubo inicial al cual se le agregaron 3 mL de metanol y 4 mL de cloroformo, se agitaron vigorosamente y se dejaron separar las fases acuosa y orgánica por 24 h, finalmente se transfirió la fase acuosa a tubos de 12 x 75 mm.

Cromatografía de Líquidos de alta presión

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) es una técnica útil para separar, identificar y cuantificar moléculas en una mezcla dada. La HPLC se fundamenta en una característica importante de las moléculas: la polaridad. En la HPLC de fase normal los grupos hidrofílicos fijos en la superficie de la sílica atrapan a los componentes hidrofílicos de la mezcla dejando pasar a los hidrofóbicos, como los metabolitos de la vitamina D.

Para el presente trabajo, la fase clorofórmica proveniente de la extracción se evaporó con flujo de nitrógeno y se procedió a la separación cromatográfica.

1ª HPLC

A cada tubo se le adicionó 500 ng de cada estándar de 1.25-(OH)₂D₃, 24,25-(OH)₂D₃ y 25(OH)D₃. 0.085 mL de fase móvil I (hexano 92:isopropanol 8) y se homogenizó. Se tomaron 0.01 mL en un vial como control y el volumen restante se inyectó al cromatógrafo con la ayuda de una jeringa Hamilton.

En la primera HPLC todas las muestras se analizaron a un flujo de 1.6 mL/minuto. Se colectó cada minuto el eluyente de la columna durante 25 minutos, y se registró el tiempo de retención para cada estándar.

Se recuperó 1.2 mL del volumen de cada vial que correspondiera al tiempo donde aparece el pico de absorbancia del estándar 1,25(OH)₂D₃ para someter a la segunda HPLC.

El eluyente colectado se evaporó a temperatura ambiente y se adicionaron 4 mL de líquido de centelleo (líquido de centelleo Liquidfluor Dupont 4.4 %, alcohol etílico 2.1 % y tolueno 93.5 %) y se cuantificó las radiactividad en un contador de radiaciones beta (Wiacalc. EUA).

2ª HPLC

El volumen recuperado de la primera HPLC correspondiente a los minutos de elución del estándar 1.25-(OH)₂D₃ se evaporó con un flujo de nitrógeno.

A cada tubo se les adicionaron 500 ng del estándar de 1.25-(OH)₂D₃ y 0.095 mL de fase móvil I. de igual manera, se tomaron 0.01 mL de la mezcla como control y el volumen restante se inyectó al cromatógrafo.

El flujo de la segunda corrida cromatográfica fue de 1 mL/minuto con una fase móvil II (diclorometano 95:isopropanol 5). colectando durante 20 minutos a razón de un vial por minuto.

Los eluyentes colectados se evaporaron a temperatura ambiente y se adicionaron 4 mL de líquido de centelleo. Finalmente se determinó la radiactividad en el espectrofotómetro de radiaciones beta.

d) Cuantificación de proteínas

Las proteínas en el cultivo se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford, 1976). La curva de calibración (*ver anexo 2*) y 0.03 mL de cada una de las muestras (solución de NaOH 1N con células que se tomaron en el momento de la extracción con cloroformo) se dispensaron en tubos de 12 x 75 mm por duplicado. Se adicionó cloruro de sodio 0.15 M de tal forma que resultara un volumen total de 0.1 mL, se adicionó 1 mL de la solución azul brillante de Coomassie y se agitó. Finalmente se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Beckman DU 600, EUA) a una longitud de onda de 595 nm.

e) Determinación de la hormona gonadotropina coriónica (hCG)

Las determinaciones de hCG en los medios de cultivo se realizaron mediante radioinmunoanálisis (RIA) (Queipo, 1998).

Se marcó radiactivamente a la hormona por el método de la cloramina T:

Preparación de la columna: 24 h previas a la preparación de la columna se dejó hidratar 1g de sephadex G-100 en 15 mL de 0.01M PBS (0.3 mM fosfato de sodio monobásico 0.002 M fosfato de sodio dibásico 0.03 M de cloruro de sodio).

En una columna de separación de 1 x 20 cm (Bio-Rad) sujeta a un soporte universal lavada cuatro veces con 0.01M PBS se empaquetó el sephadex G-100 antes hidratado. con la ayuda de una pipeta Pasteur hasta una altura de 15 cm, depositando la suspensión del sephadex G-100 uniformemente y cuidando que todas las soluciones utilizadas

a temperatura ambiente para evitar la formación de burbujas durante el empaquetamiento. Una vez que la columna de sephadex G-100 alcanzó la altura de 15 cm esta se lavó cuatro veces con 0.01M PBS y una vez con 1% albúmina. al iniciar la elución de esta se cerró la columna y se almacenó a 4°C hasta el momento del marcaje de la hormona.

El método de yodación usando es eficiente y rápido para la unión covalente del I^{125} a residuos de tirosina de una proteína. El I^{125} no unido es separado de la fracción unida a través de la columna de sephadex.

El procedimiento de marcaje de la hCG utilizada en el presente trabajo se realizó en la unidad de Medicina Nuclear del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" y bajo la dirección de la Bióloga Lorenza Díaz Nieto quien pertenece al Personal Ocupacionalmente Expuesto del mencionado Instituto.

Procedimiento de marcaje de la hCG: Se prepararon la solución de Yoduro de potasio (KI)/ sacarosa (0.1g de KI y 1.6 g de sacarosa en 10 mL de 0.01 M PBS), la solución de cloramina T (10 mg de cloramina T en 10 mL de 0.01M PBS) y la solución de metabisulfito de sodio (20 mg de metabisulfito de sodio en 10 mL de 0.01M PBS); estas soluciones se hicieron momentos antes del marcaje y fueron protegidas de la luz.

Reacción de marcaje : A 2.5 μ g de hCG en 0.025 mL de 0.01M carbonato ácido de sodio se adicionaron 0.025mL de PB 0.5M (0.004 M fosfato dibásico de sodio y 0.005 M fosfato de sodio monobásico pH 7.4), 0.01 mL de I^{125} y 0.025 mL de la solución de cloramina T. se agitó vigorosamente con un homogenizador mecánico durante 30 seg. se detuvo la reacción con 0.025 mL de metabisulfito de sodio. La mezcla resultante de la reacción se colocó sobre la columna de sephadex G-100. así como 0.2 mL de las soluciones de 0.01 M PBS/KI/sacarosa con las que fue lavado el recipiente de la reacción.

Se colectó el eluyente de la columna en 20 fracciones de 10 gotas cada uno en tubos de 12 x 75 mm. Se determinó la radiación de cada una de las fracciones colectadas en un contador de radionaciones gama, se eligieron los tubos con la hormona marcada (ver anexo 3) y ésta se almacenó a -20°C hasta el momento de la determinación. Finalmente se dispusieron los residuos radiactivos conforme al reglamento para ello establecido.

Inicialmente se elaboró un protocolo para la determinación de hCG por cada placenta evaluada. El protocolo general se diseñó de la siguiente manera:

Tabla 3. Protocolo general de las determinaciones de hCG.

Número de tubo		Tratamiento		
		1 ^{er} anticuerpo	hCG-I ¹²⁵	2 ^o anticuerpo
1 y 2	Cuentas totales (CT)		✓	
3 y 4	Uniones no específicas (UNES)		✓	
5 y 6	Cero uniones (Bo)	✓	✓	✓
7 y 8	1 ^{er} punto de la curva (0.15 ng hCG)	✓	✓	✓
9 y 10	2 ^o punto de la curva (0.31 ng hCG)	✓	✓	✓
11 y 12	3 ^o punto de la curva (0.625 ng hCG)	✓	✓	✓
13 y 14	4 ^o punto de la curva (1.25 ng hCG)	✓	✓	✓
15 y 16	5 ^o punto de la curva (2.5 ng hCG)	✓	✓	✓
17 y 18	6 ^o punto de la curva (5.0 ng hCG)	✓	✓	✓
19 y 20	7 ^o punto de la curva 10.0 ng hCG)	✓	✓	✓
21 y 22	8 ^o punto de la curva 20 ng hCG)	✓	✓	✓
23- (n-2)	Muestras	✓	✓	✓
(n-1) y n	Cero uniones (Bo)	✓	✓	✓

Determinación de la hCG en los medios de cultivo: Se dispensaron 0.1 mL de medio de cultivo proveniente de los trofoblastos incubados en los diferentes días y 0.1 mL de cada uno de los puntos de la curva estándar de la hCG (*ver anexo 4*). Se adicionaron 0.1 mL del primer anticuerpo anti-hCG a una concentración final de 1:150000 con PBS-Gel en los tubos marcados en el protocolo. Posteriormente se ajustó la concentración de la hCG- I^{125} con PBS-Gel (1500- 20000 cpm/0.1 mL). una vez preparada la concentración de la marca se adicionó 1% de suero de conejo, se homogenizó y se adicionaron 0.1 mL de la mezcla a los tubos marcados en el protocolo.

Se dejó incubando por espacio de 18 a 24 h a temperatura ambiente y protegido de la luz. Al término de la incubación se adicionó el 2º anticuerpo anti-IgG (para conejo hecha en borrego) 1:5 con 0.5 M PBS y 8 % de PEG (polietilenglicol). Se dejó incubar por 2 h a temperatura ambiente y protegido de la luz. Al finalizar el tiempo de incubación, se precipitaron los complejos químicos con 2 mL de agua fría. Se separó el precipitado por centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos, posteriormente el sobrenadante se retiró por decantación, los tubos fueron secados con un isopo de papel absorbente y finalmente se determinó la radiactividad de las pastilla de cada tubo con un contador de radiaciones gama. La radiactividad medida es inversamente proporcional a la concentración de la hormona.

f) Extracción de ARN total

Se extrajo el ARN total por el método del trizol: se homogenizaron de 50 a 100 mg de tejido placentario correspondiente a los cotiledones, del cual se retiró cuidadosamente la porción decidual. Para la extracción del ARN se adicionaron 0.2 mL de cloroformo por cada mL de trizol, se agitó vigorosamente y se dejó incubar durante 3 minutos a

temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos. Al finalizar, se separó cuidadosamente la fase acuosa, en la que se realizó la precipitación del ARN con 0.5 mL de isopropanol frío durante 30 minutos a -20°C ; la fase roja restante se desechó. El precipitado se concentró por centrifugación durante 15 minutos a 12000 rpm. El botón de ARN se separó por decantación y se dejó secar a temperatura ambiente. El extracto se lavó dos veces con 1 mL de alcohol etílico al 75 % en agua libre de ARNasa (tratado con dietilpírocarbonato (DEPC) al 0.2 %). El extracto final se resuspendió en agua libre de ARNasas y el contenido de ARN se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm.

Este método también se utilizó para aislar el ARN total a partir de células HEK 293 en la adaptación del método para células en monocapa. Se desnaturalizaron las células con trizol a razón de 1 mL por 10 cm^2 , posteriormente se procedió a la separación como arriba se indica.

g) Síntesis de la sonda e identificación de la sonda molecular

La transcriptasa reversa es una enzima multifuncional, que generalmente es utilizada para dirigir la síntesis ADN a partir de cadenas de ARN. Específicamente se emplean un conjunto de desoxi oligonucleótidos (oligo d-T) como iniciadores de transcripción de las secuencias de ARNm. El ADN sintetizado a partir de cadenas de ARN es referido como ADN complementario (ADNc).

El ARN total de las células HEK 293 extraído como se describió previamente (0.001 g) fue utilizado como templado para la síntesis de ADNc, mediante una reacción de transcripción reversa (RT) en la que se utilizaron 200 unidades (U) de la enzima *SuperScript II Reverse transcriptase* (Gibco). 0.001 g de oligo dT como iniciador y

0.5mM de la mezcla de nucleótidos (dNTP's): guanina trifosfato (GTP), timina trifosfato (TTP), citocina trifosfato (CTP) y adenina trifosfato (ATP).

La reacción de transcriptasa reversa permitió obtener la copia de ADN (ADNc) de todos los mensajes de transcripción contenidos en el ARNm.

Amplificación del ADNc

La enzima Taq-polimerasa, extraída del organismo *Thermus aquaticus* (Lawyer, 1989), es una polimerasa de la doble cadena del ADN. Su temperatura óptima de acción es de 75 a 80 °C y al parecer sólo presenta actividad exonuclease del extremo 5'→3'. En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se logra la síntesis de cadenas de ADN de manera exponencial, a partir de una secuencia de ADN que sirve como modelo (templado).

El ADN obtenido de la reacción de RT se amplificó mediante PCR utilizando 2.5 U de enzima taq DNA polimerase (Perkin Elmer), 200 ng de ADNc proveniente de la reacción de reversa transcriptasa (RT) y (1.0 µM) los iniciadores de la 1α-(OH)asa, un volumen final de 0.025 mL.

Los iniciadores utilizados fueron los siguientes:

OH1: 5'G TTG CTA TTG GCG GGA GTG GAC 3' (sentido)²⁵

OH2: 5' TA TAC GAC CAG TGA GAC ACA GTG 3' (antisentido)²⁵

Con estas amplificaciones se obtuvo un producto de RT-PCR de 298 pb del gen de la 1α-(OH)asa. Este producto se separó en geles de agarosa 1.2 %, se purificaron en columnas de Centricon-30 (Amicon, Beverly, EUA) y finalmente se reamplificó.

La sección del ARNm utilizada como sonda molecular se presenta en la figura 4.

1	CTG AAC CAG ACC ATG ACC CAG ACC CTC AAG TAC GGC TCC AGA GTG TTC CAT CCG GTC CCG TGG GCG CCC GAG TTG GCG GCC TCC CTA GCG	90
91	TAC GTA GAG TAC CAC TCA GCA CCG CCG AGC TTG GCA GAC ATC CCA GCG CCC TCT ACG CCC AGC TTT CTG GCC GAA CTT TTC TGC AAG GCG	180
181	GGG CTG TCG AGG CTA CAC GAG CTG CAG GTG CAG GCG GCC GCG CAC TTC GGG CCG GTG TGG CTA GCC AGC TTT GCG ACA GTG CCG ACU GTG	270
271	TAC GTG GCT GCC CCT GCA CTC GTC GAG GAG CTG CTG CGA CAG GAG GGA CCC CCG GCG CCG TGC AGC TTC TCG CCC TGG ACG GAG CAC	360
361	CGC CGC TGC CCG CAG CCG GCT TGC GGA CTG CTC ACT CCG GAA GGC GAA GAA TGG CAA AGG CTC CCG AGT CTC CTG GCC CCG CTC CTC CTC	450
451	CGG CCT CAA GCG GCC GCC TAC GCC GGA ACC CTG AAC AAC GTA GTC TGC GAC CTT GTG CCG COT CTG AGG CCG CAG CCG GGA CTT	540
541	GGC ACG GGG CCG CCC CTC GTT CCG GAC GTG GCG GAA TTT TAC AAG TTC GGA CTG GAA GGC ATC GCC GCG GTT CTG CTC GCG TCG	630
631	CGC TTG GGC TGC CTG GAG GCT CAA GTG CCA CCC GAC ACG GAG ACC TTC ATC CGC GCT GTG GGC TCG GTG TTT GTG TCC ACG CTG TTG ACC	720
721	ATG GCG ATG CCC CAC TGG CTG CCG CAC CTT GTG CTT GGG CCC TGG GCG CCG CTC TCC CGA GAC TGG GAC CAG ATG TTT GCA TTT GCT CAG	810
811	AGG CAC GTG GAG CCG GGA GAG GCA GCC ATG AGG AAC GGA CAG CCC GAG AAG GAC CTG GAG TCT GGG GCG CAC CTG ACU CAC	900
901	TTT CTG TTC CCG GAA GAG TTG CCT GCC CAG TCC ATC CTG GGA AAT GTG ACA GAG TTG CTA TTG GCG GGA GTG GAC ACG GTG TCC AAC ACG	990
991	CTC TCT TGG GCT CTG TAT GAG CTC TCC CCG CAC CCC GAA GTC CAG ACA GCA CTC CAC TCA GAG ATC ACA GCT GCC GTG AGC CCT GAC TCC	1080
1081	AGT GCC TAC CCC TCA GCC ACT GTT CTG TCC CAG CTG CCC CTG AAG GCG GTG GTC AAG GAA CTG CTA GAG CTG TAC CCT GTG GTA CTT	1170
1171	GGA AAT TCT CTT GTC CCA GAC AAA GAC ATT CAT GTG GGT GAC TAT ATT ATC CCC AAA AAT ACG CTG GTC ACT CTG TGT CAC TAT GCT ACT	1260
1261	TCG AAG GCA GCT GCC CAG TTC CCA GAG CCA AAT TCT TCT CCG CCA GCT CCG TGG CTG GGG GAG GGT ACC CCC CAC CCA TTT GCA TCT	1350
1351	CTT CTT TTT GGC TTT GGC AAG CCG AGC TGT ATG GCG AGA CCG CTG GCA GAG CTT GAA TTG CAA ATG GCT TTG GCG CAG ATC CTA ACA CAT	1440
1441	TTT GAG GTG CAG CTT GAG CCA GGT GCG CCC CCA AGC ACG GCT GTC CTG GTA CTT GAA AAG AGC ATC AAC CTA CAG TTT	1530
1531	TTG GAC AGA TAG TCC CAT GGA AAG AGA CTG TCA TCA CCA CCC TTT CAT TCA TCA TAG GGA TAA GAT TTT TTG TAG GCA CAA GAC CAA GGT	1620
1621	ATA CAT CTT CCC CTA ATG CCT ATC TGA CCA AAC TGG ATA GAA CCA CCA TAG TGA AGT GTC AGG CCG CCC TGA CCA ATG TGT GAA GTA TGC	1710
1711	ACT TGG CCT GAC TCA GGA AGC CAG GTG AGA AAA CCA TGG TCT CTC TGC TTG CTT GGC CCT TCT GAT CAT GTA TGC ATC CCC CAA GGA TGA	1800
1801	AAT CAG ATT TTA ACT AAT AAT GCT GGA TGG CTT GAG GAA AGA TTC AAC TGC CTC TCT TTT TGG GCT TTC ATA GTG TTC ATT GAT GAT GCT	1890
1891	GRC TAA GCA TTT ATC AAA GCA TAA GCT CAG TAA CTG TGC ATC TGG TCT GTA CCT GGT TGG TCT TTC GTC TTT GEA TGT AAG CTC TTT GAG	1980
1981	AGG AAG GGT GAA GCC TTA TTT GTT TTT TAT GTC CCC TGC CAG GGC CTG TCT CTG ACT AGG TGT CAC CAT ACA CAT TCT TAG ATT GAA TCT	2070
2071	GAA CCA TGT GRC AGA AGG GAT AAG CAG CTT ACT TAG TAG GCT CTG TCT ACC CCC TTC CTT CTT TGT CTT GCU CCT AGG AAG GTG AAT CTG	2160
2161	CCC TAG CCT GGT TTA CCG TTT CTT ATA ACT CTC CTT TGC TCT CTG GGC ACT ATT AAG TGG GTT TGC CCC ATC ACT TAG TTC TCA GGC AGA	2250
2251	GAC ATC TTT GGG CTT GTC CTT GCC CAG GCC TCT GGC TTT TTA TAT TGA AAA TTT TTA AAT ATT CAC AAA TTT TAG AAT AAA TCA AAT CCA	2340
2341	TTA AAA AAA AAA AAA AAA AA	2430

Figura 4. Mapa del gen estructural de la α hidroxilasa (ATC). Se muestra la región que fue amplificada por PCR (sonda molecular) (acgt) y la ubicación del los iniciadores (ATC ... atg) (Adaptado de Fu, 1997).

Identificación de la sonda

Para saber si la sonda sintetizada realmente corresponde a la porción esperada del gen estructural de la 1 α -(OH)asa, se procedió a determinar la secuencia de nucleótidos para compararla con las secuencias citadas para la enzima 1 α -(OH)asa en el banco de genes GeneBank. Los productos de RT-PCR fueron reamplificados con nucleótidos marcados con compuestos que dan una coloración diferente a cada uno de ellos, utilizando el estuche comercial ABI PRISM *Dye terminator cycle sequencing kit* (Perkin Elmer Co. Foster city, CA), utilizando 500 ng de ADNc y 2.5 U de *Taq DNA polimerasa* (Perkin Elmer) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizó un programa de amplificación de 25 ciclos de: 96°C durante 10 segundos, 50°C por 5 segundos y 60 °C durante 4 minutos; en un termociclador Perkin Elmer Cetus 9600 (Norwall, CT). A continuación se separaron los nucleótidos no incorporados con columnas Centricon-30 y las muestras se secaron en un concentrador (Eppendorf 5310, EUA). Las muestras se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos y finalmente se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 4.75 % bajo las siguientes condiciones: 2500 voltios, 40 miliamperes, 32 watts por un tiempo de 16 h. El análisis de la secuencia de bases se llevó a cabo en un secuenciador automático modelo 373-01 (Applied Biosystems- Perkin Elmer Co.)

h) Hibridación ARN:ADN (Northern Blot)

El ARN total de las placentas y células HEK 293 se separó en geles desnaturalizantes de agarosa 1.2 %, se le determinó la densidad óptica de las bandas ribosomales teñidas con bromuro de etidio con un analizador de imágenes Eagle Eye (Stratagene) y se procedió a su transferencia en membranas de nylon (Zeta-probe, Bio-Rad).

Transferencia de ARN a membranas de nylon

La transferencia del ARN total a la membrana se realizó por capilaridad con soluciones salinas.

El gel de agarosa con el ARN separado electroforéticamente fue lavado con agua desionizada por espacio de 30 minutos. Posteriormente se instaló el aparato de transferencia: en una cámara de transferencia (Gibco BRL) se dispuso un puente de papel filtro de manera que cruzara la plataforma elevada y tocara el fondo del contenedor de la solución de transferencia SSC 10X (0.3 M citrato de sodio y 3 M cloruro de sodio) por ambos extremos, después se colocó el gel en posición invertida, de tal forma que el frente del gel estuviera en contacto con el puente de papel; posteriormente se procedió a colocar la membrana de nylon del mismo tamaño del gel (estabilizado por 10 minutos con SSC 10X), encima de ésta se pusieron cuidadosamente tres cuadros de igual tamaño de papel filtro, evitando las formación de burbujas de aire, finalmente se colocó una torre de 5 cm de altura aproximadamente de papel secante al cual se presionó con un peso de 500 g, finalmente se llenó el contenedor con 200 mL de SSC 10X.

Se dejó transferir por espacio de 18 h y al término se desecharon la torre de papel secante y los cuadros de papel filtro, se verificó que la membrana contuviera el ARN por medio de luz UV, finalmente el ARN en la membrana se fijó covalentemente con un entrecruzador ultravioleta (Stratagene). Las membranas preparadas se almacenaron a 4°C para su posterior tratamiento.

Marcaje de la sonda

El marcaje de la sonda se realizó con el sistema de hexámeros al azar y el fragmento Klenow de la polimerasa I de *E. Coli* utilizando el estuche comercial de Random Primer ADN labelling system Kit (Gibco BRL).

La sonda (25 ng en 0.025 mL), se desnaturalizó a 94°C durante 5 minutos, al término de lo cual se incubó con los nucleótidos (dATP, dGTP, dTTP) 0.02 mM. solución amortiguadora y aproximadamente 50 μ Ci de [³²P]dCTP y el fragmento Klenow (1U). se agitó suavemente para homogenizar y se incubó a 37°C durante 1 h. Al finalizar se adicionaron 0.005 mL de la solución de paro (0.5M EDTA pH 8). La sonda marcada se separó de los nucleotidos restantes no incorporados a las cadenas del nuevo ADNc con una columna de sephadex G-50.

Prehibridación

La membrana con el ARN se prehibrido como se indica en el protocolo estándar de la membrana de nylon Zeta-Probe (BIO-RAD). En una bolsa de hibridación (BIO-RAD) se introdujo la membrana y se depositaron 20 mL de solución de prehibridación (0.25 M Na₂HPO₄, pH 7.2 y 7.0 % SDS). La bolsa de hibridación se selló con calor cuidando que no quedaran burbujas de aire dentro de ella. El tiempo de prehibridación fue de 2 h. en un horno a 65°C con agitación suave.

Hibridación

Se incubó la membrana con la solución de hibridación (0.25 M Na₂HPO₄ pH 7.0, 7.2 % SDS y la sonda marcada) durante 18 h a 65°C en un horno con agitación suave.

Al finalizar la hibridación la membrana se sometió a lavados de astringencia, el primero con 200 mL de Na_2HPO_4 20 mM pH 7.2 y SDS 5% durante 15 minutos a 65°C con agitación suave y el segundo con 200 mL de 20 mM Na_2HPO_4 pH 7.2 y 1% SDS durante 15 minutos a 65°C con agitación suave. A continuación las membranas se expusieron en una placa de rayos X y finalmente se determinó la densidad óptica de las bandas reveladas que resultaron de la hibridación en un analizador de imágenes Eagle Eye (Stratagene, EUA).

i) Hibridación ADN:ADN (Southern Blot)

Al ARN total extraído de las placentas inicialmente utilizado en los análisis de hibridación ARN:ARN fue sometido a una reacción de transcripción reversa como se indicó en la obtención de la sonda molecular. Posteriormente se amplificó el ADNc con los iniciadores de la 1α -(OH)asa y como control de la ciclofilina, un gen constitutivo cuyos iniciadores fueron:

CF1: 5'CCC CAC CGT GTT CTT CGA CAT3'(sentido)

CF2:5'AGG TCC TTA CCG TTC TGG TCG3'(antisentido)

Todos las amplificaciones se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: un ciclo de alineación de las cadenas de ADN a 94°C durante 1 minuto, posteriormente 30 ciclos de 94 °C durante 50 segundos; 60 °C durante 50 segundos y 72 °C durante 1 minuto. Finalmente se dió un periodo de extensión de 7 minutos a 72 °C. Se realizaron incubaciones en ausencia de RT como control negativo del análisis de RT-PCR.

Los productos de RT-PCR de las placentas con los iniciadores de las 1α -(OH)asa y ciclofilina, se separaron en geles de agarosa 1.2 % y se procedió a la transferencia en membranas de nylon (Zeta-probe, Bio-Rad).

Transferencia de ADN a membranas de nylon

La transferencia de ADN en geles de agarosa a membranas de nylon es en esencia la misma que la empleada para la transferencia de ARN, sin embargo este proceso requiere de tres pasos iniciales adicionales. Se sumergió el gel de agarosa con el ADN en una solución de 0.25 M HCl por 15 minutos, para eliminar las purinas de las cadenas del ADN, con la finalidad de facilitar la transferencia, posteriormente el gel se embebió en una solución desnaturalizante (0.5 N NaOH y 1M NaCl) durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave para alinear las hebras del ADN, finalmente el gel fue sumergido en una solución neutralizante (3M NaCl, 0.5 M Tris-HCl) con la finalidad de regresar a las condiciones de pH iniciales a continuación se procedió como se describe para la transferencia de ARN

Prehibridación

La membrana con el ARN se prehibridó como se indica en el protocolo estándar que acompaña a la membrana de nylon. En una bolsa de hibridación se introdujeron las membranas y se depositaron 20 mL de solución de prehibridación, el tiempo de prehibridación fue de 2 h, en un horno a 68°C con agitación suave.

La sonda marcada y el proceso de hibridación empleados en este método, fueron descritos previamente. Al finalizar la hibridación la membrana se sometió a cuatro lavados de astringencia, los primeros dos con 500 mL de 20mM Na₂HPO₄ y 5% SDS durante 15 minutos a 65°C con agitación suave y los últimos con 500 mL de 20mM Na₂HPO₄ y 1% SDS durante 15 minutos a 65°C con agitación suave. Finalmente se expusieron las membranas a placas de rayos X y se analizó la densidad óptica de las bandas de hibridación como previamente se describe.

j) Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, tanto de actividad de la enzima como de expresión del gen, así como de los parámetros clínicos y la Gonadotropina Coriónica humana (hCG), fueron analizados estadísticamente mediante una prueba de "t" de Student pareada, con un nivel de significancia de $P < 0.001$.

RESULTADOS

1. Estudio clínico.

En el presente estudio se colectaron placentas de 15 mujeres con preeclampsia y de 17 mujeres embarazadas normotensas. Las características clínicas generales de la población estudiada se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 4. Características clínicas de la población.

	Grupo NT (n=17)	Grupo PE (n=15)	p
Tensión arterial diastólica (mm Hg)	72 ± 6	103 ± 12	< 0.0001
Tensión arterial sistólica (mm Hg)	117 ± 10	151 ± 14	< 0.0001
Proteinuria (+)	±	+++	-----
Edema (+)	Ausente	++	-----
Edad de la madre (años)	25.1 ± 5.8	23.2 ± 8	0.261
Edad gestacional (semanas)	39.4 ± 1.4	38 ± 2	0.090
Peso del recién nacido (Kg)	3.260 ± 0.390	2.771 ± 0.441	0.010
Número de gesta	2.1 ± 1.1	2.1 ± 1.2	0.86

NT= grupo normotenso PE = grupo preecláptico

- Proteinuria: trazas (10mg/dL) ±
- 30 mg/dL +
- 100 mg/dL ++
- 300 mg/dL +++
- 1000 mg/dL ++++

Considerando los criterios de clasificación establecidos para la PE, todas las pacientes del grupo problema pertenecen al rango de preeclampsia severa, ya que la tensión arterial tanto istólica como diastólica, la proteinuria y el edema, son significativamente mayores en las mujeres del grupo PE en relación con el grupo control.

Por otro lado la edad gestacional y el peso del recién nacido en el grupo en estudio es menor en relación con el control, sin embargo, la edad de la madre y el número de gesta son similares en ambos grupos.

2. Caracterización del cultivo primario de trofoblastos

Con el objeto de caracterizar el cultivo de trofoblastos se dió seguimiento a las incubaciones, llevándose a cabo el análisis de los aspectos morfológicos de las células trofoblásticas y de la secreción de la hCG. Se analizó la viabilidad de los cultivos de trofoblastos mediante la evaluación por RIA de las concentraciones de hCG en los medios de cultivo en presencia y ausencia de un análogo del AMPc .

Aspecto morfológico

Se analizó el aspecto morfológico de las células mediante microscopía óptica. En la figura 5. se muestran los fenotipos de los trofoblastos normotensos separados por el gradiente de percoll a). los cuales se presentan como células aisladas, pequeñas, esféricas y mononucleadas, características de los citotrofoblastos. A las 24 h de cultivo b), las células muestran su adherencia a la placa de cultivo y además poseen pequeñas proyecciones citoplasmáticas, que reflejan el inicio de la movilización de los trofoblastos para realizar la fusión de su citoplasma con otras células. Adicionalmente, a las 24 h aún conservan su característica de ser mononucleares. En contraste, a las 48 h de cultivo c) y en particular a las 72 h d). se pueden observar ya sinciotrofoblastos, células plurinucleadas que contiene grandes vacuolas; los sinciotrofoblastos son producto de la fusión y diferenciación de los citotrofoblastos, tal como lo ha descrito Kliman y cols⁸⁰.

En la figura 6. se muestra el aspecto morfológico de las células del trofoblasto provenientes de placentas de mujeres que cursaron embarazos complicados con PE. En estos cultivos se presentaron los estadios de diferenciación del citotrofoblasto al sinciotrofoblasto de manera similiar al grupo control.

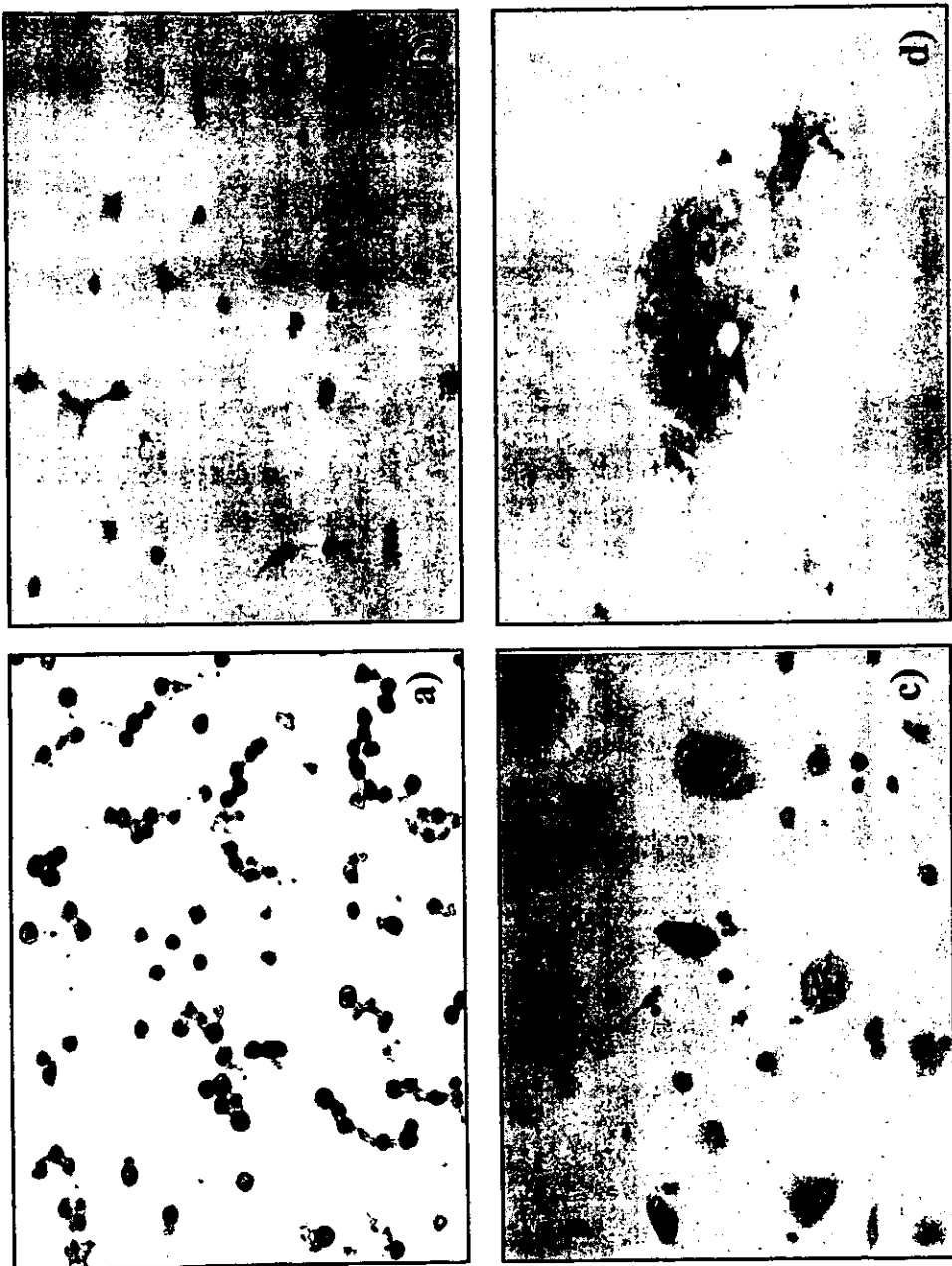


Figura 5. Vista microscópica (20X) de los trofoblastos, teñidos con eosina-hematoxilina, provenientes de mujeres con embarazos normotensos. Se muestran diferentes estadios de diferenciación: trofoblastos mononucleados (a y b) presentes a las 0 y 24 h de cultivo y los sincitiotrofoblastos (c y d) multinucleados observados a partir de las 48 y 72 h de cultivo.

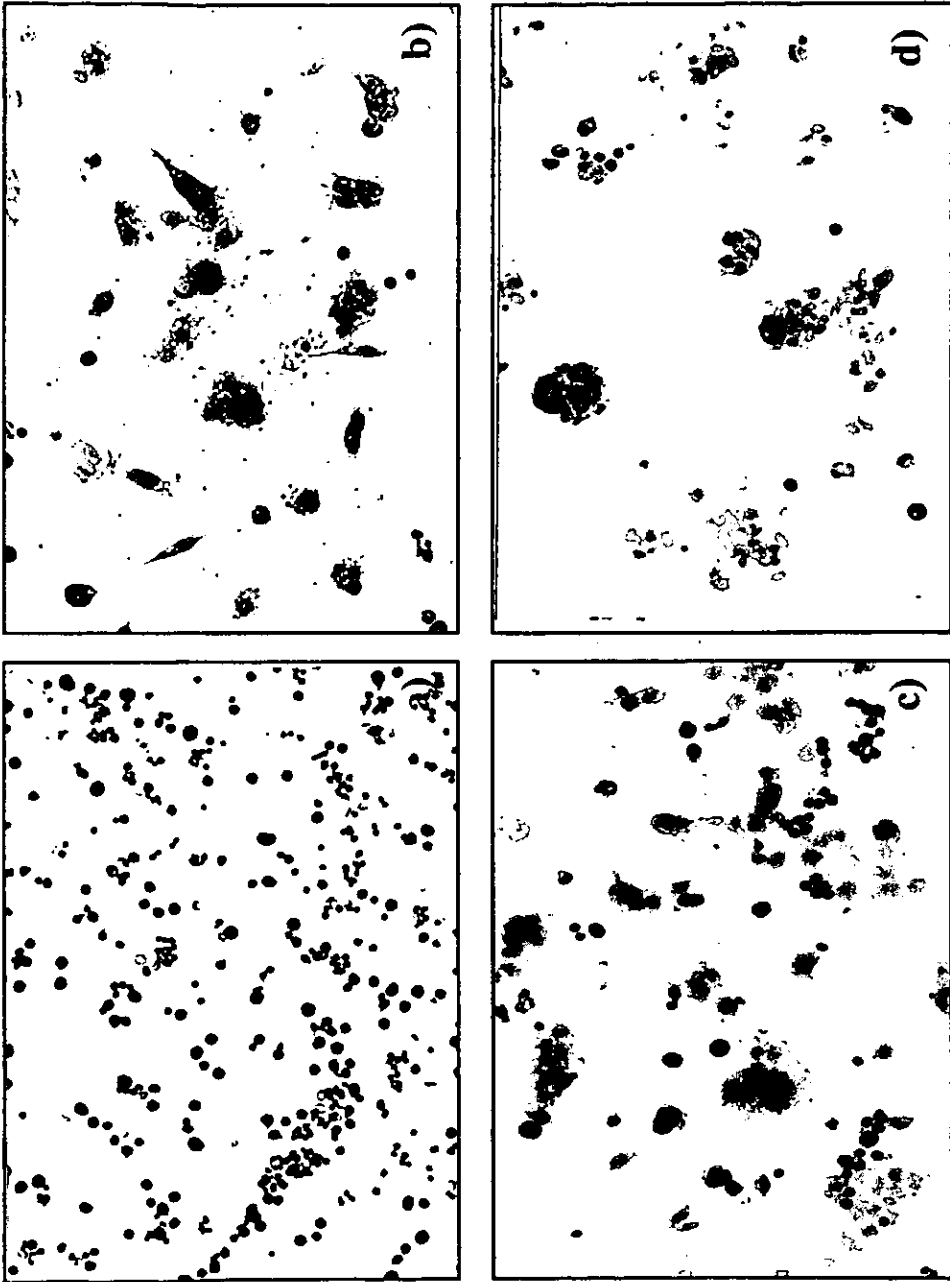


Figura 6. Vista microscópica (20X) de los trofoblastos, teñidos con eosina-hematoxilina, provenientes de mujeres con embarazos preeclámpicos. Se muestran diferentes estadios de diferenciación: trofoblastos mononucleados (a y b) presentes a las 0 y 24 h de cultivo y los sinciotrofoblastos (c y d) multinucleados observados a partir de las 48 y 72 h de cultivo.

3. Secreción de hCG en cultivos de trofoblastos

El monitoreo del cultivo mediante el análisis de las concentraciones de hCG en los medios, demostró que todos los cultivos realizados en el presente trabajo fueron capaces de sintetizar esta hormona y de responder al estímulo con 8-Br-AMPC. La respuesta se manifestó por el aumento en la secreción de la misma.

Al comparar la secreción de dicha hormona a las 72 h de incubación en ambos grupo, se observó que no existe diferencia significativa. (grupo control 1350 ± 345 y grupo preclámptico 872 ± 120 ng/mg proteína $p < 0.612$) (figura 7).

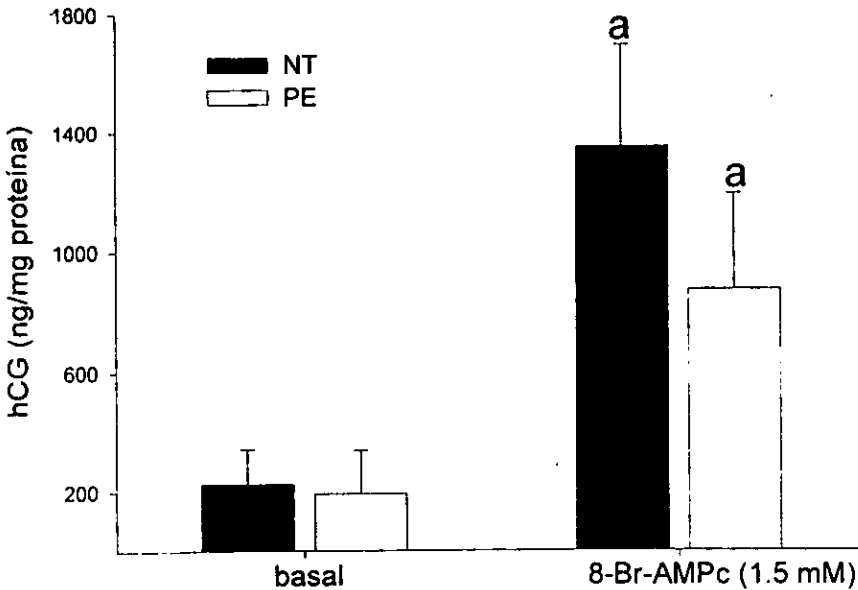


Figura 7. Secreción de la Gonadotropina Coriónica humana (hCG) en trofoblastos provenientes de placentas normotensas (NT) y preclámpticas (PE). Se muestra la producción de esta hormona en el tercer día de cultivo en condiciones basales y bajo el estímulo de 8-Bromo-Adenosin monofosfato cíclico (8-Br-AMPC). Los datos representan la media \pm desviación estándar. ^ap (n.s.) vs basal, n= 6.

Sin embargo, analizando con detalle la secreción de la hCG en los diferentes días de incubación, se encontró que los trofoblastos cultivados provenientes de placentas normotensas secretaron esta hormona desde el primero hasta el octavo día, último periodo de incubación.

Por otro lado las determinaciones de la hCG en los medios de cultivo reflejan de manera interesante un máximo estadísticamente significativo a las 48 y 72 h (870 ± 150 y 1350 ± 345 ng/mg proteína respectivamente, $p < 0.0001$), cuando se compara con los días restantes tanto en presencia del análogo de AMPc como en ausencia, (figura 8).

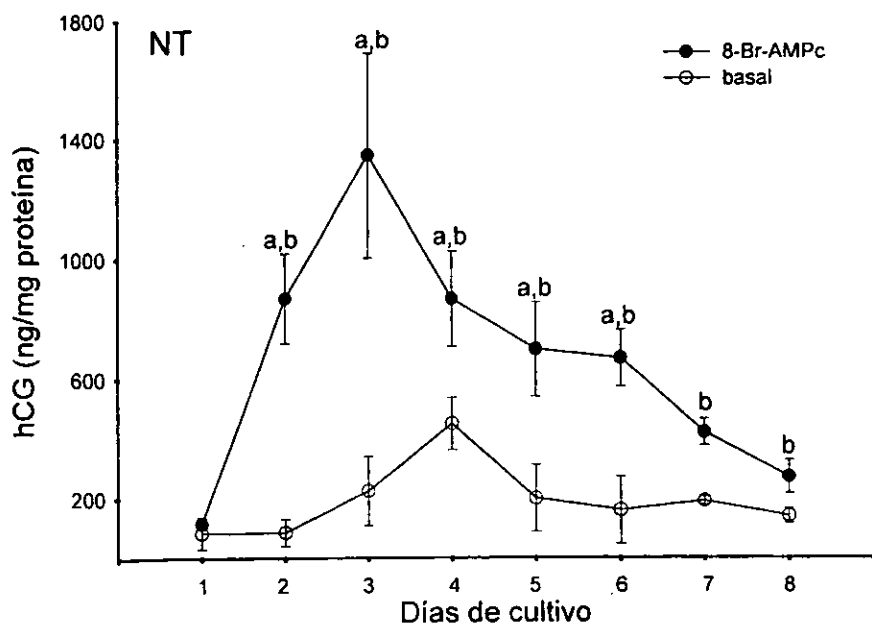


Figura 8. Secreción de la Gonadotropina Coriónica humana (hCG) en trofoblastos de placentas normotensas. Se presentan las curvas de secreción de hCG basal y bajo el estímulo del 8-Bromo-Adenosin monofosfato cílico (8-Br-AMPC). Los datos representan la media \pm desviación estándar. ^a $p < 0.0001$ vs 8-Br-AMPC. ^b $p < 0.005$ vs basal, $n = 6$.

Cabe mencionar que en el curso del cultivo se observa una disminución gradual en la secreción de hCG. sin embargo. la secreción de ésta se mantiene por encima de los valores basales encontrados al inicio del cultivo.

Secreción de hCG en cultivos de placentas con preeclampsia

De manera similar al grupo control, los cultivos de placentas con PE presentaron una respuesta positiva al ser estimuladas con el 8-Br-AMPC, resultando un aumento en la secreción de la hCG.

Otra similitud que presenta el perfil de secreción de hCG en los trofoblastos con PE comparado con el perfil de los trofoblastos del grupo control. es que los máximos significativos de secreción son a las 48 y 72 h. (466 ± 152 y 872 ± 120 , $p < 0.0001$) (figura 9), momentos en los que la población mayoritaria son sincitiotrofoblastos. Sin embargo, cabe mencionar la marcada disminución en la secreción de esta hormona en el perfil preecláptico, ya que a partir del séptimo día de incubación las concentraciones de hCG son cercanos a los valores de la secreción basal en los mismos días (33 ± 9 vs basal 22 ± 4 , p (n.s.)). En el presente trabajo se dió seguimiento a las incubaciones hasta el octavo día. sin embargo como lo muestra la figura 9, la secreción de hCG por lo trofoblastos de placentas PE mantenido en cultivo deja de ser consistente a partir del séptimo día. en comparación con la secreción basal al primer día de cultivo ($p < 0.0001$). Adicionalmente, las determinaciones de hCG en los medios de cultivo permitieron establecer que los trofoblastos de placentas normales en promedio incrementaron la síntesis y secreción de hCG cinco veces con respecto al valor basal registrado a las 72 h de cultivo, mientras que los cultivos de trofoblastos preeclápticos sólo incrementaron tres veces las concentraciones de hCG.

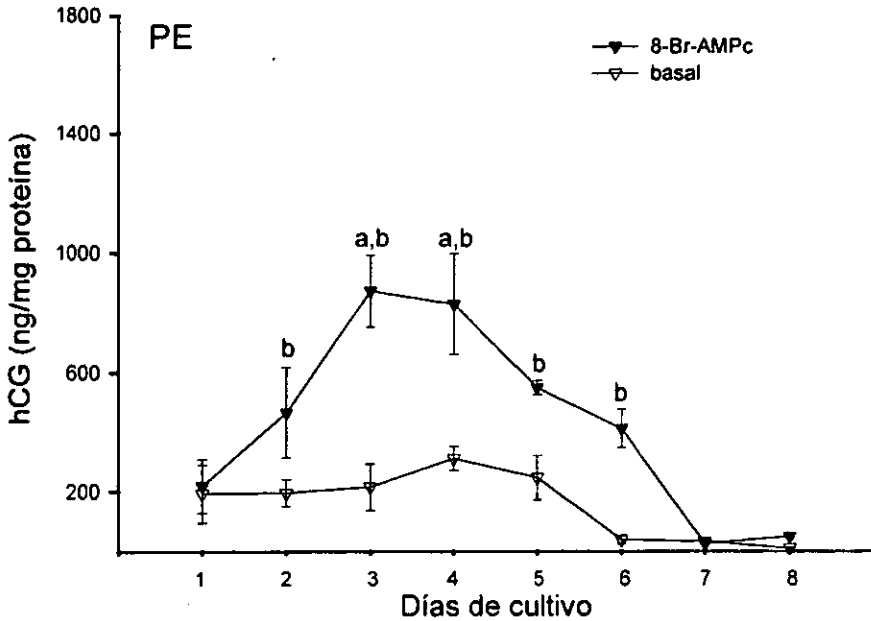


Figura 9. Secreción de la Gonadotropina Coriónica humana (hCG) en trofoblastos de placentas preeclámpticas. Se presentan las curvas de secreción de hCG basal y bajo el estímulo de 8-Bromo-Adenosin monofosfato cíclico (8-Br-AMPC). Los datos representan la media \pm desviación estándar. ^a $p < 0.0001$ vs 8-Br-AMPC, ^b $p < 0.005$ vs basal, $n = 6$.

4. Producción de metabolitos de la [³H] 25-(OH)D₃ en cultivos de trofoblastos.

Los trofoblastos cultivados en las condiciones antes mencionadas fueron capaces de metabolizar la [³H]25-(OH)D₃ en compuestos más polares. Como se muestra en la figura 10, los metabolitos sintetizados en los cultivos eluyeron durante las separaciones cromatográficas al mismo tiempo y en un área radiactiva junto con cada uno de los estándares de la 25-(OH)D₃, la 24,25-(OH)₂D₃ y 1,25-(OH)₂D₃ en la primera HPLC. En el panel A se muestran los tiempos de retención de los principales metabolitos de la vitamina D₃, los que correspondieron a la 25-(OH)D₃ eluyeron durante los minutos 4.5-5.5, para la 24,25-(OH)₂D₃ del minuto 7.5-8.5 y la 1,25-(OH)₂D₃ del minuto 15-16. La segunda HPLC

(panel B) permitió obtener una separación correspondiente a la 1.25-(OH)₂D₃ más efectiva: con un tiempo de retención del minuto 14 al 15.

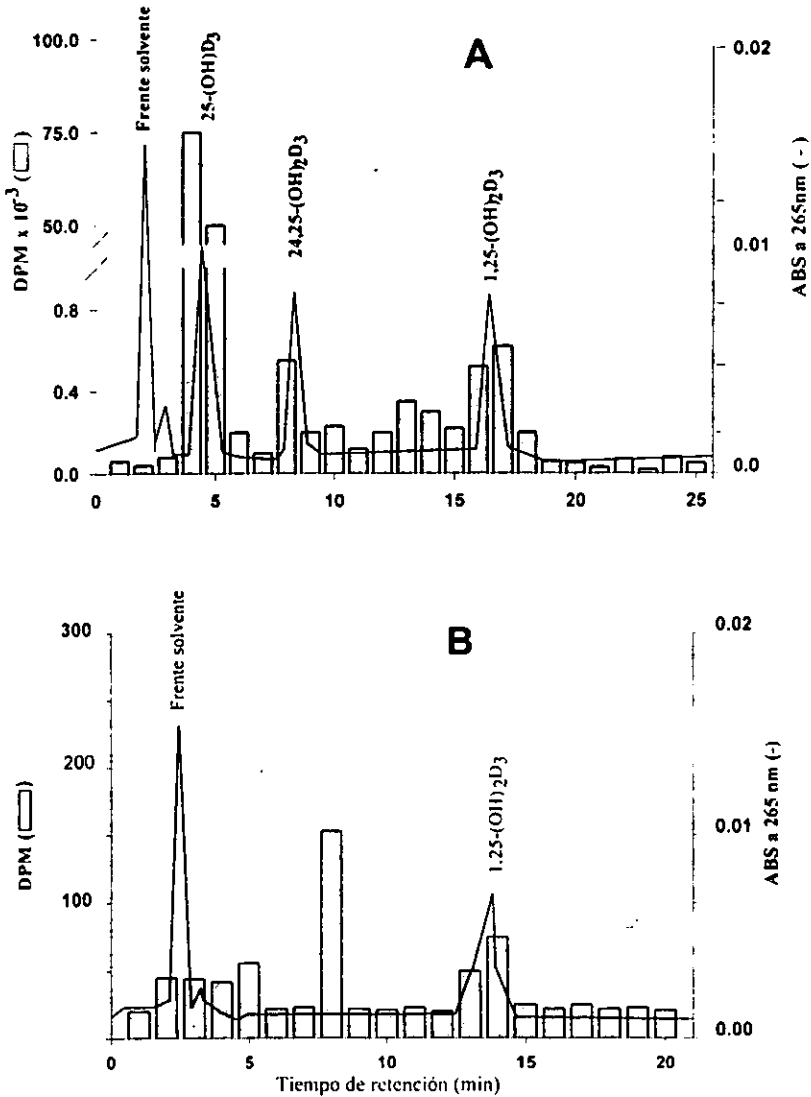


Figura 10. Perfiles de elución de los metabolitos de la vitamina D₃ separados mediante HPLC. En el panel A se presenta el perfil de elución del primer corrimiento y en el panel B del segundo. Las líneas continuas representan la absorbancia (ABS) registrada a lo largo de los mismos y las barras muestran las cuentas de radioactividad dadas en desintegraciones por minuto (DPM).

Al comparar las concentraciones de la $24,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ (figura 11) entre los grupos estudiados, se observó una menor síntesis de este metabolito en el grupo PE con respecto al grupo NT, (10.5 ± 3.49 vs 0.52 ± 0.081 nmol/mg proteína, $p < 0.008$).

Finalmente en relación al metabolito activo de la vitamina D_3 (figura 12), en el grupo PE también se observó disminución en la producción de la $1.25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ en comparación con el grupo control (157 ± 72 vs 17.5 ± 10.4 , $p < 0.0001$)

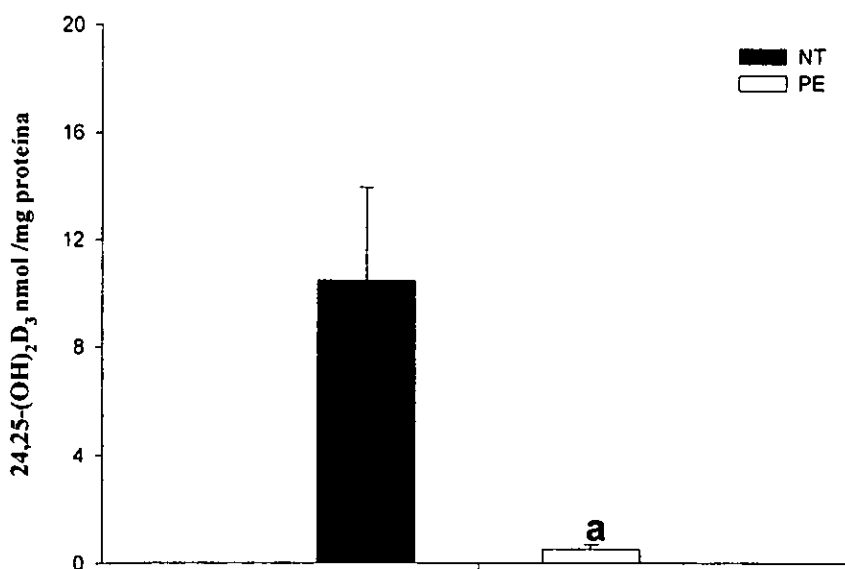


Figura 11. Producción de $24,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ en los trofoblastos normotensos (NT) y preeclámpticos (PE). Los datos representan la media \pm desviación estándar. ^a $p < 0.008$, $n = 5$.

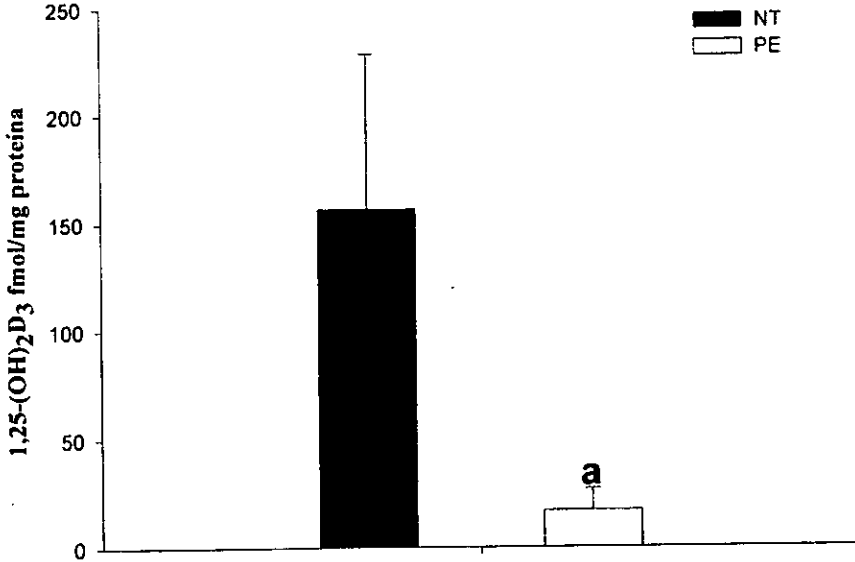


Figura 12. Producción de 1,25-(OH)₂D₃ en los trofoblastos normotensos (NT) y preclámpticos (PE). Los datos representan la media \pm desviación estándar. ^ap<0.0001, n=5.

5. Estudio de la expresión del gen de la 1 α -(OH)asa en los trofoblastos.

Con la finalidad de complementar los estudios de la actividad de la 1 α -(OH)asa, se procedió al análisis de los productos de expresión de la enzima mediante el método de Northern Blot.

Obtención de la sonda de ADNc de la 1 α -(OH)asa

Se logró la amplificación de un fragmento del gen de la 1 α -(OH)asa mediante análisis de RT-PCR con el ARN total extraído de los tejidos placentarios y de las células HEK 293 con los iniciadores específicos. El producto de la amplificación se separó en geles de agarosa y se tiñó con bromuro de etidio. Como se muestra en la figura 13, el producto de la

amplificación corresponde al tamaño esperado de 298 pb. El fragmento sintetizado a partir de células HEK 293, se utilizó como sonda en las hibridaciones del ARN total de los tejidos placentarios.

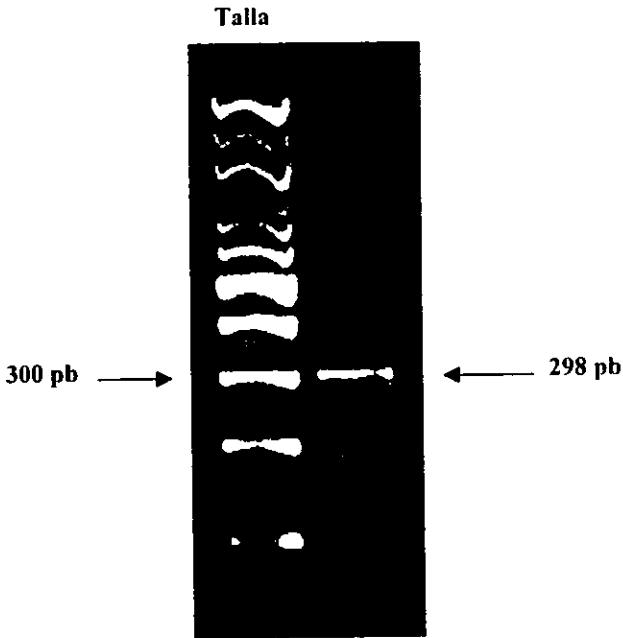


Figura 13. Sonda de la 1α (OH)asa ampliada por RT-PCR a partir de células HEK 293.

Identidad de la sonda obtenida.

Con la finalidad de confirmar la identidad de los productos amplificados se analizó su secuencia primaria, encontrando una homología del 100 % con la secuencia de la 1α -(OH)asa de riñón humano citada en el banco de genes con las claves de acceso AB005038, AF020192 y AB005989. La secuencia completa del ARNm de la 1α -(OH)asa abarca 2469 pb y los fragmentos amplificados en el presente trabajo se localizan entre las bases 951-1248 (figura 14).

951 g ttg cta ttg gcg gga gtg gac acg gtg tcc aac acg ctc tct tgg gct
ctg tat gag ctc tcc cgg cac ccc gaa gtc cag aca gca ctc cac tca gag
atc aca gct gcc ctg agc cct ggc tcc agt gcc tac ccc tca gcc act gtt ctg
tcc cag ctg ccc ctg ctg aag gcg gtg gtc aag gaa gtg cta aga ctg tac
cct gtg gta cct gga aat tct cgt gtc cca gac aaa gac att cat gtg ggt gac
tat att atc ccc aaa aat acg ctg gtc act ctg tgt cac-**1248**

Figura 14. Secuencia de nucleótidos de los productos de RT-PCR provenientes de las células HEK 293.

Northern Blot

Los análisis de Northern Blot realizados con la sonda específica de la 1α -(OH)asa no consiguieron mostrar evidencia de la transcripción de dicho gen, por lo que se procedió a amplificar el ARN de las muestras de tejido placentario por medio de RT-PCR para incrementar la señal de transcripción de la enzima y así poder realizar el análisis de los ADNc mediante Southern Blot.

Southern Blot

Los productos de RT-PCR obtenidos de placentas controles, preeclámpticas y sinciotrofoblastos fueron amplificados con los iniciadores de la 1α -(OH)asa y ciclofilina e hibridados con el fragmento del ADNc de la 1α -(OH)asa y del gen constitutivo de la ciclofilina. como control en el proceso de amplificación, adicionalmente se hibridaron las muestras sometidas a amplificación en ausencia de RT, las cuales fueron tomadas como control de dicha reacción.

La hibridación de los productos de RT-PCR provenientes de los tejidos placentarios, (amplificados con los iniciadores antes mencionados) con la sonda específica para la 1α -(OH)asa resultó en la identificación positiva de los mismos. La figura 15. muestra las bandas correspondientes a la talla esperada de 298 pb, para la 1α -(OH)asa y de 453 pb para la ciclofilina, de acuerdo con los iniciadores utilizados, adicionalmente, se puede observar las bandas de hibridación con la sonda molecular del gen de la ciclofilina, así como los controles de la reacción de RT, en los que no se muestra banda de hibridación, ya que al no existir reacción de transcripción no procede la amplificación correspondiente.

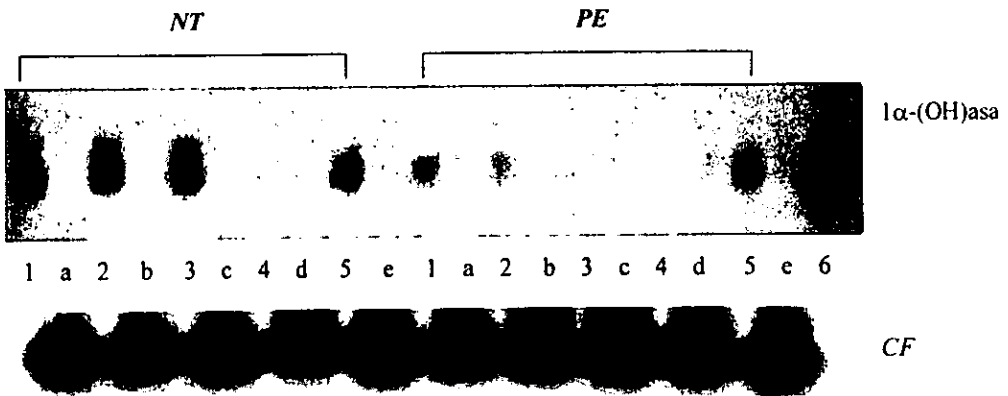


Figura 15. Southern blot de los productos de RT-PCR obtenidos de placentas normales (NT), preeclámpticas (PE) y células del trofoblasto diferenciadas (6), hibridados con un fragmento del ADNc de la 1α -(OH)asa y ciclofilina (CF). El ARN fue extraído de tejido placentario normal y preeclámptico (líneas 1 a 5) e incubado en ausencia (líneas a-e) de RT.

En la figura 16, se muestra el análisis de la relación entre las densidades relativas de las bandas de hibridación con ciclofilina y 1α -(OH)asa en los dos grupos de estudio. La expresión del gen de la 1α -(OH)asa resultó significativamente menor en el grupo PE en comparación con el grupo control (0.24 ± 0.30 vs 0.84 ± 0.50 respectivamente, $p < 0.05$).

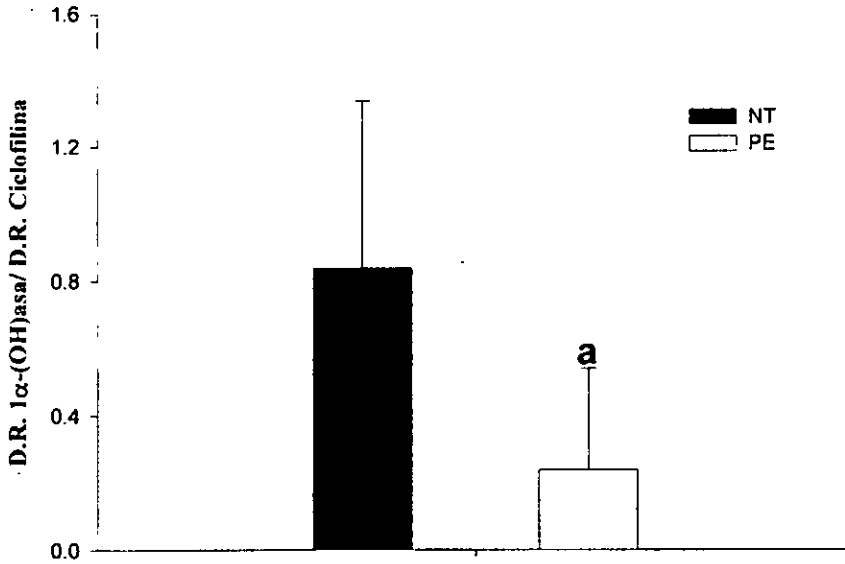


Figura 16. Expresión relativa de la 1 α -(OH)asa en tejido placentario normotenso (NT) y preeclámpico (PE). Los datos representan la media \pm desviación estándar. ^ap<0.05. n=10.

DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo fue determinar la actividad de la 1α -(OH)asa, así como su expresión génica en trofoblastos humanos mantenidos en cultivo, para analizar la fisiología de la placentas de mujeres con embarazos normotensos y complicados con preeclampsia.

En los trofoblastos en cultivos se determinó la capacidad de respuesta al estímulo con 8-Br-AMPC, adicionalmente se examinó el fenotipo celular de estos en los diferentes días de incubación.

Todos los cultivos realizados presentaron viabilidad positiva, ya que las determinaciones de la gonadotropina coriónica humana (hCG) en ambos grupos estudiados presentaron incremento en la secreción de hCG, al estimularlos con el 8-Bromo AMPC.

El seguimiento de los cultivos permitió determinar por primera vez que los trofoblastos de placentas normotensas son capaces de mantener la síntesis y secreción de hCG desde el primer día de cultivo hasta el octavo día, manteniendo los niveles por encima de los 100 ng/mg proteína.

Por otro lado, los trofoblastos de placentas con PE mostraron una disminución en la secreción de esta hormona en el séptimo día de cultivo, llegando a los valores basales, lo cual probablemente esta relacionado con la disminución del riego sanguíneo útero-placentario, observado *in vivo* (Cress, 1996). Adicionalmente este agotamiento en la secreción y síntesis de hCG pueda ser otra de las consecuencias de la insuficiencia placentaria, sin embargo no existen reportes que apoyen esta sugerencia.

Se ha demostrado que la síntesis y secreción de esta hormona es independiente del estadio de diferenciación de los trofoblastos (Kliman, 1986), ya que son capaces de producir hCG desde el primer día de cultivo; sin embargo, también se ha confirmado que ésta aumenta

hasta 14 veces las concentraciones promedio observadas desde el primer día de cultivo, en condiciones basales. En el presente trabajo se observó que la secreción de hCG aumenta cuando se estimula con 8-Bromo-AMPC y en menor grado en el control sin estímulo a medida que avanza el tiempo de incubación. Los cambios en las concentraciones de hCG a las 48, 72 y 96 horas de cultivo son acompañados de la citodiferenciación de los trofoblastos, cambios que se relacionan con las funciones biológicas del sinciotrofoblasto, pues como se ha mostrado la célula multinucleada es la unidad endócrina en el trofoblasto (Kliman, 1986).

Las evaluaciones de las concentraciones circulantes de hCG durante el embarazo han generado controversia. Algunos autores indican que las concentraciones de esta hormona son significativamente mayores en las embarazadas que cursan con preeclampsia comparadas con los controles normotensos (Raty, 1999; Myatt, 1999; Lui, 1999). Estos estudios sugieren que dichas determinaciones puedan ser útiles en el pronóstico de esta importante alteración del embarazo. Sin embargo, existen datos que indican que tal diferencia entre las producciones de hCG tanto en el embarazo normotenso como en el complicado con PE no alcanzan significancia estadística (Moodley, 1995; Pouta, 1998) y por tal motivo el uso de los niveles circulantes de hCG como indicador de la posibilidad de desarrollar PE sería inapropiado.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan a los reportes de Moodley (Moodley, 1995) y Pouta (Pouta, 1998), quienes señalan como impreciso el uso de las determinaciones circulantes de hCG como elemento de predicción en el padecimiento de la PE. Cabe mencionar que las determinaciones obtenidas en este trabajo fueron hechas en medios de cultivo de trofoblastos por lo que habría que tomar con reserva tales comparaciones sobre todo por las condiciones experimentales entre un sistema *in vivo* e *in*

in vitro. Probablemente estas afirmaciones puedan ser confirmadas con estudios de inmunohistoquímica de tejidos placentarios de ambos grupos.

Sin duda las bajas concentraciones de hCG en los cultivos de trofoblastos provenientes de embarazos complicados con PE, son consecuencia del estado patológico de éstos, aunque la causa de esta alteración sigue en estudio. Como se mencionó anteriormente la placenta puede estar comprometida en el padecimiento de la PE ya que al ser ésta removida, los síntomas desaparecen (Pritchard, 1990).

En la PE el trofoblasto presenta ciertas características patológicas como mitosis incrementada (Cress, 1996), situación que se contrapone a las bajas concentraciones de la hCG encontradas en este trabajo, adicionalmente, si se considera que en la PE existen anomalías en la invasión de las vellosidades trofoblásticas a la decidua probablemente la disminución en las concentraciones de hCG esta relacionada con esta característica patológica y sólo alcance a apreciarse un efecto en modelos de estudio *in vivo*. Finalmente, la necrosis localizada en el sincitiotrofoblasto (Cress, 1996) durante la PE podría reforzar las observaciones resultantes del presente trabajo.

Es importante mencionar que las determinaciones de la hCG en las dos condiciones (presencia y ausencia de estímulo) hacen notar la menor capacidad de respuesta de los trofoblastos PE ante el estímulo del 8-bromo-AMPC, destacando el estado patológico de éstos; ya que la secreción de hCG en los cultivos control se incrementó cinco veces y en los cultivos PE solamente tres veces en relación al control basal.

Estudios realizados sobre el metabolismo de la vitamina D₃ indican que la porción materna de la placenta (Kachkache, 1993; Rubin, 1993, Weisman, 1979), es decir la decidua posee la facultad de metabolizarla y producir su forma hormonal, al mismo tiempo descartan a la porción fetal como origen de tal biotransformación en compuestos más polares (Delvin,

1987; Glorieux, 1995; Hollis, 1989). Sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo apoyan las evidencias que consideran a la región del trofoblasto como fuente extrarenal del calcitriol.

Por lo anterior se puede decir que los trofoblastos mantenidos en cultivo son capaces de transformar a la 25-(OH)D₃ en metabolitos más polares que comigran con los estándares de la 24,25-(OH)₂D₃ y 1,25-(OH)₂D₃.

En la vida adulta del humano las concentraciones circulantes de los metabolitos de la vitamina D₃ se encuentran en un gradiente decreciente: 25-(OH)D₃ (30-50 ng/mL.) > 24,25-(OH)₂D₃ (2-4 ng/mL.) > 1,25-(OH)₂D₃ (20-65 pg/mL.). En nuestros cultivos los metabolitos radiactivos guardan este mismo gradiente de concentraciones, lo cual podría indicar en primer lugar: que el ambiente del cultivo no altera la funcionalidad de las células y en segundo: que si bien existe diferencia significativa en la producción de estos entre los grupos la homeostasis de los derivados de la vitamina D₃ de alguna manera se conserva. Esta observación puede orientar la dirección de futuras investigaciones.

Aunque la contribución de la placenta en la síntesis de la 1,25-(OH)₂D₃ y 24,25-(OH)₂D₃ con respecto a la producción renal es mínima, sin embargo su síntesis podría cobrar importancia a nivel parácrino, representando esta posibilidad un interesante campo de estudio.

La 1,25-(OH)₂D₃, el metabolito más activo de la vitamina D₃, se encuentra notablemente disminuido (90 %) en los cultivos de trofoblastos de placentas preeclámpticas con relación al grupo control, este hallazgo es congruente con los estudios realizados en donde se observó la disminución en las concentraciones de IGF-I (Halhali, 1995), la misma 1,25-(OH)₂D₃ (August, 1992) circulante y elevadas concentraciones de la PTH (Cruikshank, 1993) los cuales son elementos reguladores de la síntesis del calcitriol en el riñón.

En estudios con células cancerosas de colon (Zhao, 1993; Brehier, 1989; Harper, 1989) y keratinocitos humanos (Pilla, 1988), se encontró que la 1,25-(OH)₂D₃ es por si misma un agente poderoso que media la transición de las células a una rápida proliferación, no diferenciación del fenotipo, con concentraciones relativamente altas del receptor de la vitamina D₃ (RVD), y por otro lado, baja proliferación, mayor diferenciación, exhibiendo una baja concentración del RVD. En el presente trabajo se muestra la evidencia de la diferenciación en los cultivos de placentas PE y de una baja concentración de 1,25-(OH)₂D₃, sin embargo las concentraciones del RVD no fueron evaluadas.

Posiblemente al analizar el receptor en diferentes estadios del embarazo sea posible determinar el origen cronológico de esta complicación del embarazo, no obstante, este análisis presenta limitantes de índole ético y legal.

Zhao y Feldman (Zhao, 1993) demostraron que en poblaciones más diferenciadas de HT-24, células cancerosas de colon humano, la abundancia del RVD esta disminuida en un 50%, en comparación con las colonias con alta proliferación y no presentan respuesta biológica a la 1,25-(OH)₂D₃. Posiblemente en las placentas PE la respuesta biológica al calcitriol se encuentre alterada, ya que al realizar las disecciones de las placentas en la realización de los cultivos se observaron placas calcáreas, que al parecer podrían ser zonas de acumulación de calcio y otros minerales, situación que evidencia la falla en el transporte de calcio.

El mecanismo por el cual las células más diferenciadas no responden biológicamente a la 1,25-(OH)₂D₃ continua en estudio, sin embargo esto puede estar asociado con los procesos de diferenciación del fenotipo celular así como la disminución en el RVD.

Con el presente trabajo se demuestra que la actividad de la 1α -(OH)asa se encuentra disminuida en la PE, así como la expresión de sus transcritos observados en los análisis de Southern blot. Cabe mencionar que los estudios del ARNm de la enzima realizados en este trabajo mediante Northern blot, no mostraron alguna señal de transcripción, esta situación había sido reportada previamente por otros investigadores (Monkawa, 1997), en donde no se encuentra hibridación entre el ARNm extraído de placenta y la sonda específica de la 1α -(OH)asa, pero sí en el riñón. Posiblemente sea necesario adecuar la metodología para el estudio del ARNm de la 1α -(OH)asa, ya que al parecer la señal de transcripción de este gen no alcanza a ser detectada mediante el análisis del ARN total.

En este trabajo se muestra por primera vez la señal de transcripción de esta enzima mediante Southern blot de los productos de RT-PCR. El estudio de la enzima a nivel de transcripción apoya los datos de actividad de la enzima obtenidos durante la primera parte de este trabajo, ya que el análisis de las hibridaciones con la sonda específica de la 1α -(OH)asa refleja una disminución en la expresión relativa del gen de la 1α -(OH)asa en el grupo PE.

Aunque no se sabe con certeza la(s) causa(s) de la disminución en las concentraciones de la $1,25$ -(OH) $_2$ D $_3$ circulante en el padecimiento de la PE, se han propuesto varias teorías: 1°) la falla renal debida a la hipertensión, que puede reflejarse como una baja síntesis del calcitriol, y 2°) la subóptima función placentaria como resultado de la deficiente irrigación sanguínea. A pesar de que estos argumentos suponen un funcionamiento general, ellos pueden servir para iniciar el estudio concerniente a la regulación de la 1α -(OH)asa placentaria y llegar a la explicación de la disminución de esta en el padecimiento de la PE.

En resumen la baja capacidad de respuesta al 8-Br-AMPC y la disminución en la síntesis de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ (17.5 ± 10.4 fmol/mg proteína) es un reflejo del cuadro patológico de la PE, que podrían estar asociadas con otros elementos como hormonas y factores de crecimiento que participan en algunos de los problemas centrales de la PE a nivel placentario, el metabolismo del calcio y/o el crecimiento y diferenciación celular. La baja actividad de la $1\alpha\text{-(OH)asa}$ puede estar directamente relacionada con alteraciones a nivel transcripcional, ya que su expresión génica también se encuentra disminuida. Finalmente la baja respuesta al 8-Br-AMPC y la baja síntesis de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ podrían servir para orientar futuras investigaciones encaminadas a conocer la regulación de la síntesis del calcitriol placentario en condiciones normales y patológicas.

La $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ (Homna, 1983) y la hCG (Panesar, 1999; Petraglia, 1998; Alsat, 1998) comparten funciones como diferenciación y proliferación celular, procesos que se encuentran activos en el embarazo, probablemente al encontrarse disminuida la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ por causas desconocidas hasta el momento, la baja capacidad de respuesta al 8-Br-AMPC aumenten el desequilibrio fisiológico, hormonal y metabólico presentes en la PE.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir:

Se comprobó la hipótesis planteada: La síntesis de la $1,25-(OH)_2D_3$ en los trofoblastos de placentas provenientes de embarazos que cursan con preeclampsia se encuentra disminuida y esta alteración es secundaria a la baja transcripción del gen de la $1\alpha-(OH)asa$, ya que los productos moleculares de su expresión génica, también se encuentran reducidos.

La síntesis de $24,25-(OH)_2D_3$ en la placenta preeclámpticas es menor a la sintetizada en las placentas normotensas.

La secreción y síntesis de la hCG en las placentas provenientes de embarazos con preeclampsia es similar a la encontrada en las placentas normotensas, sin embargo, su respuesta al 8-Bromo-AMPC es menor.

En los trofoblastos en cultivo de placentas preeclámpticas el intervalo de síntesis y secreción de hCG es menor en comparación con el control.

BIBLIOGRAFÍA

- ☞ Adams JS, Gacad MA, Singer FR, Sharma OP. 1986. Production of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by pulmonary with sarcoidosis. NY. Acad. Sci., 465:587-594.
- ☞ Adams JS, Singer FR, Gacad MA. 1985. Isolation and structural identification of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ produced by cultured alveolar macrophages in sarcoidosis. J. Clin. Endocrinol. Metab., 60:960-966.
- ☞ Alsat E, Guidourdenche J, Couturier A, Evain-Brion D. 1998. Physiology role of placenta growth hormone. Med. Hypotheses., 25:140-147.
- ☞ Armbrsch HJ, Wongsurawat N, Zenser TV, Davis BB. 1984. Effect of PTH and 1,25-(OH)₂D₃ on renal 25-(OH)D₃ metabolism, adenilate ciclase, and protein kinase. Am. J. Physiol., 246:E102-E107.
- ☞ August P, Marcaccio B, Gertner MJ, Drzin LM, Resnik ML, Laragh HJ. 1992. Abnormal 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism in preeclampsia. Am. J. Obstet. Gynecol., 166:1295-1299.
- ☞ Beckman MJ, Goff JP, Reinhardt TA, Beitz DC, Horst RL, 1994. *In vitro* regulation of rat intestinal 24-hydroxylase: potential new role of bone calcitonin. Endocrinology., 135:1951-1955.
- ☞ Bjorkhem I, Holmberg I, Oftebro H, Pedersen JI, 1980. Properties of a reconstituted vitamin D₃ 25-hydroxylase from rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 255:5244-5249.
- ☞ Blight EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol., 37:911-915.

- ☞ Bouillon R, Hokamura W, Norman A. 1995. Structure function relationship in the Vitamin D endocrine system. *Endocrine Rev.*, 16:200-246.
- ☞ Bradford MM, 1976. A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-252.
- ☞ Brehier A, Thomasset M. 1988. Human colon cell line HT-29: characterization of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ receptor and induction of differentiation by the hormone. *J. Steroid. Biochem.*, 29:265-270.
- ☞ Burrow G, Ferris T. *Complicaciones médicas durante el embarazo*. 4ª edición. Argentina. Editorial Médica Panamericana. 1996. 7-17.
- ☞ Cantley LK, Russell J, Lettieri D, Sherwood LM. 1985. 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ suppreses parathyroid hormone secretion from bovine parathyroid cells in tissue culture. *Endocrinology.*, 117:2114-2119.
- ☞ Care AD. *Vitamin D in pregnancy, the fetoplacental unit and lactation* 28. de: Feldman D, Glorieux FH, Weslwy PJ. *Vitamin D. USA*. Academic Press. 1997. 437-445.
- ☞ Cress CJ. 1996. Trophoblast function in normal and preeclamptic pregnancy. *Fetal Maternal Med. Rev.*, 8:57-65.
- ☞ Cruiskshank DP, Chan MG, Doerfeld D. 1993. Alterations in vitamin D and calcium metabolism with magnesium sulfate treatment of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 168:1170-1177.
- ☞ Chen KS, De Luca HF. 1995. Cloning of the human 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ 24-hydroxilase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1263:1-9.

- De Luca HF. Historical overview 1 de: Feldman D, Glorieux FH, Weslwy PJ. Vitamin D. USA. Academic Press., 1997. 3-11.
- Delvin EE, Arabian A. 1987. Kinetics and regulation of 25-hydroxycholecalciferol 1-alpha-hydroxylase from cells isolated from human decidua. Eur. J. Biochem., 164: 659-662.
- Duran NJJ, Couoh NJ. 1999. Incidence of Preeclampsia and eclampsia in a HGOH. Ginecol. Obstet. Mex., 67: 571-577.
- Frasser DR. 1980. Regulation of the metabolism of vitamin D. Physiol. Rev., 60:551-613.
- Frasser DR. Calcium regulation homones: vitamin D. De: Kohlmeier L, Marcus R (eds). Calcium in human biology. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America., 1995. 28-41.
- Friedman WF, Roberts WC. 1986. Vitamin D and the supraavalvar stenosis sindrome. The placental effect of vitamin D in the aorta of the rabbit. Circulation., 33:77-78.
- Fu KG, Dong L, Zhang YH, Bikle DD, Shackleton HL, Miller LW, Portale AA. 1997. Clonning of human 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets Type I. Mol. Endocrinol., 11:1961-1970.
- Genbacev O, Joslin R, Damsky HC, Polliotti BM, Ficher JS. 1996. Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion *in vitro* and models the placental defects that occur in preeclampsia. J. Clin. Invest., 97:540-550.
- Glenville J. Chapter 2 Vitamin D: Cholecalciferol, Ergocalciferol and hydroxylated metabolites. de: Leenheer AP, Lambert WE, Nelis HJ. Modern chromatographic analysis of vitamins. 2ª de. U.S.A. 1992. 73-109.

- Glorieux FH, Arabian A, Delvin EE. 1995. Pseudo-vitamin D deficiency. Absence of 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase activity in human placenta decidual cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 80:2255-2258.
- Glowacki J, Deftos LJ, Mayer E, Norman AW, Henry H. Chondrichthyes cannot resorb implanted bone and have calcium regulating hormones. En: Norman AW, Achaefer K, Harrath DV, Grigoleit HG. *Vitamin D: chemical, Biochemical and Clinical endocrinology of calcium metabolism*. Gruyter, Berlin and New York. 1982. 613-615.
- Goff JP, Reinhardt TA, Engstrom GW, Horst RL. 1992. Effect of dietary calcium of phosphorus restriction and 1,25-dihydroxyvitamin D administration on rat intestinal 24-hydroxylase. *Endocrinology.*, 131:101-104.
- Gray MH. 1983. The chemical composition of the human fetus. *J. Biol. Chem.*, 102:7-13.
- Gray TK, Lowe W, Lester G. 1981. Vitamin D and pregnancy: The maternal-fetal metabolism of vitamin D. *Endocrine. Rev.*, 2:264-274.
- Haddad JG, Boisseau V, Aviolo LV. 1991. Placental transfer of vitamin D₃ and 25-hydroxycalciferol in the rat. *J. Lab. Clin. Med.*, 77:908-915.
- Halhali A, Bourges H, Carrillo A, Garabedian M. 1995. Lower circulating insulin like growth factor I and 1,25-dihydroxyvitamin D levels in preeclampsia. *Rev. Invest. Clin.* 47:259-266.
- Halhali A, Díaz L, Sánchez I, Garabedian M, Bourges H, Larrea F. 1999. Effect of IGF-I on 1,25-dihydroxyvitamin D₃ synthesis by human placentae in culture. *Mol. Hum. Reprod.* 5:771-776.

- ☞ Harper KD, Iozzo RV, Haddad JG. 1989. Receptor and biological responses to 1,25 dihydroxyvitamin D in human colon carcinoma cell line (HT-29). *Metabolism.*, 38:1062-1069.
- ☞ Harrison HE, Harrison HC. 1961. Intestinal transport of phosphate: action of vitamin D, calcium and potassium. *Am. J. Physiol.*, 205:1007-1012.
- ☞ Harrison HE, Harrison HC. 1963. Sodium, potassium, and intestinal transport of glucose, tyrosine, phosphate and calcium. *Am. J. Physiol.*, 205:107-111.
- ☞ Heany RD, Skillman TG. 1997. The effect of dietary calcium in normal human pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 33:661-670.
- ☞ Henry HL, Midgett RJ, Norman AW. 1984. Regulation of 25-hydroxyvitamin D₃ 1- α hydroxylase in vivo. *J. Biol. Chem.*, 249:7584-7592.
- ☞ Henry HL. 1989. Regulation of the hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃ in vivo and primary cultures of chicken kidney cells. *J. Biol. Chem.*, 254:2722-2729.
- ☞ Holick MF, Holick SA, Guillard RL. Calcium and phosphorus, bone metabolism. McGraw Hill. USA. 1986. 1857-1870.
- ☞ Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB. 1980. Photosynthesis of previtamin D₃ in human skin and the physiologic consequences. *Science*, 210:203-205.
- ☞ Hollis WB, Iskersky NV, Chang K. 1989. *In vitro* metabolism of 25-(OH) D by human trophoblasts homogenates, mitochondria, and microsomes: lack of evidence for the presence of 25-(OH)D-1-24R hydroxylases. *Endocrinology.*, 125:1224-1230.
- ☞ Homma Y, Hozumi M, Abe E. 1983. Prolongation of survival time of mice inoculated with myeloid leukaemic cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80:201-204.

- ☞ Horst RL, Reinhardt AT. Vitamin D metabolism 2 de: Feldman D, Gloroux FH, Weslwy PJ. Vitamin D. USA. Academic Press. 1997. 3-11.
- ☞ Iwata K, Yamamoto A, Satoh S, Ohyama Y, Tashiro Y, Setoguchi T. 1995. Quantitative immunoelectron microscopic analysis of the localization and induction of 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylases in rat kidney. J. Histochem. Cytochem., 43: 255-262.
- ☞ Jhonson JA, Beckman MJ, Pansini PA, Chistakos S, Bruns ME, Beitz DC, Horst RL, Reinhardt TA. 1995. Age and gender effects on 1,25-dihydroxyvitamin D₃-regulated gene expression. Exp. Gerontol., 30: 631-643.
- ☞ Justin S, Many-Naveh T. Vitamin D and the Parathyroid glands. 23 de: Feldman D, Gloroux FH, Weslwy PJ. Vitamin D. USA. Academic Press. 1997. 3-11.
- ☞ Kachkache M, Benneton Ch, Demingnon, Cynober E, Garabedian M. 1993. Uterine cells other than stromal decidual cells are required for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ production during early human pregnancy. FEBS Lett., 333:83-88.
- ☞ Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF. 1986. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblast from human term placentae. Endocrinology., 118:1567-1573.
- ☞ Kumar R. 1980. The metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Endoc. Rev., 1:258-260.
- ☞ Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Myambo K, Drummond R, Gelfand DH. 1989. Isolation, characterization, and expression of *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *thermus aquaticus*. J. Biol. Chem., 264:6427-6437.
- ☞ Lester GE, Gray TK, Loreno RS. 1988. Evidence of maternal and fetal differences in vitamin D metabolism. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 159:303-311.

- ☐ Lips P, Oomss ME. 1995. The effect of vitamin D supplementation in the elderly. *Chall. Modern Med.*, 7: 311-315.
- ☐ Lohnes D, Jones G. 1987 Side chain metabolism of vitamin D₃ in osteosarcoma cell line UMR-106. Characterization of products. *J. Biol. Chem.*, 262:14394-14401.
- ☐ Lui DF, Dickerman LH, Redline RW. 1999. Pathologic findings in pregnancies with unexplained increases in midtrimester maternal serum human chorionic gonadotropin levels. *Am. J. Clin. Pathol.*, 111:209-215.
- ☐ MacLaughlin JA, Holick MF. Mediation of cutaneous vitamin D₃ synthesis by UV radiation. En Goldmith L A (eds): *Biochemistry and physiology of skin*. USA, Oxford Press. 1983. 723-754.
- ☐ Mason RS. Extrarenal production of 1,25dihydroxyvitamin D₃. the metabolism of vitamin D by non traditional tissues. de: Norman A W, Schaefer K, Grigoleit HG, Von Herrath D. *Vitamin D: chemical, biochemical and clinical update*. Berlin. Gruyter. 1985. 23-32.
- ☐ Mena CH, Vrtovsnik F, Friedlander G, Corvol M, Garabedian M. 1995. Insulin like growth factor I, a unique calcium dependent stimulator of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ production. *J. Bol. Chem.*, 270:25461-25467.
- ☐ Miyuara C, Abe E, Kuribayashi T. 1981. 1 α ,25-dihydroxivitamin D₃ induces differentiation of human myeloid leukaemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 102:937-943.
- ☐ Monkawa T, Yoshida T, Wakino S, Shinki T, Anazawa H, De Luca H F, Suda T, Hayashi M, Saruta T. 1997. Molecular cloning of cDNA and genomic DNA for human

- 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 239:527-533.
- 📖 Moodley D, Moodley J, Buck R, Haneef R, Payne A. 1995. Free alpha-subunits of human chorionic gonadotropin in preeclampsia. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 49:283-7.
- 📖 Moore KL, Persaud T. *Embriología clinica*. 5ª ed. Interamericana Mc Graw Hill. México. 1995. 120-151.
- 📖 Morii H, Lund J, Neville PF, DeLuca HF. 1987. Biological activity of a vitamin D metabolite. *Arch. Biochem. Biophys.*, 120:508-512.
- 📖 Myatt L, Miodovnik M. 1999. Prediction of preeclampsia. *Semin. Perinatol.*, 23:45-57.
- 📖 Napoli JL, Horst RL, Kumar R. *Vitamin D metabolism*. Martinus Nijhoff. Boston. 1984. 91-123.
- 📖 Ohyama Y, Noshiro M, Okuda K. 1993. Structural characterization of the gene encoding rat 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase. *Biochemistry.*, 32:76-82.
- 📖 Ohyama Y, Okuda K. 1991. Isolation and characterization of a citochrome P₄₅₀ from rat kidney mitochondria that catalyzes the 24-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃. *J. Biol. Chem.*, 266:8690-8695.
- 📖 Okuda K, 1994. Liver mitochondrial p450 involved in cholesterol catabolism and vitamin D activation. *J. Lipid. Res.*, 35:361-372.
- 📖 Omdhal JL, 1988. Interaction of the paratiroid and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the control of renal 25-hydroxyvitamin D₃ metabolism. *J. Biol. Chem.*, 253:8474-8487.
- 📖 Panesar NS. 1999. Human corionic gonadotropin: a secretory hormone. *Med. Hypotheses.*, 53:136-140.

- ☞ Petraglia F, Santuz M, Florio P, Simoncini T, Luisi S, Plaino L, Genazzani A R, Genazzani A D, Volpe A. 1998. Paracrine regulation of human placenta: control of hormonogenesis. *J. Reprod. Immunol.*, 39:221-233.
- ☞ Pilla S, Bikle DD, Elias PM. 1988. 1,25 dihydroxyvitamin D production and receptor binding in human keratinocytes varies with differentiation. *J. Biol. Chem.*, 263:5390-5395.
- ☞ Pols HAP, Leewuwn JP, Schilte JP, Visser TJ, Brikenhager JC. 1988. Heterologous up-regulation of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor by PTH and PTH-like peptide in osteoblast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 156:288-294.
- ☞ Pols HAP, Schilte JP, Visser TJ, Brikenhager JC. 1988. Evidence that the self induced metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ limits the homologous up-regulation of its receptor in rat osteosarcoma cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, 970:122-129.
- ☞ Pouta AM, Hartikainen AL, Vuolteenaho OJ, Ruokonen AO, Laatikainen TJ. 1998. Midtrimester N-terminal proatrial natriuretic peptide, free beta hCG, and alpha-fetoprotein in predicting preeclampsia. *Obstet. Gynecol.*, 91:940-944.
- ☞ Pritchard JA, Mac Donald PC, Grant NF. *Williams Obstetricia*. 3ª ed. Salvat. México. 1990. 511-544.
- ☞ Queipo G, Deas M, Arranz C, Larrea F. 1998. Sex hormone-binding globulin stimulates chorionic gonadotropin secretion from human cytotrophoblast in culture. *Hum. Reprod.*, 13:1368-1370
- ☞ Raty R, Koskinen A, Alanen A, Irjala K, Matinlauri I, Ekblad U. 1999. Prediction of preeclampsia with maternal mid-trimester total renin, inhibin A, AFP and free beta-hCG levels. *Prenat. Diagn.*, 19:122-127.

- ↵ Reichel H, Koeffler HP, Barbers R. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and the hematopoietic system de: Norman AW, Schaefer K, Grigoleit HG, Von Herrath D. (eds): Vitamin D. chemical, biochemical and clinical update. Berlin. Gruyter. 1985. 167-176.
- ↵ Reinhardt TA, Horst RL. 1989 Self induction of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ metabolism limits receptor occupancy and target tissue responsiveness. *J. Biol. Chem.*, 264:15917-15921.
- ↵ Reinhardt TA, Horst RL. 1990. Parathyroid hormone down-regulates 1,25-dihydroxyvitamin D receptors and messenger ribonucleic acid in vitro and blocks homologous up regulation of vitamin D receptor in vivo. *Endocrinology.*, 127:942-498.
- ↵ Rubin PL, Yeung B, Vouros P, Vilner ML, Reddy S. 1993. Evidence for human placental synthesis of 24,25-dihydroxyvitamin D₃ and 23,25 dihydroxyvitamin D₃ *Pediatric Res.*, 34:549-556.
- ↵ Saarem K, Bergseth S, Oftebro H, Petersen JJ. 1984. Subcellular localization of vitamin D₃ 25-hydroxylation in human liver. *J. Biochem.*, 259:10936-10946.
- ↵ Sadler P. *Embriología médica*. 6ª edición. EUA. Editorial Medica Panamericana. 1993. 106-117.
- ↵ Seely WE, Wood RJ, Brown EM, Graves EW. 1992. Lower serum ionized calcium and abnormal calciotropic hormone levels in preeclampsia. *J. Clin. Endoc. Metab.*, 74:1436-1440.
- ↵ Shinki T, Jin Ch, Nishimura A, Nagai Y, Ohyama Y, Noshiro M, Okuda K, Suda T. 1992. Parathyroid hormone inhibits 25-hydroxyvitamin D₃-24hydroxylase mRNA expression stimulated by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in rat kidney but not in intestine. *J. Biol. Chem.*, 267:13757-13762.

- ☞ Sniadecki J. 1882. The cure of rickets. *Nature.* 143:121-139.
- ☞ Suda T. 1993. Determination of bone density in woman more than 10 years past the menopause. *Journal of bone and mineral research.* 11:1273-1279.
- ☞ Tanaka Y, Schoes HK, Smith CM, DeLuca HF. 1981. 1,25,26- trihydroxyvitamin D₃ isolation, identification and biological activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 210:104-109.
- ☞ Tilyard M, Spears G, Thomson J, 1992. Treatment of postmenopausal osteoporosis with calcitriol and calcium. *The New J. of Medicine.* 6:357-362.
- ☞ Tynarayama R, Norman AW, Willis DM, Goltzman D, Guyda H, Solomon S, Philips DR, Bishop E, Mayer E. 1983. Regulation of vitamin D metabolism in normal human pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 56:363-370.
- ☞ Wasserman HR. Vitamin D and the intestinal absorption of calcium and phosphorus 16 de: Feldman D, Gloreux FH, Weslwy PJ. *Vitamin D. USA. Academic Press.* 1997. 3-11.
- ☞ Weisman Y, Harell A, Edelstein S, Spierer Z, Golander A. 1979. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and 24,25-dihydroxyvitamin D₃ in vitro synthesis by human decidua and placenta. *Nature.*, 281:317-319.
- ☞ Whittsett JA, Ho MR, Tsang RG, Norman EJ. 1981. Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by human placenta in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 53:484-488.
- ☞ Wichmann J, Schoes HK, DeLuca HF. 1981. 23,24,25 trihydroxyvitamin D₃, 24,25,26, trihydroxyvitamin D₃, 24-keto-25- hydroxyvitamin D₃, and 23-dehydro-25 hydroxyvitamin D₃: New *in vivo* metabolites of vitamin D₃. *Biochemistry.* 20:7385-7391.

- ☞ Yamamoto T, Ozono K, Shima M, Yamaoka, Okada S. 1998. 24R, 25-dihydroxyvitamin D₃ increases cyclic SMP contents, leading to an enhancement of osteocalcin synthesis by 1,25-dihydroxyvitamin D-3 in culture human osteoclastic cells. *Exp. Cell. Res.* 244:71-76.
- ☞ Yumping W, Walsh WS. 1997. Hormonal and related mechanisms for preeclampsia of pregnancy. *The Endocrinologist.* 7:238-244.
- ☞ Zerwekh JE, Breslau NA. 1986. Human placental production of 1,25-dihydroxyvitamin D₃: Biochemical characterization and production in normal subjects and patients with pseudohypoparathyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62:192-196.
- ☞ Zhao X, Feldman D. 1993. Regulation of vitamin D receptor identical with that from intestine/ T74D cell mediates the actions of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ in HL-60 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1132:103-108.

ANEXOS

Anexo 1

Gradiente de Percoll para la separación de trofoblastos

En una gradilla se enumeran tubos de vidrio de 12x75 mm del 1 al 14. a cada tubo se le adiciona la cantidad de percoll al 90 % (18 mL de percoll 100% con 2 mL de solución Hank's 10X) y solución Hank's 1X indicada en la tabla.

Tubo	% Percoll	Percoll 90 % (ml)	Sol. Hank's 1X (ml)
1	70	2.33	0.67
2	65	2.17	0.83
3	60	2.00	1.00
4	55	1.83	1.17
5	50	1.67	1.33
6	45	1.50	1.50
7	40	1.33	1.67
8	35	1.17	1.83
9	30	1.00	2.00
10	25	0.83	2.17
11	20	0.67	2.33
12	15	0.50	2.50
13	10	0.33	2.67
14	5	0.17	2.83

Una vez dispensados los tubos, se comprueba que todos tengan el mismo nivel, para asegurar que la distribución de las soluciones fue la correcta, se homogenizan y se depositan en un tubo de 50 mL a través de una bomba peristáltica con flujo lento, cuidando que no se mueva bruscamente.

Anexo 2

Curva de calibración de albúmina de suero bovino (ASB)

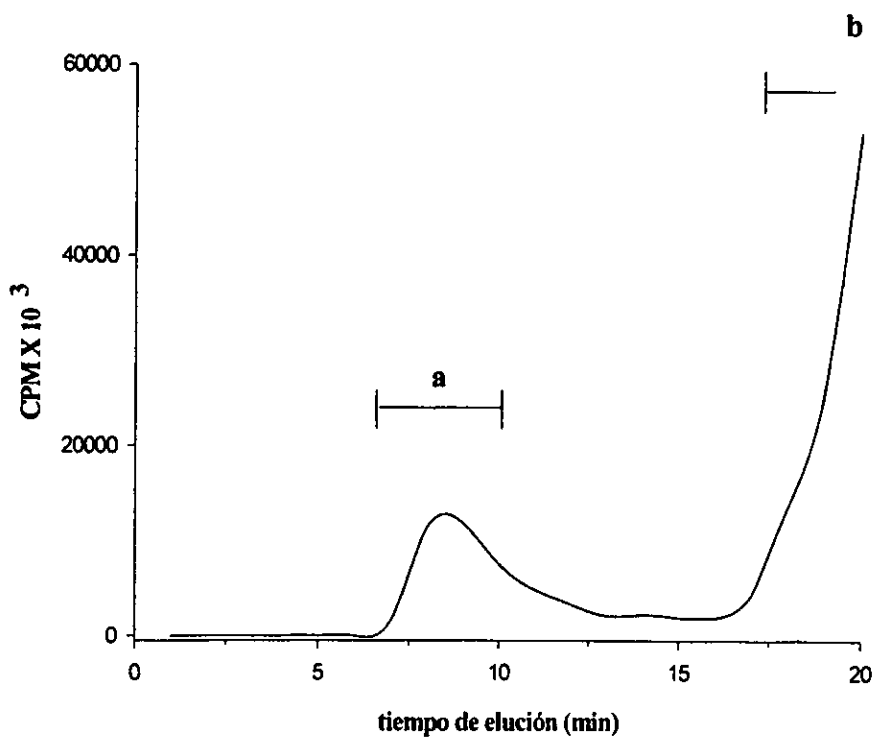
En una gradilla se enumeran tubos de 12x75 mm del 1 al 10 y se dispensa la albúmina sérica bovina (0.75 nM) como se indica en la tabla, por duplicado, y posteriormente se satura con NaCl (0.15 M) a un volumen de 100 μ L.

Tubo	ASB 0.75 nM (μ l)	NaCl 0.15 M (μ l)
1 y 2	5	95
3 y 4	10	90
5 y 6	15	85
7 y 8	20	80
9 y 10	0	100

Se homogeniza y a cada tubo se adiciona 1 ml de colorante azul de Commasie.

- Límites de detección de la prueba: 2.5-10 μ g /tubo.
- Variabilidad: 7.3 %
- Sensibilidad: 1.91 μ g /tubo.

Anexo 3
Curva de Iodación



Perfil de elución de la hCG-¹²⁵I

a) tiempo de retención correspondiente a la hCG-¹²⁵I.

b) tiempo de retención del ¹²⁵I no unido a la hormona.

(CPM = cuenta por minuto)

Anexo 4

Curva de calibración de la hCG para RIA

Tubo	Dilución	Equivalencia
1	20 μ L hCG + 480 μ L PBS-Gel	100 μ L = 20 ng hCG
2	500 μ L del tubo # 1 + 500 μ L PBS-Gel	100 μ L = 10 ng hCG
3	500 μ L del tubo # 2 + 500 μ L PBS-Gel	100 μ L = 5 ng hCG
4	500 μ L del tubo # 3 + 500 μ L PBS-Gel	100 μ L = 2.5 ng hCG
5	500 μ L del tubo # 4 + 500 μ L PBS-Gel	100 μ L = 1.25 ng hCG
6	500 μ L del tubo # 5 + 500 μ L PBS-Gel	100 μ L = 0.625 ng hCG
7	500 μ L del tubo # 6 + 500 μ L PBS-Gel	100 μ L = 0.31 ng hCG
8	500 μ L del tubo # 7 + 500 μ L PBS-Gel	100 μ L = 0.15 ng hCG

- Límites de detección de la prueba: 0.15-20 ng /tubo.
- Uniones totales: 57.5 %
- Uniones no específicas: 320 ± 128 CPM.
- Uniones máximas: 17342 ± 3569 CPM.
- Variabilidad: < 8.9 %
- Sensibilidad: 0.131 ng /tubo.