



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

ACCIONES BIOLÓGICAS DEL CALCITRIOL EN LA
PLACENTA HUMANA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. DAVID BARRERA HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. LORENZA DÍAZ NIETO

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.


Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 20 de octubre de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del Posgrado en Ciencias Biológicas, del alumno **BARRERA HERNÁNDEZ DAVID** con número de cuenta **90383212** con la tesis titulada "**Acciones Biológicas del calcitriol en la placenta humana**", realizada bajo la dirección de la **DRA. LORENZA DÍAZ NIETO**:

Presidente: DR. ENRIQUE ANTONIO PEDERNERA ASTEGIANO
Vocal: DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES
Vocal: DRA. MARTHA PÉREZ ARMENDARIZ
Vocal: DR. FELIPE VADILLO ORTEGA
Secretario: DRA. LORENZA DÍAZ NIETO
Suplente: DRA. GABRIELA MORALÍ DE LA BRENA
Suplente: DR. ALI HALHALI BAGHDAD

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de enero de 2009.


Dr. Juan Muñoz Farfán
Coordinador del Programa

RECONOCIMIENTO

Al Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), lugar donde se realizó el proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento No. 45937/A1 y beca No. 167224 otorgados como apoyo para el desarrollo del proyecto.

A la *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM), por ser la casa de estudios a quien debo mis mayores logros académicos.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por su alto nivel de atención, disposición y excelencia académica.

Al personal del Hospital de Gineco Obstetricia Luis Castelazo Ayala (IMSS), por la donación de las placentas.

Al comité tutorial; Dra. Lorenza Díaz Nieto, Dr. Felipe Vadillo Ortega y Dr. Ali Halhali Baghdad y miembros del jurado; Dr. Enrique Antonio Pedernera Astegiano, Dr. Federico Martínez Montes, Dra Martha Pérez Armendáriz y Dra. Gabriela Morali de la Brena, por sus valiosas aportaciones.

AGRADECIMIENTOS

A la *Dra. Lorenza Díaz Nieto*, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, su confianza, compañerismo, tiempo y su amplio criterio a lo largo de este proyecto que emprendimos y culminamos juntos.

Al *Dr. Euclides Avila Chavez*, un amigo con características únicas que hacen apreciar su calidad profesional y su ejemplo de superación.

Al *Dr. Ali Halhali Baghdad*, por su disposición, orientación y por compartir su experiencia laboral para ver el quehacer científico desde otra perspectiva.

A Nancy Noyola Martínez, por su paciencia, dedicación y compromiso al dar continuidad a esta ardua tarea de investigación bajo mi dirección.

Al *Dr. Fernando Larrea Gallo*, por su extraordinaria dirección y crítica que fue crucial para consolidar mi formación. Asimismo, por su confianza y apoyo incondicional.

A mis compañeros de trabajo: *Dra. Mayel Chirinos, Dra. Rocio García, Dra. Isabel Mendez, M en C. Elena González, Dra. Carolina Ariza, Dra. Carolina Guzmán, Dra. Martha Duran, Dra. Elena Zambrano, Dra. Angélica Morales, Dra. Sumiko Morimoto, Dr. Eulises Díaz*, por su amistad, apoyo y afecto durante mi formación académica en el instituto.

A mis compañeros de laboratorio: *Guillermo Hernández, Ana Figueras, David Ordaz, Isela Martínez, Leticia González, Analilia Saldivar, Jazmin Suarez, Adrián Rodríguez y Guadalupe Rodríguez* por el placer de compartir y constituir un gran equipo de trabajo.

A la *Dra. Ana Elena Lemus, Dra. Bertha Chavez, Dr. Felipe Vilchis, M en C. Luis Ramos, M. en C. Mario Cárdenas, M. en C. Roberto Chavira, Olinka Flores y Luis Pérez* por su disposición y ayuda para la realización de esta tesis.

DEDICATORIAS

A mis padres: *Daniel Barrera García y Martha Hernández Gabino*, por ser el motivo y el aliento para culminar una las metas propuestas, el Doctorado, del cual sé que estarán orgullosos.

Con especial cariño a *Erika Pérez Ortiz y a Thalíí Pamela Barrera Pérez*, por el comienzo de una nueva etapa en nuestras vidas como familia. Mis preciosas a quienes admiro, respeto, quiero y amo.

A mis hermanos: *Claudia, Daniel y Miguel*, como ejemplo de logros que son alcanzables.

A mis sobrinos *Dennis, Ivan, Adan, Erika, Lupita, Christian, Uriel y Miguel Angel* por ser la continuidad de nuevas generaciones de las cuales uno disfruta y aprende.

A mi abuelita *María de la Luz* y mis tíos *Miguel, José Luis e Isabel* a quienes quiero y respeto mucho.

En general, agradezco y dedico esta tesis a cada una de las personas que he citado y a otras que sin intención faltan, pero que en su momento compartimos un espacio y tiempo que fueron cruciales para el comienzo y término de un ciclo más en mi vida.

Los datos de esta tesis fueron parcialmente presentados en los siguientes congresos internacionales:

XLV Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, del 28 de Noviembre al 3 de Diciembre, en la Cd. de Mérida, Yucatán, 2005.

“Efectos del calcitriol sobre la secreción hormonal de la placenta humana.” **Barrera David**, Díaz Lorenza, Avila Euclides, Méndez Isabel, González Leticia, Halhali Ali, Larrea Fernando.

XIII Congreso Internacional de Vitamina D, del 8 al 12 de Abril del 2006, en Victoria, BC Canada.

“Estradiol and Progesterone Placental Synthesis is Stimulated by Calcitriol.” Díaz L, Avila E, **Barrera D**, Halhali A, Larrea F.

XX Reunión Bienal de la Asociación latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana, (ALIRH), en Argentina, Buenos Aires, del 25 al 27 de abril del 2007.

“Efectos del calcitriol sobre la expresión y secreción de la gonadotropina coriónica en la placenta humana”. **Barrera D**, Hernández G, Avila E, Méndez I, González L, Halhali A, Larrea F, Díaz L.

ÍNDICE

I. RESUMEN	4
II. ABSTRACT	5
III. INTRODUCCIÓN	6
a) Generalidades	6
b) Formación y Metabolismo del calcitriol	7
c) Funciones del calcitriol	10
d) El calcitriol y el embarazo	12
e) Mecanismos de acción del calcitriol	13
f) Características generales de la hCG	17
g) Características generales de los esteroides	19
h) Regulación hormonal	23
IV. JUSTIFICACIÓN	27
V. OBJETIVOS	28
Objetivo general	28
Objetivos particulares	28
VI. HIPÓTESIS	29
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	30
Reactivos	30
Material Biológico	32
Cultivo de trofoblastos humanos	32
Evaluación del calcitriol sobre hCG, P ₄ y E ₂	34
Inmunodetección de la hCG	35
Cuantificación de la P ₄ y el E ₂	37

Radioinmunoensayo de los esteroides	37
Cuantificación del AMPc intracelular	38
Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	39
Estudios de expresión génica	40
Análisis de los datos	46
VIII. RESULTADOS	47
Morfología celular	47
Funcionalidad celular	48
Efecto del calcitriol sobre la secreción de hCG	50
Calcitriol y AMPc	52
Efecto del calcitriol sobre la expresión de hCG β 5	53
Efecto del calcitriol sobre la secreción de hCG inducida por el 8Br-AMPc	56
Efecto del calcitriol sobre la secreción de la P ₄	57
Efecto del calcitriol sobre la secreción del E ₂	59
Efecto del bloqueo de la vía de la PKA sobre la síntesis de P ₄ y E ₂ mediada por calcitriol	60
Efecto del calcitriol sobre la expresión de HSD3B1 y CYP19	61
IX. DISCUSIÓN	62
General	62
Regulación de la hCG por el calcitriol	63
Consideraciones de la regulación de la hCG por el calcitriol	66
Efecto del calcitriol sobre la producción de la P ₄	66
Efecto del calcitriol sobre la producción del E ₂	67
Consideraciones de la regulación de la P ₄ y el E ₂ por el calcitriol	69
Perspectivas	70

X. CONCLUSIONES	71
XI. ANEXO	72
XII. REFERENCIAS	73
XIII. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	86

I. RESUMEN

El calcitriol ($1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3), es un secoesteroide sintetizado principalmente por el riñón; sin embargo, se sabe que también la placenta posee la capacidad enzimática para producir esta hormona. En el embarazo, las concentraciones sanguíneas del calcitriol se duplican durante el primer trimestre y se mantienen así hasta llegar a término. Actualmente, se desconoce el significado biológico de la síntesis placentaria de esta hormona, pero evidencias recientes en células de coriocarcinoma muestran que el calcitriol aumenta la producción del lactógeno placentario y la expresión del gen *CYP19*, que codifica para la P450 aromatasas. Por otro lado, se ha demostrado que el calcitriol induce la acumulación de AMPc en otros tipos celulares. Considerando lo anterior, el propósito del presente trabajo fue determinar la participación del calcitriol sobre la secreción de la gonadotropina coriónica humana (hCG), la progesterona (P_4) y el estradiol (E_2), así como sus efectos sobre el AMPc en trofoblastos cultivados. Asimismo se estudió la regulación de la expresión de los genes *hCG β 5*, *HSD3B1* y *CYP19* por el calcitriol. Estos dos últimos codifican para las enzimas esteroideogénicas implicadas en la biosíntesis de la P_4 y el E_2 , respectivamente. Como modelo biológico se utilizó el cultivo de trofoblastos obtenidos de placentas humanas a término. La determinación de la hCG secretada se realizó por análisis inmunoenzimático, mientras que la secreción de la P_4 y el E_2 se analizó por radioinmunoanálisis. La incubación de los sinciotrofoblastos en presencia de calcitriol provocó un efecto bifásico dependiente del tiempo sobre la secreción y la expresión de la hCG. A las 6 horas posteriores a la adición del calcitriol se incrementaron significativamente la expresión y la secreción de la hCG. Sin embargo, 24 y 48 horas después el calcitriol inhibió en forma dependiente de la concentración a la hCG, efecto que probablemente represente mejor las acciones del calcitriol en el trofoblasto. Con el objeto de indagar el mecanismo de acción del calcitriol se cuantificó el AMPc intracelular. Los datos mostraron que el AMPc se incrementó en presencia del calcitriol, lo cual sugiere que la inducción de la síntesis de la hCG en tiempos cortos es mediada por la acumulación rápida (10 min) del AMPc. En apoyo a lo anterior, el bloqueo de la vía de la PKA anuló el efecto estimulador del calcitriol sobre la secreción y la expresión de la hCG. Sin embargo, el efecto inhibitorio en tiempos prolongados involucró otras rutas de señalización, así como probablemente la participación del receptor para la vitamina D. Por otra parte, se observó que el calcitriol incrementó de manera significativa la secreción de la P_4 y el E_2 así como la expresión de sus enzimas, efecto mediado en parte por el aumento del AMPc. Estos datos indican que el calcitriol es un regulador fisiológico de la producción placentaria de algunas hormonas durante el embarazo.

II. ABSTRACT

Calcitriol ($1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3) is a secosteroid mainly synthesized by the kidneys; however, the placenta also has the enzymatic capability to produce this hormone. In pregnancy, maternal serum concentrations of calcitriol duplicate during the first trimester and remain high until the end of gestation. At present, nothing is known about the biological meaning of placental synthesis of this hormone, but recent evidence in choriocarcinoma cells shows that calcitriol increases the production of placental lactogen and the expression of the gene *CYP19* which encodes for the P450 aromatase. In addition, calcitriol is able to induce cAMP accumulation in other cell types. Considering this, we studied calcitriol actions upon human chorionic gonadotropin (hCG), progesterone (P_4), and estradiol (E_2) secretion, as well as its effects upon cAMP production. We also studied calcitriol dependent regulation of the genes *hCG β 5*, *HSD3B1* and *CYP19*. These latter genes encode for the steroidogenic enzymes involved in the biosynthesis of P_4 and E_2 respectively. The biological model used was the culture of human trophoblasts obtained from term placentas. Determining hCG secretion was possible by means of an enzyme immunoassay, whereas secretion of P_4 and E_2 was analyzed by radioimmunoassay. In this study we showed that calcitriol is a factor that modulates hCG in human trophoblasts. In fact, calcitriol regulated hCG in a time-dependent manner, stimulating or inhibiting hormone secretion and expression. Six hours after the addition of calcitriol there was a significant increase in expression and secretion of hCG. However, calcitriol long-term effects upon hCG were inhibitory, which appears to be the more representative biological effect. In order to investigate the action mechanism of calcitriol, we examined calcitriol effects upon intracellular cAMP. Data showed that cAMP increased in presence of calcitriol, which suggests that the induction of hCG synthesis in short periods of time is due to the rapid accumulation (10 minutes) of cAMP. Blocking the PKA signaling pathway impeded the stimulatory effects of calcitriol upon the secretion and expression of hCG, which supports the previous findings. However, hCG inhibition that occurred in longer periods of time involved other pathways as well as a possible participation of the receptor for vitamin D. On the other hand, it was also determined that calcitriol increased significantly P_4 and E_2 secretion as well as the gene expression of the enzymes involved in their biosynthesis; which is an effect mediated in part by the cAMP increase. These data indicate that calcitriol is a physiological regulator of placental hormone synthesis during pregnancy.

III. INTRODUCCIÓN

a) Generalidades

El embarazo implica condiciones únicas que modifican el metabolismo y la fisiología materna con el objeto de mantener la gestación y el progreso de un nuevo organismo, el cual posee un perfil antigénico diferente al de la madre. Por tal razón, desde la fecundación se producen cambios en las concentraciones en el suero materno de hormonas polipeptídicas, esteroides, factores de crecimiento y citocinas, que funcionan en conjunto para permitir la implantación y el correcto desarrollo del producto [1, 2]. La placenta es el órgano que asegura el transporte de nutrimentos y la excreción de los metabolitos entre la madre y el feto. Además, es el principal modulador de las fluctuaciones que se presentan de hormonas críticas durante la gestación, como la gonadotropina coriónica humana (hCG), el lactógeno placentario (hLP), la progesterona (P_4), el estradiol (E_2) y el calcitriol, que mantienen en condición estable los órganos tanto maternos como fetales y permiten la tolerancia inmunológica. No obstante, poco se sabe acerca de cómo se regula la producción de cada una de ellas durante la gestación. En particular, el calcitriol ha sido poco estudiado; sin embargo, trabajos recientes han mostrado su participación en el ámbito de la reproducción y es considerado un compuesto importante durante el embarazo.

b) Formación y Metabolismo del calcitriol

El calcitriol es un secoesteroide conocido químicamente como $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 ($1\alpha,25$ -(OH) $_2D_3$). Su síntesis comienza en la piel a partir del precursor 7-dehidrocolesterol por acción de las radiaciones ultravioleta (UV 290-315 nm) provenientes de la luz solar, que rompen el enlace que existe entre el carbono 9 y 10 del anillo B de la molécula, dando lugar a un intermediario inestable que a través de un proceso fototérmico se biotransforma en colecalciferol. El colecalciferol formado es transportado por su proteína de unión hasta el hígado, donde es hidroxilado por la enzima vitamina D-25-hidroxilasa (25-OHasa; CYP2R1) produciendo así la 25-hidroxitamina D_3 (25-OHD $_3$ o calcidiol), el compuesto de la vitamina D más abundante en la circulación sanguínea (10-50 ng/mL) [3, 4]. La 25-OHD $_3$, posteriormente se traslada hasta el riñón, donde se hidroxila en el carbono 1 por acción de la 25-hidroxitamina D_3 - 1α hidroxilasa (1α -hidroxilasa; CYP27B1) mitocondrial la cual se encuentra abundantemente en los túbulos proximales [5] para así obtener su forma hormonalmente activa: el calcitriol, el cual circula en la sangre en concentraciones que oscilan entre 15-60 pg/mL (Figura 1).

Aunque la síntesis del calcitriol tiene lugar principalmente en el riñón, la presencia del CYP27B1 ha sido reportada en otros tejidos tales como la piel, la próstata, el tejido mamario, el intestino, el músculo esquelético, el tejido adiposo, en los islotes pancreáticos, en células del sistema inmune y en la placenta [6-12]. La presencia extrarrenal del CYP27B1 permite la biodisponibilidad del calcitriol en sitios específicos probablemente para ejercer efectos locales en el organismo.

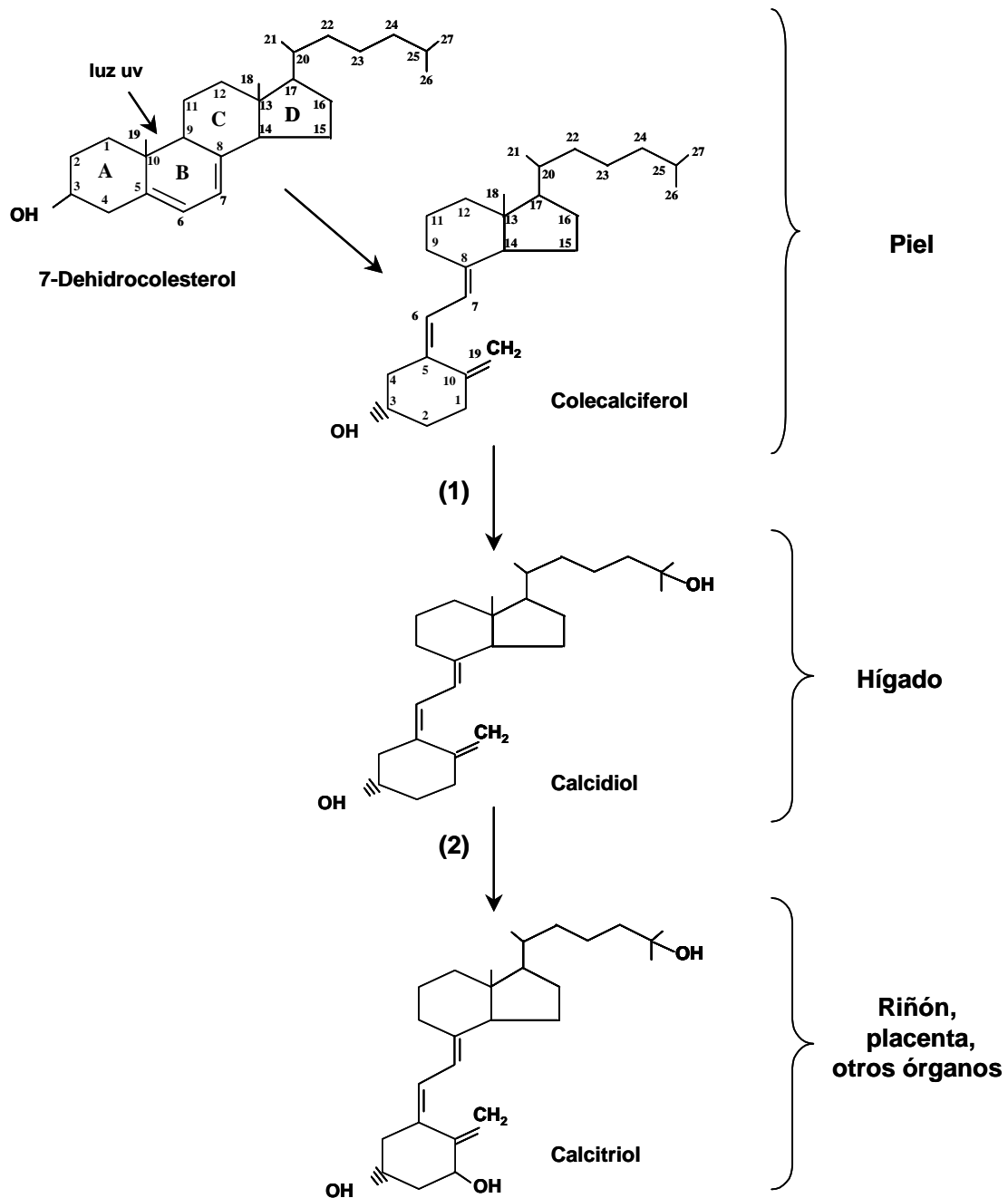


Figura 1. Biosíntesis de calcitriol. La luz solar rompe el anillo B para formar al colecalciferol, que al hidroxilarse en el hígado por la acción del CYP2R1 (1), se convierte en calcidiol. La forma activa se obtiene tras una segunda hidroxilación en el riñón, placenta y otros órganos por el CYP27B1 (2).

El proceso catabólico del calcitriol se realiza por la acción enzimática de la $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D-24 hidroxilasa (24-OHasa; CYP24A1), que provoca la hidroxilación de los carbonos 24 ó 23 para formar a la $1\alpha,24,25$ -trihidroxitamina D₃ o la $1\alpha,23,25$ -trihidroxitamina D₃, los cuales son metabolitos inactivos que mediante subsecuentes oxidaciones, hidroxilaciones y el rompimiento de la cadena lateral de la molécula concluyen en la formación del ácido calcitróico o de una lactona respectivamente, (Figura 2). Cabe mencionar que el calcitriol ejerce un mecanismo de autorregulación en el organismo, donde altas concentraciones de calcitriol reprimen la expresión del *CYP27B1* y estimulan la del *CYP24A1*, lo cual permite regular las señales biológicas del calcitriol dentro de las células blanco [13, 14].

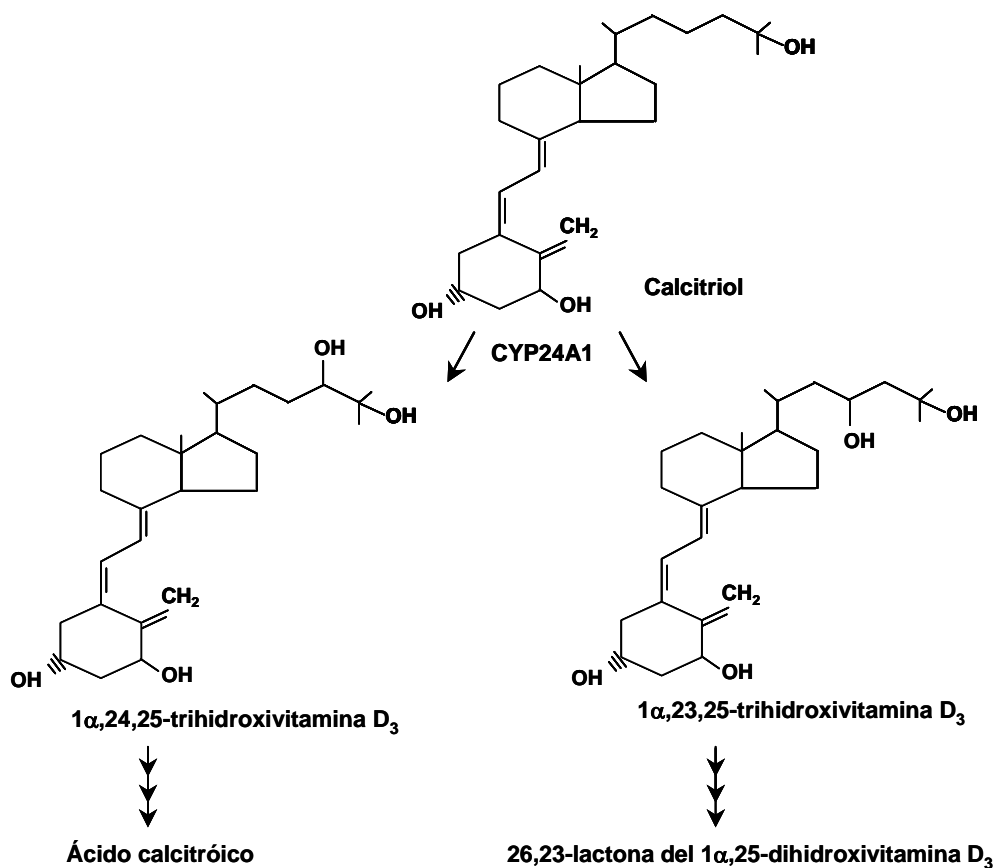


Figura 2. Ruta catabólica del calcitriol mediada por el CYP24A1.

c) Funciones del calcitriol

Las funciones mejor documentadas del calcitriol indican que es una hormona esencial para el mantenimiento de la homeostasis mineral y del metabolismo óseo [14, 15]. Asimismo, el calcitriol es capaz de regular la diferenciación, proliferación y apoptosis celular por lo que se ha considerado un compuesto importante en la prevención de cáncer [16, 17]. Además, induce la secreción de insulina en células β del páncreas y modula la transcripción génica que involucra el control de otros sistemas hormonales [18-21]. La carencia de esta hormona ocasiona raquitismo, defectos en el desarrollo óseo y muscular, así como diversas alteraciones reproductivas e inmunológicas [22, 23].

Durante el embarazo el calcitriol tiene un papel importante en la mineralización del esqueleto fetal, ya que estimula el paso transplacentario del calcio (Ca^{2+}) [24] y promueve la producción del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de las calbindinas, las cuales son proteínas transportadoras de este mineral [25]. Por otra parte, se ha descrito que el calcitriol estimula la expresión y secreción del hLP en trofoblastos humanos [26], incrementa la expresión de la P450-aromatasa (*CYP19*) en la línea celular de coriocarcinoma JEG-3 [27], induce la síntesis de estrógenos en las gónadas [28] y promueve la expresión de HOXA10 en células endometriales, un gen implicado en procesos de implantación [29]. Adicionalmente, en células naturales asesinas deciduales, se ha demostrado que el calcitriol incrementa la expresión del gen que codifica para el péptido antimicrobiano catelicidina y disminuye la síntesis de citocinas tales como el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos-

2, el factor de necrosis tumoral y la interleucina 6. Por lo anterior, se ha considerado al calcitriol como una hormona supresora del sistema inmunológico en general, y que consecuentemente puede participar en la aceptación del aloinjerto fetal para evitar el rechazo materno [7, 30, 31].

Por otro lado, estudios *in vivo* en donde se ha silenciado la expresión del receptor de la vitamina D (VDR) han demostrado que los ratones mutantes nulos para el gen que codifica para el VDR mostraron características similares al raquitismo tipo II dependiente de vitamina D humana tales como alopecia, hipocalcemia, disminución en la concentración de calbindina D9K, lento crecimiento con un 50% de reducción en el peso corporal comparado con ratones normales, hipofosfatemia e hiperparatiroidismo aunado a defectos esqueléticos. Además los ratones hembra presentan hipoplasia uterina, foliculogénesis anormal, reducida concentración de estrógenos y disminuida tasa de fertilidad [7, 28, 32, 33]. Por otra parte, los ratones mutantes nulos para el gen *CYP27B1*, presentaron un fenotipo similar a los nulos VDR pero sin alopecia y en ambos casos se mostró alteración del sistema inmunológico [34-36]. Lo anterior destaca la participación del calcitriol en diferentes actividades fisiológicas que involucran funciones de carácter reproductivo, inmunológico y de regulación del metabolismo de Ca^{2+} y del fósforo.

d) El calcitriol y el embarazo

A lo largo del embarazo, la concentración de calcitriol en el suero materno se duplica a partir del primer trimestre y se mantiene así hasta llegar a término [37, 38]. Dicho incremento de calcitriol se atribuye a un aumento en la producción renal tanto de la madre como del feto, así como a la contribución placentaria [6]. No obstante, el mayor aporte de calcitriol en el suero durante la gestación es atribuido al funcionamiento del CYP27B1 renal materno [39, 40]; por lo que el calcitriol de origen placentario en este período parece ejercer funciones de naturaleza autocrina o paracrina. Aun cuando existen estudios que indican que es posible el desarrollo de recién nacidos sanos de madres que han cursado su embarazo con bajas concentraciones de calcitriol [41], hay muchos otros que demuestran alteraciones en el desarrollo y crecimiento fetal. A este respecto algunas investigaciones han informado de nacimientos de niños con hipocalcemia, raquitismo neonatal o que lo desarrollaron más tarde y crecimiento intrauterino reducido en casos donde la madre presentaba concentraciones sanguíneas reducidas de vitamina D [42-44]. Además, existen estudios que indican que bajas concentraciones de calcitriol en el suero fetal se asocian con talla pequeña y menor contenido mineral en el recién nacido [45]. Por otro lado, la preeclampsia, una patología del embarazo de etiología desconocida caracterizada por hipertensión, edema y proteinuria, se asocia con bajas concentraciones circulantes de calcitriol [46]; y si bien las causas de esto no se conocen, es probable que esta característica sea consecuencia de deficiencias en la función endocrina de la placenta, del riñón materno o de ambos [47].

e) Mecanismos de acción del calcitriol

El calcitriol es una hormona versátil, capaz de generar respuestas biológicas por mecanismos genómicos o no genómicos [23, 48]. En el primer caso, el calcitriol lleva a cabo sus efectos al unirse con el VDR que pertenece a la familia de receptores nucleares, el cual presenta amplia distribución en diferentes tejidos como el intestino, la glándula paratiroide, el ovario, los testículos y la placenta entre otros [49, 50]. El calcitriol tiene una constante de disociación de 0.1 nM y posee una afinidad por el VDR 1 000 veces mayor que el calcidiol [11, 51]. El acoplamiento del secoesteroide con su receptor permite la dimerización del VDR con otro receptor nuclear conocido como el receptor de retinoide X (RXR) y el heterodímero formado se une a elementos de respuesta para la vitamina D (VDRE) en la región promotora de los genes blanco, (Figura 3). Para la activación transcripcional el VDR y el RXR ocupan el extremo 3' y 5' del VDRE respectivamente [16]. El heterodímero recluta coactivadores y componentes del complejo de inicio de la transcripción, con la finalidad de modular la transcripción de genes específicos [52, 53]. Asimismo, se han caracterizado secuencias que funcionan en genes reprimidos por el calcitriol a través del complejo ternario VDR, RXR y el factor de transcripción llamado VDIR. Considerando lo anterior, el calcitriol modula genómicamente la activación o la represión de la transcripción a través del remodelamiento local de la cromatina de los genes regulados por esta hormona [54]. Los efectos biológicos producidos por esta vía requieren horas o días.

Por otra parte, el calcitriol también induce efectos de tipo no genómicos, que involucran proteínas de membrana que activan diferentes vías de señalización de acción rápida (segundos a minutos), y que no dependen del proceso transcripcional regulado por su receptor nuclear [55, 56]. Al respecto se ha identificado en las membranas basolaterales del intestino de pollo una proteína de unión al calcitriol no relacionado al VDR clásico denominada proteína de unión a esteroides de respuesta rápida asociada a la membrana (MARSS) [57]. Asimismo se ha demostrado la presencia de un receptor de membrana específico para el calcitriol (VDRm) en fracciones de membrana enriquecidas con caveolas en 2 líneas celulares que expresan al VDR nuclear y en diferentes tejidos de pollo, ratón y humano, como el intestino, el riñón y el pulmón [58-60]. Aunque la posibilidad existe, no hay estudios que lo hayan caracterizado en las células de la placenta.

Los cambios generados en las concentraciones de segundos mensajeros como el adenosín monofosfato 3',5'cíclico (AMPc) y el Ca^{2+} son ejemplos de activación iniciada en la membrana celular. En particular, se ha documentado que el calcitriol incrementa las concentraciones intracelulares de AMPc en células del intestino de rata y músculo cardiaco de pollo [61, 62] o de Ca^{2+} en condrocitos y osteoblastos [60, 63, 64].

El incremento de AMPc intracelular es consecuencia de la activación de receptores de membrana acoplados a proteínas Gs, las cuales sufren la disociación de sus subunidades (α , β y γ). La subunidad α activada estimula la adenilato ciclasa que

cataliza la conversión del ATP hacia AMPc. El AMPc es el encargado de activar a la proteína cinasa A (PKA), la cual fosforila proteínas específicas responsables de las respuestas biológicas [65]. Entre las proteínas que se fosforilan por acción de la PKA se encuentran principalmente las proteínas de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB), el factor activador de la transcripción 1 (ATF-1) y la proteína activadora 2 α (AP2 α), que han sido implicados en inducir la expresión de la hCG en células placentarias [66].

Por otra parte, se ha descrito que el calcitriol induce la apertura de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje en células de músculo cardiaco, esquelético y en osteoblastos como un mecanismo inmediato de la acción hormonal [59, 67, 68]. Asimismo, el calcitriol incrementa las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) al interactuar con receptores acoplados a proteínas Gq, para activar la fosfolipasa C (PLC) que hidroliza al fosfatidilinositol, liberando inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol. El IP_3 liberado se une a receptores de membrana del retículo endoplásmico, lo cual promueve la liberación de Ca^{2+} y la subsecuente activación de la proteína cinasa C (PKC), culminando así en diferentes efectos biológicos (Figura 3) [69, 70].

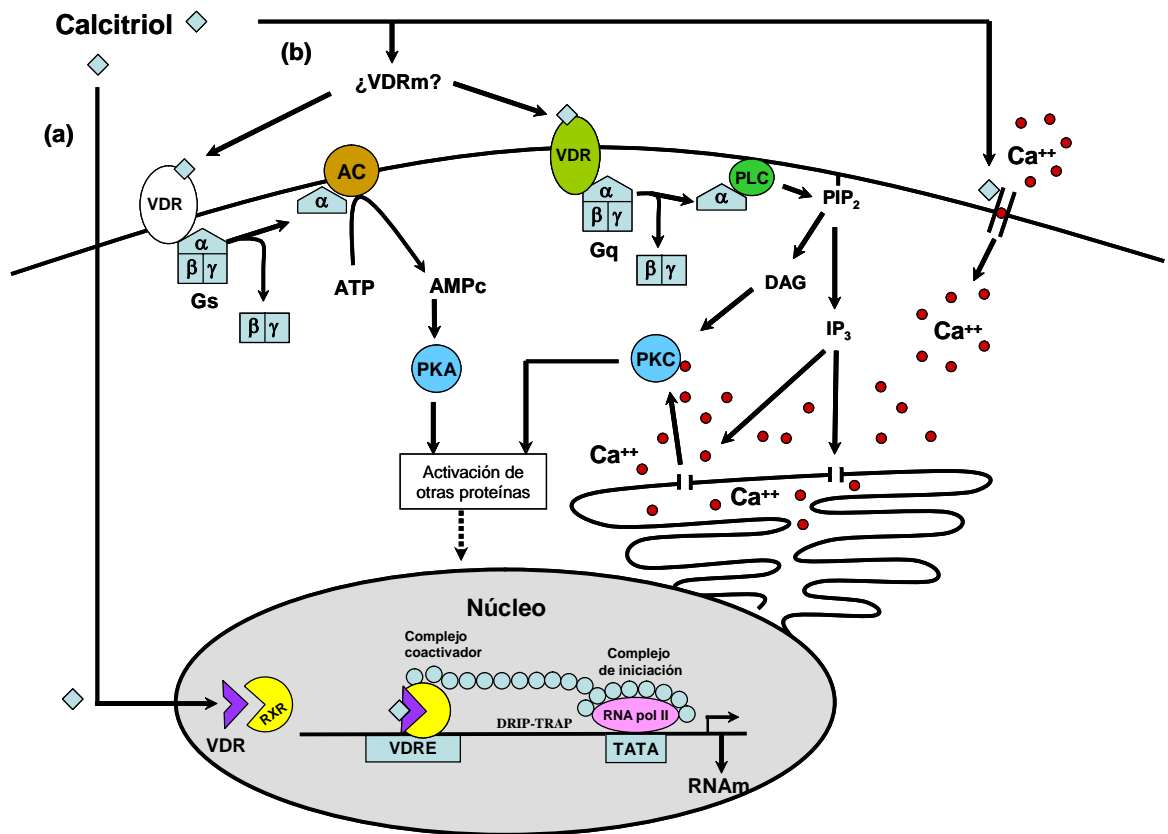


Figura 3. Mecanismo de acción genómico (a) y no genómico (b) del calcitriol. En la primera ruta el calcitriol se une a su receptor nuclear (VDR) y heterodimeriza con el receptor X de retinoides (RXR) para unirse a elementos de respuesta para la vitamina D (VDRE) en genes específicos para modular su actividad transcripcional. En la segunda ruta se plantea la unión del calcitriol con un receptor ubicado en la membrana plasmática (VDRm) acoplado a proteínas G, con lo cual se inicia la activación de la adenilato ciclasa (AC) o de la fosfolipasa c (PLC), y subsecuentemente de PKA por AMPc o de PKC por calcio y/o diacilglicerol (DAG). Asimismo, el calcitriol permite la apertura de los canales de calcio sensibles a voltaje.

Considerando lo anterior, es factible que el calcitriol producido por el trofoblasto [50] induzca efectos de tipo autocrino o paracrino para modular la biosíntesis de otras hormonas importantes para el sostenimiento del embarazo como la hCG, la P_4 y el E_2 tal como se ha documentado para el hLP [26]. Por tal motivo, resulta de interés analizar las características específicas de cada una de estas hormonas.

f) Características generales de la hCG

La hCG es una glicoproteína de 237 aminoácidos (aa) con masa molecular de 38 kDa formada por dos subunidades, una α y otra β codificadas por genes independientes. La actividad biológica de la hCG depende de la integridad y correcto acoplamiento de las dos subunidades. El gen de la subunidad α de hCG ($hCG\alpha$) está localizado en el cromosoma 6q21.1-23 y codifica para un polipéptido de 92 aa que es idéntico a la cadena α de las hormonas folículo estimulante, luteinizante y estimulante de la tiroides. Por su parte, la subunidad β ($hCG\beta$) de 145 aa es rica en residuos de prolina en el dominio carboxilo terminal, lo cual le otorga la especificidad biológica para la interacción con su receptor [71]. La $hCG\alpha$ está codificada por un solo gen mientras que la subunidad β puede ser codificada por seis genes distintos ($hCG\beta$ 1, 2, 3, 5, 7 y 8), localizados en el cromosoma 19q13.3 en una región de 56 kb [72]. En células de la placenta y de coriocarcinoma humano se expresa principalmente la $hCG\beta$ 5 [66].

Se ha demostrado que la hCG es necesaria para evitar la luteólisis, así como para mantener la síntesis y la secreción de P_4 por las células del cuerpo lúteo [73]. Otros estudios mostraron que la hCG promueve la diferenciación de las células placentarias, la angiogénesis e induce la producción de metaloproteinasas específicas de la matriz extracelular que favorecen la invasión de los trofoblastos en el endometrio [74-77]. Asimismo, la hCG en la placenta regula la síntesis de las prostaglandinas y de los estrógenos, la degradación de glucógeno [78], suprime la actividad de algunas enzimas proteolíticas e inhibe la infección de la placenta por el virus de inmunodeficiencia humana [79, 80]. Además, se ha identificado a la hCG como un agente inmunomodulador [81].

Aparte de las funciones descritas, la hCG disminuye la actividad contráctil del miometrio humano provocando la quiescencia uterina requerida para evitar amenazas de aborto [82]. Janssens y cols. [83] mostraron que la administración de la hCG a ratas vírgenes indujo la maduración de las glándulas mamarias y la secreción de leche de forma similar a lo observado durante el embarazo, y proponen que la hCG es importante en la prevención de cáncer de mama. Adicionalmente, la hCG favorece la producción de testosterona y corticoesteroides en los testículos de los fetos masculinos y neonatos [84]. En modelos de ratones mutantes nulos para el gen del receptor hCG/LH se ha observado que los ratones de ambos sexos son infértiles y con características sexuales pobremente desarrolladas [85], destacando su participación en otros eventos reproductivos.

Durante la gestación, la hCG se incrementa de forma lineal en las primeras 9 semanas de gestación, alcanzando en la décima semana valores de hasta 100 000 mUI/mL en el plasma materno. Posteriormente, entre la tercera y la segunda semana antes del parto las concentraciones disminuyen significativamente, a diferencia de otras hormonas como la P_4 o el E_2 cuyas concentraciones no se modifican [86, 87].

g) Características generales de los esteroides

Las progestinas, los andrógenos y los estrógenos son hormonas esteroides sexuales que comprenden un amplio número de moléculas que han sido catalogados de acuerdo a su estructura y su actividad biológica. Estas hormonas son producidas tanto por el hombre como por la mujer en diferentes cantidades. En el embarazo, la biosíntesis de estos esteroides depende de la estrecha interrelación entre la madre, la placenta y el feto, y se le ha atribuido un papel preponderante a la P_4 para mantener la gestación.

La P_4 es una hormona de 21 átomos de carbono con múltiples funciones biológicas relacionadas con eventos reproductivos. En el embarazo es producida inicialmente por el cuerpo lúteo y subsecuentemente por la placenta. La P_4 favorece la diferenciación y decidualización endometrial creando un ambiente propicio para el proceso de la implantación [88]. Por otra parte, de manera similar a la hCG, la P_4 inhibe las contracciones uterinas, un efecto opuesto al ejercido por los estrógenos, las prostaglandinas y la oxitocina. También disminuye las conexiones gap, estimula

la actividad de la oxido nítrico sintasa uterina y ejerce un efecto supresor sobre la secreción de citocinas y el factor inhibidor de la leucemia [89-92].

Aunque la placenta es el principal productor de la P_4 a lo largo de la gestación, cabe señalar que este órgano presenta limitada capacidad para biosintetizar al colesterol, el cual es el precursor de las hormonas esteroides. Por consiguiente, la placenta obtiene al colesterol a partir de la captura de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) provenientes de la circulación materna. El colesterol capturado es catalizado por la P450_{scc} (de las siglas en inglés *side chain cleavage*) para la conversión a pregnenolona (PREG) [93] y posteriormente, por la acción de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo I (3 β -HSDI) la PREG se convierte en P_4 , (Figura 4).

Referente a los andrógenos, se cuenta con escasas evidencias sobre su participación en procesos fisiológicos en la mujer durante el embarazo y se han considerado sólo como metabolitos intermediarios para la síntesis de los estrógenos.

En cuanto a los estrógenos, esteroides de 18 carbonos, está descrito que favorecen el flujo uteroplacentario y la neovascularización; en las células de la placenta promueven la captura de LDL para facilitar la esteroidogénesis y estimulan la actividad del citocromo P450_{scc} incrementando así la síntesis de la P_4 [94-96]. Además, los estrógenos están involucrados en el incremento de la concentración de varios agentes uterotónicos, como las prostaglandinas E_2 y $F_{2\alpha}$ [97] e inducen la síntesis de canales iónicos y la concentración de los receptores a oxitocina en el

tejido miometrial [98, 99]. Adicionalmente, en la placenta los estrógenos favorecen la conversión de cortisol materno a cortisona, lo que conlleva a la síntesis de novo de cortisol fetal para la maduración del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal del feto [88].

En el embarazo, la producción de estrógenos depende de la aromatización de los precursores con 19 carbonos (andrógenos) que provienen principalmente del compartimento fetal, los cuales se biotransforman en la placenta por acción de la sulfatasa que elimina el grupo sulfato del sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS) e inmediatamente la enzima P450 aromatasa (CYP19) realiza la aromatización del anillo A del núcleo esteroide [100, 101], (Figura 4).

Las concentraciones en el suero materno de la P_4 y del E_2 se incrementan de forma lineal conforme avanzan las semanas de gestación alcanzando al término del embarazo valores entre 150 a 175 ng/mL y de 15 a 17 ng/mL, respectivamente [86, 88].

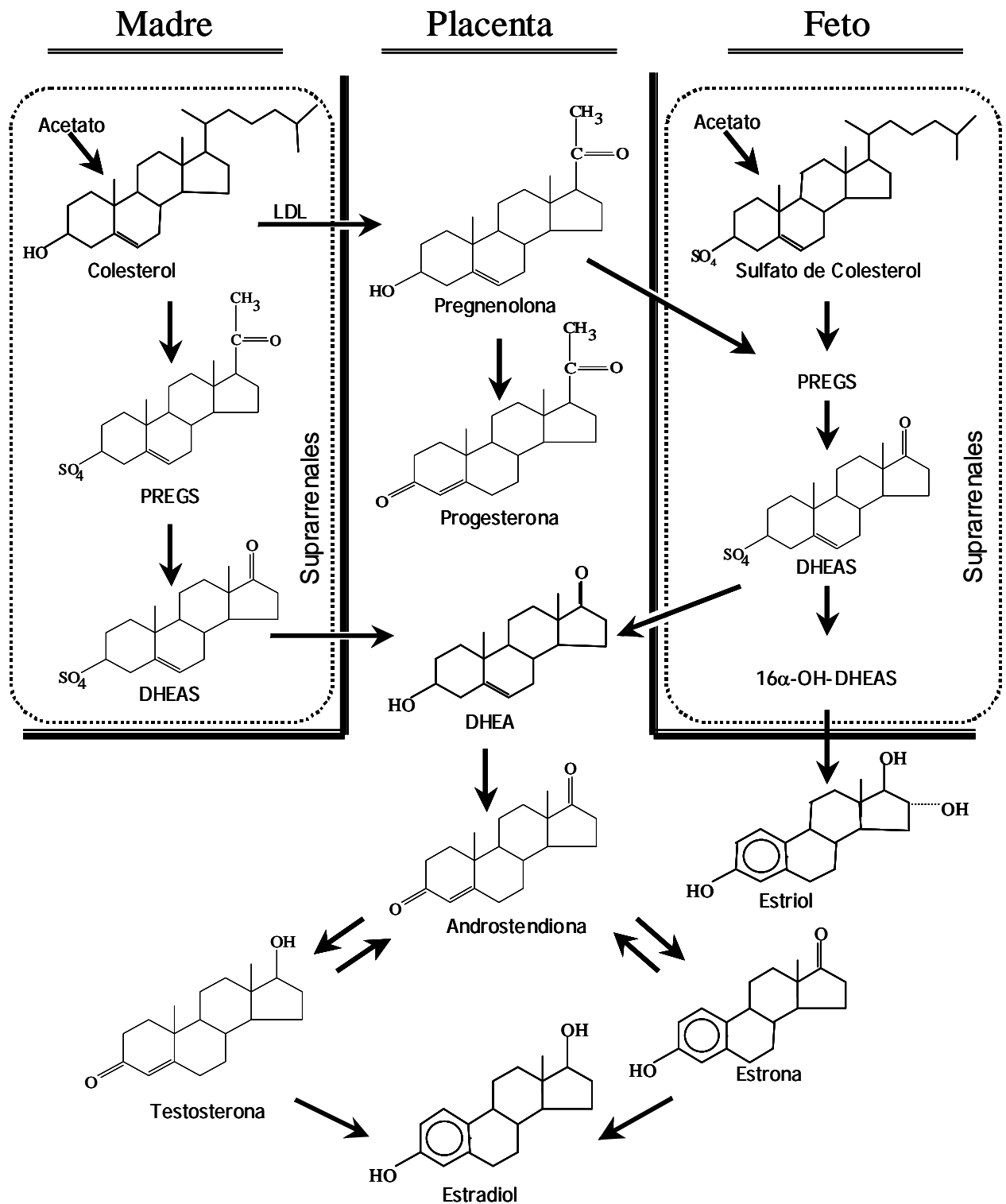


Figura 4. Ruta de síntesis de la P₄ y el E₂ en la placenta. Se muestra la estrecha relación madre-placenta-feto, que involucra los procesos de transporte y biosíntesis de los esteroides entre los compartimentos. PREGS: Sulfato de pregnenolona, DHEAS: sulfato de dehidroepiandrosterona.

h) Regulación hormonal

La producción de las hormonas tanto glicoprotéicas como esteroides está sometida a una regulación compleja y multifactorial, donde diferentes moléculas inducen o reprimen diversas vías de señalización para modular la cantidad adecuada de cada hormona en un embarazo normal [66, 102].

En general, se ha demostrado en células de trofoblasto y líneas celulares de coriocarcinoma humano que la síntesis de la hCG se induce por AMPc y Ca^{2+} [73, 103]. Asimismo, se ha descrito que el metabolito activo del ácido retinoico (AR), el 9-cis AR, compuestos sintéticos del AR, agonistas específicos del $RXR\alpha$ y la rosiglitazona, la cual provoca la heterodimerización entre el $RXR\alpha$ y el receptor activado por los proliferadores de peroxisomas ($PPAR\gamma$ / $RXR\alpha$), inducen la producción de la hCG [104, 105]. Considerando que los RXRs (α , β y γ) pueden acoplarse también con el VDR [106], la posibilidad de que el cacitriol module la síntesis de la hCG por esta vía en la placenta humana es alta.

Por otra parte, se acepta que la producción de hormonas esteroides es a través del incremento en las concentraciones intracelulares del AMPc [107]. Sin embargo, los ligandos implicados en la producción de AMPc en la placenta no son del todo conocidos. La biosíntesis de los esteroides depende de la expresión y actividad de las enzimas esteroideogénicas, las cuales se encuentran estrechamente reguladas de una forma tejido específico (Tabla 1). Como se describió y se esquematiza en la Figura 4, la síntesis de P_4 a partir de PREG en la placenta depende de la actividad de

la 3 β -HSDI. La 3 β -HSDI es una proteína de 372 aa ubicada en la mitocondria y en el retículo endoplásmico (Tabla 1), la cual provoca el cambio del grupo 3-hidroxilo a 3-ceto y modula la isomerización del doble enlace $\Delta 5$ hacia $\Delta 4$ [108]. En el ser humano, el gen de la enzima se localiza en el cromosoma 1p13.1 conformado de 4 exones que en conjunto constituyen un fragmento de 7.8 kb [102, 109]. Trabajos realizados en la línea celular JEG-3, han demostrado que la expresión del gen de la 3 β -HSDI (*HSD3B1*) es estimulada por análogos del AMPc y ésteres de forbol, con efecto sinérgico al ser adicionados simultáneamente [110]. Lo anterior muestra que las vías de la PKA y PKC son rutas clave en la producción de la enzima. Dichas vías de señalización son moduladas por el calcitriol en diversos tipos celulares [59, 60, 70].

Por otra parte, la enzima encargada de aromatizar el anillo A de los estrógenos (CYP19), es una proteína que consta de 503 aa con masa molecular de 58 kDa que se ubica en el retículo endoplásmico de las células productoras de estrógenos, (Tabla 1). El CYP19 se origina de un gen de copia única que se localiza en el cromosoma 15q21.1 [111]. El gen contiene 10 exones, de los cuales 9 implican la región codificante como consecuencia del mecanismo de corte y empalme alternativo (Tabla 1). En las células placentarias, el *CYP19* contiene al exón I.1 encontrado a 89 kb río arriba del exón II. Aunque poco se sabe acerca de su regulación, se ha descrito que además del AMPc, su actividad se incrementa en presencia de ligandos para los receptores RXR y RAR, así como para el VDR en la línea celular JEG-3, y se ha caracterizado un elemento en el promotor del exón I.1 como responsable de

inducir la expresión del *CYP19* por estos compuestos. Dicho elemento se ha catalogado como un lugar de unión atípico para el VDR [27, 102]. Considerando lo anterior, este proyecto contempla el estudio de las acciones del calcitriol sobre la regulación de la síntesis y secreción de hormonas clave en el mantenimiento del embarazo.

Tabla 1. Datos específicos de la 3 β -HSD y del CYP19.

Gen	Nombre de la proteína (masa molecular)	Sinónimos	Expresión tejido específico	Localización subcelular
<i>HSD3B1</i>	3 β -HSDI (42 kDa)	3 β -HSD tipo 1, 3 β -HSD/ Δ 5- Δ 4 isomerasa, 3 β -hidroxi esteroide deshidrogenasa, 3 β -hidroxi 5 ene esteroide	Placenta, glándula mamaria, piel y próstata	Retículo endoplásmico liso y mitocondria
<i>HSD3B2</i>	3 β -HSD2 (42 kDa)	Igual al anterior	Ovario, células de Leydig, y glándula suprarrenal	Retículo endoplásmico liso y mitocondria
<i>CYP19</i> Producto de un mismo gen	CYP19 (58 kDa)	Aromatasa, P450arom, citocromo P450arom, estrógeno sintetasa	Corte y empalme dependiente del tejido: El exón I.1 es el específico de la placenta El exón I.4 determina la expresión en tejido adiposo, piel y hueso El exón I.f es específico del cerebro El exón I.3 se ubica en cáncer de mama y tejido adiposo El promotor II proximal determina la expresión en el ovario (células de la granulosa)	Retículo endoplásmico liso

Tabla modificada (Payne AH y Hales DB, 2004 [102]).

IV. JUSTIFICACIÓN

El metabolismo placentario de la vitamina D constituye una línea de investigación activa en nuestro laboratorio [6, 47, 112, 113], en donde se ha demostrado la producción de calcitriol en cultivos de trofoblastos así como la regulación del CYP27B1 por diversos factores; sin embargo, los estudios encaminados a indagar el papel de esta hormona en la placenta son escasos. Se sabe de la presencia de receptores para el calcitriol en el trofoblasto [50], lo cual sugiere funciones específicas de esta hormona en la placenta. Es por ello que el presente estudio analiza la participación del calcitriol sobre la síntesis de la hCG, la P_4 y el E_2 en trofoblastos humanos en cultivo. Los resultados de esta investigación conducirán al esclarecimiento de algunas funciones biológicas del calcitriol en la placenta.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el efecto del calcitriol sobre la producción de hormonas placentarias en un modelo de trofoblastos humanos en cultivo.

Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto del calcitriol sobre la expresión y secreción de la hCG en células de trofoblasto humano en cultivo.
2. Estudiar el efecto del calcitriol sobre las concentraciones intracelulares del AMPc en el trofoblasto.
3. Caracterizar el efecto del calcitriol sobre la secreción de las hormonas esteroides P₄ y E₂ en el trofoblasto.
4. Estudiar el efecto del calcitriol sobre la expresión de las enzimas esteroidogénicas *HSD3B1* y *CYP19* en el trofoblasto.

VI. HIPÓTESIS

1.- Tomando en cuenta que la placenta humana produce calcitriol y considerando la acción que induce esta hormona sobre la actividad endocrinológica en otros sistemas mediante mecanismos genómicos y no genómicos, es factible que el calcitriol regule la producción de la hCG, la P_4 y el E_2 en los trofoblastos humanos en cultivo.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

El calcitriol utilizado en este estudio fue donado por Hoffmann-La Roche Ltd (Basilea, Suiza).

Los reactivos obtenidos de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EEUU) fueron:

La pregnenolona (PREG; 3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona), la androstendiona (androstan-4-ene-3,17-diona), el monofosfato 3'5'-cíclico de 8-bromoadenosina (8Br-AMPc), el diclorhidrato de N-[2-(p-bromocinamilamino)etil]-5-isoquinolina sulfonamida (H89), la 3-Isobutil-1-metilxantina (IBMX), el éster tirosilmetílico del AMPc 2'-O-monosuccinilado, la tripsina, la desoxirribonucleasa I (Dnasa I), el Percoll, la albúmina de suero bovino (BSA), el etanol absoluto y el reactivo de Bradford.

Los reactivos obtenidos de Invitrogen, (EEUU) fueron:

El suero fetal de ternera (SFT), la penicilina, la estreptomina, la anfotericina, los medios de cultivo, Dulbecco alto en glucosa (DMEM-HG), Dulbecco con CaCl₂ 1 mM y 1 mM NaH₂PO₄ (DMEM-F12), las sales balanceadas de Hank's (HBSS) y el Trizol.

Los reactivos obtenidos de Roche (Roche Applied Science, IN, USA) fueron:

Las sondas TaqMan, el estuche comercial *Light Cycler Taqman Master*, el estuche para la retrotranscripción *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* y los capilares de vidrio de 20 μ L para el termociclador *LightCycler® 2.0*.

De immunometrics Ltd. (London, UK) se obtuvo el estuche comercial de ensayo inmunoenzimático (EIA) para detectar la hCG.

De *Diagnostic Products Corporation*, se obtuvieron los estuches DPC Coat-A-Count (Los Angeles, CA), para cuantificar P_4 y E_2 por radioinmunoanálisis (RIA).

Material biológico

En este estudio se utilizaron placentas humanas a término, las cuales fueron obtenidas previo consentimiento informado de pacientes sometidas a operación cesárea y previa aprobación del comité de ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", así como del Hospital de Gineco Obstetricia "Luis Castelazo Ayala" del Instituto Mexicano del Seguro Social donde fueron colectadas (ver anexo). Las placentas fueron obtenidas de embarazos normales de mujeres con edad biológica entre 18 a 35 años y edad gestacional \geq a 37 semanas.

Cultivo de trofoblastos humanos

El cultivo de trofoblastos se llevó a cabo mediante algunas modificaciones a los lineamientos establecidos por Kliman y cols. [114], y el procedimiento general se describe a continuación: después de la obtención de la placenta y su traslado al laboratorio, con ayuda de material de cirugía se obtuvieron los cotiledones placentarios, los cuales fueron sometidos a lavados con solución salina 0.9 % a temperatura ambiente con la finalidad de eliminar el exceso de sangre. Enseguida se eliminaron las membranas corioamnióticas, el tejido decidual y los vasos sanguíneos. Posteriormente, se pesaron 50 g del tejido y se procesaron mediante 3 digestiones enzimáticas con tripsina y Dnasa I en HBSS libre de Ca^{2+} y magnesio como se muestra en la Tabla 2. Para recuperar las células se colectó el sobrenadante de las digestiones y se centrifugó a 1457.68 gravedades (x g) (centrífuga Sorvall RT7, USA).

Tabla 2. Procedimiento para realizar la digestión enzimática.

Digestión	HBSS 1x	Tripsina (1 mg / 5μL)	Dnasa μL (1 mg / 24.15 μL)	Incubación (37°C)	Centrifugación (x g / min)
1	150 mL	850 μ L	150 μ L	20 min	1457 / 10
2	100 mL	550 μ L	100 μ L	20 min	1457 / 10
3	75 mL	350 μ L	75 μ L	20 min	1457 / 10

La pastilla celular resultante se resuspendió en 600 μ L de DMEM-HG. La suspensión celular se colocó sobre un gradiente continuo de Percoll 5-70% en HBSS previamente elaborado (Tabla 3), y se centrifugó a 1457 x g durante 20 minutos. Los citotrofoblastos recuperados de la banda intermedia cuya densidad osciló entre 1.048 y 1.062 g/mL, se lavaron con medio DMEM-HG. Inmediatamente, se contó el número total de células y se sembraron en cajas de cultivo de 6 pozos a razón de 800,000 células por pozo y 3,000,000 de células por caja de 25 cm² en medio DMEM-HG suplementado con penicilina 100 U/mL, estreptomycin 0.1 mg/mL, anfotericina B 0.25 μ g/mL y SFT al 20 % inactivado previamente a 56°C por 45 min. Las células se incubaron en atmósfera húmeda con aire (95%) y CO₂ (5%) a 37°C. Después de 24 horas de la siembra las células se lavaron con HSSB 1x y se cambió el medio con nuevo DMEM-HG suplementado. A las 48 horas del cultivo se cambió el medio por DMEM-F12 sin SFT para realizar los diferentes tratamientos.

Tabla 3. Montaje del gradiente de percoll

No. de tubo (12 x 75 mm)	Percoll al 90 %* (mL)	HBSS 1x (mL)	% de Percoll
1	2.33	0.67	70
2	2.17	0.83	65
3	2.00	1.00	60
4	1.83	1.17	55
5	1.67	1.33	50
6	1.50	1.50	45
7	1.33	1.67	40
8	1.17	1.83	35
9	1.00	2.00	30
10	0.83	2.17	25
11	0.67	2.33	20
12	0.50	2.50	15
13	0.33	2.67	10
14	0.17	2.83	5

* El Percoll al 90 % se preparó previamente adicionando 18 mL de Percoll + 2 mL de HBSS 10x. Con ayuda de una bomba peristáltica se hizo fluir el contenido de cada tubo (del tubo 1 al 14) en un tubo de 50 mL.

Evaluación del calcitriol sobre hCG, P₄ y E₂

Con el propósito de estudiar el efecto del calcitriol sobre la secreción de la hCG, la P₄ y el E₂, se incubaron los sinciotrofoblastos en medio DMEM-F12 libre de suero fetal con diferentes concentraciones de calcitriol (1×10^{-11} a 1×10^{-7} M) o su vehículo (vh; etanol) cuya concentración final en pozo fue de 0.1 %. La determinación de la hCG se realizó por EIA mientras que la secreción de la P₄ y el E₂ (previa incubación de las células en presencia de sus precursores) se analizó por RIA. Por otra parte, las células se procesaron para los estudios de expresión génica de *hCGβ5*, *HSD3B1* y *CYP19*. Cada metodología se describe con más detalle a continuación.

Inmunodetección de la hCG

Se cuantificó la hCG secretada por los sinciciotrofblastos incubados con las diferentes concentraciones de calcitriol o su veh, en alícuotas del medio colectadas 6, 12, 24 y 48 horas posteriores al tratamiento. Asimismo, con la finalidad de indagar si la vía de la PKA estaba involucrada en el mecanismo de acción del calcitriol, se incubaron las células en presencia de un análogo del AMPc; el 8Br-AMPc (0.6 mM) y un inhibidor selectivo de la PKA; el H89 (5 μ M).

La inmunodetección de hCG se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. El procedimiento general consistió en la interacción de la hormona con dos anticuerpos monoclonales anti-hCG mediante un procedimiento tipo "sandwich" (Tabla 4). El primer anticuerpo unido a una partícula magnética fue específico para la región carboxilo terminal de la cadena β de la hCG. Después de incubar la muestra con el primer anticuerpo, se colocaron los tubos sobre una gradilla magnética para realizar los lavados y así eliminar los componentes diferentes a la hCG. Posteriormente, se adicionó el segundo anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina que reconoce la hCG previamente unida a las partículas magnéticas. Al término de la incubación y después de 2 lavados, se agregó el sustrato, cuya reacción con la enzima mostró un cambio de color amarillo a rosa proporcional a la cantidad de la hCG presente en la muestra como consecuencia de la desfosforilación del sustrato. Al cabo de la incubación la adición de la solución de paro detuvo la reacción. Posteriormente se determinó la densidad óptica de la curva estándar de la hCG (0, 8, 14, 65, 250 y 900

UI/L) y de las muestras a 550 nm en un espectrofotómetro (Clima Plus 1093, Europa) previamente calibrado.

Tabla 4. Ensayo inmunoenzimático tipo “sándwich” para determinar a la hCG.

hCG UI/L	μL	min	Lavado*	μL	min	Lavado*	μL	min	mL
Calibradores (0-900)	100	15 (37°C)	2						
Muestra									
Primer anticuerpo									
Segundo anticuerpo				250	60 (37°C)	2			
Sustrato							500	30 (37°C)	
Solución de paro									1

* La placa se lava con 500 μL de solución de lavado.

Cuantificación de la P₄ y el E₂

Para la cuantificación de las hormonas esteroides los sinciciotrofbastos se incubaron con las diferentes concentraciones de calcitriol o su vehículo 18 horas antes de adicionar a los precursores PREG o androstendiona a la concentración equimolecular de 1×10^{-7} M, para evaluar la bioconversión a P₄ o E₂, respectivamente. La evaluación del efecto se realizó 6 horas después de la adición de los precursores. Asimismo, se realizaron preincubaciones de las células con el 8Br-AMPC (0.6 mM) o el H89 (5 μ M).

Radioinmunoensayo de los esteroides

Para determinar la cantidad producida de la P₄ o el E₂ en los cultivos, se analizaron las muestras mediante radioinmunoensayo de fase sólida, donde la hormona marcada con I¹²⁵ compite con la de la muestra por sitios de unión al anticuerpo durante un tiempo fijo. Debido a que el anticuerpo está inmovilizado en la pared de un tubo de polipropileno, la simple decantación del sobrenadante es suficiente para terminar con la competencia (Tabla 5). La lectura de cada tubo en un contador gamma (Cristal Plus multidetector RIA system, Packard Instrument Company, EEUU), proporciona un número que se convierte por medio de una curva de calibración en una medida de la concentración de hormona presente en la muestra.

Tabla 5. Procedimiento para realizar el RIA para la detección de P₄ o E₂.

P ₄	ng/mL	μL	Tiempo	E ₂	pg/mL	μL
Calibradores			Después de la adición de todos los componentes el tiempo de incubación fue de 3 horas.	Calibradores		
A	0	100		A	0	100
B	0.1	"		B	20	"
C	0.5	"		C	50	"
D	2	"		D	150	"
E	10	"		E	500	"
F	20	"		F	1800	"
G	40	"	G	3600	"	
Muestras	---	100		Muestras	---	100
P ₄ marcada con I ¹²⁵	---	1000		E ₂ marcado con I ¹²⁵	---	1000

Cuantificación del AMPc intracelular

La acumulación del AMPc intracelular en los trofoblastos en cultivo en ausencia y presencia de calcitriol, se determinó por RIA utilizando un anticuerpo anti-AMPc (Calbiochem, EEUU) [115]. El ensayo consistió en la incubación de los sinciotrofoblastos en presencia de las diferentes concentraciones de calcitriol o su vehículo durante 10 minutos. Posteriormente se retiró el medio y se adicionó a cada pozo 500 μL de la solución de lisis (9.1 mM de fosfato de sodio dibásico, 1.7 mM de fosfato de sodio monobásico, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, pH 7.4) con IBMX (0.1 mM) para romper las células y liberar el AMPc. Con la finalidad de inactivar a las fosfodiesterasas, los homogenados celulares fueron calentados inmediatamente a 95°C durante 5 minutos. Los extractos celulares, así como la sal de sodio del AMPc utilizada como estándar, fueron diluidas en acetato de sodio 5 mM (pH 4.7) y acetiladas con una mezcla de 2:1 de trietilamina y anhídrido acético.

Las muestras se incubaron durante 18 horas a 4°C en presencia del anticuerpo anti-AMPc 1:3 000 en solución de acetato de sodio 50 mM pH 6.1 con BSA 0.1%. El éster tirosilmetílico del AMPc 2'-O-monosuccinilado marcado con I¹²⁵ (Amersham Pharmacia Biotech) por el método de cloramina T [116], se purificó en una columna de dietilaminoetil-celulosa. El trazador fue utilizado a razón de 10 000 cpm por tubo. Después de 18 horas a 4°C, se determinó la radioactividad presente en los precipitados mediante el contador gamma.

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Con la finalidad de contar con un parámetro de normalización para los datos obtenidos se evaluó el contenido de proteína total en pozo mediante el método establecido por Bradford en 1976 [117]. Así, posterior a la toma de alícuotas y aspiración total del medio, a cada pozo se le adicionaron 500 µL de solución de lisis, se homogenizaron y con ayuda de un raspador se colectó la proteína, la cual se sometió al ensayo utilizando BSA para realizar la curva estándar (Tabla 6). El principio de este método consiste en que el reactivo de Bradford de coloración café produce diferentes tonalidades de color azul cuando reacciona con las proteínas de las muestras, cuya intensidad es proporcional a la concentración de las proteínas presentes. La lectura de la absorbancia se determinó a la longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro (Labsystems 352, USA).

Tabla 6. Concentraciones de la curva y dilución utilizada de las muestras para determinar la proteína total por pozo.

Proteína total	Concentración ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	μL por pozo
Calibradores BSA [200 $\mu\text{g} / \text{mL}$]	0.0	0
	0.4	2
	0.6	3
	0.8	4
	1.0	5
	1.5	7.5
	2.0	10
	2.5	12.5
Muestra	1:3	5
Reactivo de Bradford	200	200

Estudios de expresión génica

Con el propósito de correlacionar la secreción de las hormonas de interés con la expresión de los genes involucrados, paralelamente se cuantificó la expresión de *hCG β 5*, *HSD3B1* y *CYP19*. Se eligió estudiar el RNAm de la *hCG β 5* por ser el gen que más se expresa en la placenta en relación con los otros 5 que codifican para la *hCG β* . La *HSD3B1* se eligió como indicador del efecto del calcitriol sobre la síntesis de la P_4 , considerando que esta enzima convierte a la PREG a P_4 [88]. Para el E_2 se eligió estudiar el gen *CYP19*, ya que cataliza la biosíntesis de andrógenos hacia estrógenos [100]. Asimismo, se eligió evaluar la expresión del *CYP24A1* como control biológico de la respuesta al calcitriol. Además, para controlar la eficiencia de la reacción y contar con un parámetro para normalizar los resultados, se amplificó el gen constitutivo gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Para evaluar la expresión de cada gen se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1) Extracción del RNAm

Brevemente: Para extraer el RNA de los sinciciotrofoblastos cultivados en cajas de 25 cm² se utilizó *Trizol* como reactivo comercial, de acuerdo a la técnica derivada de Chomczynski y Sacchi [118] (Tabla 7). El *Trizol* disolvió los componentes celulares y permitió la extracción de los RNAs preservando su integridad. Así, las células en presencia de 1 mL de *Trizol* fueron raspadas y colectadas en tubos Eppendorf de 1.5 mL, a los cuales se les adicionó cloroformo frío, se agitaron y centrifugaron (microcentrífuga Eppendorf 5417R, USA), para la formación de una fase acuosa y una fase orgánica. La fase acuosa que contenía al RNA se transfirió a tubos nuevos, y el RNA se precipitó con isopropanol mediante centrifugación, el sobrenadante se descartó y el precipitado conteniendo el RNA fue centrifugado con etanol al 75%. Al término, se invirtieron los tubos para evaporar el etanol residual y finalmente se disolvió el RNA obtenido en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

Tabla 7. Ensayo para la extracción del RNA por Trizol

RNA	Muestra (ж)	Centrifugación a 4°C (x g / min)		
Trizol	1000 μL	13 672 / 20		
Cloroformo	200 μL			
Isopropanol	Recuperar fase clorofórmica	500 μL	17 302 / 20	
Incubar por 1 hora a 4°C				
Etanol al 70%			500 μL	13 672 / 20
Agua tratada con DEPC				20 μL

(ж) Cada muestra contenía 3 X 10⁶ células por caja de 25 cm²

La cantidad y pureza del RNA de cada muestra se cuantificó con ayuda de una celda de cuarzo y un espectrofotómetro (Beckman DU-6, USA) calibrado con absorbancia de 260 y 280 nm. La concentración final del RNA se calculó tomando en cuenta que una absorbancia con valor de 1 equivale a 40 μg/mL. Considerando que en el estudio se utilizaron 2 μL de muestra del RNA diluida en 1 mL de agua desionizada estéril, la concentración de RNA para cada muestra sería:

$$\text{Concentración de RNA (en } \mu\text{g}/\mu\text{L)} = A_{260 \text{ nm}} \times 40/2 = A_{260 \text{ nm}} \times 20$$

1) Transcripción reversa

Para la generación del ácido desoxiribonucleico complementario (ADNc), se utilizó el RNA total de cada muestra, la transcriptasa reversa (RT) y el oligo-dT, siguiendo las indicaciones del estuche comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* y utilizando el termociclador, Perkin-Elmer 9600, previamente programado (Tabla 8).

Tabla 8. Protocolo para obtener ADNc

ADNc	Muestra	Temperatura °C / minutos		
RNA	1 µg	65 / 10		
Oligo-dT (50 µM)	1 µL			
Agua	cbp 15 µL			
	Enfriamiento en hielo por 1 min			
Mezcla (+)		7 µL	55 / 30	85 / 5

(+) Previamente se preparó un volumen de mezcla RT suficiente para el número total de muestras. Para cada muestra, se agregaron 4 µL de amortiguador 5x, 0.5 µL de inhibidor de Rnasa (40 U / µL), 2 µL de una mezcla de los cuatro desoxiribonucleótidos (dNTPs, 10 mM c/u) y 0.5 µL de transcriptasa reversa (20 U / µL).

Con el ADNc se llevó a cabo la amplificación en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) que se describe a continuación.

2) Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

El qPCR es una técnica que permite la amplificación y la cuantificación del gen de forma simultánea. Esta técnica utiliza sondas de hidrólisis que vienen marcadas con un fluorocromo donador ubicado en el extremo 5' de la sonda que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor localizado en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador solo si se encuentran espacialmente próximas, es decir, cuando la sonda se encuentra íntegra, el donador no emite fluorescencia. La sonda es complementaria a un segmento del gen de interés. Durante el proceso de amplificación el desplazamiento de la DNA polimerasa que tiene actividad 5' exonucleasa desplaza por hidrólisis la sonda a partir del extremo 5' liberando al

donador, los nucleótidos y al aceptor. De esta manera, el donador libre y espacialmente alejada del aceptor, emite fluorescencia que es captada por un lector con una intensidad de emisión proporcional a la cantidad de amplicones generados en cada ciclo.

Para realizar el qPCR se utilizó el estuche comercial *Light Cycler Taqman Master* de Roche. Cada ADNc fue amplificado en un volumen final de 10 μL , utilizando una mezcla de reacción que contenía para cada 2 μL de muestra: 5.7 μL de agua grado PCR, 0.1 μL de sonda + 0.1 μL de iniciador (primer) sentido + 0.1 μL de iniciador antisentido + 2 μL de DNA polimerasa Taqman (*Master Mix*, 5x conc.). La mezcla se colocó en capilares de vidrio, los cuales se centrifugaron a 95 x g a 4°C por 1 minuto y se colocaron en el termociclador, *LightCycler® 2.0*, previamente programado para realizar la qPCR según las características que se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Protocolo de amplificación del ADNc por qPCR

Ciclos	T (°C)	Suceso	Segundos
1	95	Activación de la TaqMan y desnaturalización inicial del DNAc	600
45	95 60 72	Desnaturalización el DNAc Alineamiento Alargamiento	10 30 1
1	40	Enfriamiento	10

Para llevar a cabo el diseño de las secuencias de los iniciadores y las sondas específicas para cada gen se utilizó el *Universal Probe Library Assay Design Center* de Roche (<https://roche-applied-science.com/index.jsp>), con el cual se adquirieron las secuencias mostradas en la Tabla 10.

Tabla 10. Secuencia de los iniciadores y sondas de hidrólisis utilizadas para cada gen así como algunas características particulares.

Producto	Secuencia	Orientación	Amplicón	No. sonda
<i>HCGβ5</i>	gct cac ccc agc atc cta t cag cag caa cag cag cag	Sentido Antisentido	131 nt	79
<i>HSD3B1</i>	cgg acc aga att gag aga gg gaa tgg ctc atc cag aat gtc	Sentido Antisentido	88 nt	11
<i>CYP19</i>	gaa ttc atg cga gtc tgg atc t tca tta tgt gga aca tac ttg agg a	Sentido Antisentido	56 nt	55
<i>CYP24A1</i>	cat cat ggc cat caa aac aa gca gct cga ctg gag tga c	Sentido Antisentido	65 nt	88
<i>GAPDH</i>	agc cac atc gct gag aca c gcc caa tac gac caa atc c	Sentido Antisentido	66 nt	60

Análisis de los datos

Los datos obtenidos de la secreción de las hormonas se expresaron como la media \pm la desviación estándar. Los datos de la expresión se graficaron como la media \pm el error estándar. El significado estadístico se determinó mediante las pruebas estadísticas de *t* de Student y U de Mann-Whitney respectivamente. Las diferencias entre los tratamientos se consideraron significativas cuando el valor de $P < 0.05$.

VIII. RESULTADOS

Morfología celular

La fusión celular es un evento restringido solo a cierto tipo de células especializadas entre las cuales se incluyen a las células placentarias [119]. Este proceso se puede apreciar mediante microscopía óptica y sirve como índice de diferenciación y viabilidad celular. Como se observa en la Figura 5, el proceso de diferenciación de los citotrofbastos cultivados hacia sinciotrofbastos se examinó diariamente durante 3 días. La formación de sincicios fue paulatina conforme avanzaba el tiempo, observándose que después de 24 horas de cultivo las células presentaron proyecciones citoplasmáticas que les permiten fusionarse entre células vecinas para formar células multinucleadas que fueron apreciadas desde las 48 horas de la siembra. Los sinciotrofbastos formados adquieren características endocrinológicas únicas con mayor producción hormonal que las células de citotrofblasto y su diferenciación es un proceso dependiente de AMPc [114].

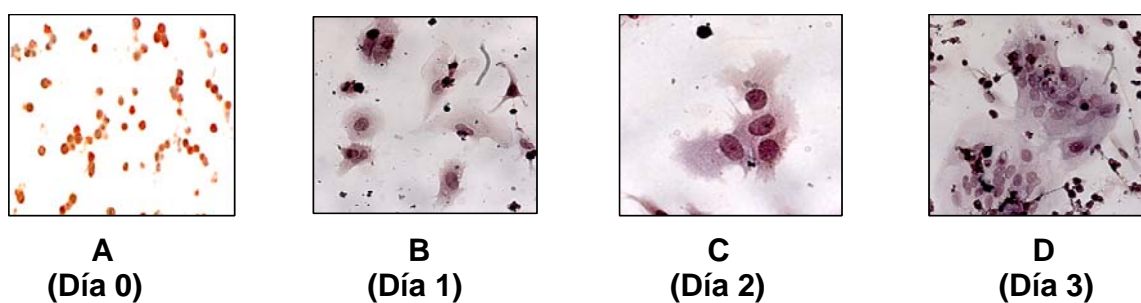


Figura 5. Diferenciación celular de citotrofblasto mononuclear hacia sinciotrofblasto multinuclear. A) Células de citotrofblasto, B) Proyecciones citoplasmáticas típicas para iniciar la fusión celular, C) Formación de sinciotrofbastos multinucleados y D) Sinciotrofblasto de 72 h.

Funcionalidad celular

La funcionalidad endocrina de las células se determinó a las 24, 48 y 72 horas del cultivo, mediante el estudio de su capacidad para secretar a la hCG en presencia o ausencia de un análogo del AMPc permeable a la membrana celular: el 8Br-AMPc.

Como se muestra en la Figura 6, la secreción de la hCG se incrementó significativamente durante el proceso de citodiferenciación en condiciones basales.

En presencia del 8Br-AMPc la secreción de la hCG se incrementó significativamente en cada día del cultivo al compararse con el valor obtenido en ausencia del análogo.

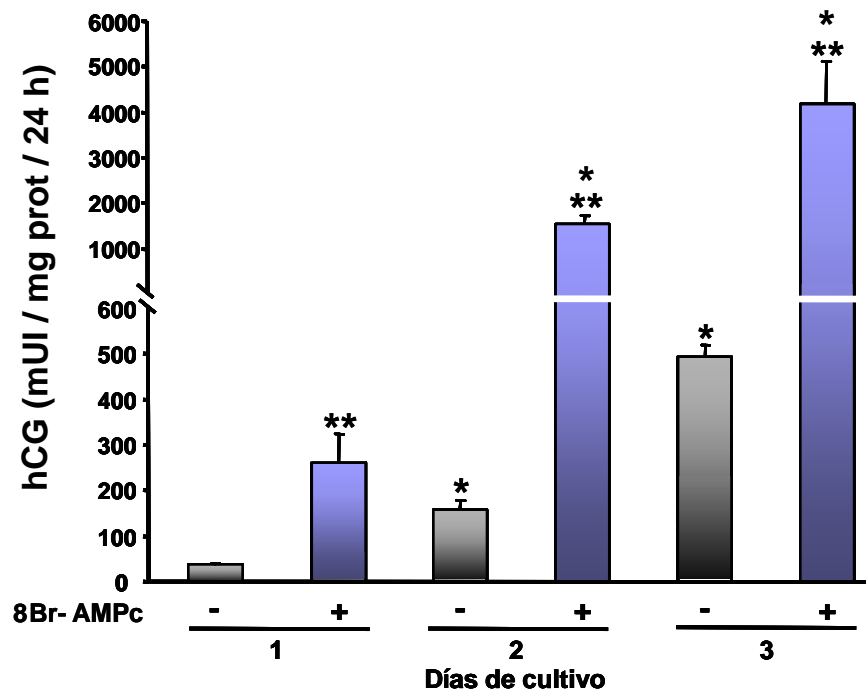


Figura 6. Secreción de la hCG en ausencia (-) y presencia (+) del 8Br-AMPc (0.6 mM) en los diferentes días de cultivo. Cada barra representa la media de $n = 3 \pm DE$. * $P < 0.05$ vs. día 1, ** $P < 0.005$ vs. secreción basal del mismo día.

Considerando que la *hCGβ5* es el gen de la hCG que más se expresa en las células placentarias, se evaluó su expresión a los diferentes días de cultivo en ausencia y presencia del 8Br-AMPc como control de la expresión génica de las células. Como se aprecia en la Figura 7, la expresión de la subunidad β fue dependiente del proceso de diferenciación celular, incrementándose significativamente en presencia del análogo. Estos datos confirmaron la viabilidad y capacidad funcional de los cultivos celulares.



Figura 7. Expresión de la *hCGβ5* en ausencia (●) y presencia (▲) del 8Br-AMPc (0.6 mM) en los diferentes días de cultivo. Los datos fueron obtenidos por qPCR atribuyendo el valor de 1 a la expresión obtenida en el día 1. Cada símbolo representa la media \pm EE (n = 3). * $P < 0.05$ vs. día 1, ** $P < 0.005$ vs. secreción basal del mismo día.

Del mismo modo y a manera de control, se evaluó la capacidad del calcitriol de incrementar la expresión del *CYP24A1*, el cual contiene 2 VDRE en su promotor [120]. Como se muestra en la Figura 8, el calcitriol indujo la expresión del *CYP24A1* de forma dependiente de la concentración comparado con el vehículo (vh).

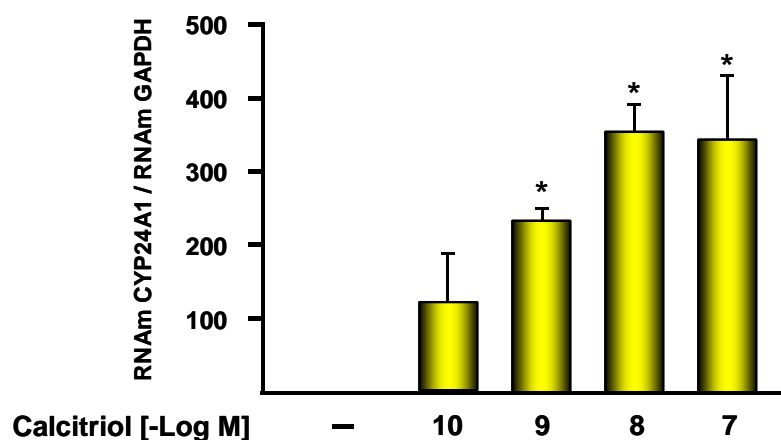


Figura 8. Efecto del calcitriol sobre la expresión del *CYP24A1* 24 horas después de su adición. Los datos fueron obtenidos por qPCR atribuyendo el valor de 1 al vh (-). Los datos muestran la media \pm EE (n = 3). * $P < 0.05$ vs. vh.

Efecto del calcitriol sobre la secreción de hCG

Se estudió el efecto del calcitriol sobre la expresión y secreción de la hCG con diferentes tiempos de incubación. Como se aprecia en la Figura 9, el calcitriol incrementó la secreción de la hCG seis horas después de su adición de manera dependiente de la concentración. Asimismo, el 8Br-AMPC a este tiempo mostró un efecto equipotencial al ejercido a la mayor concentración probada de calcitriol (1×10^{-7} M). Sin embargo, el calcitriol no modificó la secreción de la hCG después de 24 horas (datos no mostrados), lo cual sugiere una pérdida del efecto inductor por el calcitriol conforme transcurre el tiempo de exposición.

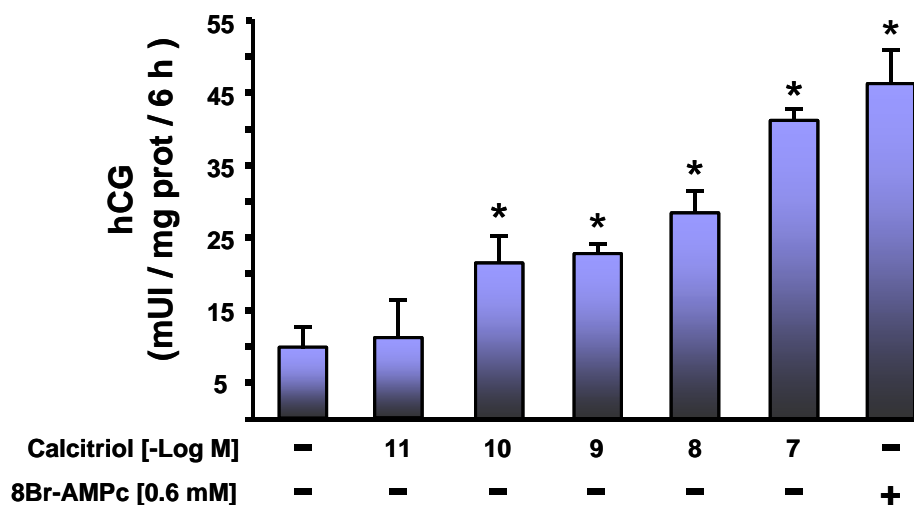


Figura 9. Efecto del calcitriol sobre la secreción de hCG 6 horas después de su adición. Cada barra representa la media \pm DE (n = 3). * $P < 0.05$ vs. vh (-).

En otros experimentos se incubaron las células con calcitriol y el 8Br-AMPC de forma simultánea y se evaluó la secreción de hCG 6 horas después. La incubación simultánea no incrementó más la secreción de hCG, lo que sugiere la utilización de la misma vía de señalización. Con la finalidad de sustentar lo anterior las células fueron incubadas en presencia de un inhibidor selectivo de la PKA; el H89, una hora antes del calcitriol. El estímulo del calcitriol sobre la secreción de hCG se bloqueó por el H89 (Figura 10) lo que sugiere que la activación de la PKA es indispensable para el efecto inducido por el secoesteroide.

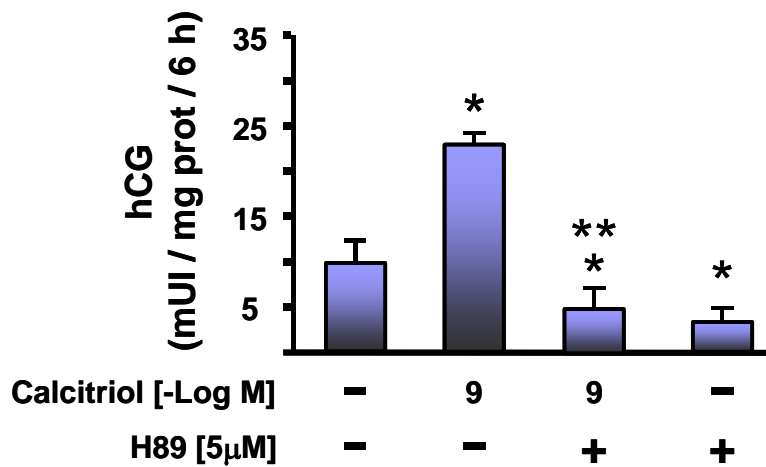


Figura 10. Efecto del calcitriol sobre la secreción de la hCG en ausencia y presencia de H89 después de 6 horas del tratamiento. Cada barra representa la media \pm DE (n = 3). * $P < 0.05$ vs. vh (-) y ** $P < 0.005$ vs. calcitriol 1×10^{-9} M.

Calcitriol y AMPc

Considerando que la producción de la hCG es mediada principalmente por la activación de la PKA, y que el calcitriol es capaz de inducir la generación de AMPc en músculo cardíaco [61], se realizaron pruebas para determinar el efecto del calcitriol sobre las concentraciones intracelulares del AMPc en los sinciotrofoblastos. En la Figura 11 se muestra que el nucleótido cíclico en presencia de concentraciones crecientes de calcitriol se acumula de manera significativa con respecto al vh. Cabe señalar que este efecto fue observado desde los 10 minutos y se mantuvo hasta 3 horas después de la adición de la hormona.

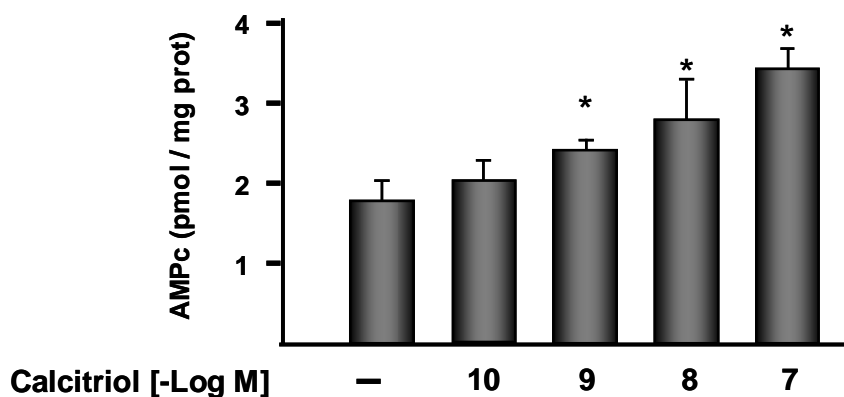


Figura 11. Acumulación del AMPc intracelular 10 minutos posteriores a la incubación en presencia de diferentes concentraciones de calcitriol. Los datos fueron obtenidos mediante RIA. Cada barra representa la media \pm DE (n = 3). * $P < 0.05$ vs. Vh (-).

Efecto del calcitriol sobre la expresión de $hCG\beta 5$

En cuanto al efecto del calcitriol sobre la expresión de la $hCG\beta 5$ se observó que el calcitriol 6 horas después de su adición indujo significativamente la expresión de la subunidad aproximadamente 2 veces sobre el vh, mientras que el 8Br-AMPc en este mismo tiempo indujo la expresión cerca de 7.5 veces (Figura 12). El efecto estimulador del calcitriol sobre la expresión de la $hCG\beta 5$ fue abolido por el H89.

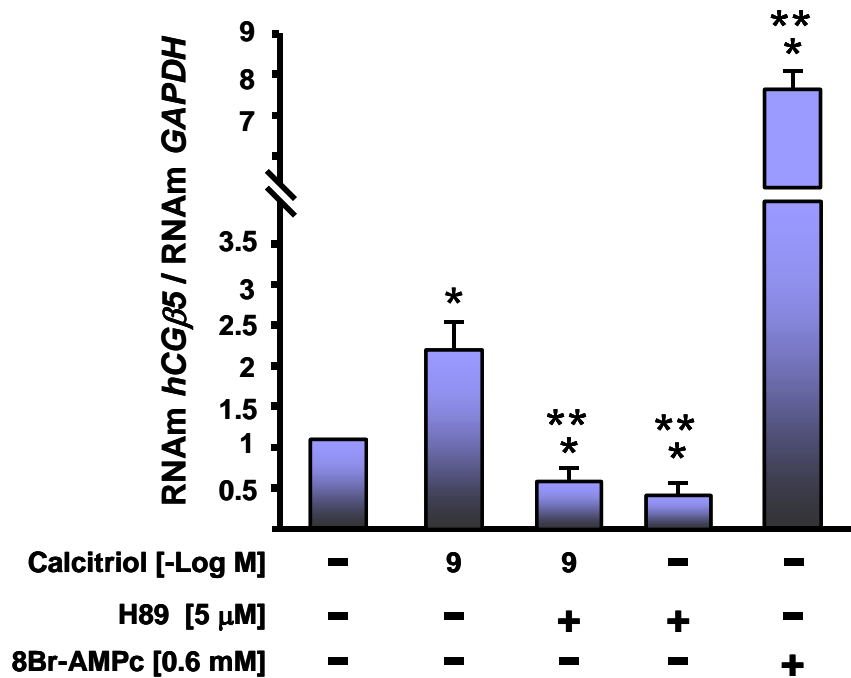


Figura 12. Efecto del calcitriol sobre la expresión de la *hCGβ5* después de 6 horas de incubación. Los datos fueron obtenidos por qPCR atribuyendo el valor de 1 al vh. Cada barra representa la media \pm EE (n = 6). * $P < 0.05$ vs. vh (-), ** $P < 0.005$ vs. calcitriol 1×10^{-9} M.

Los datos anteriores muestran que la expresión de la subunidad β de la hCG es regulada por el calcitriol de manera similar a lo observado en la secreción de la glicoproteína. Adicionalmente los resultados sugieren que la vía que utiliza el calcitriol para inducir la secreción y expresión de la hCG es por la vía de la PKA. Sin embargo, la expresión de la *hCGβ5* 24 horas después del tratamiento con el calcitriol fue inhibida por el secoesteroide (Figura 13), efecto que no puede ser atribuido a un efecto tóxico ya que la expresión del CYP24A1 fue estimulada de forma dependiente de la concentración de calcitriol, (Figura 8). Además el cultivo aún era viable ya que las células conservaron su capacidad de responder al 8Br-AMPC, (Figura 13).

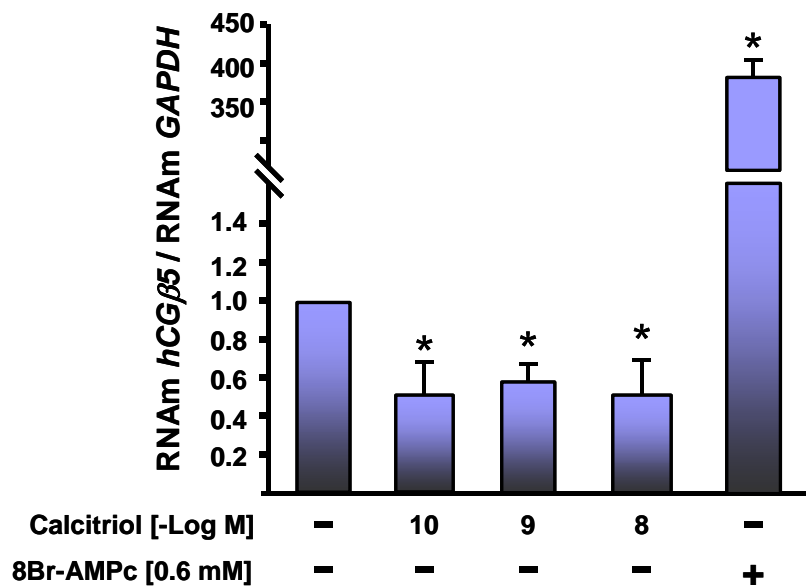


Figura 13. Efecto del calcitriol sobre la expresión de *hCGβ5* después de 24 horas de incubación. Los datos fueron obtenidos por qPCR atribuyendo el valor de 1 al vh (-). Cada barra representa la media ± EE (n = 6). **P* < 0.05 vs. vh.

Debido a los hallazgos obtenidos con incubaciones prolongadas de calcitriol y la expresión de *hCGβ5*, se estudió también la secreción de la hCG 48 horas después de la adición del secoesteroide. El calcitriol inhibió la secreción de la hCG de manera similar a los resultados de la expresión de *hCGβ5* después de 48 horas de incubación, (Figura 14). Por otro lado, el 8Br-AMPC utilizado como control positivo, después de 48 horas indujo la secreción de la gonadotropina, (Figura 14).

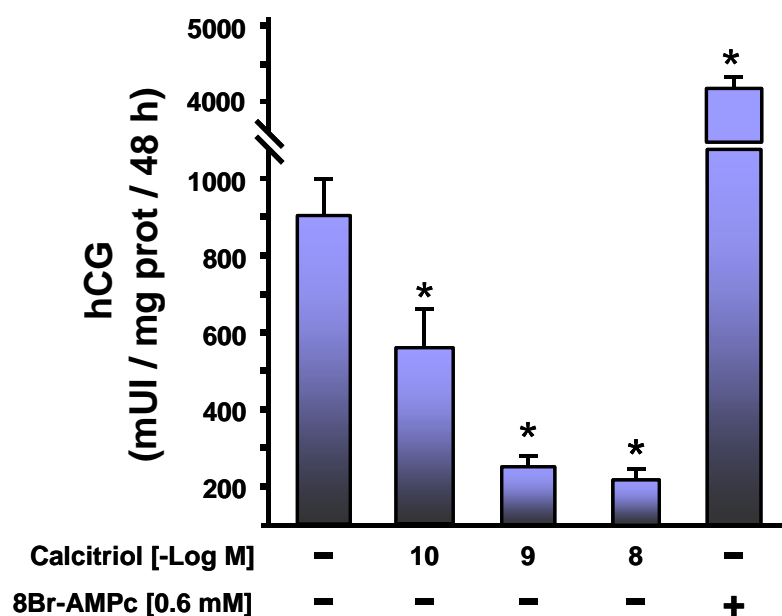


Figura 14. Efecto del calcitriol y el 8Br-AMPC, sobre la secreción de la hCG 48 horas después de su adición. Cada barra representa la media \pm DE (n = 3). * $P < 0.05$ vs. vh (-).

Efecto del calcitriol sobre la secreción de hCG inducida por el 8Br-AMPC

Con la intención de corroborar el efecto inhibidor del calcitriol a largo plazo, se decidió evaluar el efecto del calcitriol sobre la secreción de la hCG inducida por el 8Br-AMPC después de 48 horas. Como se observa en la Figura 15, el estímulo causado por el 8Br-AMPC sobre la secreción de la hCG fue inhibido significativamente en presencia del calcitriol.

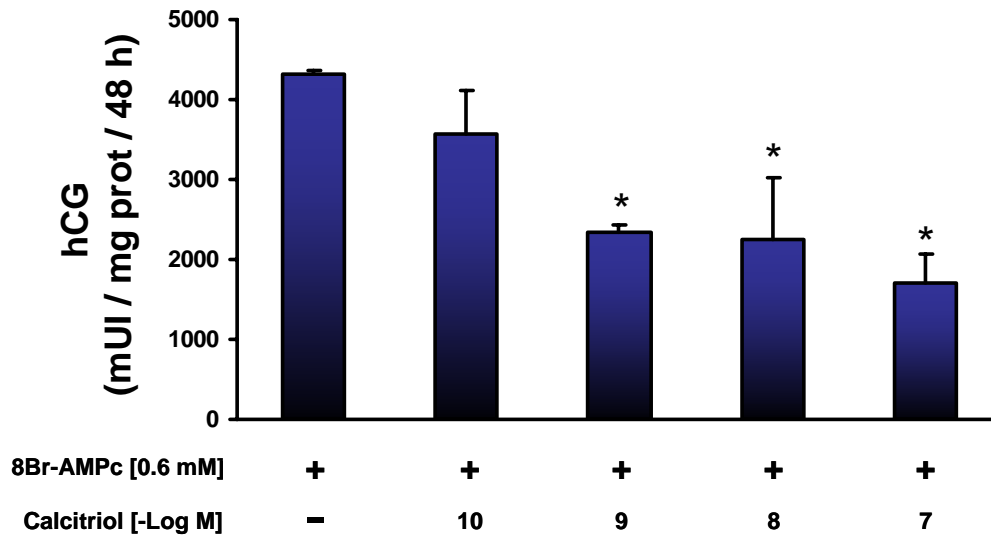


Figura 15. Efecto del calcitriol sobre la secreción de la hCG inducida con 8Br-AMPC durante 48 horas de exposición. Cada barra representa la media \pm DE (n = 3). * $P < 0.05$ vs. 8Br-AMPC en ausencia de calcitriol.

En conjunto los resultados demostraron que el calcitriol induce un efecto bifásico dependiente del tiempo sobre la secreción y expresión de la hCG, y sugieren que mecanismos distintos operan en cada caso. En tiempos cortos el calcitriol estimuló hCG mediante la activación de la vía AMPc/PKA, mientras que la inhibición observada en tiempos largos utiliza otra vía de señalización.

Efecto del calcitriol sobre la secreción de la P_4

Por otra parte, algunos estudios han demostrado que la síntesis de hormonas esteroideas se encuentra bajo la influencia de factores que actúan mediante el AMPc como segundo mensajero [121]. Por lo tanto, los resultados obtenidos en la Figura

11, nos indican que además de la hCG otras hormonas como la P₄ y el E₂ serían blanco de acción del calcitriol. Así, se estudio el efecto del calcitriol sobre la secreción de la P₄ en ausencia y presencia del precursor PREG. Como se aprecia en la Figura 16A, el calcitriol en ausencia del precursor exógeno indujo significativamente la producción de P₄ de forma dependiente de la concentración hasta 3.5 veces sobre el control. Mientras que en los experimentos llevados a cabo en presencia de PREG el calcitriol indujo un incremento de aproximadamente 1.7 veces (Figura 16B).

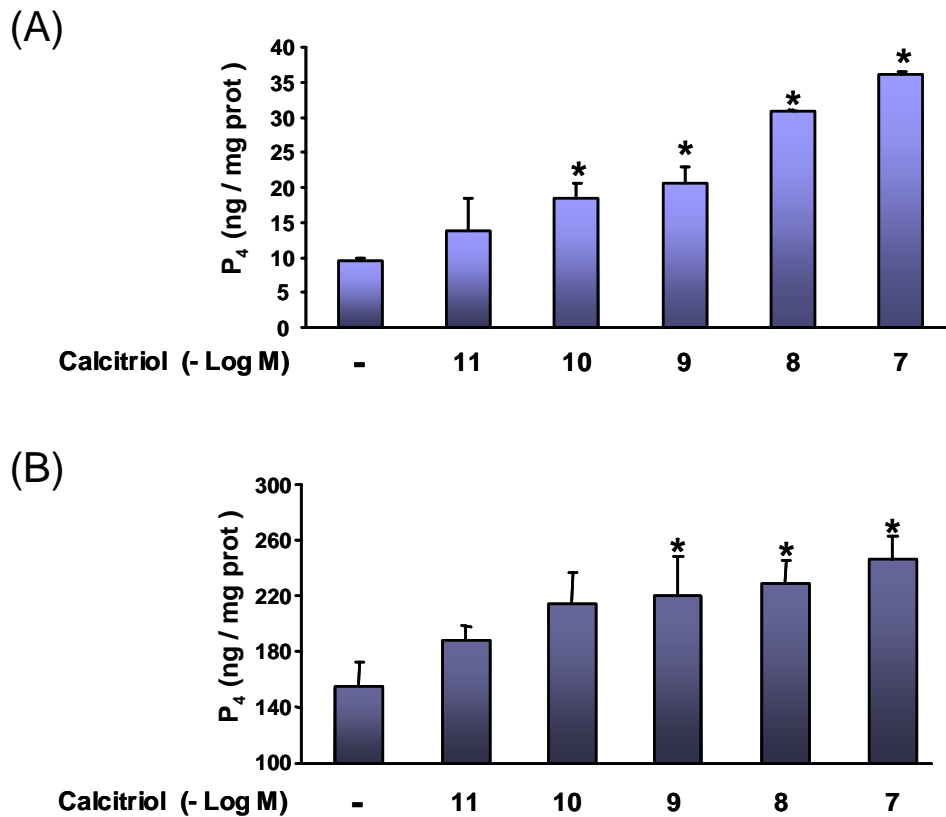


Figura 16. Efecto del calcitriol sobre la secreción de P₄, en ausencia (A) o presencia (B) de pregnenolona [1×10^{-7} M]. Cada barra representa la media \pm DE (n = 3). * $P < 0.05$ vs. vh (-).

Efecto del calcitriol sobre la secreción del E₂

Para estudiar el efecto del calcitriol sobre la secreción del E₂ fue necesaria la presencia del precursor androstendiona, debido a la incapacidad de los sinciotrofoblastos de producir andrógenos. Como se aprecia en la Figura 17, el calcitriol estimuló significativamente la bioconversión de androstendiona a E₂ hasta 1.6 veces sobre el control.

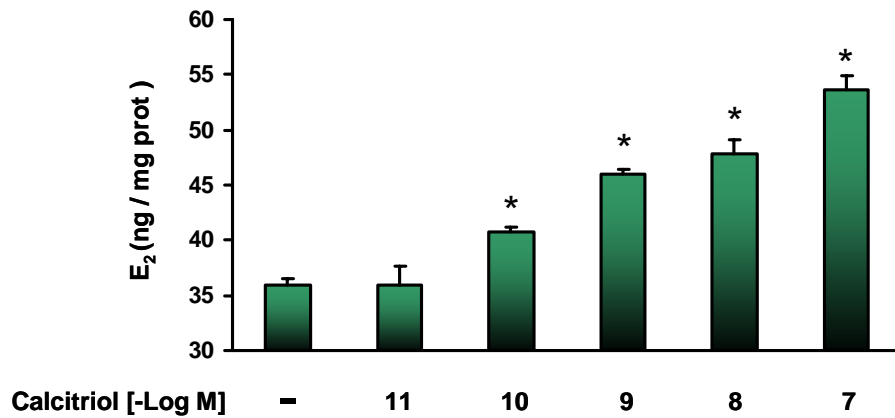


Figura 17. Efecto del calcitriol sobre la secreción de E₂. Las células fueron incubadas en presencia de androstendiona [1×10^{-7} M]. Cada barra representa la media \pm DE (n = 3). * $P < 0.05$ vs. vh (-).

Efecto del bloqueo de la vía de la PKA sobre la síntesis de P_4 y E_2 mediada por calcitriol

Con la finalidad de indagar el posible mecanismo por el cual el calcitriol modula la síntesis de los esteroides, las células se incubaron con calcitriol y H89. Como se aprecia en la Figura 18, el estímulo del calcitriol sobre la bioconversión de ambos esteroides se bloqueó en presencia de H89 en un 20 % y 90% después de la adición de los precursores de P_4 y E_2 , respectivamente.

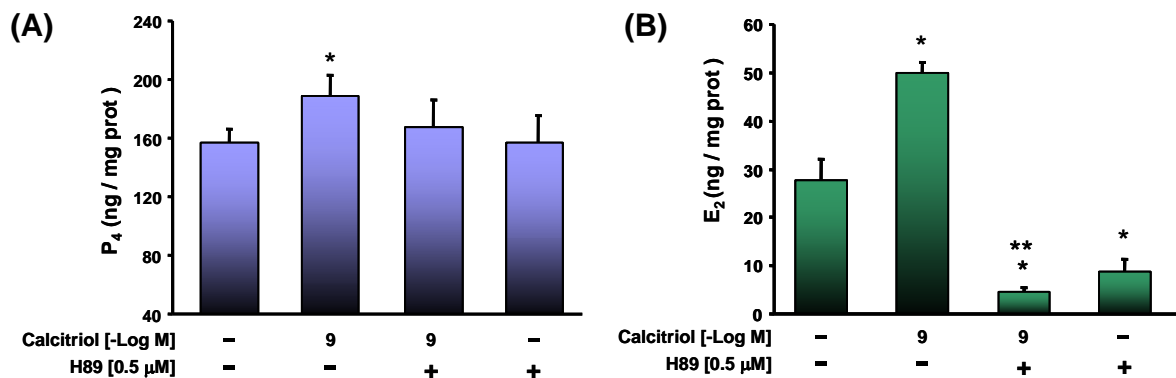


Figura 18. Efecto del calcitriol sobre la secreción de P_4 (A) y E_2 (B) en ausencia y presencia de H89. Los datos mostrados son en presencia del precursor correspondiente para cada esteroide. Cada barra representa la media \pm DE (n = 3). * P < 0.05 vs. vh (-), ** P < 0.05 vs. calcitriol en ausencia de H89.

Efecto del calcitriol sobre la expresión de *HSD3B1* y *CYP19*

Adicionalmente se evaluó la expresión del gen que codifica para *HSD3B1* y *CYP19*, enzimas relacionadas con la producción de la P_4 y el E_2 , respectivamente. Las células fueron incubadas en ausencia o presencia de calcitriol como se indicó en materiales y métodos. Este estudio mostró que la expresión de ambas enzimas es estimulada significativamente por el calcitriol después de 6 horas de incubación, (Figura 19). Asimismo, se observó que el H89 bloqueó la expresión de ambas enzimas y revirtió el estímulo mediado por el calcitriol.

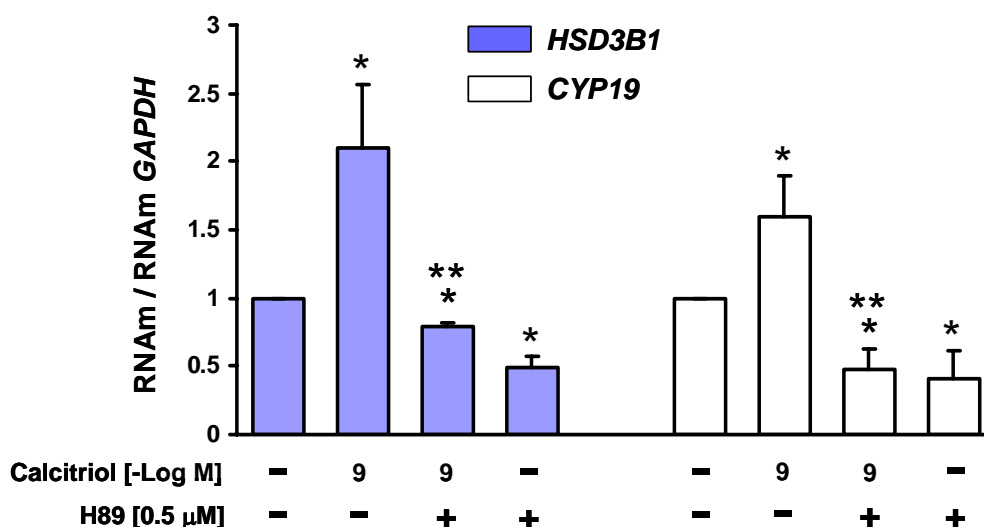


Figura 19. Efecto del calcitriol sobre la expresión génica de *HSD3B1* y *CYP19*, 6 horas después de su adición. La normalización se realizó comparando los datos de cada gen vs. GAPDH. Cada barra representa la media \pm EE ($n = 6$). * $P < 0.05$ vs. vh (-) al cual le fue asignado el valor de 1, ** $P < 0.05$ vs. calcitriol 1×10^{-9} M.

IX. DISCUSIÓN

General

El calcitriol fue catalogado durante mucho tiempo como un compuesto cuya única función era la regulación del metabolismo mineral; sin embargo, actualmente su estudio sobre aspectos endocrinológicos e inmunológicos abre un vasto panorama ya que se le ha implicado en diversas funciones no relacionadas al sistema óseo y sí en eventos reproductivos como la gestación [23].

Las células placentarias son las responsables de regular el metabolismo materno-fetal mediante la secreción hormonal en diferentes etapas de la gestación. En el presente trabajo, el proceso de diferenciación celular y la secreción de la hCG *in vitro*, así como la respuesta de las células a determinados estímulos corroboraron la funcionalidad y viabilidad del sistema experimental, lo cual mostró que el cultivo de trofoblastos es un modelo de estudio confiable para entender más acerca de los procesos biológicos que se llevan a cabo en el metabolismo placentario.

En particular, este trabajo muestra los efectos del calcitriol sobre la secreción hormonal en células de trofoblasto humano en cultivo. Se demostró que el calcitriol modula la secreción y expresión de hormonas glicoproteícas y esteroides involucradas en el mantenimiento del embarazo. Los datos mostrados concuerdan con estudios previos llevados a cabo en líneas de coriocarcinoma [26, 27].

Regulación de la hCG por el calcitriol

En los cultivos incubados en presencia de diferentes concentraciones de calcitriol se demostró un efecto regulador bifásico dependiente del tiempo y de manera dependiente de la concentración, sobre la secreción y expresión de la hCG en los trofoblastos. Se demostró que en las células incubadas en presencia del calcitriol durante 6 horas la secreción de la hCG se incrementó significativamente comparada con el vehículo. Además, se observó que la secreción inducida a la mayor concentración probada del calcitriol (1×10^{-7} M) fue equipotencial con respecto al efecto inducido por el 8Br-AMPC a este mismo tiempo.

En lo que respecta al mecanismo de acción por el cual el calcitriol indujo la secreción de la hCG, se demostró que el tratamiento con el inhibidor de la PKA, abolió dicho estímulo. Esto sugiere que el calcitriol utiliza al AMPC como segundo mensajero para activar la vía de la PKA. Para sustentar lo anterior, en este estudio también se demostró que el calcitriol es capaz de incrementar el AMPC intracelular después de 10 minutos de su adición. Este efecto rápido del calcitriol implica la activación de la adenilato ciclasa, como ha sido descrito en otros tipos celulares [61, 62], que es iniciada en la membrana celular y es independiente de los receptores nucleares. La acumulación intracelular del AMPC permite explicar el estímulo del calcitriol sobre la secreción y la expresión de la hCG después de 6 horas. Sin embargo, la inducción ejercida por el calcitriol sobre la hCG no se observó en incubaciones prolongadas, lo cual puede deberse a la disminución de la concentración intracelular del AMPC (en vista de que este nucleótido cíclico es de vida corta por la presencia de

fosfodiesterasas), o bien por la activación de vías alternas que resultan en la regulación negativa de la hCG. Esta última posibilidad se ve sustentada por el hecho de que la expresión y secreción de la hCG se inhibieron después de 24 y 48, horas respectivamente. Además, se demostró que la secreción de la hCG inducida por el 8Br-AMPC es bloqueada por el calcitriol después de 24 (dato no mostrado) y 48 horas cuando ambos compuestos se incuban conjuntamente. Esta evidencia sugiere que el efecto inhibitor del calcitriol es en último término, el efecto real del secoesteroide en la síntesis de la hCG en el embarazo, y considerando el perfil de concentración del calcitriol en el suero materno en los diferentes trimestres y el de la hCG [86, 87, 112], el calcitriol podría fungir como responsable, al menos en parte de la disminución de la glicoproteína después del primer trimestre de gestación.

Para explicar el efecto inhibitor del calcitriol sobre la hCG, se sugieren diferentes mecanismos:

1) Que el calcitriol como resultado de su catabolismo se biotransforme en otro metabolito como la 1,24,25-trihidroxivitamina D₃ [23], resultando en la inhibición de la síntesis de la hCG por un efecto secundario del metabolito trihidroxilado, lo cual es poco probable debido a su baja actividad biológica.

2) Que el efecto inhibitor sea mediado por algún factor inducido por el calcitriol. Apoyando lo anterior, los resultados del presente trabajo demostraron que el calcitriol estimuló la secreción de P₄ de forma dependiente de la concentración y se sabe que la P₄ inhibe la secreción de hCG en la placenta y en la línea celular Rcho-1 [122, 123], en la cual se demostró que la interacción del receptor activado de P₄ con las

CREB inhibió la fosforilación de estas últimas, bloqueando así su unión con los elementos de respuesta al AMPc [123].

3) Alternativamente, la inhibición de hCG podría deberse al secuestro de las CREB directamente por el complejo calcitriol-VDR, de manera similar al mecanismo reportado para la regulación del gen de la renina [124].

4) Finalmente, es probable la participación de eventos genómicos mediados directamente por el VDR, capaces de inhibir la transcripción del gen de la hCG o factores involucrados en su expresión. A este respecto, durante el estudio se realizó la búsqueda *in silico*, de sitios potenciales de unión para el heterodímero RXR-VDR (Mat-Inspector V2.2, <http://www.genomatix.de/>) en la región promotora del gen que codifica para la *hCGβ5* (*gi|31719|emb|X00265.1|HSGG02*), encontrando 5 regiones de unión para el heterodímero, lo cual aporta información adicional de secuencias específicas a las que han sido previamente reportadas a partir del uso de líneas celulares [66] y que podrían ser blanco del calcitriol para la regulación de la hCG. Lo anterior es factible ya que como se mencionó existen otros heterodímeros funcionales con los RXRs, que son capaces de inducir o reprimir la secreción de la hCG de forma tejido específico [75, 104, 105]. Sin embargo, la funcionalidad de estas secuencias queda aún por determinar.

Consideraciones de la regulación de la hCG por el calcitriol

Este estudio permite ubicar al calcitriol como un factor regulador de la producción de la hCG durante el embarazo, que junto con otras moléculas modulan el delicado balance que existe en la producción de la gonadotropina para obtener concentraciones adecuadas de hCG a lo largo de la gestación. Es probable que alteraciones en la producción del calcitriol se traduzcan en modificaciones de la síntesis de la hCG, como lo que ocurre en la preeclampsia, donde se han descrito bajas concentraciones de calcitriol y altas concentraciones de hCG [125]. Aunque, esta enfermedad es de etiología desconocida, el incremento de la hCG podría deberse en parte, a la disminuida concentración de calcitriol. Sin embargo, hacen falta estudios para sustentar esta hipótesis. En suma, los resultados del presente trabajo con respecto a la hCG, indican que el calcitriol es un factor regulador de la secreción de la hCG en la placenta humana, ejerciendo un efecto bifásico dependiente del tiempo.

Efecto del calcitriol sobre la producción de la P₄

En este estudio se demostró que el calcitriol indujo significativamente la secreción de P₄. En condiciones basales se observó un efecto dependiente de la concentración debido probablemente a la actividad enzimática de la P450_{scc} y la 3β-HSDI a partir del colesterol almacenado intramitocondrialmente en los sinciotrofoblastos. Aunque se sabe que el paso limitante en la síntesis de la P₄ a partir del colesterol es el transporte de electrones que realizan la adrenodoxina y la adrenodoxina reductasa de la P450_{scc} cuya expresión es inducida por el AMPc [109, 126, 127], se ha demostrado que en células de coriocarcinoma humano la expresión y actividad de la

3 β -HSDI también se inducen por el AMPc [110]. Tomando en cuenta que el calcitriol provocó la acumulación del AMPc en los trofoblastos y que induce la expresión de otras deshidrogenasas como la *HSD17B* tipo 2, 4 y 5 en otro sistema [21], en este estudio se delimitaron los pasos enzimáticos al adicionar la PREG como precursor exógeno y se cuantificó su bioconversión hacia P₄. El calcitriol estimuló la producción de P₄ en presencia del precursor exógeno, la cual resultó significativamente diferente del vehículo, pero no se observó que fuera dosis-respuesta. Por otro lado, la expresión de la *HSD3B1* fue inducida por el calcitriol y su expresión fue bloqueada en presencia del H89. Sin embargo, los resultados en ausencia del precursor exógeno sugieren que el AMPc actúa preferencialmente sobre la adrenodoxina reductasa y la P450_{scc}. Por otro lado, se observó que la actividad de la 3 β -HSDI en presencia de calcitriol y PREG fue parcialmente bloqueada de manera no significativa por el H89.

Efecto del calcitriol sobre la producción del E₂

Como se sabe, la producción de los estrógenos por el trofoblasto es dependiente del aporte de los andrógenos de origen fetal, debido a la carencia de la 17 α -hidroxilasa placentaria [128]. Por lo cual, la determinación del E₂ se realizó mediante la adición de androstendiona como sustrato para el CYP19. Los resultados mostraron que el calcitriol incrementó la bioconversión de androstendiona hacia E₂ de una forma dependiente de la concentración.

Aunque el calcitriol como el VDR son producidos en la placenta, las funciones del VDR y su ligando natural no han sido del todo determinadas. Evidencias previas

muestran que el calcitriol juega un papel primordial en la biosíntesis de estrógenos. Al respecto, Kinuta y cols [28], demostraron que la expresión y actividad del CYP19 disminuyó en las gónadas de ratones mutantes nulos para el VDR. En otro estudio Sun y colaboradores, mostraron en una línea de coriocarcinoma humano que la actividad del CYP19 se estimuló por el calcitriol y retinoides, caracterizando un VDRE atípico en el promotor del *CYP19*. Lo anterior sugiere que el efecto del calcitriol sobre el citocromo en el trofoblasto es a través de la modulación transcripcional. Esta posibilidad es apoyada por la observación de que la adición simultánea del calcitriol y androstendiona no aumentaron significativamente la secreción del estradiol (dato no mostrado). La búsqueda *in silico* de regiones reguladas por el calcitriol en el promotor del gen *CYP19* mostró 2 VDRE que podrían ser sitios regulados por el calcitriol. Sin embargo, el hallazgo de que el inhibidor selectivo de la PKA previno el efecto del calcitriol sobre la secreción del E₂ coincide con previos reportes que muestran que la conversión de los andrógenos hacia estrógenos en células JEG-3 y ovario se estimuló con tóxina del colera y forskolina [129, 130]. Por lo tanto, el hecho de que el calcitriol no ejerció efecto sobre la secreción del E₂ en presencia del H89 indica que también la vía de señalización de la PKA está involucrada. Apoyando lo anterior, el trabajo mostró que el calcitriol propició la acumulación de AMPc intracelular, con lo cual se sugiere que el calcitriol estimuló la secreción del E₂ en el trofoblasto actuando sobre el promotor del *CYP19* ya sea por la vía de señalización de la PKA o a través de algún VDRE localizado en la región promotora del gen.

Consideraciones de la regulación de la P₄ y el E₂ por el calcitriol

En conjunto, los datos muestran que el calcitriol induce la secreción de la P₄ y el E₂ en las células de trofoblasto en cultivo mediante el estímulo de sus respectivas enzimas. Lo anterior resulta relevante en vista de que poco se sabe de los ligandos naturales que contribuyen al incremento de hormonas esteroides durante la gestación. Además con los hallazgos obtenidos resulta interesante estudiar la participación del calcitriol sobre otras secuencias y factores de transcripción que regulan la expresión de la *HSD3B1* y del *CYP19*, las cuales son moduladas de manera específica en el trofoblasto [102, 109, 131, 132]. Por otra parte, los resultados sugieren que el calcitriol podría modular la actividad enzimática de otras deshidrogenasas y/o citocromos involucrados en la biosíntesis esteroideal, así como la síntesis de otros compuestos como el 2-metoxiestradiol, un derivado del E₂ que se forma por acción de la catecol-o-metiltransferasa, el cual actúa como agente protector en contra de la preeclampsia [133], o tal vez favorecer la biosíntesis del estetrol en el compartimento fetal, el cual se ha identificado como marcador de viabilidad fetal y preventivo de la osteoporosis [134].

En general, basados en los resultados, en la presente tesis se han integrado algunas vías que participan en la regulación de la producción de la hCG, P₄ y E₂ por el calcitriol. Los datos mostrados pueden ser de utilidad en medicina reproductiva, ya que algunas patologías del embarazo se asocian con concentraciones inadecuadas de alguna de estas hormonas y los resultados podrían considerarse para el diseño de estrategias específicas en el tratamiento de dichas patologías.

Perspectivas

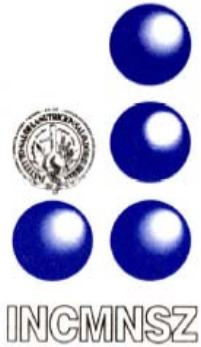
Los datos presentados demostraron un efecto bifásico del calcitriol sobre la secreción y expresión de la hCG, así como un efecto inductor sobre la secreción de la P₄ y el E₂. Se probó también que para ejercer estas respuestas, uno de los mecanismos de acción es por una vía dependiente del incremento del AMPc intracelular. Sin embargo, será interesante comprobar la participación de las corrientes de calcio que el calcitriol pudiera estar regulando en las células de trofoblasto. Se propone utilizar como herramienta electrofisiológica la técnica de patch-clamp para llevar a cabo dichas evaluaciones. Asimismo, se sugiere evaluar el impacto del calcio sobre las concentraciones intracelulares del AMPc.

Por otra parte, será importante evaluar los efectos del calcitriol en presencia de un antagonista específico del VDR, con la finalidad de conocer si el mecanismo genómico del calcitriol está implicado en la disminución de la hCG a largo plazo.

X. CONCLUSIONES

- El calcitriol en la placenta ejerce un efecto de tipo autocrino en la regulación de hormonas tanto glicoproteicas como esteroides.
- Los resultados obtenidos muestran que el calcitriol ejerce un efecto bifásico dependiente del tiempo sobre la secreción y expresión de la hCG: el estímulo es mediado por la acumulación rápida de AMPc intracelular, mientras que la inhibición puede deberse a un evento genómico mediado por el VDR.
- Las observaciones de este estudio indican que el calcitriol es capaz de incrementar significativamente la secreción P_4 y E_2 en trofoblastos humanos en cultivo.
- La biotransformación de los esteroides involucra primordialmente la regulación de las regiones promotoras de *HSD3B1* y *CYP19* que fueron inducidos significativamente por el calcitriol.
- El efecto del calcitriol sobre la 3β -HSDI sugiere un mecanismo que depende parcialmente de la activación de la PKA, mientras que para el CYP19 se utiliza tanto la generación de AMPc, así como de la acción directa sobre elementos de respuesta en la región promotora del gen CYP19.

XI. ANEXO



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN

AGOSTO 23, 2005

DRA. LORENZA DÍAZ NIETO
INVESTIGADORA PRINCIPAL
DEPARTAMENTO BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN
P R E S E N T E

ESTIMADA DRA. DÍAZ:

Le informo que con relación al protocolo titulado: **Efectos Biológicos del Calcitriol en la Placenta Humana.**

El Comité ha revisado y **aprobado** el estudio, así como la carta de Consentimiento Informado.

Su proyecto queda registrado en esta Institución con la **REF. 1481**. Este número es necesario para la autorización de los servicios de apoyo a la Investigación.

Sin más por el momento le reitero la seguridad de mi más atenta y distinguida consideración.

ATENTAMENTE

DR. ANTONIO R. CABRAL CASTAÑEDA
COORDINADOR

COMITÉ INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN HUMANOS



c.c.p. Dr. Rubén Lisker Y. Dirección de Investigación
C.P. Martha Arredondo Urzúa. Jefe del Depto. C.F.E.I

ACC/mrg

Investigación

Tradición Servicio

Asistencia Docencia

20007700

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C.P. 14000 México, D.F.
- Tel. 54-87-09-00

XII. REFERENCIAS

1. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H: Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 2004, 25:341-373.
2. Lee KY, DeMayo FJ: Animal models of implantation. *Reproduction* 2004, 128:679-695.
3. Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT, Jr., Anderson RR, Blank IH, Parrish JA, Elias P: Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science* 1980, 210:203-205.
4. Ali MM, Vaidya V: Vitamin D and cancer. *J Cancer Res Ther* 2007, 3:225-230.
5. Henry HL, Norman AW: Studies on calciferol metabolism. IX. Renal 25-hydroxyvitamin D3-1 hydroxylase. Involvement of cytochrome P-450 and other properties. *J Biol Chem* 1974, 249:7529-7535.
6. Diaz L, Sanchez I, Avila E, Halhali A, Vilchis F, Larrea F: Identification of a 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene transcription product in cultures of human syncytiotrophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85:2543-2549.
7. Evans KN, Bulmer JN, Kilby MD, Hewison M: Vitamin D and placental-decidual function. *J Soc Gynecol Investig* 2004, 11:263-271.
8. Hewison M, Burke F, Evans KN, Lammass DA, Sansom DM, Liu P, Modlin RL, Adams JS: Extra-renal 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in human health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007, 103:316-321.
9. Lehmann B: The vitamin D3 pathway in human skin and its role for regulation of biological processes. *Photochem Photobiol* 2005, 81:1246-1251.
10. Zehnder D, Bland R, Williams MC, McNinch RW, Howie AJ, Stewart PM, Hewison M: Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86:888-894.
11. Li J, Byrne ME, Chang E, Jiang Y, Donkin SS, Buhman KK, Burgess JR, Teegarden D: 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D hydroxylase in adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008, 112:122-126.
12. Bland R, Markovic D, Hills CE, Hughes SV, Chan SL, Squires PE, Hewison M: Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in pancreatic islets. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004, 89-90:121-125.

13. Bajwa A, Forster MN, Maiti A, Woolbright BL, Beckman MJ: Specific regulation of CYP27B1 and VDR in proximal versus distal renal cells. *Arch Biochem Biophys* 2008, 477:33-42.
14. St-Arnaud R: The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Arch Biochem Biophys* 2008, 473:225-230.
15. Holick MF: Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest* 2006, 116:2062-2072.
16. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS: Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007, 7:684-700.
17. Swami S, Krishnan AV, Feldman D: 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ down-regulates estrogen receptor abundance and suppresses estrogen actions in MCF-7 human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2000, 6:3371-3379.
18. Norman AW, Frankel JB, Heldt AM, Grodsky GM: Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science* 1980, 209:823-825.
19. Bourlon PM, Billaudel B, Faure-Dussert A: Influence of vitamin D₃ deficiency and 1,25 dihydroxyvitamin D₃ on de novo insulin biosynthesis in the islets of the rat endocrine pancreas. *J Endocrinol* 1999, 160:87-95.
20. Palomer X, Gonzalez-Clemente JM, Blanco-Vaca F, Mauricio D: Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 2008, 10:185-197.
21. Wang JH, Tuohimaa P: Regulation of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, type 4 and type 5 by calcitriol, LXR agonist and 5 α -dihydrotestosterone in human prostate cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007, 107:100-105.
22. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E: Vitamin D. *Am J Physiol* 1999, 277:F157-175.
23. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E: Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005, 289:F8-28.
24. Tuan RS, Moore CJ, Brittingham JW, Kirwin JJ, Akins RE, Wong M: In vitro study of placental trophoblast calcium uptake using JEG-3 human choriocarcinoma cells. *J Cell Sci* 1991, 98 (Pt 3):333-342.

25. Belkacemi L, Zuegel U, Steinmeyer A, Dion JP, Lafond J: Calbindin-D28k (CaBP28k) identification and regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human choriocarcinoma cell line JEG-3. *Mol Cell Endocrinol* 2005, 236:31-41.
26. Stephanou A, Ross R, Handwerger S: Regulation of human placental lactogen expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Endocrinology* 1994, 135:2651-2656.
27. Sun T, Zhao Y, Mangelsdorf DJ, Simpson ER: Characterization of a region upstream of exon I.1 of the human CYP19 (aromatase) gene that mediates regulation by retinoids in human choriocarcinoma cells. *Endocrinology* 1998, 139:1684-1691.
28. Kinuta K, Tanaka H, Moriwake T, Aya K, Kato S, Seino Y: Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology* 2000, 141:1317-1324.
29. Du H, Daftary GS, Lalwani SI, Taylor HS: Direct regulation of HOXA10 by 1,25-(OH)2D3 in human myelomonocytic cells and human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol* 2005, 19:2222-2233.
30. Castillo AI, Jimenez-Lara AM, Tolon RM, Aranda A: Synergistic activation of the prolactin promoter by vitamin D receptor and GHF-1: role of the coactivators, CREB-binding protein and steroid hormone receptor coactivator-1 (SRC-1). *Mol Endocrinol* 1999, 13:1141-1154.
31. Evans KN, Nguyen L, Chan J, Innes BA, Bulmer JN, Kilby MD, Hewison M: Effects of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on cytokine production by human decidual cells. *Biol Reprod* 2006, 75:816-822.
32. Johnson LE, DeLuca HF: Vitamin D receptor null mutant mice fed high levels of calcium are fertile. *J Nutr* 2001, 131:1787-1791.
33. Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K, Yoshihara Y, Kawakami T, Arioka K, Sato H, Uchiyama Y, et al: Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet* 1997, 16:391-396.
34. Mathieu C, Van Etten E, Gysemans C, Decallonne B, Kato S, Laureys J, Depovere J, Valckx D, Verstuyf A, Bouillon R: In vitro and in vivo analysis of the

- immune system of vitamin D receptor knockout mice. *J Bone Miner Res* 2001, 16:2057-2065.
35. Rummens K, van Cromphaut SJ, Carmeliet G, van Herck E, van Bree R, Stockmans I, Bouillon R, Verhaeghe J: Pregnancy in mice lacking the vitamin D receptor: normal maternal skeletal response, but fetal hypomineralization rescued by maternal calcium supplementation. *Pediatr Res* 2003, 54:466-473.
 36. Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A: Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, and the immune system. *Am J Clin Nutr* 2004, 80:1717S-1720S.
 37. Reddy GS, Norman AW, Willis DM, Goltzman D, Guyda H, Solomon S, Philips DR, Bishop JE, Mayer E: Regulation of vitamin D metabolism in normal human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1983, 56:363-370.
 38. Kumar R, Cohen WR, Silva P, Epstein FH: Elevated 1,25-dihydroxyvitamin D plasma levels in normal human pregnancy and lactation. *J Clin Invest* 1979, 63:342-344.
 39. Kovacs CS, Kronenberg HM: Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. *Endocr Rev* 1997, 18:832-872.
 40. Kovacs CS: Vitamin D in pregnancy and lactation: maternal, fetal, and neonatal outcomes from human and animal studies. *Am J Clin Nutr* 2008, 88:520S-528S.
 41. Glorieux FH: Pseudo-vitamin D deficiency rickets. *J Endocrinol* 1997, 154 Suppl:S75-78.
 42. Memmi I, Brauner R, Sidi D, Sauvion S, Souberbielle JC, Garabedian M: [Neonatal cardiac failure secondary to hypocalcemia caused by maternal vitamin D deficiency]. *Arch Fr Pediatr* 1993, 50:787-791.
 43. Brunvand L, Quigstad E, Urdal P, Haug E: Vitamin D deficiency and fetal growth. *Early Hum Dev* 1996, 45:27-33.
 44. Blond MH, Gold F, Pierre F, Berger C, Guerois M, Queru MS, Ramponi N: [Nutritional fetal rickets. A case report]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 1997, 26:834-836.
 45. Namgung R, Tsang RC, Specker BL, Sierra RI, Ho ML: Reduced serum osteocalcin and 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations and low bone mineral

- content in small for gestational age infants: evidence of decreased bone formation rates. *J Pediatr* 1993, 122:269-275.
46. Halhali A, Tovar AR, Torres N, Bourges H, Garabedian M, Larrea F: Preeclampsia is associated with low circulating levels of insulin-like growth factor I and 1,25-dihydroxyvitamin D in maternal and umbilical cord compartments. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85:1828-1833.
 47. Diaz L, Arranz C, Avila E, Halhali A, Vilchis F, Larrea F: Expression and activity of 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase are restricted in cultures of human syncytiotrophoblast cells from preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87:3876-3882.
 48. Diaz L, Carino C, Mendez I: [Vitamin D: implications for health and pregnancy]. *Rev Invest Clin* 2001, 53:77-85.
 49. Stumpf WE: Vitamin D sites and mechanisms of action: a histochemical perspective. Reflections on the utility of autoradiography and cytopharmacology for drug targeting. *Histochem Cell Biol* 1995, 104:417-427.
 50. Tanamura A, Nomura S, Kurauchi O, Furui T, Mizutani S, Tomoda Y: Purification and characterization of 1,25(OH)₂D₃ receptor from human placenta. *J Obstet Gynaecol* 1995, 21:631-639.
 51. Carlberg C, Seuter S: The vitamin D receptor. *Dermatol Clin* 2007, 25:515-523, viii.
 52. Christakos S, Barletta F, Huening M, Dhawan P, Liu Y, Porta A, Peng X: Vitamin D target proteins: function and regulation. *J Cell Biochem* 2003, 88:238-244.
 53. Lehmann B: Role of the vitamin D₃ pathway in healthy and diseased skin--facts, contradictions and hypotheses. *Exp Dermatol* 2009, 18:97-108.
 54. Avila E, Barrera D, Diaz L: [Calcitropic actions of parathyroid hormone and vitamin D-endocrine system]. *Rev Invest Clin* 2007, 59:306-317.
 55. Losel R, Wehling M: Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, 4:46-56.

56. Losel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, Wehling M: Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev* 2003, 83:965-1016.
57. Nemere I, Safford SE, Rohe B, DeSouza MM, Farach-Carson MC: Identification and characterization of 1,25D3-membrane-associated rapid response, steroid (1,25D3-MARRS) binding protein. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004, 89-90:281-285.
58. Hammes SR, Levin ER: Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev* 2007, 28:726-741.
59. Huhtakangas JA, Olivera CJ, Bishop JE, Zanello LP, Norman AW: The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 alpha,25(OH)₂-vitamin D₃ in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol* 2004, 18:2660-2671.
60. Norman AW: Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 2006, 147:5542-5548.
61. Selles J, Boland R: Evidence on the participation of the 3',5'-cyclic AMP pathway in the non-genomic action of 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ in cardiac muscle. *Mol Cell Endocrinol* 1991, 82:229-235.
62. Massheimer V, Boland R, de Boland AR: Rapid 1,25(OH)₂-vitamin D₃ stimulation of calcium uptake by rat intestinal cells involves a dihydropyridine-sensitive cAMP-dependent pathway. *Cell Signal* 1994, 6:299-304.
63. Schwartz Z, Ehland H, Sylvia VL, Larsson D, Hardin RR, Bingham V, Lopez D, Dean DD, Boyan BD: 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) and 24R,25-dihydroxyvitamin D(3) modulate growth plate chondrocyte physiology via protein kinase C-dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 2002, 143:2775-2786.
64. Zanello LP, Norman A: 1alpha,25(OH)₂ Vitamin D₃ actions on ion channels in osteoblasts. *Steroids* 2006, 71:291-297.
65. Tasken K, Aandahl EM: Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* 2004, 84:137-167.

66. Knofler M, Saleh L, Bauer S, Galos B, Rotheneder H, Husslein P, Helmer H: Transcriptional regulation of the human chorionic gonadotropin beta gene during villous trophoblast differentiation. *Endocrinology* 2004, 145:1685-1694.
67. de Boland AR, Boland RL: Rapid changes in skeletal muscle calcium uptake induced in vitro by 1,25-dihydroxyvitamin D3 are suppressed by calcium channel blockers. *Endocrinology* 1987, 120:1858-1864.
68. Selles J, Boland R: Rapid stimulation of calcium uptake and protein phosphorylation in isolated cardiac muscle by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Mol Cell Endocrinol* 1991, 77:67-73.
69. Le Mellay V, Grosse B, Lieberherr M: Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol. *J Biol Chem* 1997, 272:11902-11907.
70. Fleet JC: Rapid, membrane-initiated actions of 1,25 dihydroxyvitamin D: what are they and what do they mean? *J Nutr* 2004, 134:3215-3218.
71. Pierce JG, Parsons TF: Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 1981, 50:465-495.
72. Bo M, Boime I: Identification of the transcriptionally active genes of the chorionic gonadotropin beta gene cluster in vivo. *J Biol Chem* 1992, 267:3179-3184.
73. Jameson JL, Hollenberg AN: Regulation of chorionic gonadotropin gene expression. *Endocr Rev* 1993, 14:203-221.
74. Yang M, Lei ZM, Rao Ch V: The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium. *Endocrinology* 2003, 144:1108-1120.
75. Handschuh K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, Fournier T: Human chorionic gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells. *Placenta* 2007, 28:175-184.
76. Herr F, Baal N, Reisinger K, Lorenz A, McKinnon T, Preissner KT, Zygmunt M: HCG in the regulation of placental angiogenesis. Results of an in vitro study. *Placenta* 2007, 28 Suppl A:S85-93.
77. Fluhr H, Bischof-Islami D, Krenzer S, Licht P, Bischof P, Zygmunt M: Human chorionic gonadotropin stimulates matrix metalloproteinases-2 and -9 in

- cytotrophoblastic cells and decreases tissue inhibitor of metalloproteinases-1, -2, and -3 in decidualized endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2008:En prensa.
78. Rao CV, Lei ZM: The past, present and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine. *Mol Cell Endocrinol* 2007, 269:2-8.
 79. Milwidsky A, Finci-Yeheskel Z, Yagel S, Mayer M: Gonadotropin-mediated inhibition of proteolytic enzymes produced by human trophoblast in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1993, 76:1101-1105.
 80. Polliotti BM, Gnall-Sazenski S, Laughlin TS, Miller RK: Inhibitory effects of human chorionic gonadotropin (hCG) preparations on HIV infection of human placenta in vitro. *Placenta* 2002, 23 Suppl A:S102-106.
 81. Khil LY, Jun HS, Kwon H, Yoo JK, Kim S, Notkins AL, Yoon JW: Human chorionic gonadotropin is an immune modulator and can prevent autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetologia* 2007, 50:2147-2155.
 82. Ticconi C, Zicari A, Belmonte A, Realacci M, Rao Ch V, Piccione E: Pregnancy-promoting actions of HCG in human myometrium and fetal membranes. *Placenta* 2007, 28 Suppl A:S137-143.
 83. Janssens JP, Russo J, Russo I, Michiels L, Donders G, Verjans M, Riphagen I, Van den Bossche T, Deleu M, Sieprath P: Human chorionic gonadotropin (hCG) and prevention of breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2007, 269:93-98.
 84. O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H: The foetal Leydig cell-- differentiation, function and regulation. *Int J Androl* 2006, 29:90-95; discussion 105-108.
 85. Pakarainen T, Ahtiainen P, Zhang FP, Rulli S, Poutanen M, Huhtaniemi I: Extragonadal LH/hCG action--not yet time to rewrite textbooks. *Mol Cell Endocrinol* 2007, 269:9-16.
 86. Taylor RN, Martin MC: Endocrinología del embarazo. In *Endocrinología básica y clínica*. 4a edition. Edited by Greenspan FS, Strewler GJ. México: El Manual Moderno; 1998: 623-654
 87. Edelstam G, Karlsson C, Westgren M, Lowbeer C, Swahn ML: Human chorionic gonadatropin (hCG) during third trimester pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest* 2007, 67:519-525.

88. Albrecht ED, Pepe GJ: Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocr Rev* 1990, 11:124-150.
89. Weiss G: Endocrinology of parturition. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85:4421-4425.
90. Pepe GJ, Albrecht ED: Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocr Rev* 1995, 16:608-648.
91. Hansen PJ: Regulation of uterine immune function by progesterone--lessons from the sheep. *J Reprod Immunol* 1998, 40:63-79.
92. Barrera D, Avila E, Diaz L: [Immunological role of progesterone in the maintenance of pregnancy]. *Rev Invest Clin* 2007, 59:139-145.
93. Tuckey RC: Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta* 2005, 26:273-281.
94. Albrecht ED, Henson MC, Pepe GJ: Regulation of placental low density lipoprotein uptake in baboons by estrogen. *Endocrinology* 1991, 128:450-458.
95. Henson MC, Pepe GJ, Albrecht ED: Regulation of placental low-density lipoprotein uptake in baboons by estrogen: dose-dependent effects of the anti-estrogen ethamoxytriphetol (MER-25). *Biol Reprod* 1991, 45:43-48.
96. Babischkin JS, Grimes RW, Pepe GJ, Albrecht ED: Estrogen stimulation of P450 cholesterol side-chain cleavage activity in cultures of human placental syncytiotrophoblasts. *Biol Reprod* 1997, 56:272-278.
97. Olson DM, Skinner K, Challis JR: Estradiol-17 beta and 2-hydroxyestradiol-17 beta-induced differential production of prostaglandins by cells dispersed from human intrauterine tissues at parturition. *Prostaglandins* 1983, 25:639-651.
98. Sanborn BM: Relationship of ion channel activity to control of myometrial calcium. *J Soc Gynecol Investig* 2000, 7:4-11.
99. Adachi S, Oku M: The regulation of oxytocin receptor expression in human myometrial monolayer culture. *J Smooth Muscle Res* 1995, 31:175-187.
100. Conley A, Hinshelwood M: Mammalian aromatases. *Reproduction* 2001, 121:685-695.
101. Li Y, Isomaa V, Pulkka A, Herva R, Peltoketo H, Vihko P: Expression of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, P450 aromatase, and 17beta-

- hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 2, 5 and 7 mRNAs in human early and mid-gestation placentas. *Placenta* 2005, 26:387-392.
102. Payne AH, Hales DB: Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* 2004, 25:947-970.
 103. Petraglia F, Santuz M, Florio P, Simoncini T, Luisi S, Plaino L, Genazzani AR, Genazzani AD, Volpe A: Paracrine regulation of human placenta: control of hormonogenesis. *J Reprod Immunol* 1998, 39:221-233.
 104. Guibourdenche J, Alsat E, Soncin F, Rochette-Egly C, Evain-Brion D: Retinoid receptors expression in human term placenta: involvement of RXR alpha in retinoid induced-hCG secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83:1384-1387.
 105. Tarrade A, Schoonjans K, Guibourdenche J, Bidart JM, Vidaud M, Auwerx J, Rochette-Egly C, Evain-Brion D: PPAR gamma/RXR alpha heterodimers are involved in human CG beta synthesis and human trophoblast differentiation. *Endocrinology* 2001, 142:4504-4514.
 106. Hashimoto Y, Miyachi H: Nuclear receptor antagonists designed based on the helix-folding inhibition hypothesis. *Bioorg Med Chem* 2005, 13:5080-5093.
 107. Tosca L, Froment P, Solnais P, Ferre P, Fougelle F, Dupont J: Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates progesterone secretion in rat granulosa cells. *Endocrinology* 2005, 146:4500-4513.
 108. Pepe GJ, Albrecht ED: Regulation of functional differentiation of the placental villous syncytiotrophoblast by estrogen during primate pregnancy. *Steroids* 1999, 64:624-627.
 109. Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH: Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocr Rev* 2005, 26:525-582.
 110. Tremblay Y, Beaudoin C: Regulation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid levels by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and phorbol myristate acetate in human choriocarcinoma cells. *Mol Endocrinol* 1993, 7:355-364.

111. Chen SA, Besman MJ, Sparkes RS, Zollman S, Klisak I, Mohandas T, Hall PF, Shively JE: Human aromatase: cDNA cloning, Southern blot analysis, and assignment of the gene to chromosome 15. *DNA* 1988, 7:27-38.
112. Halhali A, Villa AR, Madrazo E, Soria MC, Mercado E, Diaz L, Avila E, Garabedian M, Larrea F: Longitudinal changes in maternal serum 1,25-dihydroxyvitamin D and insulin like growth factor I levels in pregnant women who developed preeclampsia: comparison with normotensive pregnant women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004, 89-90:553-556.
113. Halhali A, Diaz L, Sanchez I, Garabedian M, Bourges H, Larrea F: Effects of IGF-I on 1,25-dihydroxyvitamin D(3) synthesis by human placenta in culture. *Mol Hum Reprod* 1999, 5:771-776.
114. Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF, 3rd: Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 1986, 118:1567-1582.
115. Villanueva LA, Mendez I, Ampuero S, Larrea F: The prolactin inhibition of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in cultured rat granulosa cells is in part tyrosine kinase and protein kinase-C dependent. *Mol Hum Reprod* 1996, 2:725-731.
116. Bocci V: Efficient Labelling of Tissue-Soluble Proteins with Iodine-131 Using Chloramine T. *Nature* 1964, 203:985-986.
117. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72:248-254.
118. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987, 162:156-159.
119. Potgens AJ, Schmitz U, Bose P, Versmold A, Kaufmann P, Frank HG: Mechanisms of syncytial fusion: a review. *Placenta* 2002, 23 Suppl A:S107-113.
120. Chen KS, DeLuca HF: Cloning of the human 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *Biochim Biophys Acta* 1995, 1263:1-9.

121. Zosmer A, Elder MG, Sullivan MH: Second messengers and the control of progesterone production from first trimester trophoblast. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997, 62:201-205.
122. Barnea ER, Feldman D, Kaplan M: The effect of progesterone upon first trimester trophoblastic cell differentiation and human chorionic gonadotrophin secretion. *Hum Reprod* 1991, 6:905-909.
123. Yamamoto T, Matsumoto K, Kurachi H, Okamoto Y, Nishio Y, Sakata M, Tasaka K, Murata Y: Progesterone inhibits transcriptional activation of human chorionic gonadotropin-alpha gene through protein kinase A pathway in trophoblast cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001, 182:215-224.
124. Yuan W, Pan W, Kong J, Zheng W, Szeto FL, Wong KE, Cohen R, Klopot A, Zhang Z, Li YC: 1,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. *J Biol Chem* 2007, 282:29821-29830.
125. Basirat Z, Barat S, Hajiahmadi M: Serum beta human chorionic gonadotropin levels and preeclampsia. *Saudi Med J* 2006, 27:1001-1004.
126. Miller WL: Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology* 2005, 146:2544-2550.
127. Chung BC, Guo IC, Chou SJ: Transcriptional regulation of the CYP11A1 and ferredoxin genes. *Steroids* 1997, 62:37-42.
128. Strauss JF, 3rd, Martinez F, Kiriakidou M: Placental steroid hormone synthesis: unique features and unanswered questions. *Biol Reprod* 1996, 54:303-311.
129. Harada N, Yoshimura N, Honda S: Unique regulation of expression of human aromatase in the placenta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003, 86:327-334.
130. Ritvos O, Voutilainen R: Regulation of aromatase cytochrome P-450 and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid levels in choriocarcinoma cells. *Endocrinology* 1992, 130:61-67.
131. Guerin SL, Leclerc S, Verreault H, Labrie F, Luu-The V: Overlapping cis-acting elements located in the first intron of the gene for type I 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase modulate its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 1995, 9:1583-1597.

132. Peng L, Huang Y, Jin F, Jiang SW, Payne AH: Transcription enhancer factor-5 and a GATA-like protein determine placental-specific expression of the Type I human 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene, HSD3B1. *Mol Endocrinol* 2004, 18:2049-2060.
133. Kanasaki K, Palmsten K, Sugimoto H, Ahmad S, Hamano Y, Xie L, Parry S, Augustin HG, Gattone VH, Folkman J, et al: Deficiency in catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyoestradiol is associated with pre-eclampsia. *Nature* 2008.
134. Holinka CF, Diczfalusy E, Coelingh Bennink HJ: Estetrol: A unique steroid in human pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008.

XIII. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Los trabajos presentados a continuación fueron parte de las contribuciones que el postulante realizó durante el Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina, UNAM.

1. **Barrera D**, Avila E, Hernández G, Halhali A, Biruete B, Larrea F and Díaz L. Estradiol and progesterone synthesis in human placenta is stimulated by calcitriol. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007, Mar;103(3-5):529-32.
2. **Barrera D**, Díaz L y Avila E. Papel inmunológico de la progesterona en el mantenimiento del embarazo. *Rev Invest Clin*. 2007, 59(2):139-145.
3. **Barrera D**, Avila E, Hernández G, Mendez I, González L, Halhali A, Larrea F, Morales A and Díaz L. Calcitriol affects hCG gene transcription in human syncytiotrophoblast cultures. *Reprod Biol Endocrinol*. 2008, 6: 3.
4. **Barrera D**, Chirinos M y García-Becerra R. Mecanismos de regulación de la síntesis y secreción de la gonadotropina coriónica humana (hCG) durante el embarazo. *Rev Invest Clin*. 2008, 60 (2):124-132.
5. Avila E, Díaz L, **Barrera D**, Halhali A, Mendez I, González L, Zuegel U, Steinmeyer A and Larrea F. Regulation of vitamin D hydroxylases gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblasts. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007 Jan;103(1):90-6.
6. Avila E, Díaz L, **Barrera D**, Arranz C, Halhali A, Larrea F. Metabolism of vitamin D in the human choriocarcinoma cell line JEG-3. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007, Mar;103(3-5):781-5.
7. Avila E, **Barrera D** y Díaz L. Acciones calciotrópicas de la hormona paratiroidea y del sistema endocrino de la vitamina D. *Rev Invest Clin*. 2007, 59(4): 306-317.

Estradiol and progesterone synthesis in human placenta is stimulated by calcitriol

David Barrera^a, Euclides Avila^a, Guillermo Hernández^a, Ali Halhali^a,
Benjamín Biruete^b, Fernando Larrea^a, Lorenza Díaz^{a,*}

^a *Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14000, México, D.F., Mexico*

^b *Hospital de Gineco-Obstetricia "Luis Castelazo Ayala", IMSS, Río Magdalena No. 289, Tizapán 01090, México, D.F., Mexico*

Abstract

Calcitriol exerts a diverse range of biological actions including the control of growth and cell differentiation, modulation of hormone secretion, and regulation of reproductive function. The placenta synthesizes calcitriol through the expression of CYP27B1, but little is known about local actions of this hormone in the fetoplacental unit. The objective of this study was to investigate the effects of calcitriol upon progesterone (P₄) and estradiol (E₂) secretion in trophoblasts cultured from term human placenta. Cells were incubated in the presence of calcitriol for 18 h and pregnenolone or androstenedione were subsequently added as substrates for the 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD) or P450-aromatase (CYP19), respectively. Calcitriol stimulated in a dose-dependant manner E₂ and P₄ secretion. The use of a selective inhibitor of PKA prevented the effects of calcitriol upon E₂ secretion, but not on P₄. These results show that calcitriol is a physiological regulator of placental E₂ and P₄ production and suggest a novel role for calcitriol upon placental steroidogenesis.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Trophoblast; 1,25-Dihydroxyvitamin D; CYP19; 3β-HSD; Steroidogenesis

1. Introduction

Calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D₃) has well-established effects on bone metabolism, mineral homeostasis and as an antiproliferative and immunomodulatory hormone [1]. Besides the organs involved in mineral homeostasis, the vitamin D receptor (VDR) and the vitamin D-activating enzyme CYP27B1 are expressed in many tissues and cell types, which respond to calcitriol with a diverse range of biological actions. In non-classic vitamin D target organs, calcitriol induces local autocrine–paracrine effects that diverge from the traditional endocrine effects. The placenta expresses CYP27B1 [2] and the VDR [3,4]; but the potential role of locally generated calcitriol as a modulator of fetal-placental development and function is still under investigation. Previous studies have demonstrated that calcitriol promotes calcium transport in the placenta [5], stimulates placental lactogen expression [6], decidualization of the endometrium [7], and regulates

HOXA10 expression [8], a key target gene associated with the implantation process. Furthermore, since calcitriol is an immunosuppressive agent [9] and regulates the synthesis of several cytokines including decidual prolactin [10], it may contribute to the establishment of the fetoplacental unit. The hormones estradiol (E₂) and progesterone (P₄) are produced from testosterone and pregnenolone by P450-aromatase (CYP19) and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD), respectively [11]. P₄ and E₂ rise in concert with advancing gestation, and these hormones synthesized within the placenta play a major role in homeostatic mechanisms important to pregnancy maintenance and the development of the fetus. In general, E₂ regulates the maternal cardiovascular system, uteroplacental blood flow, and placental neovascularization, while progesterone helps to maintain uterine quiescence as well as maternal immunotolerance to the fetal allograft [11]. In the present study we investigated a direct effect of calcitriol upon androstenedione and pregnenolone biotransformation into E₂ and P₄, respectively, in cultured human syncytiotrophoblasts, in an effort to understand some of the biological actions of calcitriol in the placenta.

* Corresponding author. Tel.: +52 5 555731160; fax: +52 5 556559859.
E-mail address: lorenzadiaz@gmail.com (L. Díaz).

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Culture media and fetal bovine serum (FBS) were from Invitrogen (Grand Island, NY). Calcitriol was kindly donated from Dr. Perrin, Hoffmann-La Roche Ltd. (Basel, Switzerland). 8-Bromo cAMP (8-Br-cAMP), 3β -hydroxy-5-pregnen-20-one (pregnenolone) and androst-4-ene-3,17-dione (androstenedione) were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Radioimmunoassays (RIA) for E_2 and P_4 were from Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, CA) and the immunoassay (EIA) for human chorionic gonadotrophin (hCG) was from Immunometrics Ltd. (London, UK).

2.2. Trophoblast cell culture

This study was approved by the Institutional Human Ethical Committee. Term placentae were obtained from normal gestations. Trophoblasts were cultured as previously described [2]. Briefly, villous tissue was enzymatically dispersed and cells were separated on density Percoll gradients. Trophoblasts were plated at a density of 8×10^5 cells/ml in supplemented medium [(DMEM) 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 0.25 μ g/ml fungizone], containing 20% heat-inactivated FBS. Incubations were performed in humidified 5% CO_2 –95% air at 37 °C. Secreted hCG was measured by EIA. Protein content was determined by the method of Bradford [12] and results were expressed as IU/mg protein.

2.3. P450-aromatase and 3β -HSD activity

Trophoblasts cultured for 24 h were incubated with increasing concentrations of calcitriol in serum-free DMEM/F12. After 18 h, pregnenolone or androstenedione were added as substrates for 3β -HSD and P450-aromatase, respectively, and incubations continued for 3 and 6 more hours. P_4 and E_2 were evaluated in culture media by RIA, and results normalized against total protein content.

2.4. Statistical analysis

Statistical significance among comparisons was established using Student's *t*-test. A *P*-value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Morphological and functional evaluation of cultured syncytiotrophoblasts

Cultured purified cytotrophoblasts aggregated and formed syncytia in a time dependent manner. Cell culture viability

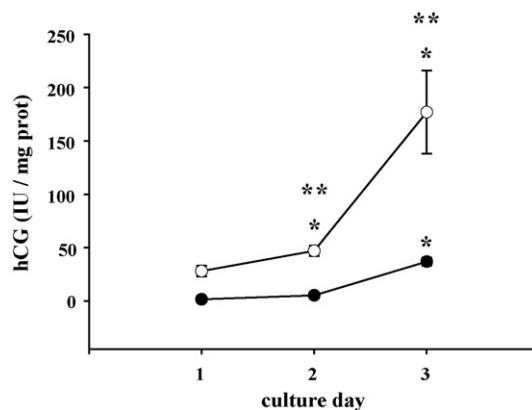


Fig. 1. Temporal pattern of hCG secretion by cultured human syncytiotrophoblasts. Mononuclear cells were incubated for 3 days in the absence (closed circles) or the presence (open circles) of 8-Br-cAMP (1.5 mM). hCG in culture media was measured daily and data are presented as the mean \pm S.D. of three cell cultures. **P* < 0.005 vs. day 1; ***P* < 0.005 vs. control.

was evaluated by measurements of hCG in the presence or absence of 8-Br-cAMP. Basal secretion of hCG into the culture media increased during the cytodifferentiation process. Cells cultured in the presence of 8-Br-cAMP secreted significantly more hCG (Fig. 1). These data, in addition to morphological cell evaluation, further confirmed the functional integrity of the culture system used throughout this study.

3.2. Stimulation of P450-aromatase and 3β -HSD activity by calcitriol

Incubation of cells in the presence of calcitriol during 18 h and subsequent addition of androstenedione or pregnenolone resulted in a dose-dependant increase in E_2 (Fig. 2A) and P_4 (Fig. 2B) secretion, which was statistically significant after 3 and 6 h respectively. However, no differences in steroid secretion between control and calcitriol stimulated cells were observed when calcitriol and steroid precursors were added simultaneously and incubated for only 6 h. Interestingly, calcitriol stimulated P_4 secretion even in the absence of the corresponding exogenous precursor (data not shown).

3.3. Effects of H-89 upon calcitriol-dependant hormone stimulation

Incubation of cells in the presence of calcitriol and H-89, a selective inhibitor of the protein kinase A (PKA), abrogated the stimulatory effects of calcitriol upon the bioconversion of androstenedione to E_2 (Fig. 3); however, calcitriol-mediated 3β -HSD activity was not affected by the PKA inhibitor (Fig. 3).

4. Discussion

In the present study, we demonstrated that calcitriol stimulates E_2 and P_4 secretion in cultured human syncytiotro-

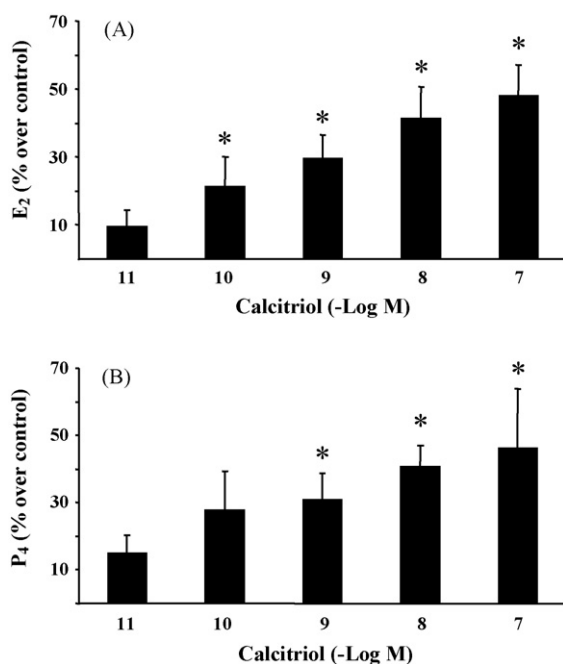


Fig. 2. Calcitriol effects upon E₂ and P₄ secretion in cultured human syncytiotrophoblasts. Cells were incubated in the presence of increasing concentrations of calcitriol (1×10^{-11} to 1×10^{-7} M) during 18 h. Subsequently, E₂ and P₄ secretion was measured after 3 or 6 h incubation with 1×10^{-7} M androstenedione (A) or pregnenolone (B), respectively. Results were expressed as percent over ethanol-treated control cultures. Each bar represents the mean \pm S.D. of three cell cultures. * $P < 0.05$ vs. control.

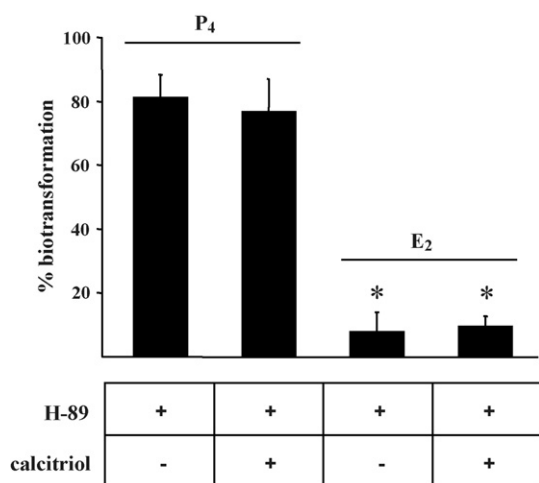


Fig. 3. Effects of a PKA inhibitor upon calcitriol-dependent stimulation of P₄ and E₂ secretion in cultured human syncytiotrophoblasts. Cells were incubated with calcitriol (1×10^{-7} M) in the presence or absence of H-89 (5 μ M). Following 18 h, steroid precursors (1×10^{-7} M) were added, and the incubations proceeded for 3 or 6 h for E₂ and P₄ quantification, respectively. Calcitriol incubations in the absence of H-89 represent 100% biotransformation. Bars are the mean \pm S.D. of three cell cultures. * $P < 0.005$ vs. calcitriol incubations without H-89.

phoblasts. Calcitriol effects upon other placental hormones such as placental lactogen and prolactin have previously been shown [6,10]. These observations support the concept that calcitriol is a regulator of placental endocrine function. Even though calcitriol and VDR are synthesized and expressed in the placenta [2,3], the functions of the VDR and its natural ligand in this tissue are poorly understood. Two pieces of evidence have shown that calcitriol, acting through the VDR, plays a primordial role in estrogen biosynthesis. Kinuta et al. showed that P450-aromatase activity and CYP19 gene expression are decreased in gonads of the VDR null mutant mice [13]. In another study, Sun et al. demonstrated in a human choriocarcinoma cell line, that P450-aromatase activity and expression are stimulated by calcitriol and retinoids; and characterized an atypical vitamin D response element in CYP19 promoter [14]. These findings suggest that calcitriol stimulation of CYP19 activity in the model used in this study, was probably at the level of CYP19 gene transcription. This possibility was further supported by the observation that concomitant addition of calcitriol and steroid precursors did not significantly augment E₂ secretion. Additional research to this regard is being undertaken in our laboratory. The finding that a selective inhibitor of PKA activity (H-89) prevented calcitriol effects upon E₂ secretion was in line with previous reports showing that bioconversion of androgens to estrogens in JEG-3 cells and ovary is stimulated by cholera toxin and forskolin [15,16]. Harada et al. demonstrated that cAMP is involved in CYP19 transcription, and characterized a cAMP responsive element in CYP19 placental-specific promoter [16]. Furthermore, the observation that calcitriol did not stimulate E₂ secretion in the presence of H-89 suggested that the PKA signaling pathway is involved in calcitriol actions at the placental level. In fact, it has been shown that calcitriol significantly increased cAMP within a period of 1–10 min in heart muscle cells and human trophoblasts [17,18]. These data suggest that calcitriol stimulates E₂ secretion in the trophoblast acting at different levels of the CYP19 promoter; either by the PKA signaling pathway, or through the atypical VDR response element. Our results also showed that P₄ secretion was stimulated by the secosteroid, but in contrast to E₂, the presence of H-89 did not abrogate calcitriol-stimuli. In placenta and other tissues, pregnenolone, produced by the action of the P450 side chain cleavage enzyme (P450_{scc}), is converted to P₄ by the 3 β -HSD [19]. It is accepted that the rate-determining step in placental P₄ synthesis is the electron transport to the P450_{scc}, indicating that the concentrations of adrenodoxin reductase (AR) is the limiting component for P450_{scc} activity [19]. Although Chaudhary et al. demonstrated that hCG stimulation of P₄ secretion is through a cAMP second messenger pathway [20], cAMP does not seem to act directly upon the 3 β -HSD, but rather on P450_{scc} and AR [19]. In our study, the rise on P₄ secretion appeared to be an effect independent of the PKA signaling pathway. Considering previous results from our laboratory demonstrating that cultured trophoblasts synthesize calcitriol [2], the present study indicates that this hormone acts as an

autocrine–paracrine signal in the regulation of E₂ and P₄ secretion in placental cells.

In summary, the results presented herein showed that calcitriol stimulated both 3 β -HSD and P450-aromatase in cultured human syncytiotrophoblasts, and suggested that the mechanism underlying calcitriol-mediated effects upon androstenedione bioconversion to E₂ was a PKA-mediated pathway, whereas regulation of 3 β -HSD appeared to be controlled by a different mechanism independent of cAMP.

Acknowledgments

D.B. is a Ph.D. student from Doctorado en Ciencias, UNAM, under a fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México). This work was supported by a grant (45937/A1) from CONACyT, México.

References

- [1] A.S. Dusso, A.J. Brown, E. Slatopolsky, Vitamin D, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 289 (1) (2005) F8–F28.
- [2] L. Diaz, I. Sanchez, E. Avila, A. Halhali, F. Vilchis, F. Larrea, Identification of a 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene transcription product in cultures of human syncytiotrophoblast cells, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (7) (2000) 2543–2549.
- [3] A. Tanamura, S. Nomura, O. Kurauchi, T. Furui, S. Mizutani, Y. Tomoda, Purification and characterization of 1,25(OH)₂D₃ receptor from human placenta, *J. Obstet. Gynaecol.* 21 (6) (1995) 631–639.
- [4] E. Avila, L. Diaz, A. Halhali, F. Larrea, Regulation of 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase, 1,25-dihydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression by 8-bromo cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblast cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 89–90 (1–5) (2004) 115–119.
- [5] R.S. Tuan, C.J. Moore, J.W. Brittingham, J.J. Kirwin, R.E. Akins, M. Wong, In vitro study of placental trophoblast calcium uptake using JEG-3 human choriocarcinoma cells, *J. Cell Sci.* 98 (Part 3) (1991) 333–342.
- [6] A. Stephanou, R. Ross, S. Handwerger, Regulation of human placental lactogen expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃, *Endocrinology* 135 (6) (1994) 2651–2656.
- [7] A. Halhali, G.M. Acker, M. Garabedian, 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces in vivo the decidualization of rat endometrial cells, *J. Reprod. Fertil.* 91 (1) (1991) 59–64.
- [8] H. Du, G.S. Daftary, S.I. Lalwani, H.S. Taylor, Direct regulation of HOXA10 by 1,25-(OH)₂D₃ in human myelomonocytic cells and human endometrial stromal cells, *Mol. Endocrinol.* 19 (9) (2005) 2222–2233.
- [9] J.M. Lemire, D.C. Archer, L. Beck, H.L. Spiegelberg, Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃: preferential inhibition of Th1 functions, *J. Nutr.* 125 (Suppl. 6) (1995) 1704S–1708S.
- [10] E.E. Delvin, L. Gagnon, A. Arabian, W. Gibb, Influence of calcitriol on prolactin and prostaglandin production by human decidua, *Mol. Cell. Endocrinol.* 71 (3) (1990) 177–183.
- [11] E.D. Albrecht, G.J. Pepe, Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy, *Endocr. Rev.* 11 (1) (1990) 124–150.
- [12] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [13] K. Kinuta, H. Tanaka, T. Moriwake, K. Aya, S. Kato, Y. Seino, Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads, *Endocrinology* 141 (4) (2000) 1317–1324.
- [14] T. Sun, Y. Zhao, D.J. Mangelsdorf, E.R. Simpson, Characterization of a region upstream of exon I.1 of the human CYP19 (aromatase) gene that mediates regulation by retinoids in human choriocarcinoma cells, *Endocrinology* 139 (4) (1998) 1684–1691.
- [15] O. Ritvos, R. Voutilainen, Regulation of aromatase cytochrome P-450 and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid levels in choriocarcinoma cells, *Endocrinology* 130 (1) (1992) 61–67.
- [16] N. Harada, N. Yoshimura, S. Honda, Unique regulation of expression of human aromatase in the placenta, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 86 (3–5) (2003) 327–334.
- [17] J. Selles, R. Boland, Evidence on the participation of the 3',5'-cyclic AMP pathway in the non-genomic action of 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ in cardiac muscle, *Mol. Cell. Endocrinol.* 82 (2–3) (1991) 229–235.
- [18] E. Avila, L. Díaz, D. Barrera, A. Halhali, I. Méndez, L. González, U. Zuegel, A. Steinmeyer, F. Larrea, Regulation of vitamin D hydroxylases gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblasts, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 103 (1) (2007) 90–96.
- [19] R.C. Tuckey, Progesterone synthesis by the human placenta, *Placenta* 26 (4) (2005) 273–281.
- [20] J. Chaudhary, S. Bhattacharyya, C. Das, Regulation of progesterone secretion in human syncytiotrophoblast in culture by human chorionic gonadotropin, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42 (3–4) (1992) 425–432.

Papel inmunológico de la progesterona en el mantenimiento del embarazo

David Barrera,* Euclides Avila,* Lorenza Díaz*

* Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Immunological role of progesterone in the maintenance of pregnancy

ABSTRACT

Progesterone is an essential hormone for pregnancy maintenance. This hormone acts by binding to its intracellular receptor or by rapid non-genomic actions to regulate a wide variety of biological functions in the feto-placental unit. Progesterone regulates blastocyst implantation and placental development by inducing immunosuppression through type Th2 cytokines secretion. This review summarizes current research about the role of progesterone as critical regulator of expression and secretion of cytokines by T-cell and other placental cells.

Key words. Progesterone. Cytokines. NF-kB. Calcineurin. T-lymphocytes. Trophoblast.

INTRODUCCIÓN

La progesterona (P_4) es una hormona esteroide de 21 átomos de carbono con numerosas funciones biológicas, principalmente ligadas a eventos reproductivos. En la mujer esta hormona es producida principalmente en el ovario por las células del cuerpo lúteo. En caso de que ocurra la fertilización, los trofoblastos sintetizarán P_4 en gran cantidad, gracias a la bioconversión de lipoproteínas de baja densidad maternas a pregnenolona y posteriormente a P_4 . Las concentraciones séricas de P_4 durante el embarazo se incrementan significativamente de forma lineal conforme avanzan las semanas de gestación,

RESUMEN

La progesterona es una hormona esteroide muy versátil y esencial para el mantenimiento del embarazo. El principal mecanismo de acción de la progesterona es el clásico, vía receptor intracelular, regulando diversas funciones, aspectos celulares y vías moleculares implicadas en el proceso de la implantación. Asimismo existen mecanismos adicionales que no dependen de la interacción del complejo hormona receptor con la maquinaria transcripcional y que son capaces de regular rápidamente cascadas de señalización que determinarán la respuesta de la célula. En particular se ha demostrado que la progesterona ejerce efectos inmunosupresores durante la gestación al favorecer la secreción de citocinas de tipo Th2 por los linfocitos T, evento importante para regular el sistema inmunológico materno y evitar el rechazo de la placenta. El objetivo de esta revisión se centra en analizar la influencia de la progesterona en la interfase materno-fetal sobre la expresión y secreción de citocinas por las células T y no T como es el caso del trofoblasto.

Palabras clave. Progesterona. Citocinas. NF-kB. Calcineurina. Linfocitos T. Trofoblasto.

alcanzando valores que oscilan entre 475-556 nmol/L (150-175 ng/mL) al término.¹ Este aumento favorece la adaptación del sistema materno-fetal al inducir cambios directos sobre blancos específicos a P_4 o mediante su biotransformación a otros esteroides tales como andrógenos y estrógenos (Figura 1) producidos por la unidad funcional fetoplacentaria.²

Se ha descrito que la P_4 tiene efectos sobre la ovulación y el desarrollo de la glándula mamaria. Después de la fecundación, la P_4 induce la proliferación, diferenciación y decidualización de las células del endometrio creando un ambiente propicio para el proceso de la implantación. Asimismo, la P_4 contribuye a la inhibición de las contracciones uterinas,

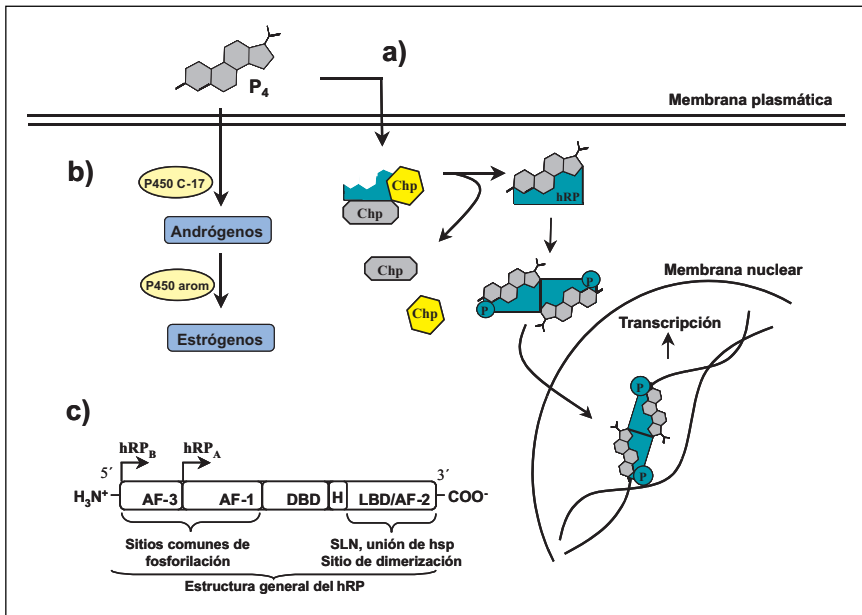


Figura 1. Mecanismo de acción genómica de P_4 , metabolismo, y estructura general de los receptores de P_4 (hRPs). a) Formación del complejo hormona-receptor, dimerización e interacción con el DNA sobre elementos de respuesta a P_4 para iniciar la transcripción. b) Biosíntesis de andrógenos y estrógenos a partir de P_4 mediante sus correspondientes citocromos, P450C-17 y P450 aromataasa (P450 arom), y c) Principales componentes del hRP. Fosfatos (P); chaperonas (Chp), dominio de activación funcional (AF), dominio de unión al DNA (DBD), secuencias de localización nuclear (SLN), región bisagra (H), dominio de unión al ligando (LBD).

disminuye las conexiones gap, estimula la actividad del óxido nítrico sintetasa uterina y regula la secreción de citocinas.³⁻⁵ Sin embargo, los mecanismos para ejercer estos efectos son diversos y en algunos casos no han sido totalmente esclarecidos. En esta revisión se analizan las principales vías que utiliza la P_4 para modular el proceso de implantación y la retención del feto a lo largo de la gestación, enfatizando sus propiedades inmunológicas.

MECANISMO CLÁSICO DE ACCIÓN DE LA P_4

Desde hace varias décadas el mecanismo por el cual la P_4 ejerce sus efectos ha sido motivo de estudio, atribuyendo en gran parte sus acciones al mecanismo clásico de la acción genómica de las hormonas esteroides. Por sus propiedades hidrofóbicas la P_4 atraviesa la membrana plasmática de las células blanco y se internaliza en el citoplasma para interactuar con su receptor intracelular específico (hRP). La interacción del esteroide con su receptor en el dominio de unión al ligando (LBD) induce un cambio conformacional que permite separar las moléculas chaperonas (hsp90, hsp70, hsp40, Hop y p23) que se encuentran unidas al hRP y favorece la fosforilación del receptor para iniciar su dimerización. Posteriormente el complejo hormona-receptor se une a los elementos de respuesta a P_4 en el DNA y se acoplan los factores de transcripción necesarios para que la polimerasa se una al promotor e inicie la transcripción de genes específicos dependiendo del

tipo celular (Figura 1). La expresión de genes blanco es modulada a través del efecto de coactivadores o correpresores, respectivamente.^{6,7}

RECEPTORES A P_4

En el ser humano existen principalmente dos isoformas del receptor para P_4 que son estructuralmente similares pero diferentes funcionalmente: el receptor A (hRP_A) de 94 kDa y el B (hRP_B) de 116 kDa que pertenecen a la familia del tipo I de los receptores a hormonas nucleares.⁸ El gen del hRP_B consiste de ocho exones separados por siete intrones que codifican para una proteína que contiene diferentes dominios funcionales. El exón 1 codifica para la región N-terminal del receptor y para uno de los tres dominios de activación funcional: el AF-3. Los exones 2 y 3 codifican para el AF-1 y el dominio de unión al DNA altamente conservado, que contiene dos dedos de cinc asimétricos coordinados cada uno por cuatro residuos de cisteína. Los exones 4-8 codifican para el LBD y para el AF-2. En esta parte también se codifica para la región bisagra, los sitios de localización nuclear y motivos importantes para la dimerización del receptor y unión de las proteínas de choque térmico (hsp) e inmunofilinas. El hRP_A proviene del mismo gen que el hRP_B, pero su transcripción es regulada por un promotor alternativo que presenta la terminación N-terminal truncada, y que carece de 164 aminoácidos que corresponden al dominio AF-3.^{9,10}

Las isoformas de los receptores a P_4 , al igual que otros miembros de la familia de receptores a hormo-

nas esteroides, son susceptibles de ser fosforiladas por múltiples proteínas cinasas principalmente sobre residuos de serina a través de toda la molécula, pero particularmente en la región amino terminal (Figura 1). Los RPs contienen un total de 14 sitios de fosforilación conocidos (ser^{20, 25, 81, 102, 130, 162, 190, 213, 294, 345, 400 y 676} y Thr^{430, 554}). Los residuos de serina en la posición 81, 162, 190, 400 y un residuo de treonina son definidos como sitios basales constitutivamente fosforilados en ausencia de la hormona, mientras que las serinas 102, 294 y 345 son sitios inducidos por la hormona que se fosforilan entre 1-2 horas después del tratamiento con progestinas.¹¹ Aunque la importancia de la fosforilación no ha sido totalmente estudiada, se ha implicado en la regulación de la transcripción de genes al permitir la interacción del receptor con algunos correguladores aún independientemente del ligando. Por otra parte, la P₄ y los RPs pueden activar vías de señalización que involucran el entrecruzamiento de señales para inducir diferentes efectos biológicos.¹²⁻¹⁴

ACCIONES INMUNOSUPRESORAS Y ANTIINFLAMATORIAS DE LA P₄ DURANTE EL EMBARAZO

El embarazo es una condición única que garantiza el desarrollo de un organismo independiente con diferente perfil antigénico al de la madre. El proceso de la implantación se controla por la integración de mecanismos promovidos por los diferentes tipos celulares presentes en la interfase materno-fetal que incluyen: células del trofoblasto, células deciduales y linfocitos T. Como ha sido revisado en extenso por otros autores, durante este proceso están involucradas diversas moléculas que incluyen a las hormonas esteroides sexuales, los factores de crecimiento, las citocinas, los mediadores lipídicos, los agentes vasoactivos, el calcitriol, los factores de adhesión celular y los factores de transcripción que implican a los genes HOX, entre otros.^{15,16} Asimismo, la regulación del aspecto inmunológico materno se mantiene en constante estudio, señalándose que las moléculas producidas por las células deciduales y del trofoblasto tienen una importante participación en la aceptación de la placenta por la madre.

En particular, la P₄ contribuye de forma preponderante e integral en funciones de tolerancia inmunológica que permiten la supervivencia del feto al evitar el rechazo de la placenta, que es considerada como un alo-injerto dentro del útero.¹⁷ Durante el embarazo los diferentes tipos celulares que median la implantación, son susceptibles a los efectos de la

P₄ debido a la creciente producción de esta hormona y sus receptores en este periodo.¹⁸ El efecto de la P₄ sobre estas células promueve la retención del alo-injerto fetal regulando el reconocimiento de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad paternos, la polaridad de las células T efectoras, la sensibilidad de las células presentadoras de antígeno y suprimiendo la actividad de los macrófagos.

Es importante mencionar que diferentes estudios han concluido que las citocinas como IL-12 (un poderoso inductor de IFN- γ), IFN- γ e IFN- α promueven la diferenciación de las células T vírgenes hacia células Th1 y que son dañinas para el embarazo, mientras que en numerosos sistemas IL-4 es un factor que determina la polarización de las células T vírgenes y células Th de memoria a células Th2 para favorecer así la implantación, evitando el rechazo de la madre.¹⁹ Sin embargo, el mecanismo de regulación de la secreción de citocinas presentes en la interfase continúa en estudio.

Los trabajos de Szekeres-Bartho, *et al.*²⁰ señalan que los efectos inmunomoduladores de la P₄ son mediados por una proteína de 34 kDa llamada factor bloqueador inducido por progesterona (PIBF). El PIBF es sintetizado por la acción de P₄ en los linfocitos de mujeres embarazadas sanas mediante el mecanismo clásico antes descrito. El incremento del PIBF en linfocitos bloquea la acción de la fosfolipasa A2, evitando así la liberación del ácido araquidónico y la producción de prostaglandinas y/o leucotrienos, lo que conduce a su vez a la disminución de la producción de IL-12 dependiente de esta vía. Paralelamente, se inhibe la actividad de las células "natural killer" (NK) que son activadas por IL-12, con una subsecuente degranulación y liberación de las perforinas.²¹ La biosíntesis del PIBF se favorece por la sobreproducción de los receptores a P₄ en los linfocitos activados entre las células del trofoblasto y las células deciduales.²² Trabajos realizados en ratones Balb/c y en humanos tratados con la antiprogestina RU486 han confirmado la importancia de la P₄ sobre la producción del PIBF. La administración del RU486 en ratones propicia la reabsorción de las crías, lo cual se asocia con la incapacidad de las células del bazo para producir PIBF.²³ Este efecto se revierte cuando existe un tratamiento simultáneo con PIBF. En el humano, se determinó que el índice de expresión de esta proteína disminuye en los linfocitos de sangre periférica de mujeres embarazadas que interrumpieron su gestación por la administración del RU486 y los estudios inmunocitoquímicos mostraron que el porcentaje de linfocitos positivos a PIBF se redujo después de la administración de la

antihormona.²⁴ Experimentos *in vivo* e *in vitro* muestran que en linfocitos activados y tratados con PIBF se induce la producción de citocinas de tipo Th2 (IL-3, IL-4 e IL-10) capaces de suprimir la diferenciación a Th1. El mecanismo propuesto para explicar este hecho es por la interacción del PIBF con las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STATs), las cuales juegan un papel importante en la síntesis y vías de señalización de las citocinas.²⁰ Diferentes miembros de la familia STAT (en los mamíferos la familia STAT consta de al menos seis miembros, designados como STAT 1-6), son activados por una variedad de citocinas que incluyen a los interferones α , β y γ , la IL-6, hormonas de crecimiento, la eritropoyetina y la leptina de una forma dependiente de la familia Janus cinasas. Este tipo de tirosinas cinasas pueden activar a las proteínas STAT, fosforilando directamente los residuos de tirosina críticos para que las moléculas STAT formen homo- o hetero-dímeros. Los complejos STAT fosforilados en residuos de tirosina entran al núcleo y activan genes blanco al unirse con sus secuencias de DNA específicas. En particular se sabe que STAT-4 es principalmente fosforilado por una vía dependiente de IL-12 en células T y en las células NK por las tirosinas cinasas Jak2 y Tyk2, lo que conduce a la producción de citocinas de tipo Th1.²⁵ Sin embargo, el PIBF producido por la acción genómica de la P_4 ejerce efectos negativos sobre la fosforilación de la proteína STAT-4 impidiendo su translocación al núcleo. En contraste, el PIBF fosforila a la proteína cinasa C (PKC) y al receptor de IL-4 los cuales interactúan con la proteína STAT-6 para favorecer su fosforilación y translocación nuclear e inducir la producción de citocinas de tipo

Th2.^{26,27} Cuando IL-4 e IL-12 están presentes, la diferenciación de las células T y NK es regulada por el balance de PKC activa y las concentraciones de calcio, de manera que la alta actividad de PKC y la baja concentración de calcio favorecen el desarrollo tipo Th2 y viceversa (Figura 2).

INMUNOSUPRESIÓN DE P_4 POR INTERFERENCIA DE LA VÍA NF- κ B

Por otra parte, el proceso de polarización celular de los linfocitos T hacia un fenotipo Th1 *vs.* Th2 es un evento regulado por la activación y/o inhibición del factor nuclear NF- κ B. Al respecto se ha descrito que la P_4 ejerce su función inmunosupresora en los linfocitos de forma similar a los glucocorticoides, al impedir la activación del NF- κ B (Figura 2).²⁸ El NF- κ B es un factor de transcripción que está formado por dímeros pertenecientes a la familia proteica Rel constituido principalmente por el heterodímero prototípico p65/p50, considerado como el mejor inductor de genes inflamatorios. El NF- κ B se localiza en el citoplasma inactivado por una proteína inhibidora llamada I κ B de 60 a 70 kDa que se asocia específicamente con los dímeros NF- κ B formando un trímero incapaz de unirse al DNA. El mecanismo de señalización comienza cuando I κ B es fosforilado por la vía dependiente del complejo I κ B cinasa (IKK), un complejo con una masa molecular de aproximadamente 700-900 κ Da, que contiene una subunidad reguladora IKK γ /NEMO 2 y dos subunidades catalíticas; IKK α e IKK β . La activación de IKK requiere de la fosforilación previa de las dos subunidades catalíticas y finalmente de I κ B, marcándola para su degradación por la vía de la ubiquitina-proteosoma, así el

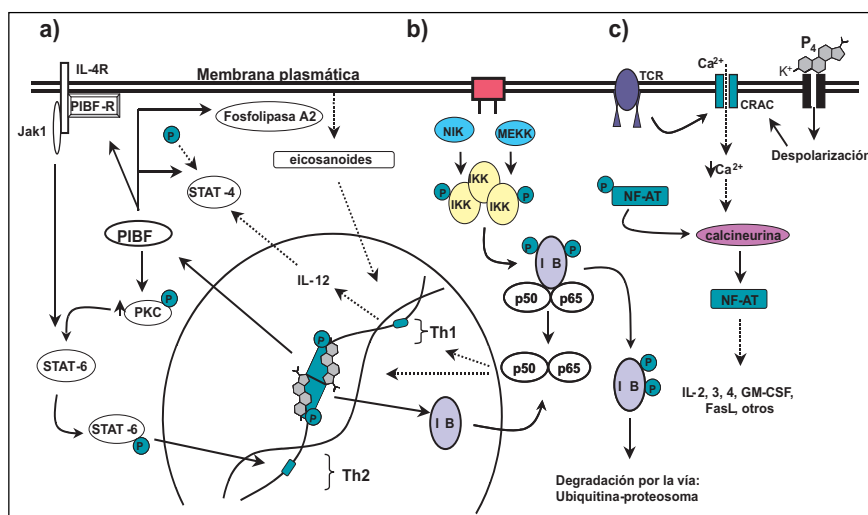


Figura 2. Control de la P_4 sobre la secreción de citocinas tipo Th1/Th2. a) El complejo hormona receptor en el DNA induce la producción del PIBF. El PIBF permite la fosforilación (P) del receptor a IL-4 ($IL-4R\alpha$) y de la PKC con la subsecuente activación de STAT-6. Asimismo, el PIBF inhibe la fosforilación de STAT-4 y la acción de la fosfolipasa A, impidiendo la liberación de los eicosanoides y la producción de citocinas Th1, b) Inhibición de la P_4 sobre la producción de citocinas proinflamatorias inducidas por NF- κ B, c) Interacción de la P_4 con canales de K^+ en la membrana celular, disminuyendo la $[Ca^{2+}]_i$ y en consecuencia evitando la activación de NF-AT, respectivamente. Nótese la supresión de citocinas tipo Th1. Las líneas punteadas representan las vías de señalización bloqueadas.

NF- κ B queda activado para su translocación nuclear e inducir la expresión de algunas citocinas que incluyen: IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 y TNF- α entre otras.²⁹ En la línea celular T47D, que expresa constitutivamente los receptores a P₄, se mostró la capacidad de P₄ para inducir la producción de I κ B α (inhibidor de NF- κ B) interfiriendo directamente con la activación de NF- κ B.²⁹ Asimismo se propone que la P₄ unida a su receptor puede competir con NF- κ B por un sitio de unión adyacente al DNA impidiendo la expresión de genes inducidos por parte del NF- κ B, así como por la competición de cofactores esenciales para su transcripción o bien al modificar la producción de citocinas por efecto de transrepresión del RP con el NF- κ B directamente o con factores de transcripción clave de forma tejido específico.³⁰

ACCIONES DE LA P₄ POR VÍAS NO GENÓMICAS

En contraste a la acción genómica de la P₄, existen efectos que han sido catalogados como de tipo no genómico,³¹ determinados por su rápido inicio de acción (de segundos a minutos), que resultan en diferentes vías de señalización que involucran proteínas de membrana. La activación de dichas vías favorece o reprime la producción de algunas citocinas linfocitarias, que en consecuencia determinarán su tipo de polarización. En efecto, se determinó que los canales de potasio (K⁺) de la membrana de linfocitos T son sensibles a la acción de P₄ más que a otros esteroides como testosterona o estradiol. Los canales de K⁺ activados por voltaje y los canales de K⁺ activados por calcio son bloqueados por acción directa de la P₄ de forma rápida y reversible. El bloqueo provoca la despolarización de la membrana y la inhibición de vías que dependen de la concentración de calcio intracelular ([Ca²⁺]_i).^{32,33} En los linfocitos T la expresión del gen IL-2 puede activarse mediante el factor nuclear de las células T activadas en el citoplasma (NF-ATc), sin embargo, la activación del NF-ATc es dependiente de una fosfatasa de treonina y serina, llamada calcineurina. Cuando el receptor de la célula T interacciona con el antígeno, se induce la liberación de Ca²⁺ de almacenes intracelulares y la captura de Ca²⁺ extracelular por la apertura de los canales de calcio regulados por capacitancia (CRAC) en la membrana celular. El incremento en la [Ca²⁺]_i activa a la calcineurina, que se une y desfosforila al NF-ATc para promover su translocación al núcleo e inducir la expresión de IL-2. Este proceso es reprimido por la interacción de P₄ sobre los canales de K⁺ que al despolarizar la membrana

disminuye la [Ca²⁺]_i, evitando la activación de la calcineurina, de NF-ATc y la expresión génica de IL-2, respectivamente. Las concentraciones séricas de P₄ secretada por las células de la placenta son suficientes para bloquear los canales de K⁺ en los linfocitos circulantes en la interfase materno-fetal, mostrando un mecanismo que contribuye al efecto inmunosupresor que presenta la P₄ de manera independiente a la unión con su receptor específico (Figura 2).

El efecto dual de la P₄ en su mecanismo de acción incrementa la posibilidad de su asociación en las diferentes vías y mecanismos de señalización, para direccionar el fenotipo Th2 durante el embarazo y mantener el efecto inmunosupresor a lo largo de la gestación; no obstante, su interacción con otras moléculas se encuentra en constante estudio. Interesantemente, reportes recientes han mostrado que además de los linajes Th1 y Th2, existe el subtipo poblacional Th17, involucrado en enfermedades autoinmunes y cáncer.³⁴ Las células Th17, así como las células de cito- y sincitiotrofoblasto secretan IL-17, una citocina proinflamatoria que se encuentra involucrada en procesos de neovascularización, en la producción de moléculas proangiogénicas y en el proceso invasor del trofoblasto.^{35,36} En general, la producción de células Th17 es determinada por la asociación de TGF- β 1 e IL-6 y en menor grado por IL-23.^{34,37,38} Su diferenciación depende de la activación de STAT-3 por acción de IL-6 o IL-23, mientras que su producción es inhibida por IL-4, IL-13 e IL-25.³⁹ Estas observaciones abren importantes fuentes de investigación del efecto de la P₄ en la regulación de esta subpoblación y en la producción de IL-17 de una forma autocrina o paracrina por las células del trofoblasto o las deciduales. Cabe mencionar que las células del trofoblasto expresan además de IL-17 otras citocinas tales como IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, el IFN- γ , el TNF- α y el GM-CSF^{35,40,41} y se ha descrito que en mujeres con preeclampsia la placenta secreta cantidades mayores de IL-2, IFN- γ y TNF- α y produce menos IL-10 que las embarazadas normales.⁴² Asimismo, se ha determinado que los niveles de IL-4 e IL-10 producidos por las células T deciduales son bajos en mujeres que sufren abortos espontáneos en comparación con los de una mujer normal,⁴³ estos hallazgos sugieren que la secreción de citocinas no es regulada correctamente por la P₄.

P₄ Y EL PARTO

Es interesante destacar que los trabajos realizados a la fecha no han logrado determinar si la funcionalidad de la P₄ se pierde durante el parto en el

ser humano, ya que a diferencia de otras especies, la concentración de la P_4 en circulación no disminuye en relación con el inicio de la labor. Con base en esta observación, algunas explicaciones han sido sugeridas para el inicio de trabajo de parto:

1. La inactivación de P_4 en tejidos blanco antes de la interacción con su receptor, por un cambio en la síntesis local de su metabolismo o mediante su secuestro por una proteína de unión.
2. Un cambio en el número, afinidad o distribución de los receptores a P_4 , determinando que en mujeres que no han entrado a labor la isoforma predominante es hPR_B mientras que en mujeres que entraron a trabajo de parto es hPR_A ,^{44,45} con el subsecuente aumento en la expresión de los receptores de estrógenos. Asimismo, no se descarta la participación de nuevas isoformas de los RPs presentes en la decidua.⁴⁶
3. La producción de antiprogestinas endógenas y/o la participación de inhibidores naturales de las cascadas de señalización, los cuales previenen las acciones biológicas de la P_4 .
4. El incremento en la concentración de agentes uterotónicos, los cuales mimetizan las acciones iniciales de la P_4 y/o cambian el patrón de secreción de algunas citocinas que han sido reguladas por la P_4 y en consecuencia provocan un cambio local del balance Th1/Th2 al término del embarazo, y
5. Las acciones génomicas de las isoformas del RP podrían ser diferencialmente modificadas por su asociación con las chaperonas y correguladores nucleares o bien ser moduladas por la fosforilación del receptor y por el entrecruzamiento con otras vías de señalización.

CONCLUSIÓN

Las evidencias mostradas dilucidan de manera general cómo la P_4 afecta el balance Th1/Th2 durante el embarazo; evento indispensable para contrarrestar el rechazo inmunológico materno. Asimismo, la producción local de citocinas por las células del trofoblasto podrían ser influenciadas por la P_4 interactuando de forma paracrina sobre la polaridad de los linfocitos circulantes. Sin embargo, no se ha determinado aún cuál vía es la más importante para regular el evento de la tolerancia inmunológica y la retención del producto. Sin duda, es necesaria la integración simultánea de diversos mecanismos para mantener el embarazo, así como la interacción de la P_4 con otras moléculas indispensables para el proceso de implantación, lo cual es favorecido por el cons-

tante incremento de las concentraciones séricas de la P_4 durante la gestación. Por ejemplo, no se excluye la interacción de la P_4 con otros esteroides para sinergizar o potenciar su efecto. Dichos esteroides pueden ser otras progestinas o el calcitriol, que disminuye la expresión de IL-2 e INF- γ cuando es administrado periféricamente,⁴⁷ lo cual evoca un patrón de respuesta Th2 beneficiando la implantación.⁴⁸ Cabe señalar que algunas citocinas derivadas de las células Th2 como IL-4 e IL-6 estimuladas por la presencia de P_4 , inducen la liberación de la gonadotropina coriónica humana (hCG) del trofoblasto y esta hormona a su vez estimula la secreción de P_4 , estableciéndose una estrecha relación entre el sistema endocrino y el inmunológico.⁴⁹

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma. Eugenia Torres M., por la clase impartida "Transducción de señales" en la Facultad de Medicina, UNAM.

REFERENCIAS

1. Albrecht ED, Pepe GJ. Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocr Rev* 1990; 11: 124-50.
2. Diczfalusy E. Steroid metabolism in the human foeto-placental unit. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1969; 61: 649-64.
3. Ragusa A, de Carolis C, dal Lago A, Miriello D, Ruggiero G, Brucato A, et al. Progesterone supplement in pregnancy: an immunologic therapy? *Lupus* 2004; 13: 639-42.
4. Astle S, Slater DM, Thornton S. The involvement of progesterone in the onset of human labour. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 108: 177-81.
5. Weiss G. Endocrinology of parturition. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4421-5.
6. Auboeuf D, Dowhan DH, Dutertre M, Martin N, Berget SM, O'Malley BW. A subset of nuclear receptor coregulators act as coupling proteins during synthesis and maturation of RNA transcripts. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 5307-16.
7. Bain DL, Heneghan AF, Connaghan-Jones KD, Miura MT. Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu Rev Physiol* 2007; 69: 201-20.
8. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lydon JP. Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* 2003; 68: 771-8.
9. Bramley T. Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues. *Reproduction* 2003; 125: 3-15.
10. Mulac-Jericevic B, Conneely OM. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* 2004; 128: 139-46.
11. Lange CA. Making sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: who will have the last word? *Mol Endocrinol* 2004; 18: 269-78.
12. Ballare C, Vallejo G, Vicent GP, Saragueta P, Beato M. Progesterone signaling in breast and endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; 102: 2-10.
13. Vallejo G, Ballare C, Baranao JL, Beato M, Saragueta P. Progesterin activation of nongenomic pathways via cross talk of progesterone receptor with estrogen receptor beta induces

- proliferation of endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 3023-37.
14. Faivre EJ, Lange CA. Progesterone Receptors upregulate Wnt-1 to Induce epidermal growth factor receptor transactivation and c-Src-dependent sustained activation of Erk1/2 Mitogen-activated protein kinase in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 466-80.
 15. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, et al. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 2004; 25: 341-73.
 16. Lee KY, DeMayo FJ. Animal models of implantation. *Reproduction* 2004; 128: 679-95.
 17. Peltier MR. Immunology of term and preterm labor. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 122.
 18. Piccinni MP, Romagnani S. Regulation of fetal allograft survival by a hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines. *Immunol Res* 1996; 15: 141-50.
 19. Piccinni MP. T cells in normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 2006; 13: 840-4.
 20. Szekeres-Bartho J, Polgar B, Kozma N, Miko E, Par G, Szere-day L, et al. Progesterone-dependent immunomodulation. *Chem Immunol Allergy* 2005; 89: 118-25.
 21. Par G, Geli J, Kozma N, Varga P, Szekeres-Bartho J. Progesterone regulates IL12 expression in pregnancy lymphocytes by inhibiting phospholipase A2. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49: 1-5.
 22. Druckmann R, Druckmann MA. Progesterone and the immunology of pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97: 389-96.
 23. Joachim R, Zenclussen AC, Polgar B, Douglas AJ, Fest S, Knackstedt M, et al. The progesterone derivative dydrogesterone abrogates murine stress-triggered abortion by inducing a Th2 biased local immune response. *Steroids* 2003; 68: 931-40.
 24. Salomon LJ, Rozenberg P, Szekeres-Bartho J, Malagrida L, Giudicelli Y, Ville Y. Changes in progesterone-induced-blocking-factor expression rates following mifepristone administration in termination of pregnancy at 5 to 8 weeks. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2005; 17: 353-6.
 25. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 933-44.
 26. Kozma N, Halasz M, Polgar B, Poehlmann TG, Markert UR, Palkovics T, et al. Progesterone-induced blocking factor activates STAT6 via binding to a novel IL-4 receptor. *J Immunol* 2006; 176: 819-26.
 27. Kozma N, Halasz M, Palkovics T, Szekeres-Bartho J. The progesterone-induced blocking factor modulates the balance of PKC and intracellular Ca. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55: 122-9.
 28. Kelly RW, King AE, Critchley HO. Cytokine control in human endometrium. *Reproduction* 2001; 121: 3-19.
 29. Wissink S, van Heerde EC, van der Burg B, van der Saag PT. A dual mechanism mediates repression of NF-kappaB activity by glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 355-63.
 30. McKay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 1999; 20: 435-59.
 31. Losel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, et al. Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev* 2003; 83: 965-1016.
 32. Ehring GR, Kerschbaum HH, Eder C, Neben AL, Fanger CM, Khoury RM, et al. A nongenomic mechanism for progesterone-mediated immunosuppression: inhibition of K⁺ channels, Ca²⁺ signaling, and gene expression in T lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 188: 1593-602.
 33. Simoncini T, Genazzani AR. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 281-92.
 34. Tato CM, O'Shea JJ. Immunology: what does it mean to be just 17? *Nature* 2006; 441: 166-8.
 35. Pongcharoen S, Somran J, Sritippayawan S, Niumsup P, Chanchan P, Butkhamchot P, et al. Interleukin-17 expression in the human placenta. *Placenta* 2007; 28: 59-63.
 36. Pongcharoen S, Niumsup P, Sanguanserm Sri D, Supalap K, Butkhamchot P. The effect of interleukin-17 on the proliferation and invasion of JEG-3 human choriocarcinoma cells. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55: 291-300.
 37. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006; 441: 231-4.
 38. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441: 235-8.
 39. Kleinschek MA, Owyang AM, Joyce-Shaikh B, Langrish CL, Chen Y, Gorman DM, et al. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2007; 204(1): 161-70.
 40. Robertson SA, Seamark RF, Guilbert LJ, Wegmann TG. The role of cytokines in gestation. *Crit Rev Immunol* 1994; 14: 239-92.
 41. Bowen JM, Chamley L, Mitchell MD, Keelan JA. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women. *Placenta* 2002; 23: 239-56.
 42. Rein DT, Breidenbach M, Honscheid B, Friebe-Hoffmann U, Engel H, Gohring UJ, et al. Preeclamptic women are deficient of interleukin-10 as assessed by cytokine release of trophoblast cells in vitro. *Cytokine* 2003; 23: 119-25.
 43. Piccinni MP. T-cell cytokines in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2002; 47: 289-94.
 44. Oh SY, Kim CJ, Park I, Romero R, Sohn YK, Moon KC, et al. Progesterone receptor isoform (A/B) ratio of human fetal membranes increases during term parturition. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 1156-60.
 45. Goldman S, Weiss A, Almalah I, Shalev E. Progesterone receptor expression in human decidua and fetal membranes before and after contractions: possible mechanism for functional progesterone withdrawal. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 269-77.
 46. Taylor AH, McParland PC, Taylor DJ, Bell SC. The progesterone receptor in human term amniochorion and placenta is isoform C. *Endocrinology* 2006; 147: 687-93.
 47. Staeva-Vieira TP, Freedman LP. 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits IFN-gamma and IL-4 levels during in vitro polarization of primary murine CD4⁺ T cells. *J Immunol* 2002; 168: 1181-9.
 48. Evans KN, Bulmer JN, Kilby MD, Hewison M. Vitamin D and placental-decidual function. *J Soc Gynecol Invest* 2004; 11: 263-71.
 49. Saito S. Cytokine network at the fetomaternal interface. *J Reprod Immunol* 2000; 47: 87-103.

Reimpresos:

Dr. David Barrera

Departamento de Biología de la Reproducción
 Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
 Salvador Zubirán,
 Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan
 14000, México, D.F.
 Tel.: 5573-1160,
 Fax: 5655-9859,
 Correo electrónico: barrera1912@gmail.com

*Recibido el 8 de agosto de 2006.
 Aceptado el 23 de enero de 2007.*

Research

Open Access

Calcitriol affects hCG gene transcription in cultured human syncytiotrophoblasts

David Barrera, Euclides Avila, Guillermo Hernández, Isabel Méndez, Leticia González, Ali Halhali, Fernando Larrea, Angélica Morales and Lorenza Díaz*

Address: Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14000, México, D.F; México

Email: David Barrera - barrera1912@gmail.com; Euclides Avila - euclides_@excite.com; Guillermo Hernández - inviernomudo@gmail.com; Isabel Méndez - isabelmendez1968@hotmail.com; Leticia González - leti1903@yahoo.com.mx; Ali Halhali - alih@quetzal.innsz.mx; Fernando Larrea - larrea@innsz.mx; Angélica Morales - angelica170969@aol.com; Lorenza Díaz* - lorenzadiaz@gmail.com

* Corresponding author

Published: 22 January 2008

Received: 16 November 2007

Reproductive Biology and Endocrinology 2008, **6**:3 doi:10.1186/1477-7827-6-3

Accepted: 22 January 2008

This article is available from: <http://www.rbej.com/content/6/1/3>

© 2008 Barrera et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: In pregnancy, maternal serum concentrations of calcitriol significantly rise as a result of increased renal and placental contribution in order to assure calcium supply for the developing fetus. Considering that placenta is a site for vitamin D activation, and the versatility and potency of calcitriol, it is feasible that this hormone participates in fetal/placental development and physiology. In the present work we studied calcitriol actions upon human chorionic gonadotropin (hCG) secretion and expression in cultured trophoblasts, as well as vitamin D receptor (VDR) and CYP27B1 immunolocalization in placental villi.

Methods: Quantification of hCG in culture media was performed by immunoassay. Expression studies were carried out by real time PCR. Analysis of CYP27B1 and VDR localization in placental slides were performed by immunohistochemistry. Statistical significance was established by one way ANOVA using Tukey test for comparisons.

Results: Calcitriol regulated hCG in a time-dependent manner: at 6 h the secosteroid stimulated hCG, whereas longer incubations (24 h) showed opposite effects. Interestingly, calcitriol stimulatory effects on hCG were accompanied by an increase in intracellular cAMP content and were abolished by pre-incubation of the cells with a selective protein kinase A inhibitor. Immunohistochemical techniques showed differential VDR localization in the syncytiotrophoblast layer or in the vascular smooth muscle cells depending on the epitope to which the antibodies were raised (specific for the carboxy- or amino-terminal regions, respectively). CYP27B1 was immunolocalized in the syncytiotrophoblast layer of placental villi.

Conclusion: The presence and location of the vitamin D activating enzyme CYP27B1 as well as the specific receptor for vitamin D were shown in placental sections. The latter, together with findings demonstrating specific effects of calcitriol acting through the VDR and the cAMP/PKA signaling pathway upon hCG expression and secretion, indicate that there is a functional vitamin D endocrine system in the placenta, and recognize calcitriol as an autocrine regulator of hCG.

Background

Vitamin D is metabolized to the steroid hormone 1,25-dihydroxyvitamin D₃ or calcitriol, which regulates calcium homeostasis, modulates the immune response, and promotes cellular differentiation, among other actions. Calcitriol, the most active vitamin D metabolite, exerts its biological effects by binding to the vitamin D receptor (VDR), which is a ligand-activated transcription factor that recognizes cognate vitamin D response elements (VDREs) in target genes, and can also elicit rapid responses mediated by membrane receptors [1]. Placenta is a source and target of calcitriol [2]. In a similar manner to the renal process, placental production of calcitriol is catalyzed by the mitochondrial CYP27B1 [3]. In early reproductive events, calcitriol has shown to evoke specific biological effects such as regulation of the decidualization and implantation processes [4,5]. In addition, calcitriol regulates placental lactogen expression as well as progesterone and estradiol secretion in cultured human syncytiotrophoblasts [6,7]. Regarding other molecules that are regulated by calcitriol in the placenta, Evans *et al* showed that calcitriol acts in an autocrine/paracrine fashion to regulate both acquired and innate immune responses, decreasing synthesis of cytokines such as granulocyte-macrophage colony stimulating factor 2, tumor necrosis factor, and interleukin 6, but increasing expression of mRNA for the cathelicidin antimicrobial peptide [8]. Since human chorionic gonadotropin (hCG) is a pivotal hormone for pregnancy maintenance, the aim of the present work was to broaden the knowledge of calcitriol actions in the placenta, focusing in the study of its effects upon hCG expression and secretion in cultured human syncytiotrophoblasts. The data presented herein display a functional vitamin D endocrine system present in human placenta and suggest its involvement in regulating placental physiology.

Methods

Reagents

Culture media, fetal bovine serum (FBS) and Trizol were from Invitrogen (NY, USA). TaqMan Master reaction, TaqMan probes and the transcriptor RT system were from Roche (Roche Applied Science, IN, USA), calcitriol (1 α ,25-dihydroxycholecalciferol) was kindly donated from Hoffmann-La Roche Ltd (Basel, Switzerland). 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 8-Bromo cAMP (8-Br-cAMP), H-89 and the enzymes used for cell cultures were from Sigma-Aldrich (MO, USA). Immunoassay for hCG was from Immunometrics Ltd, (London, UK). CYP27B1 antibody (sheep anti-murine 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase) was from The Binding Site (Birmingham, UK). The VDR antibodies (rabbit polyclonal anti-VDR N-20 sc-1009 and anti-VDR C-20 sc-1008), as well as the secondary antibodies rabbit anti-sheep-horseradish peroxidase, and mouse anti-rabbit IgG-HRP were purchased

from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) was from Zymed Laboratories Inc. (CA, USA).

Immunohistochemistry

This study was approved by the Institutional Human Ethical Committee (Hospital de Gineco-Obstetricia "Luis Castelazo Ayala", IMSS, México), and written informed consents forms were obtained from each placental donor. Term placentae (37–42 weeks of gestation) were acquired from uncomplicated pregnancies.

Fresh placental tissue from 5 term placentas was embedded in paraffin after fixation in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Serial sections (7 μ m) were obtained according to standard procedures. Slides were treated with methanol-hydrogen peroxide in order to block the endogenous peroxidase activity. Normal rabbit serum and 1% BSA were used as blockers to decrease non-specific signal. Slides were then incubated with primary antibodies (anti-CYP27B1, anti-VDR-N and anti-VDR-C) during 45 minutes at room temperature, followed by further washing and incubation with secondary antibodies for another 45 minutes. Staining was developed using DAB substrate and the chromogen was contrasted with Mayer's hematoxylin. Immunolabeling specificity was tested by omitting the primary antibody.

Trophoblast cell culture

Trophoblasts were cultured as previously described [3,9,10]. Briefly: Villous cytotrophoblasts were obtained by enzymatic dispersion and cells were separated on density Percoll gradients. Trophoblasts were plated at a density of 8×10^5 cells/mL in supplemented medium [(DMEM) 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 0.25 mg/ml Fungizone], containing 20% heat-inactivated FBS. Incubations were performed in humidified 5% CO₂-95% air at 37°C. The morphological aspects of cells were examined daily, secreted hCG was measured by immunoassay (EIA) following manufacturer instructions and results were normalized against total protein content. Protein was determined by the method of Bradford [11].

Calcitriol effects on hCG secretion

Two days-cultured trophoblasts were incubated in the presence of different concentrations of calcitriol or ethanol as vehicle, in serum-free DMEM-F12 during 6 h or 24 h. Additional experiments were performed incubating the cells with a selective protein kinase A inhibitor (H-89). Incubations were stopped by media collection, cell lysis with RIPA buffer (9.1 mM dibasic sodium phosphate, 1.7 mM monobasic sodium phosphate, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, pH 7.4) was used for protein determination and hCG was quantified in culture media.

Calcitriol effects on hCG expression

For expression studies 3×10^6 cells were plated in 25 cm² cell culture flasks and subjected to the same treatments as stated above. Total RNA was extracted using Trizol and 1 µg was reverse transcribed using the transcriptor RT system. Real-time PCR was carried out using the LightCycler 2.0 from Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), according to the following protocol: activation of Taq DNA polymerase and DNA denaturation at 95°C for 10 min, proceeded by 45 amplification cycles consisting of 10 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 1 s at 72°C. The primer pair was targeted to the β subunit of the hCG mRNA and the sequences were as follows: GCTCACCCCAGCATCTAT and CAGCAGCAACAGCAGCAG. The house keeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was also amplified as an internal control, using the primers: AGCCACATCGCTGAGACAC and GCCCAATACGACCAAATCC. The sizes of the resulting amplicons were 131 bp and 66 bp, and the probes utilized were # 79 and # 60 (Roche human universal probe library), for hCG and GAPDH, respectively. The expression of CYP24A1 used as a control for calcitriol effects was evaluated using the following sense and anti-sense primers: CATCATGGCCATCAAACAA and GCAGCTCGACTGGAGTGAC and probe # 88 from Roche human universal probe library.

Calcitriol effects on cAMP accumulation

Cells were incubated in the presence of calcitriol or its vehicle in DMEM-F12 supplemented with IBMX (0.05 mM). Incubations were terminated after 10 minutes by media collection and homogenization of the cells in RIPA buffer. Samples were boiled during 5 min for phosphodiesterases inactivation and intracellular cAMP was measured by specific radioimmunoassay (RIA) as previously described [12]. Results were normalized against total protein content and expressed as fmol cAMP/mg protein.

Statistical analysis

Data are presented as the mean ± S.D. Statistical significance among groups was established by one way ANOVA using Tukey test. A *P* value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

Immunohistochemical studies

Analysis of sequential placental tissue sections indicated the presence of immunoreactive CYP27B1 in the syncytiotrophoblast layer (Fig. 1A). A similar immunostaining pattern for VDR was visualized using an anti C-terminus specific antibody, immunostaining was also identified in vascular smooth muscle cells (VSMC, Fig. 1C). Interestingly, the use of an anti N-terminus VDR specific antibody disclosed intense immunostaining in the VSMC, and weak signal in the syncytiotrophoblast layer was observed

(Fig. 1E). Control incubations without primary antibodies are shown in figure 1B, D and 1F. These results demonstrated the presence in the placenta of two important components of the vitamin D endocrine system. Considering these data, we searched for a marker of placental function. Since trophoblast cell culture has proven to be a good model to study placental physiology and hCG is an important marker of placental functionality, we decided to use this system in order to evaluate calcitriol regulatory actions at the placental level.

Calcitriol effects on hCG in cultured trophoblasts

Cultured purified cytotrophoblasts aggregated and formed syncytia in a time dependent manner. Cell culture viability was evaluated by measurements of hCG in the presence or absence of 8-Br-cAMP, an analog of cAMP, a well known regulatory factor of hCG expression [13,14]. Basal secretion of hCG into the culture media increased during the cytodifferentiation process, and cells cultured in the presence of 8-Br-cAMP secreted significantly more hCG than controls (Fig. 2A). Similarly, hCGβ mRNA increased with the same pattern observed under basal conditions (Fig. 2B), and in the presence of 8-Br-cAMP the highest hCGβ gene expression was observed on day 2, which preceded the maximal hCG secretion on day 3. These data, in addition to morphological cell evaluation, further confirmed the functional integrity of the primary culture system.

In the presence of calcitriol, hCG secretion increased significantly after 6 hours of incubation (Fig. 3A). Calcitriol also upregulated hCGβ mRNA (Fig. 3B). Since hCG is highly regulated by the cAMP/PKA pathway, and calcitriol has shown to induce cAMP accumulation [12,15], we investigated the participation of this second messenger upon hCG-upregulation by calcitriol. For this purpose, cAMP was quantified in calcitriol-incubated cells. Results indicated that after 10 minutes of treatment, the secosteroid significantly increased intracellular cAMP content in a dose-dependent manner (Fig. 4A). Preincubation of cells with a selective inhibitor of PKA (H-89) reduced hCG expression below basal levels and prevented the calcitriol-dependent protein and gene hCG-stimulation detected at the 6 h incubation period (Fig. 4B and 4C, respectively). The same results were obtained in 72 h cultures (data not shown).

Calcitriol long-term effects upon hCG were also studied. The stimulatory effects observed at 6 h were no further evident after 24 h (data not shown), and when cells were incubated in the presence of calcitriol during 2 consecutive days, the effects were rather inhibitory (Fig. 5A). Inhibition was evident at the mRNA level after 24 hours treatment (Fig. 5B), preceding the observed response in hCG protein. This repressive calcitriol effect could not be

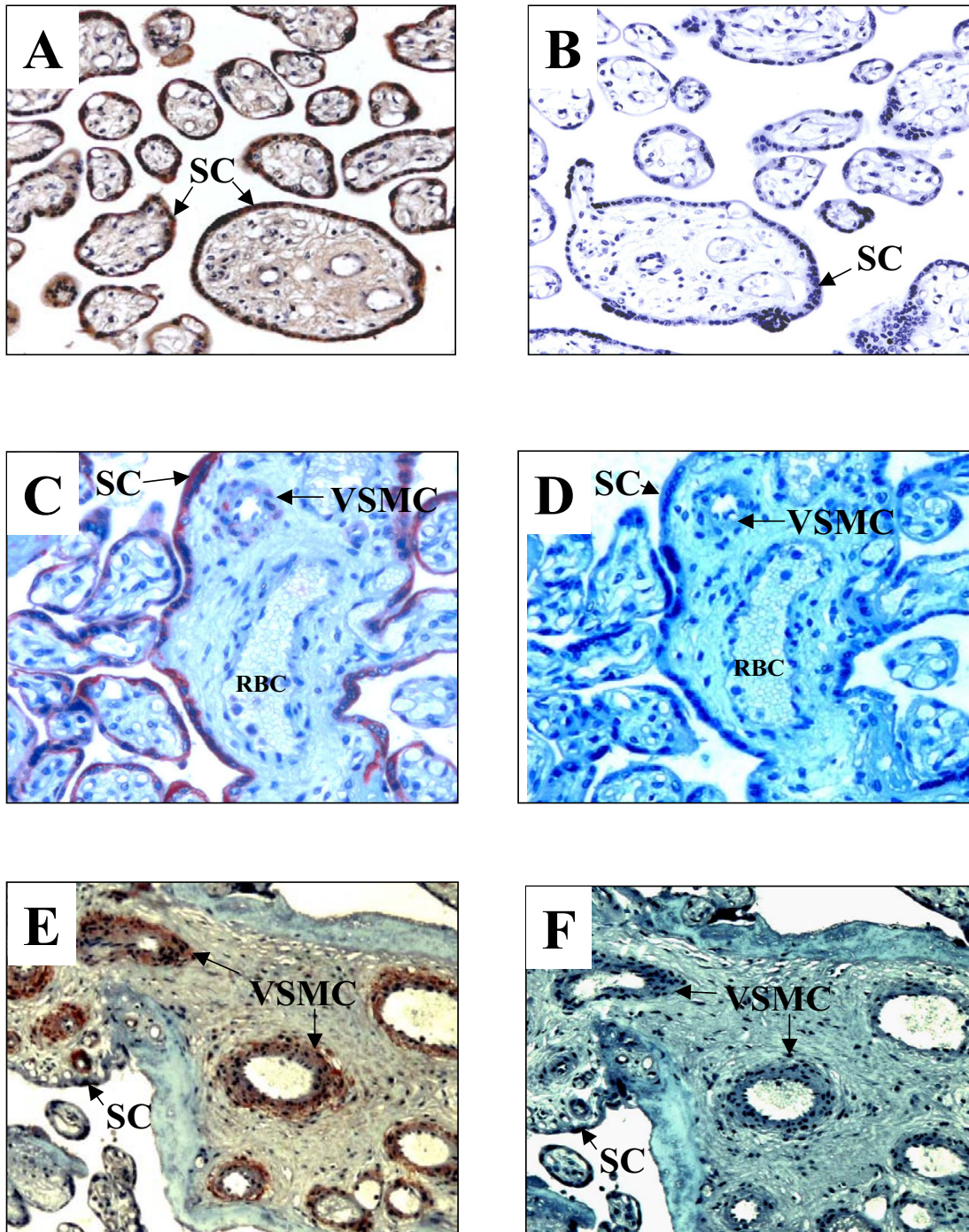


Figure 1

Immunolocalization of CYP27B1 and VDR in placental chorionic villi. Placental sections were incubated with specific antibodies in order to localize important components of the vitamin D endocrine system. CYP27B1 protein was located in the syncytiotrophoblast layer (A). The use of anti N-terminus VDR specific antibody disclosed intense immunostaining in the VSMC (E), whereas a VDR-C-terminus antibody preferentially stained the syncytiotrophoblast layer (C). Figure shows representative pictures of 5 different placentas. Negative controls in the absence of first antibodies are shown in B, D and F. SC = syncytiotrophoblast layer, VSMC = vascular smooth muscle cells, RBC = red blood cells. (200×).

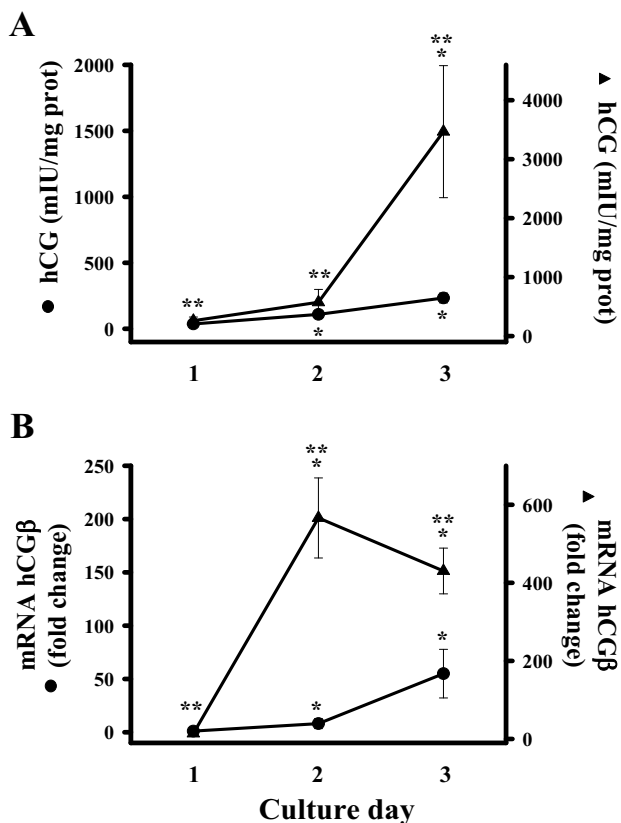


Figure 2
Temporal pattern of hCG secretion (A) and expression (B) in cultured human trophoblasts. Cytotrophoblasts were plated in the absence (●) or presence (▲) of 8-Br-cAMP (1.5 mM). Two scale bars were used in order to show all data [stimulated (▲) vs. non stimulated (●)] in the same graphic. Media was changed every day. A) Secretion of hCG in culture media was measured daily and results were expressed as mIU/mg protein. B) Real time PCR analysis of hCGβ expression in different culture days. Results were normalized against GAPDH mRNA. Vehicle data were arbitrarily given a value of 1. Basal hCG secretion and expression increased significantly compared with day 1. Note that hCGβ mRNA increased considerably on day 2 in the presence of 8-Br-cAMP (B), which was reflected on hCG secretion on day 3 (A), showing an important protein synthesis activity between day 2 and 3 of the cell culture. Data are presented as the mean ± S.D. of three different cell cultures. *P < 0.05 vs. day 1; **P < 0.05 vs. control.

attributed to decreased cell viability, since under the same conditions, calcitriol upregulated CYP24A1 gene expression (Fig. 5C).

Discussion

Serum concentrations of biologically active hCG depend on the rate of synthesis of its specific β subunit; whereas at the cellular level multiple factors modulate hCG produc-

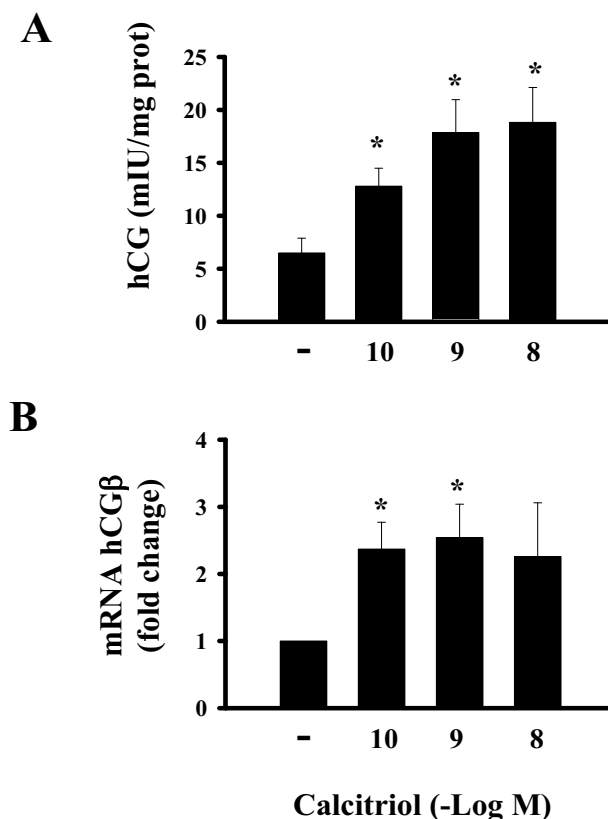


Figure 3
Stimulatory effects of calcitriol on hCG secretion and gene expression in cultured syncytiotrophoblasts. A) Hormone secretion was determined by EIA after 6 hours incubation in the presence of increasing concentrations of calcitriol or its vehicle (-). B) Real time PCR analysis of hCGβ gene expression of calcitriol-treated cells. Results were normalized against GAPDH mRNA. Vehicle data were arbitrarily given a value of 1. Each bar represents the mean ± S.D. of triplicate cultures. *P < 0.05 vs. control.

tion by interacting with specific membrane receptors on placental trophoblasts. The most studied factors that modulate hCG are the gonadotropin releasing hormone (GnRH), hCG itself and other molecules that activate cAMP-dependent signal transduction pathways [16-18]. Indeed, both hCGα and hCGβ genes are highly transcriptionally induced by cAMP [19-21]. In this study we showed that calcitriol is an additional factor that modulates hCG in human trophoblasts. In fact, calcitriol regulated hCG in a time-dependent manner, stimulating or inhibiting hormone secretion and expression. The stimulatory effect after 6 hours was probably due, as demonstrated in this study, to the rapid calcitriol-dependent increase in intracellular cAMP. This assumption was further supported by results in the presence of H-89, a selective inhibitor of PKA. Indeed, blocking the cAMP/PKA

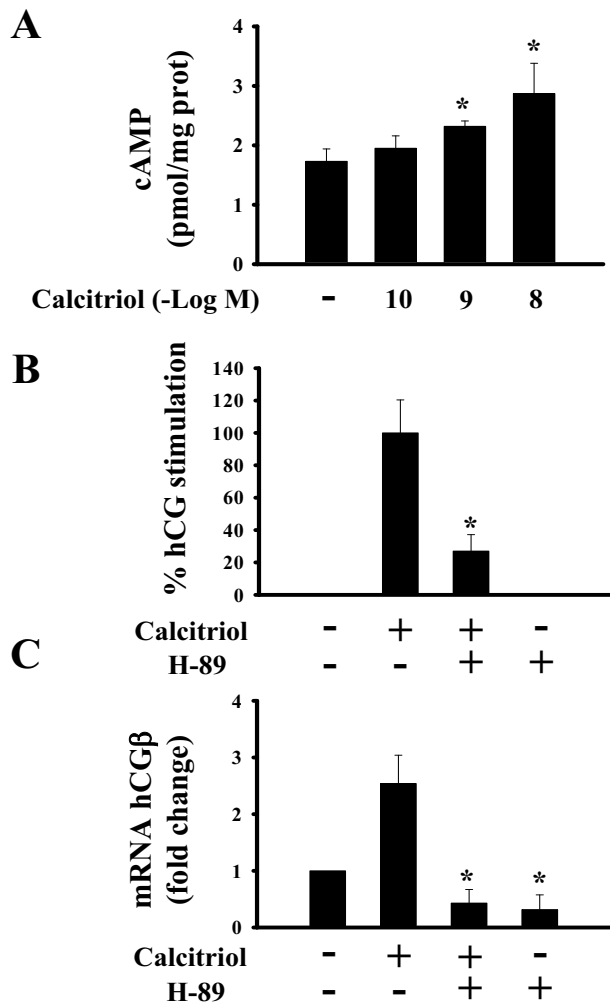


Figure 4
 Calcitriol stimulatory effects on hCG involve cAMP. A) Dose-dependent effects of calcitriol upon intracellular cAMP. Quantification of intracellular cAMP was determined by RIA after 10 minutes incubation in the presence of increasing concentrations of calcitriol or the vehicle (-). Effects of H-89 (a selective PKA inhibitor) upon calcitriol-dependent stimulation of hCG secretion and gene expression are shown in B and C, respectively. B and C) Cells were incubated with calcitriol (1×10^{-9} M) in the presence or absence of H-89 ($5 \mu\text{M}$) during 6 hours. In panel B, calcitriol incubations in the absence of H-89 represent 100% stimulation. In panel C results were normalized against GAPDH mRNA, giving vehicle data an arbitrarily value of 1. Each bar represents the mean \pm S.D. of triplicate experiments. * $P < 0.05$ vs. control.

signal transduction cascade impaired the ability of calcitriol to elicit transcriptional induction of hCG β gene, as well as hCG secretion into the culture media. Rapid cAMP generation induced by calcitriol has been previously reported in other cell types [15,22], and may be the result

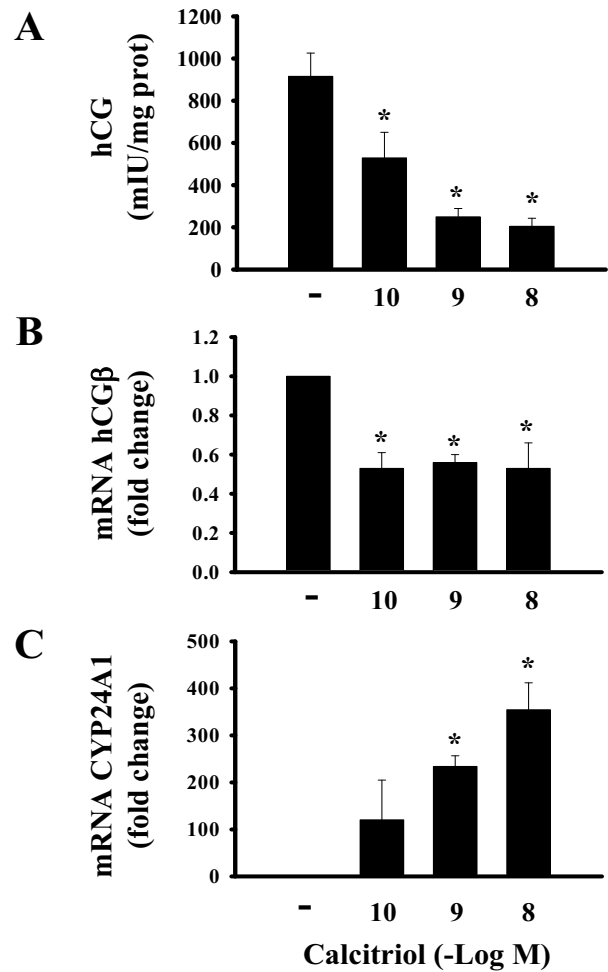


Figure 5
 Long-term inhibitory effects of calcitriol on placental hCG. A) hCG concentration in culture medium was determined after 2 days incubation in the presence of increasing concentrations of calcitriol or the vehicle alone (-). B) Real time PCR analysis of hCG β gene expression in calcitriol-treated cells after 24 h. Results were normalized against GAPDH mRNA, vehicle data were arbitrarily given a value of 1. C) CYP24A1 mRNA induction by calcitriol after 24 h. Results were normalized against GAPDH mRNA. Vehicle data were arbitrarily given a value of 1. The inhibitory effects of calcitriol upon hCG gene expression detected after 24 h (B) were reflected in a reduction of secreted hCG after 48 h (A). These effects were not due to a toxic effect of calcitriol since cells showed increased CYP24A1 gene expression, as expected (C). Each bar represents the mean \pm S.D. of triplicate experiments. * $P < 0.05$ vs. control.

of its interaction with membrane-VDR or other surface proteins. In addition, since it has been demonstrated that calcium ion channels are involved in GnRH dependent-hCG secretion [23], calcitriol could also release stored

hCG through promoting a rapid calcium entry into the cell. Further studies are needed in order to clarify this matter.

The concentration of hCG was also measured after 12, 24 and 48 h of calcitriol treatment, but the results reported in the present study were only those that differed significantly when compared with the vehicle alone. The stimulatory effects observed at 6 h were no further evident after 12 or 24 h, and when cells were incubated in the presence of calcitriol during 2 consecutive days, the effects were rather inhibitory. Inhibition was evident at the mRNA level after 24 hours treatment, preceding the observed response in hCG protein. These data are probably more likely to be reflective of the true biological situation. Indeed, our results that calcitriol inhibited hCG were in line with previous data from this and other laboratories where low serum calcitriol and high serum hCG levels were found in preeclampsia [24-26], that conjointly with the fact that [³H]25-hydroxyvitamin D bioconversion into [³H]1,25-dihydroxyvitamin D was significantly reduced in preeclamptic placentas [9], may suggest a direct regulatory effect of calcitriol on hCG production. Regarding the inhibitory effects of calcitriol on hCG, it is likely that a secondary metabolic C23/C24 calcitriol oxidation pathway might play a role, since the resulting trihydroxylated metabolite is considered biologically inactive [1]. Alternatively, since calcitriol has been shown to stimulate progesterone secretion [6] and in turn this hormone inhibits hCG secretion [27], this mechanism could additionally participate in calcitriol long term inhibitory effects in placenta. In any case, the demonstration in this study of genomic mediated effects of calcitriol on hCG suggested the presence of VDR dependent regulatory regions on hCG promoters. Indeed we found five putative VDR/RXR heterodimer binding sites in the hCG β -5 gene promoter [28], which probably may be acting as calcitriol dependent-transcriptional regulatory regions. Nevertheless, the sole presence of the VDREs in the hCG β -5 promoter is not sufficient to indicate transcriptional function; therefore, functional evaluation of the putative VDREs deserves further investigation.

In non pregnant women the physiological concentration of calcitriol fluctuates between 40–100 pM. In the present study the calcitriol doses tested were: 100 pM, 1 nM and 10 nM. The lowest concentration (100 pM) is within the physiological range of circulating calcitriol levels in Mexican pregnant women (127 pM and 151 pM) as observed previously [24,29]. The other doses tested were supra-physiological, nevertheless, calcitriol effects upon hCG were evident starting with the lowest concentration.

Placenta is considered not only as a source but also as a target of calcitriol [2]. In order to get insights on calcitriol

paracrine/autocrine effects in placenta, we investigated the immunolocalization of VDR and CYP27B1 in placental chorionic villi. In accordance with previous reports [30], CYP27B1 protein was located in the syncytiotrophoblast layer, corroborating that the endocrine phenotype of trophoblasts cells is responsible for vitamin D activation in placenta. To answer where the locally produced calcitriol acts in the placenta, we looked for VDR protein in placental sections. To our knowledge, this is the first report to show immunoreactive VDR in different locations in the placental villi, since VDR expression has been mainly addressed at the mRNA level in placenta [2,31]. The antibodies showed the presence of VDR in the endocrine placental cells and VSMC, suggesting that calcitriol could be involved in regulating hormonal production and vascular remodeling through the VDR. The latter assumption derives from previous studies demonstrating that calcitriol acts in the vasculature promoting VSMC growth and migration [32,33]. Interestingly, the C-terminus antibody intensely stained the syncytiotrophoblast layer and faintly stained the surrounding cells of placental vessels, whereas the N-terminus antibody detected a strong signal in the endothelial and VSMC. These observations may indicate different epitopes recognized by the antibodies depending on the topological position of the VDR. An interesting challenge would be to define specific VDR responses in different placental structures.

Conclusion

In summary, the present study broadens the knowledge of placental vitamin D endocrine system by demonstrating the physiological effects of calcitriol on an important biochemical placental function marker such as hCG. In addition, this is the first report to show immunoreactive VDR in different locations in human placental villi, and opens the field to address important research questions on the role of calcitriol in specific placental structures.

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

DB carried out real time PCR's analysis, hCG quantification and participated in the design of the study and statistical analysis. EA participated in the design of the study, particularly the molecular studies, performed real time PCR analysis and helped to draft the manuscript. GH performed placenta collection, trophoblast primary cell cultures, RNA extraction and reverse transcription reactions. IM and LG were in charge of all experiments concerning cAMP, including design and analysis of the results. AH contributed in interpretation of data and was involved in drafting the manuscript. FL made substantial contribution to the design of the study, was involved in drafting the

manuscript and revised it critically. AM performed the immunohistochemical studies and helped to draft the manuscript. LD conceived the study, participated in the design and coordination, structured the manuscript and actively participated in experimental procedures. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

D.B. is a Ph.D. student from the posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) under a fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México). This work was supported by a grant (45937/A1) from CONACyT, México. We acknowledge with special thanks to Hoffmann-La Roche Ltd for calcitriol donation and to Hospital de Gineco-Obstetricia "Luis Castelazo Ayala", IMSS, México, for placental donation.

References

- Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E: **Vitamin D**. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005, **289**:F8-28.
- Avila E, Diaz L, Halhali A, Larrea F: **Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase, 1,25-dihydroxyvitamin D3 24-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression by 8-bromo cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblast cells**. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004, **89-90**:115-119.
- Diaz L, Sanchez I, Avila E, Halhali A, Vilchis F, Larrea F: **Identification of a 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene transcription product in cultures of human syncytiotrophoblast cells**. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, **85**:2543-2549.
- Halhali A, Acker GM, Garabedian M: **1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces in vivo the decidualization of rat endometrial cells**. *J Reprod Fertil* 1991, **91**:59-64.
- Du H, Daftary GS, Lalwani SI, Taylor HS: **Direct regulation of HOXA10 by 1,25-(OH)2D3 in human myelomonocytic cells and human endometrial stromal cells**. *Mol Endocrinol* 2005, **19**:2222-2233.
- Barrera D, Avila E, Hernandez G, Halhali A, Biruete B, Larrea F, Diaz L: **Estradiol and progesterone synthesis in human placenta is stimulated by calcitriol**. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007, **103**:529-532.
- Stephanou A, Ross R, Handwerger S: **Regulation of human placental lactogen expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3**. *Endocrinology* 1994, **135**:2651-2656.
- Evans KN, Nguyen L, Chan J, Innes BA, Bulmer JN, Kilby MD, Hewison M: **Effects of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on cytokine production by human decidual cells**. *Biol Reprod* 2006, **75**:816-822.
- Diaz L, Arranz C, Avila E, Halhali A, Vilchis F, Larrea F: **Expression and activity of 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase are restricted in cultures of human syncytiotrophoblast cells from preeclamptic pregnancies**. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, **87**:3876-3882.
- Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF 3rd: **Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae**. *Endocrinology* 1986, **118**:1567-1582.
- Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
- Avila E, Diaz L, Barrera D, Halhali A, Mendez I, Gonzalez L, Zuegel U, Steinmeyer A, Larrea F: **Regulation of Vitamin D hydroxylases gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblasts**. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007, **103**:90-96.
- Ulloa-Aguirre A, August AM, Golos TG, Kao LC, Sakuragi N, Kliman HJ, Strauss JF 3rd: **8-Bromo-adenosine 3',5'-monophosphate regulates expression of chorionic gonadotropin and fibronectin in human cytotrophoblasts**. *J Clin Endocrinol Metab* 1987, **64**:1002-1009.
- Jameson JL, Lindell CM: **Isolation and characterization of the human chorionic gonadotropin beta subunit (CG beta) gene cluster: regulation of transcriptionally active CG beta gene by cyclic AMP**. *Mol Cell Biol* 1988, **8**:5100-5107.
- Santillan GE, Boland RL: **Studies suggesting the participation of protein kinase A in 1, 25(OH)2-vitamin D3-dependent protein phosphorylation in cardiac muscle**. *J Mol Cell Cardiol* 1998, **30**:225-233.
- Petraglia F, Santuz M, Florio P, Simoncini T, Luisi S, Plaino L, Genazzani AR, Genazzani AD, Volpe A: **Paracrine regulation of human placenta: control of hormonogenesis**. *J Reprod Immunol* 1998, **39**:221-233.
- Licht P, Cao H, Lei ZM, Rao CV, Merz WE: **Novel self-regulation of human chorionic gonadotropin biosynthesis in term pregnancy human placenta**. *Endocrinology* 1993, **133**:3014-3025.
- Milsted A, Cox RP, Nilson JH: **Cyclic AMP regulates transcription of the genes encoding human chorionic gonadotropin with different kinetics**. *DNA* 1987, **6**:213-219.
- Ringler GE, Kao LC, Miller VL, Strauss JF 3rd: **Effects of 8-bromo-cAMP on expression of endocrine functions by cultured human trophoblast cells. Regulation of specific mRNAs**. *Mol Cell Endocrinol* 1989, **61**:13-21.
- Jameson JL, Hollenberg AN: **Regulation of chorionic gonadotropin gene expression**. *Endocr Rev* 1993, **14**:203-221.
- Johnson W, Albanese C, Handwerger S, Williams T, Pestell RG, Jameson JL: **Regulation of the human chorionic gonadotropin alpha- and beta-subunit promoters by AP-2**. *J Biol Chem* 1997, **272**:15405-15412.
- Fleet JC: **Rapid, membrane-initiated actions of 1,25 dihydroxyvitamin D: what are they and what do they mean?** *J Nutr* 2004, **134**:3215-3218.
- Sharma SC, Rao AJ: **Effect of calcium ion channel antagonists on chorionic gonadotropin secretion**. *Biochem Mol Biol Int* 1997, **43**:1101-1106.
- Halhali A, Tovar AR, Torres N, Bourges H, Garabedian M, Larrea F: **Preeclampsia is associated with low circulating levels of insulin-like growth factor I and 1,25-dihydroxyvitamin D in maternal and umbilical cord compartments**. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, **85**:1828-1833.
- August P, Marcaccio B, Gertner JM, Druzin ML, Resnick LM, Laragh JH: **Abnormal 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism in preeclampsia**. *Am J Obstet Gynecol* 1992, **166**:1295-1299.
- Basirat Z, Barat S, Hajjahmadi M: **Serum beta human chorionic gonadotropin levels and preeclampsia**. *Saudi Med J* 2006, **27**:1001-1004.
- Yamamoto T, Matsumoto K, Kurachi H, Okamoto Y, Nishio Y, Sakata M, Tasaka K, Murata Y: **Progesterone inhibits transcriptional activation of human chorionic gonadotropin-alpha gene through protein kinase A pathway in trophoblast cells**. *Mol Cell Endocrinol* 2001, **182**:215-224.
- Genomatix [<http://www.genomatix.de/>]
- Halhali A, Villa AR, Madrazo E, Soria MC, Mercado E, Diaz L, Avila E, Garabedian M, Larrea F: **Longitudinal changes in maternal serum 1,25-dihydroxyvitamin D and insulin like growth factor I levels in pregnant women who developed preeclampsia: comparison with normotensive pregnant women**. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004, **89-90**:553-556.
- Zehnder D, Bland R, Williams MC, McNinch RW, Howie AJ, Stewart PM, Hewison M: **Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase**. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, **86**:888-894.
- Zehnder D, Evans KN, Kilby MD, Bulmer JN, Innes BA, Stewart PM, Hewison M: **The ontogeny of 25-hydroxyvitamin D(3) 1alpha-hydroxylase expression in human placenta and decidua**. *Am J Pathol* 2002, **161**:105-114.
- Rebsamen MC, Sun J, Norman AW, Liao JK: **1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase**. *Circ Res* 2002, **91**:17-24.
- Mitsuhashi T, Morris RC Jr, Ives HE: **1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates growth of vascular smooth muscle cells**. *J Clin Invest* 1991, **87**:1889-1895.

Mecanismos de regulación de la síntesis y secreción de la gonadotropina coriónica humana (hCG) durante el embarazo

David Barrera,* Mayel Chirinos,* Rocío García-Becerra*

* Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Mechanism of regulation of synthesis and secretion of human Chorionic Gonadotropin (hCG) during pregnancy

ABSTRACT

Human chorionic gonadotropin (hCG) is an essential hormone for development and sustaining of gestation. Adequate hCG production is fundamental for pregnancy success since abnormal hCG serum concentrations have been correlated with pregnancy anomalies such as recurrent abortions and preeclampsia. Regulation of hCG production involves diverse molecules associated with different signaling pathways, which have complicated the establishment of the mechanisms involved in its production. The present study provides a critical review of the most relevant findings related to hCG production and functions during pregnancy, in order to help to understand some related pathologies and to treat them more adequately.

Key words. hCG. Pregnancy. Trophoblast. cAMP. Calcium. Nuclear receptors.

RESUMEN

La gonadotropina coriónica humana (hCG) es una hormona proteica esencial para el desarrollo y sostenimiento de la gestación. La adecuada producción de la hCG es fundamental para que el embarazo llegue a término, ya que concentraciones anormales de la hormona han sido correlacionadas con anomalías como los abortos recurrentes y la preeclampsia. La regulación de la producción de la hCG implica diversas moléculas que emplean diferentes vías de señalización para mediar sus efectos sobre las concentraciones de hCG, lo cual ha dificultado el establecimiento de los mecanismos involucrados en su producción. En este trabajo se hace una revisión crítica de los hallazgos más relevantes relacionados con la producción de la hCG y su función durante el embarazo con el objeto de comprender ciertas patologías relacionadas y tratarlas de la manera más apropiada.

Palabras clave. hCG. Embarazo. Trofoblasto. AMPc. Calcio. Receptores nucleares.

INTRODUCCIÓN

El embarazo modifica el metabolismo y la fisiología materna con el objeto de mantener la gestación y el progreso de un nuevo organismo, el cual posee un perfil antigénico diferente al de la madre. Por tal razón, desde la fecundación se producen cambios en las concentraciones séricas maternas de hormonas polipeptídicas, esteroides, factores de crecimiento y citocinas, que funcionan en conjunto para permitir la implantación y el correcto desarrollo del producto. La placenta es el órgano que coordina el transporte de nutrientes y la excreción de los metabolitos

entre la madre y el feto. Además, es el principal modulador de las fluctuaciones que se presentan en hormonas críticas durante la gestación, como la gonadotropina coriónica humana (hCG), el lactógeno placentario, la progesterona (P_4), el estradiol y el calcitriol, que mantienen en condición estable los órganos del sistema materno-fetal y permiten la tolerancia inmunológica. A pesar de que la hCG es una hormona fundamental en el embarazo, alteraciones en su concentración se han correlacionado con defectos en la implantación, abortos espontáneos, desarrollo de tumores trofoblásticos, síndrome de Down y preeclampsia. Considerando lo anterior, el

objetivo de esta revisión es mostrar el panorama actual de las funciones, el origen y la regulación de la producción de la hCG en el embarazo.

GENERALIDADES

La hCG es una glicoproteína de 237 aminoácidos (aa) con masa molecular de 38 kDa formada por dos subunidades, una α y otra β codificadas por genes independientes. La actividad biológica de la hCG depende de la integridad y correcto acoplamiento de las dos subunidades. El gen de la subunidad α de hCG (hCG α) está localizado en el cromosoma 6q21.1-23 y codifica para un polipéptido de 92 aa que es idéntico a la cadena α de las hormonas folículo estimulante, luteinizante y estimulante de la tiroides (FSH, LH y TSH). Por su parte, la subunidad β (hCG β) de 145 aa es rica en residuos de prolina en el dominio carboxilo terminal, lo cual le otorga la especificidad biológica para la interacción con su receptor.¹ La hCG α está codificada por un solo gen mientras que la subunidad β puede ser codificada por seis genes distintos (hCG β 1, 2, 3, 5, 7 y 8), localizados en el cromosoma 19q13.3 en una región de 56 kb.² En células de la placenta y de coriocarcinoma humano se expresa principalmente la hCG β 5.³

FUNCIONES

La hCG lleva a cabo sus efectos al unirse con el receptor de LH/hCG, que pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G y presenta amplia distribución en diferentes tejidos. Debido a la similitud estructural entre la hCG y la LH, ambas se unen al mismo receptor, aunque las acciones de la hCG son más potentes, ya que tiene mayor afinidad por el receptor y mayor vida media en la circulación sanguínea.⁴ El gen del receptor está localizado en el cromosoma 2q21 y está constituido por 11 exones. Los exones 1-10 codifican para la mayor parte del dominio extracelular, mientras que el exón 11 codifica para una pequeña parte del dominio extracelular, la región transmembranal y la región intracelular que contiene el extremo carboxilo terminal.⁵

Las funciones mejor documentadas de la hCG están relacionadas con eventos reproductivos, particularmente con el embarazo. Se ha demostrado que la hCG es necesaria para evitar la luteólisis, así como para mantener la síntesis y la secreción de P₄ por las células del cuerpo lúteo.⁶ Otros estudios mostraron que la hCG promueve la diferenciación de las células placentarias y la angiogénesis e induce la producción de metaloproteinasas de matriz específi-

cas que favorecen la invasión de los trofoblastos en el endometrio.⁷⁻¹⁰ Asimismo, la hCG en la placenta regula la síntesis de las prostaglandinas y de los estrógenos, el rompimiento de glucógeno,⁴ suprime la actividad de algunas enzimas proteolíticas e inhibe la infección de la placenta por el virus de inmunodeficiencia humana.^{11,12} Además, se ha implicado a la hCG como un agente inmunomodulador.¹³ Por otra parte, una variante hiperglicosilada de la hCG se ha correlacionado con la exitosa proliferación e invasión del citotrofoblasto en la decidua durante la implantación.^{14,15}

Además de las funciones descritas, la hCG disminuye la actividad contráctil del miometrio humano provocando la quiescencia uterina requerida para evitar amenazas de aborto.¹⁶ Janssens, *et al.* mostraron que la administración de la hCG en ratas vírgenes indujo la maduración de las glándulas mamarias y la secreción de leche de forma similar a lo observado durante el embarazo, y proponen que la hCG es importante en la prevención de cáncer de mama.¹⁷ Adicionalmente, la hCG favorece la producción de testosterona y corticoesteroides en los testículos de los fetos masculinos y neonatos, respectivamente.¹⁸ En modelos de ratones mutantes nulos para el gen del receptor hCG/LH se ha observado que los ratones de uno y otro sexo son infértiles y con características sexuales pobremente desarrolladas,¹⁹ destacando su participación en otros eventos reproductivos.

ORIGEN DE LA hCG DURANTE EL EMBARAZO

La hCG se expresa al inicio de la gestación en el estadio de seos a ocho células embrionarias y se secreta en el blastocisto siete días después de la fertilización *in vitro*,⁶ coincidiendo con el momento del desarrollo cuando se produce la implantación en el útero. Después de la implantación, el trofoblasto se diferencia en células de citotrofoblasto mononuclear veloso y citotrofoblasto extraveloso invasor, ambos con capacidad de expresar y secretar hCG.²⁰ El citotrofoblasto veloso prolifera y se fusiona para crear un tipo celular denominado sincitiotrofoblasto. El sincitiotrofoblasto tiene características endocrinológicas únicas que le permiten mayor producción de la hCG y expresión del gen que codifica para el receptor de hCG/LH que las células del citotrofoblasto.²¹ Estudios realizados en cultivos de trofoblastos humanos mostraron que la secreción de hCG varía según el tiempo de gestación. Al respecto, estudios *in vitro* hallaron que se produce mayor cantidad de la hormona en células obtenidas del primer trimestre que en células del tercer trimestre,²² lo cual va

acompañado de la disminución observada en las concentraciones séricas de hCG durante el embarazo y de los receptores para la hormona ubicados en el miometrio al término de la gestación.^{23,24} Esto sugiere que el tiempo de gestación determina cambios que repercuten en el sistema endocrino de la placenta.

CONCENTRACIÓN SÉRICA DE LA hCG DURANTE EL EMBARAZO Y SUS IMPLICACIONES

La concentración sérica de hCG es utilizada como indicador temprano del embarazo. Durante la gestación, la hCG se incrementa de forma lineal en las primeras nueve semanas de gestación, alcanzando en la décima semana valores de hasta 100,000 mUI/mL en el plasma materno. Posteriormente, entre la tercera y la segunda semanas antes del parto las concentraciones disminuyen significativamente, a diferencia de otras hormonas como la P_4 o el estradiol cuyas concentraciones no se modifican.^{23,25}

Las concentraciones bajas de hCG durante el embarazo se han correlacionado con la incidencia de abortos recurrentes.²⁶ En contraste, se ha determinado que existe un incremento anormal de la concentración sérica de la hCG en mujeres que sufren preeclampsia. La preeclampsia es un síndrome de etiología desconocida caracterizada por hipertensión, edema, proteinuria y desorden hormonal e inmunológico. En relación con el desorden hormonal, Basirat, *et al.* hallaron que la concentración sérica de hCG β en embarazos a término fue mayor en mujeres con preeclampsia que en mujeres normotensas. Además, la concentración de hCG β de pacientes con preeclampsia moderada fue menor a la de pacientes con preeclampsia severa, indicando que la severidad de la enfermedad se acompaña del incremento en la producción de hCG.²⁷ Por otra parte, la aparición de tumores trofoblásticos durante el segundo trimestre de gestación, así como la alteración cromosómica presentada en individuos con el síndrome de Down están asociados con mayor producción de hCG.²⁸ Considerando lo anterior, es importante entender cómo se regulan las concentraciones de la hCG con el objeto de comprender su relación con dichas patologías.

REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LA hCG

El estudio de la regulación de la producción de la hCG ha involucrado diferentes modelos experimentales con capacidad para secretar la hormona, como los explantes o las células de la placenta en cultivo y líneas celulares de coriocarcinoma humano, que han permitido avanzar en la identificación de ligandos,

factores de transcripción y elementos reguladores en el ADN que controlan la expresión y secreción de esta hormona. El esfuerzo para identificar los mecanismos que inducen o reprimen la producción de hCG ha generado hallazgos relevantes, mismos que se describen a continuación.

REGIONES REGULADORAS EN LOS PROMOTORES DE hCG α Y β

El uso de líneas celulares que producen hCG ha sido útil para el estudio de los promotores de la hormona. En el promotor de la hCG α se han caracterizado algunos elementos reguladores ubicados entre -180 y -80 pb del sitio de inicio de la transcripción del gen, como son:

1. Dos secuencias idénticas a los elementos de respuesta para AMPc (CRE), donde interactúan proteínas de unión a los elementos de respuesta a AMPc (CREB) junto con otros factores de transcripción miembros de la familia B-Zip.
2. El elemento específico del trofoblasto (TSE).
3. El elemento activador- α (α -ACT), que es una secuencia reconocida por factores de transcripción GATA.
4. El elemento regulador de unión (JRE).
5. La región CCAAT, que es reconocida por un polipéptido de 50 kDa responsable de aumentar la expresión de la hCG α .²⁹

Por otra parte, el promotor de la hCG β ubicado entre -311 y -188 pb de su sitio de inicio de la transcripción, es rico en nucleótidos de guanina y citosina que interactúan con factores de transcripción conocidos como el factor promotor selectivo (Sp) y la proteína activadora 2 (AP-2), los cuales también inducen la expresión de la cadena α . Secuencias localizadas entre -315 y -279 mantienen la expresión basal, mientras que la transcripción dependiente de AMPc requiere una región más extensa en el extremo 5', entre -311 y -202 pb.³

MOLÉCULAS REGULADORAS DE LA PRODUCCIÓN DE LA hCG

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) está considerada como el principal inductor de la liberación de la hCG durante el embarazo, ya que la GnRH y su receptor son sintetizados por la placenta. Sin embargo, existen otras moléculas que activan la expresión y la secreción de la hCG durante la gestación, como la leptina, la corticotropina, la nora-

drenalina, la dehidroepiandrosterona, el ácido retinoico, la glicodelina A, la albúmina, el calcio, factores de crecimiento como el epidérmico, el fibroblástico, los IGF-I y II, la activina, las interleucinas (IL) IL-1, IL-6, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la hCG que regula su propia síntesis.^{6,30-37} Por el contrario, los inhibidores de la hCG descritos son la P₄, la inhibina, la folistatina, la insulina, el calcitriol, el factor de crecimiento tumoral (TGF- α y β), la dopamina, neuropéptidos opioides como la endorfina y el neuropéptido Y, y factores de transcripción como c-Jun, Oct-3/4 y el receptor X del hígado (LXR).^{6,31,38-43}

Lo anterior muestra que la regulación de la hCG es compleja y multifactorial, y que diferentes moléculas interactúan para modular la cantidad ade-

cuada de hCG durante el embarazo. Diversos estudios han establecido algunas de las vías de señalización que regulan la producción de la hCG, las cuales son descritas a continuación y esquematizadas en la figura 1.

Regulación positiva de la hCG mediada por AMPc

En las células de trofoblasto y las líneas celulares de coriocarcinoma humano que producen hCG, la síntesis de ambas subunidades (hCG α/β) se induce por acción del AMPc. El uso de análogos del AMPc, así como de ligandos que generan este nucleótido cíclico, han corroborado este efecto.⁴⁴ El incremento de AMPc intracelular es consecuencia de la activación

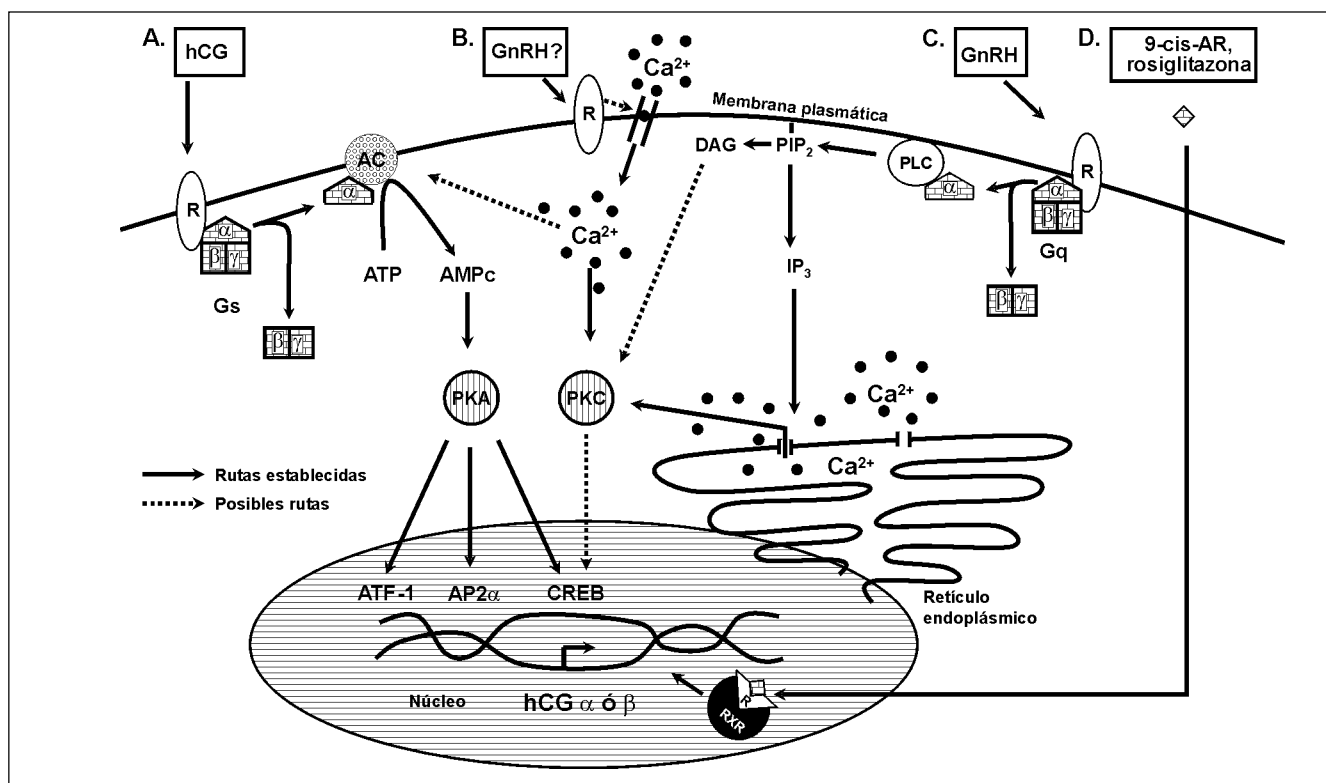


Figura 1. Principales vías de señalización que inducen la transcripción de la hCG. **A.** Vía de activación de la hCG mediada por receptores acoplados a proteínas Gs. La unión de ligandos (por ejemplo, hCG) a receptores (R) acoplados a proteína Gs inducen la activación de la adenilato ciclasa (AC) para generar AMPc que activa a la PKA, las subunidades catalíticas de la PKA se translocan al núcleo y activan factores de transcripción (ATF, AP2 α y CREB) que inducen la expresión génica de las subunidades α y/o β . **B.** Activación de canales de Ca²⁺ membranales. Hipotéticamente, la GnRH podría activar los receptores acoplados a canales de Ca²⁺ provocando el influjo de iones de Ca²⁺ extracelular, lo que posiblemente conduce a la activación de AC dependiente de este ión y a la activación de PKC. **C.** Vía de activación de receptores acoplados a proteínas Gq inducida por la GnRH. La unión de la GnRH a receptores acoplados a proteínas Gq conduce a la activación de la fosfolipasa C (PLC) que hidroliza PIP₂ para generar IP₃ y diacilglicerol (DAG). El IP₃ se internaliza en el citoplasma hasta el retículo endoplásmico lo cual promueve la liberación de Ca²⁺ al citosol. Los iones de Ca²⁺ y DAG activan a la PKC, que podría fosforilar a las CREB. Alternativamente, el calcio podría activar a la AC y ambas vías conducirían a la expresión génica de la hCG. **D.** Activación de los receptores RXR. La unión de ligandos agonistas (9-cis-AR y rosiglitazona) a receptores nucleares específicos (AR y PPAR- γ) induce su heterodimerización con el RXR, que resulta en la activación de la transcripción de la hCG.

de receptores de membrana acoplados a proteínas Gs, las cuales sufren la disociación de sus subunidades (α , β y γ). La subunidad α activada estimula la adenilato ciclasa que cataliza la conversión del ATP hacia AMPc. El AMPc es el encargado de activar la PKA, la cual fosforila proteínas específicas responsables de las respuestas biológicas.⁴⁵ Entre las proteínas que se fosforilan por acción de la PKA se encuentran las CREB, el factor de transcripción activado 1 (ATF-1) y la AP2 α , que han sido implicados en inducir la expresión de ambas subunidades de la hCG (Figura 1A). Knofler, *et al.* realizaron mutaciones en los CRE del promotor de la hCG α en células de trofoblasto y encontraron que la pérdida de estas secuencias disminuye la expresión del gen entre 90 y 95%, mientras que mutaciones dirigidas en otras secuencias como α ACT, JRE y la secuencia CCAAT afectan la expresión entre 12 y 50%, dependiendo del tiempo de cultivo, resaltando así la importancia de los CRE en la inducción del gen α . Adicionalmente, se demostró que conforme avanza el proceso de diferenciación en cultivos primarios de trofoblastos aumenta la fosforilación de las CREB y del ATF-1, que podrían modular la producción de hCG α/β de una forma dependiente de la diferenciación celular.²⁹

Por su parte, el AMPc induce la hCG β mediante rutas alternas de activación como el factor de transcripción AP2 α . La AP2 en forma de homodímero interactúa con el ADN para inducir la expresión de genes y modular las respuestas inducidas por el AMPc en la célula.³ Las AP2 se encuentran en células de trofoblasto y su expresión se incrementa de forma paralela al proceso de diferenciación celular, y en el caso de AP2 α por una vía dependiente de AMPc. Jonson, *et al.* realizaron mutaciones dirigidas en las regiones de unión para AP2 en los promotores de hCG α y β , encontrando que las mutaciones no alteraron la inducción de hCG α por AMPc, mientras que la inducción de hCG β disminuyó entre 50-70%.⁴⁶ Por otra parte, se ha demostrado la presencia de otros factores de transcripción denominados Sp en la regulación de hCG β . Los Sp actúan de una forma sinérgica o antagónica sobre la expresión génica, dependiendo de su abundancia y del contexto celular. En el trofoblasto, las Sp obstruyen la unión de AP2 al ADN para así coordinar la expresión de las subunidades de hCG.³

Regulación positiva de la hCG mediada por calcio y PKC

El ión calcio (Ca^{2+}) es un mensajero intracelular utilizado por neurotransmisores y hormonas para

activar múltiples funciones celulares y regular respuestas biológicas a través de diferentes mecanismos. El incremento de las concentraciones intracelulares de calcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en los trofoblastos induce la expresión y la secreción de la hCG *in vitro*. Las fluctuaciones en las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediadas por ligandos se producen por dos rutas alternas, mediante la liberación de Ca^{2+} contenido en almacenes intracelulares o la entrada de Ca^{2+} extracelular. En la liberación de calcio intracelular participan proteínas Gq acopladas a la fosfolipasa C (PLC), mientras que la entrada de Ca^{2+} extracelular puede ser mediada por la apertura de los canales de calcio operados por voltaje y/o receptor, los canales catiónicos permeables a calcio, el influjo de calcio capacitativo, la activación de bombas de intercambio iónico como las ATPasas de Ca^{2+} o la bomba de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.^{47,48}

La PLC se encarga del rompimiento del fosfatidilinositol, liberando inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol. El IP_3 liberado se internaliza y se une a receptores de membrana en el retículo endoplásmico que promueven la liberación de Ca^{2+} y la subsecuente activación de PKC que culmina con el aumento de hCG (Figura 1C). Como evidencia de lo anterior se ha demostrado que los ésteres de forbol interactúan con la PKC e inducen la secreción de hCG.⁴⁹ En la placenta, existen diferentes tipos de PKC que son activadas para mediar la fosforilación de otras proteínas. En particular, la PKC podría fosforilar las CREB y posiblemente mediante esta vía incrementar la producción de la hCG.⁵⁰ Por otro lado, se ha demostrado que el influjo mediado por canales de Ca^{2+} es una de las principales vías por la cual opera el incremento intracelular de este ión y subsecuentemente de hCG (Figura 1B).⁴⁸ Uno de los ligandos para incrementar la secreción de hCG por una vía dependiente de Ca^{2+} es la GnRH, la cual ha demostrado que incrementa las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células de sinciotrofoblasto.⁵¹ Además, la adición de GnRH en presencia de antagonistas a GnRH o antagonistas de los canales de calcio redujo la producción de hCG, lo cual demostró que el incremento de hCG es dependiente del incremento de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Es posible que el incremento de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por las diferentes vías active las adenilato ciclasas dependientes de Ca^{2+} para generar AMPc.^{52,53}

Regulación de la hCG por receptores nucleares acoplados a receptores X de retinoides (RXRs)

Diferentes estudios han demostrado que la producción de hCG es modulada por mecanismos media-

Regulación de la hCG por citocinas

dos por receptores nucleares específicos. Los receptores X de retinoides (RXRs) forman homo- o heterodímeros que regulan la expresión génica al interactuar con elementos de respuesta en el ADN. Los RXRs (α , β y γ) se acoplan con otros receptores nucleares, que incluyen los receptores del ácido retinoico (RAR α , β y γ), los receptores activados por los proliferadores de peroxisomas (PPAR α , β o δ , y γ), el receptor de vitamina D (VDR), el receptor de la hormona tiroxina (TR) y algunos receptores huérfanos.⁵⁴ Se ha descrito que el metabolito activo del ácido retinoico (AR), el 9-*cis* AR, análogos sintéticos del AR y agonistas específicos del RXR α inducen la secreción de hCG en las células de trofoblasto humano en cultivo y en la línea celular JEG-3, demostrando que el AR forma el heterodímero RAR α /RXR α que se une a elementos de respuesta en el ADN (RARE y RXRE) del gen de hCG β .⁵⁵ Por otra parte, los PPARs son activados por ácidos grasos saturados e insaturados, y sus derivados. Estos receptores, de manera similar al RXR α , se han detectado durante todo el proceso de diferenciación trofoblástica. En células de citotrofoblasto vellosos, el ligando de PPAR- γ llamado rosiglitazona, indujo la expresión y secreción de hCG β , efecto que aumentó sinérgicamente en presencia de un agonista selectivo al RXR α (BMS649). En cambio, los ligandos fenofibrato y L-165,041 de los PPAR α y δ respectivamente, no afectaron la producción de hCG β . Asimismo, se demostró que el heterodímero funcional PPAR- γ /RXR α se une al elemento de respuesta RE5 ubicado en la secuencia promotora de hCG β ,⁵⁶ sugiriendo que la unión sobre este elemento de respuesta es una de las causas del incremento de la hCG (Figura 1D). Controversialmente, se observó que la activación de PPAR- γ por rosiglitazona inhibió la expresión y secreción de hCG α/β en el citotrofoblasto extraveloso invasor,⁸ indicando que estos procesos varían dependiendo del tipo celular.

Recientemente, nuestro grupo demostró que el metabolito biológicamente activo de la vitamina D, el calcitriol (1,25-dihidroxitamina D₃) induce un efecto bifásico dependiente del tiempo sobre la secreción de la hCG en los trofoblastos humanos en cultivo. Se observó en tiempos cortos un efecto inductor del calcitriol sobre la producción de la hCG mediado por la activación de la PKA, mientras que incubaciones prolongadas reprimieron la expresión y la secreción de hCG. Esto último sugiere la regulación negativa de la hCG mediada por el heterodímero VDR/RXR, ya que también existen sitios potenciales de unión para el RXR y para el VDR en el gen que codifica para la hCG β .⁴⁰

En la producción de la hCG se ha sugerido la participación de citocinas, las cuales son proteínas de bajo peso molecular involucradas en eventos inmunológicos. Como ha sido revisado por otros autores, la placenta tiene la capacidad de expresar y secretar citocinas y se ha determinado que las citocinas predominantes en el embarazo normal son del tipo Th2, mientras que en eventos patológicos se observa predominio del tipo Th1.^{57,58}

La IL-6 está considerada como una citocina pro- o anti- inflamatoria dependiendo de su concentración en el tejido. En la placenta, modula múltiples efectos biológicos sobre la proliferación y diferenciación celular. Estudios en trofoblastos han demostrado que esta citocina induce la secreción de hCG. Sin embargo, existen controversias al respecto, debido a que otros estudios no mostraron cambios en la secreción y expresión de hCG en presencia de IL-6. Igualmente, estudios realizados en líneas celulares de coriocarcinoma han mostrado resultados contradictorios.^{37,59}

En relación con otras citocinas, en trofoblastos cultivados y en células JEG-3 se ha observado que el TNF- α y la IL-1 incrementaron la secreción de hCG, y que la adición simultánea de ambas citocinas sobre las células de trofoblasto mostraron un efecto sinérgico en la secreción de la hormona.^{60,61} Paralelamente, el TNF- α y la IL-1 indujeron la producción de IL-6, y el pre-tratamiento del trofoblasto con un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 (PM-1) bloqueó la inducción de la secreción de hCG ejercida por ambas citocinas,⁶² sugiriendo que el aumento en la secreción de hCG inducido por estas citocinas está mediada por la unión de IL-6 con su receptor. No obstante, otro estudio realizado con trofoblastos en cultivo mostró que el TNF- α y la IL-1 inhibieron la secreción de hCG.³⁶ Asimismo, se demostró que las IL's -1 β , 2, 4, 10, 13, 15 y TNF- α , no modificaron la expresión de hCG α ni de hCG β a excepción de TNF- α , el cual inhibió la expresión de hCG β .³⁷

Considerando lo anterior se puede inferir que los modelos y diseños experimentales empleados hasta ahora no permiten dilucidar el papel que las citocinas juegan en la regulación de la hCG en la placenta, y que nuevas aproximaciones deberán ser utilizadas para este tipo de estudios.

Regulación negativa de la hCG

Estudiar los factores que regulan negativamente la producción de hCG son de gran importancia para

entender los cambios que se producen en las concentraciones séricas de hCG a lo largo del embarazo. Los factores que inhiben la producción de hCG más estudiados son c-Jun, Oct-3/4, LXR α , y P $_4$. La proteína c-Jun pertenece a los factores de transcripción AP1, que tienen en su estructura distintos dominios de activación transcripcional referidos como A1, A2 y Epsilon. Pestell, *et al.* demostraron que c-Jun reprime la transcripción de la hCG β a través de su dominio A2, mientras la represión de la hCG α está mediada por la interacción de c-Jun sobre los CRE del promotor.⁴¹ El factor de transcripción Oct-3/4 es otro inhibidor de la expresión de hCG α/β , el Oct-3/4 se une al promotor de la hCG α sobre la secuencia ACAATAATCA. Este factor pertenece a la familia POU y es expresado en células embrionarias totipotentes y pluripotentes en estados iniciales de diferenciación. En cuanto a la hCG α , el mecanismo específico de represión no ha sido esclarecido.^{38,63} Por otra parte, la función principal de los LXR α es mediar la homeostasis de los lípidos en diferentes tejidos, pero el papel que tienen en la placenta es poco claro. Experimentos realizados en la línea celular de trofoblasto humano BeWo demostraron que la interacción del LXR con el agonista natural 22(R) hidroxicolessterol o el agonista sintético T0901317, estimuló la síntesis de lípidos y disminuyó la secreción de hCG durante el proceso de diferenciación celular. Por otra parte, la expresión del LXR α es inducida por darglitazona, un ligando sintético de PPAR- γ , indicando que los genes de los LXR α son un blanco de activación por PPAR- γ , por lo cual se especula que la producción de LXR mediada por PPAR γ es una vía alterna de autorregulación en la producción de hCG en las células placentarias.³⁹ Otro factor inhibidor de la expresión y secreción de hCG es la P $_4$, la cual es un esteroide producido en cantidades crecientes por el trofoblasto durante el embarazo. Se ha sugerido que la inhibición de hCG por P $_4$ está mediada por el bloqueo en la producción de la GnRH placentaria. No obstante, en la línea celular Rcho-1 se ha observado que la interacción del receptor de P $_4$ activado con las CREB inhibió la fosforilación de estas últimas.⁴³ Es posible que éstos y otros factores aún no descritos participen en la disminución de las concentraciones de la hCG desde la décima semana de gestación hasta el final del embarazo.

CONCLUSIONES

Diferentes estudios han demostrado que la regulación de la producción de la hCG es multifactorial, donde diferentes moléculas participan en la estimu-

lación o inhibición de la síntesis de esta hormona en el sistema materno-placento-fetal. Sin embargo, aún queda mucho por comprender acerca de la regulación de la producción de la hCG a lo largo de la gestación. El uso de diferentes modelos de estudio así como variaciones en las condiciones experimentales empleadas por los distintos grupos de investigación, tales como la concentración de los compuestos de prueba o el tiempo de incubación, han arrojado resultados contradictorios en algunos casos. Por lo tanto, es importante plantear nuevas aproximaciones que permitan interrelacionar los resultados obtenidos y esclarecer si los eventos observados *in vitro* pueden ayudar a comprender lo que ocurre *in vivo* en la placenta. Basados en los resultados más concluyentes, en la presente revisión se han integrado las vías que participan en la regulación de la producción de la hCG. El modelo aquí propuesto puede ser de utilidad en medicina reproductiva, ya que algunas patologías del embarazo están correlacionadas con concentraciones inadecuadas de la hCG, y entender los mecanismos que regulan la producción de esta hormona pueden ser relevantes para el diseño de estrategias específicas para su tratamiento.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Lorenza-Díaz por sus valiosas observaciones y comentarios al manuscrito. Asimismo, al Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

REFERENCIAS

1. Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 1981; 50: 465-95.
2. Bo M, Boime I. Identification of the transcriptionally active genes of the chorionic gonadotropin beta gene cluster in vivo. *J Biol Chem* 1992; 267: 3179-84.
3. Knofler M, Saleh L, Bauer S, Galos B, Rotheneder H, Husslein P, et al. Transcriptional regulation of the human chorionic gonadotropin beta gene during villous trophoblast differentiation. *Endocrinology* 2004; 145: 1685-94.
4. Rao CV, Lei ZM. The past, present and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 269: 2-8.
5. Ziecik AJ, Kaczmarek MM, Blitek A, Kowalczyk AE, Li X, Rahman NA. Novel biological and possible applicable roles of LH/hCG receptor. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 269: 51-60.
6. Jameson JL, Hollenberg AN. Regulation of chorionic gonadotropin gene expression. *Endocr Rev* 1993; 14: 203-21.
7. Yang M, Lei ZM, Rao Ch V. The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium. *Endocrinology* 2003; 144: 1108-20.
8. Handschuh K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, et al. Human chorionic gonadotropin produced by the invasive trophoblast but not the villous

- trophoblast promotes cell invasion and is down-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Endocrinology* 2007; 148: 5011-9.
9. Herr F, Baal N, Reisinger K, Lorenz A, McKinnon T, Preissner KT, et al. HCG in the regulation of placental angiogenesis. Results of an in vitro study. *Placenta* 2007; 28 Suppl A: S85-S93.
 10. Fluhr H, Bischof-Islami D, Krenzer S, Licht P, Bischof P, Zygmunt M. Human chorionic gonadotropin stimulates matrix metalloproteinases-2 and -9 in cytotrophoblastic cells and decreases tissue inhibitor of metalloproteinases-1, -2, and -3 in decidualized endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2008; En prensa.
 11. Milwidsky A, Finci-Yeheskel Z, Yagel S, Mayer M. Gonadotropin-mediated inhibition of proteolytic enzymes produced by human trophoblast in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 1101-5.
 12. Polliotti BM, Gnall-Sazenski S, Laughlin TS, Miller RK. Inhibitory effects of human chorionic gonadotropin (hCG) preparations on HIV infection of human placenta in vitro. *Placenta* 2002; 23 (Suppl. A): S102-S106.
 13. Khil LY, Jun HS, Kwon H, Yoo JK, Kim S, Notkins AL, et al. Human chorionic gonadotropin is an immune modulator and can prevent autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetologia* 2007; 50: 2147-55.
 14. Sasaki Y, Ladner DG, Cole LA. Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin and the source of pregnancy failures. *Fertil Steril* 2007; En prensa.
 15. Kovalevskaya G, Kakuma T, Schlatterer J, O'Connor JF. Hyperglycosylated HCG expression in pregnancy: cellular origin and clinical applications. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 260-2: 237-43.
 16. Ticconi C, Zicari A, Belmonte A, Realacci M, Rao Ch V, Piccione E. Pregnancy-promoting actions of HCG in human myometrium and fetal membranes. *Placenta* 2007; 28 (Suppl. A): S137-S143.
 17. Janssens JP, Russo J, Russo I, Michiels L, Donders G, Verjans M, et al. Human chorionic gonadotropin (hCG) and prevention of breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 269: 93-8.
 18. O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H. The foetal Leydig cell— differentiation, function and regulation. *Int J Androl* 2006; 29: 90-5; discussion 105-8.
 19. Pakarainen T, Ahtiainen P, Zhang FP, Rulli S, Poutanen M, Huhtaniemi I. Extragonadal LH/hCG action—not yet time to rewrite textbooks. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 269: 9-16.
 20. Handschuh K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, et al. Human chorionic gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells. *Placenta* 2007; 28: 175-84.
 21. Shi QJ, Lei ZM, Rao CV, Lin J. Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology* 1993; 132: 1387-95.
 22. Malek A, Sager R, Willi A, Muller J, Hanggi W, Leiser R, et al. Production of protein hormones by cultured trophoblast cells isolated from term and early placentae. *Am J Reprod Immunol* 2000; 43: 278-84.
 23. Taylor RN, Martin MC. Endocrinología del embarazo. En: Greenspan FS, Strewler GJ (eds.). *Endocrinología básica y clínica*. 4a. Ed. México: El Manual Moderno; 1998, p. 623-54.
 24. Zuo J, Lei ZM, Rao CV. Human myometrial chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptors in preterm and term deliveries. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 907-11.
 25. Edelstam G, Karlsson C, Westgren M, Lowbeer C, Swahn ML. Human chorionic gonadotropin (hCG) during third trimester pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest* 2007; 67: 519-25.
 26. Bas-Budecka E, Perenc M, Sieroszewski P. Abnormal second trimester screening for fetal chromosomal abnormalities as a predictor of adverse pregnancy outcome. *Ginekol Pol* 2007; 78: 877-80.
 27. Basirat Z, Barat S, Hajiahmadi M. Serum beta human chorionic gonadotropin levels and preeclampsia. *Saudi Med J* 2006; 27: 1001-4.
 28. Ganapathy R, Lamont RF, Bassett P. Unexplained elevated maternal serum beta-HCG concentration and adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn* 2007; 27: 995-9.
 29. Knofler M, Saleh L, Bauer S, Vasicek R, Griesinger G, Strohmmer H, et al. Promoter elements and transcription factors involved in differentiation-dependent human chorionic gonadotrophin-alpha messenger ribonucleic acid expression of term villous trophoblasts. *Endocrinology* 2000; 141: 3737-48.
 30. Petraglia F, Florio P, Nappi C, Genazzani AR. Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms. *Endocr Rev* 1996; 17: 156-86.
 31. Petraglia F, Santuz M, Florio P, Simoncini T, Luisi S, Plaino L, et al. Paracrine regulation of human placenta: control of homonogenesis. *J Reprod Immunol* 1998; 39: 221-33.
 32. Jeschke U, Karsten U, Reimer T, Richter DU, Bergemann C, Briese V, et al. Stimulation of hCG protein and mRNA in first trimester villous cytotrophoblast cells in vitro by glycodelin A. *J Perinat Med* 2005; 33: 212-8.
 33. Licht P, Russu V, Wildt L. On the role of human chorionic gonadotropin (hCG) in the embryo-endometrial microenvironment: implications for differentiation and implantation. *Semin Reprod Med* 2001; 19: 37-47.
 34. Cirelli N, Lebrun P, Gueuning C, Delogne-Desnoeck J, Vanbellinghen AM, Graff G, et al. Physiological concentrations of albumin stimulate chorionic gonadotrophin and placental lactogen release from human term placental explants. *Hum Reprod* 2001; 16: 441-8.
 35. Lambot N, Lebrun P, Delporte C, De Vriese C, Delogne-Desnoeck J, Vanbellinghen AM, et al. Effect of IPs, cAMP, and cGMP on the hPL and hCG secretion from human term placenta. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 243: 80-5.
 36. Meisser A, Chardonnes D, Campana A, Bischof P. Effects of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha, macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor beta on trophoblastic matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 252-60.
 37. Leisser C, Saleh L, Haider S, Husslein H, Sonderegger S, Knofler M. Tumour necrosis factor-alpha impairs chorionic gonadotrophin beta-subunit expression and cell fusion of human villous cytotrophoblast. *Mol Hum Reprod* 2006; 12: 601-9.
 38. Liu L, Leaman D, Villalta M, Roberts RM. Silencing of the gene for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin by the embryonic transcription factor Oct-3/4. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 1651-8.
 39. Weedon-Fekjaer MS, Duttaroy AK, Nebb HI. Liver X receptors mediate inhibition of hCG secretion in a human placental trophoblast cell line. *Placenta* 2005; 26: 721-8.
 40. Barrera D, Avila E, Hernandez G, Mendez I, Gonzalez L, Halhali A, et al. Calcitriol affects hCG gene transcription in cultured human syncytiotrophoblasts. *Reprod Biol Endocrinol* 2008; 6: En prensa.
 41. Pestell RG, Hollenberg AN, Albanese C, Jameson JL. c-Jun represses transcription of the human chorionic gonadotropin alpha and beta genes through distinct types of CREs. *J Biol Chem* 1994; 269: 31090-6.
 42. Barnea ER, Neubrun D, Shurtz-Swirski R. Effect of insulin on human chorionic gonadotrophin secretion by placental explants. *Hum Reprod* 1993; 8: 858-62.

43. Yamamoto T, Matsumoto K, Kurachi H, Okamoto Y, Nishio Y, Sakata M, et al. Progesterone inhibits transcriptional activation of human chorionic gonadotropin-alpha gene through protein kinase A pathway in trophoblast cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 182: 215-24.
44. Knofler M, Saleh L, Strohmer H, Husslein P, Wolschek MF. Cyclic AMP- and differentiation-dependent regulation of the proximal alphaHCG gene promoter in term villous trophoblasts. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 573-80.
45. Tasken K, Aandahl EM. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* 2004; 84: 137-67.
46. Johnson W, Albanese C, Handwerger S, Williams T, Pestell RG, Jameson JL. Regulation of the human chorionic gonadotropin alpha- and beta-subunit promoters by AP-2. *J Biol Chem* 1997; 272: 15405-12.
47. Lambot N, Lebrun P, Cirelli N, Vanbellingen AM, Delogne-Desnoeck J, Graff G, et al. Colloidal effect of albumin on the placental lactogen and chorionic gonadotrophin releases from human term placental explants. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315: 342-8.
48. Bernucci L, Henriquez M, Diaz P, Riquelme G. Diverse calcium channel types are present in the human placental syncytiotrophoblast basal membrane. *Placenta* 2006; 27: 1082-95.
49. Shi CZ, Zhuang LZ. Norepinephrine regulates human chorionic gonadotrophin production by first trimester trophoblast tissue in vitro. *Placenta* 1993; 14: 683-93.
50. Xie H, Rothstein TL. Protein kinase C mediates activation of nuclear cAMP response element-binding protein (CREB) in B lymphocytes stimulated through surface Ig. *J Immunol* 1995; 154: 1717-23.
51. Currie WD, Setoyama T, Lee PS, Baimbridge KG, Church J, Yuen BH, et al. Cytosolic free Ca²⁺ in human syncytiotrophoblast cells increased by gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 1993; 133: 2220-6.
52. Bernatchez R, Belkacemi L, Rassart E, Daoud G, Simoneau L, Lafond J. Differential expression of membrane and soluble adenylyl cyclase isoforms in cytotrophoblast cells and syncytiotrophoblasts of human placenta. *Placenta* 2003; 24: 648-57.
53. Borodinsky LN, Spitzer NC. Second messenger pas de deux: the coordinated dance between calcium and cAMP. *Sci STKE* 2006; 2006: 1-4.
54. Hashimoto Y, Miyachi H. Nuclear receptor antagonists designed based on the helix-folding inhibition hypothesis. *Bioorg Med Chem* 2005; 13: 5080-93.
55. Guibourdenche J, Alsat E, Soncin F, Rochette-Egly C, Evain-Brion D. Retinoid receptors expression in human term placenta: involvement of RXR alpha in retinoid induced-hCG secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1384-7.
56. Tarrade A, Schoonjans K, Guibourdenche J, Bidart JM, Vidaud M, Auwerx J, et al. PPAR gamma/RXR alpha heterodimers are involved in human CG beta synthesis and human trophoblast differentiation. *Endocrinology* 2001; 142: 4504-14.
57. Piccinni MP. T cells in normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 2006; 13: 840-4.
58. Barrera D, Avila E, Diaz L. Immunological role of progesterone in the maintenance of pregnancy. *Rev Invest Clin* 2007; 59: 139-45.
59. Meisser A, Cameo P, Islami D, Campana A, Bischof P. Effects of interleukin-6 (IL-6) on cytotrophoblastic cells. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 1055-8.
60. Yanushpolsky EH, Ozturk M, Polgar K, Berkowitz RS, Hill JA. The effects of cytokines on human chorionic gonadotropin (hCG) production by a trophoblast cell line. *J Reprod Immunol* 1993; 25: 235-47.
61. Pedersen AM, Fulton SK, Porter L, Francis GL. Tumor necrosis factor-alpha affects in vitro hormone production by JEG-3 choriocarcinoma cell cultures. *J Reprod Immunol* 1995; 29: 69-80.
62. Li Y, Matsuzaki N, Masuhiro K, Kameda T, Taniguchi T, Saji F, et al. Trophoblast-derived tumor necrosis factor-alpha induces release of human chorionic gonadotropin using interleukin-6 (IL-6) and IL-6-receptor-dependent system in the normal human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 184-91.
63. Liu L, Roberts RM. Silencing of the gene for the beta subunit of human chorionic gonadotropin by the embryonic transcription factor Oct-3/4. *J Biol Chem* 1996; 271: 16683-9.

Reimpresos:

Dr. David Barrera

Departamento de Biología de la Reproducción,
 Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
 Salvador Zubirán,
 Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan
 14000, México, D.F.
 Tel.: 5487-0900, Fax: 5655-9859
 Correo electrónico: barrera1912@gmail.com

Recibido el 5 de noviembre de 2007.

Aceptado el 16 de mayo de 2008.

Regulation of Vitamin D hydroxylases gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblasts

Euclides Avila^a, Lorenza Díaz^a, David Barrera^a, Ali Halhali^a, Isabel Méndez^a, Leticia González^a, Ulrich Zuegel^b, Andreas Steinmeyer^b, Fernando Larrea^{a,*}

^a Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14000, México D.F., Mexico

^b Schering AG, Berlin 13342, Germany

Received 28 April 2006; accepted 3 July 2006

Abstract

Human placenta synthesizes and metabolizes 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃/calcitriol] through the activity of 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase (CYP27B1) and 1,25(OH)₂D₃-24-hydroxylase (CYP24A1), the two key enzymes for Vitamin D metabolism. In this study, calcitriol rapidly generated intracellular cAMP accumulation in cultured human syncytiotrophoblast cells, which in turn enhanced hCG secretion, a marker of trophoblast endocrine activity. The effects of 1,25(OH)₂D₃ upon the expression of CYP27B1 and CYP24A1 were also investigated. 1,25(OH)₂D₃ and activators of the PKA signaling system decreased the expression of CYP27B1, whereas increased CYP24A1 gene transcription. The use of a selective inhibitor of PKA (H-89) prevented the effects of calcitriol on CYP27B1 gene and hCG secretion, but not on CYP24A1 transcription. Addition of ZK 159222, a Vitamin D receptor (VDR) antagonist, blocked the calcitriol-mediated upregulation of 24-hydroxylase gene expression but did not affect calcitriol-induced downregulation of CYP27B1 gene or hCG stimulation. In addition, our study also demonstrated a role of calcitonin on Vitamin D hydroxylases gene regulation in placenta. The overall data suggest that calcitriol downregulates CYP27B1 expression via a cAMP-dependent signaling pathway, whereas upregulates 24-hydroxylase gene expression through a VDR-dependent mechanism.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: CYP27B1; CYP24A1; VDR; Calcitonin; Trophoblast; Gene expression

1. Introduction

The 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃] or calcitriol is a pluripotent seco steroid, which besides its role on mineral and ion homeostasis is associated with important cellular processes including cell proliferation and differentiation [1]. Synthesis of calcitriol from the Vitamin D precursor, 25-hydroxyvitamin D₃ [25OHD₃], takes place mainly in proximal renal tubular cells and is catalyzed by the enzyme 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase (1 α -

hydroxylase/CYP27B1). However, expression of CYP27B1 has also been reported in a variety of extrarenal tissues, including the immune system, skin, and placenta [2–6]. The identification of extrarenal CYP27B1 gene transcription products may indicate a possible role for calcitriol in autocrine or paracrine actions. Another important modulator of 1,25(OH)₂D₃ is the mitochondrial cytochrome P₄₅₀ 1,25(OH)₂D₃ 24-hydroxylase (24-hydroxylase/CYP24A1), which inactivates calcitriol to water-soluble products by the C23/C24 oxidation pathway [2,7,8]. Calcitriol through its binding to the Vitamin D receptor (VDR) enhances CYP24A1 and downregulates 1 α -hydroxylase gene expression [2,9,10], which constitute an important negative feedback regulatory mechanism in the metabolism and function

* Corresponding author. Tel.: +52 55 55 73 11 60;

fax: +52 55 56 55 98 59.

E-mail address: larrea@innsz.mx (F. Larrea).

of Vitamin D. Hence, coordinated regulation of CYP27B1 and CYP24A1 gene expression represents a pivotal mechanism to keep adequate serum and cellular concentrations of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

The identification of CYP27B1 gene expression products in cultured human placental syncytiotrophoblast cells [4], together with other reports concerning its expression patterns throughout pregnancy and decidual localization [5,6], suggests an active participation of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in early stages of fetoplacental development, particularly in those during implantation and/or placentation [11–13]. In this study, we have examined the effects of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and cyclic AMP (cAMP) on both CYP27B1 and CYP24A1 gene expression in cultured human syncytiotrophoblast cells, in an effort to understand the regulation and biological implications of Vitamin D metabolism in placenta.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Culture media, fetal bovine serum, trizol, and RT-PCR reagents were from Invitrogen (Carlsbad, CA). $(^{125}\text{I})\text{NaI}$ and $(^{32}\text{P})\text{-dCTP}$ were purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK). Cholera toxin and anti-cAMP antibody were from Calbiochem-Novabiochem (La Jolla, CA). Calcitriol was a donation from Hoffmann-La Roche Ltd. (Basel, Switzerland). Human calcitonin and parathyroid hormone (PTH), IBMX, 8-Bromo cAMP (8-Br-cAMP), H-89, tyrosyl methyl ester of 2'-O-monosuccinyladenosine 3',5'-cyclic monophosphate and the enzymes used for cell culture were from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). The VDR antagonist ZK 159222 was a donation from Schering (Berlin, Germany).

2.2. Cell culture and assay methods

This study was approved by the Human Ethical Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Term placentae were obtained from normal pregnant women (38–42 weeks of gestation). The isolation of cytotrophoblasts and culture conditions were as previously described [4,14]. Briefly: villous tissue was enzymatically dispersed with trypsin and DNase I, and cytotrophoblasts were separated on a Percoll gradient. The cytotrophoblasts were plated in DMEM with 20% fetal bovine serum at a density of 8×10^5 cells/ml and incubated in humidified 5% CO_2 –95% air at 37 °C. Unless otherwise indicated, at 48 h from plating, cells were incubated in serum-free DMEM and treated with the compounds of interest. The morphological aspects of cells were examined daily. The concentration of human chorionic gonadotrophin (hCG) in culture media was measured by specific enzyme immunoassay (Immunometrics Ltd., London, UK) according to the manufacturer instructions and results were expressed as IU/mg protein. Total protein

content was determined by the method of Bradford using BSA as standard [15].

Intracellular cAMP was measured by radioimmunoassay (RIA) as previously described [16]. For this purpose, cells were treated with IBMX (0.1 mM) and homogenized in RIPA buffer (phosphate buffer saline, pH 7.4, containing 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS). Samples were boiled during 5 min before the assay. The sensitivity of the assay was 40 fmol/ml and the inter- and intra-assay coefficients of variation were <12% and <6%, respectively.

2.3. RT-PCR and Southern blots

cDNA was prepared from total RNA isolated from trophoblast cells and the following primers were used for PCR amplifications: CYP27B1: 5'-ACCAGATGTTTGC-ATTTGCTC-3' and 5'-GGACGAAAAGAATTTGGCTCT-3', and CYP24A1: 5'-CCTCGTGTGTATGAGAAGAGAT-T-3' and 5'-TTTAAATACGGCATATTCCTCAAA-3', yielding a 517 and 486 bp RT-PCR products, respectively. These products were separated in agarose gels, blotted onto nylon membranes and hybridized with $(^{32}\text{P})\text{-dCTP}$ -radiolabeled specific nested probes. The probes used throughout this study were obtained by RT-PCR as previously described [17]. Normalization was done by parallel amplifications of the housekeeping gene, cyclophilin.

2.4. Statistical analysis

Statistical significance among comparisons was established using Student's *t*-test. A *P*-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Morphological and functional evaluation of cultured syncytiotrophoblasts

As previously shown [4,17–19], cultured Percoll-purified cytotrophoblasts aggregated and formed syncytia in a time dependent manner. At 3 days from plating, syncytiotrophoblasts appeared as network structures of multinucleated cells. As shown in Fig. 1, addition of 8-Br-cAMP increased significantly hCG content in culture media. A significant increase on hCG secretion, although to lesser extent, was also observed in the absence of the cyclic nucleotide analog (Fig. 1). These data further confirmed the functionality and morphological integrity of the culture system used in this study.

3.2. Rapid cAMP accumulation and hCG stimulation by calcitriol

In placenta, cAMP is a second messenger involved in the transcriptional regulation of the Vitamin D hydroxylases

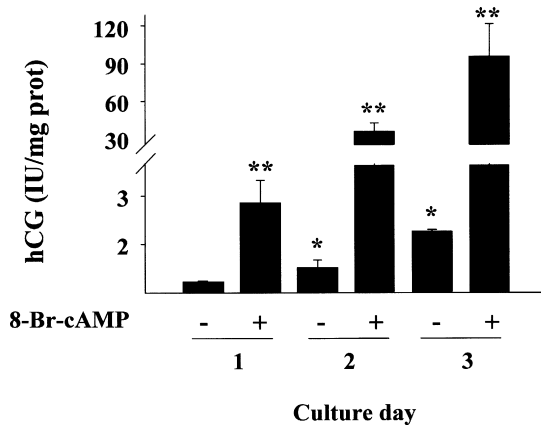


Fig. 1. Temporal pattern of hCG secretion by cultured human trophoblasts. Mononuclear cells (8×10^5 cells/ml) were incubated for 3 days in the absence (–) or presence (+) of 8-Br-cAMP (1.5 mM). Secretion of hCG in culture media was measured daily and data are presented as the mean \pm S.D. of three cultures. * $P < 0.05$ vs. day 1; ** $P < 0.05$ vs. control.

CYP27B1 and CYP24A1 [17]. In addition, rapid cAMP generation induced by calcitriol has been previously reported in other cell types [20,21]. Herein, we studied if calcitriol affects cAMP generation in cultured trophoblasts. For this purpose, the presence of an operating G-protein mediated pathway in placental cell cultures was investigated by incubations performed in the presence of cholera toxin, an agent that modifies G-protein activity. The presence of cholera toxin rapidly increased in a dose-dependent manner the intracellular concentration of cAMP (data not shown). Then, the effects of calcitriol on cAMP generation were evaluated. As shown in Fig. 2A, dose–response studies revealed that calcitriol at physiological concentrations were able to significantly stimulate cAMP accumulation within 10 min of treatment. Since calcitriol increased intracellular cAMP, we asked whether the rapid changes in cAMP were significantly enough to affect the secretion of hCG, a cAMP-dependent placental marker. As depicted in Fig. 2B, 3 h incubation in the presence of increasing concentrations of calcitriol significantly stimulated hCG secretion. Calcitriol effects on hCG were not observed when cells were coincubated in the presence of H-89, a selective inhibitor of PKA (8.14 ± 1.88 IU/mg protein versus 2.0 ± 1.6 IU/mg protein; $P < 0.05$, in the absence or presence of the PKA inhibitor).

3.3. Effects of 8-Br-cAMP and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on CYP27B1 and CYP24A1 gene expression

To investigate the molecular mechanisms by which Vitamin D₃ metabolism is regulated in placenta, total RNA was extracted from syncytiotrophoblasts treated with increasing concentrations of 8-Br-cAMP or $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and subjected to RT-PCR using primers based on human 1α -hydroxylase and 24-hydroxylase genes. Fig. 3A shows a representative Southern blot analysis of RT-PCR products of CYP27B1 (517 bp) and CYP24A1 (486 bp) genes obtained

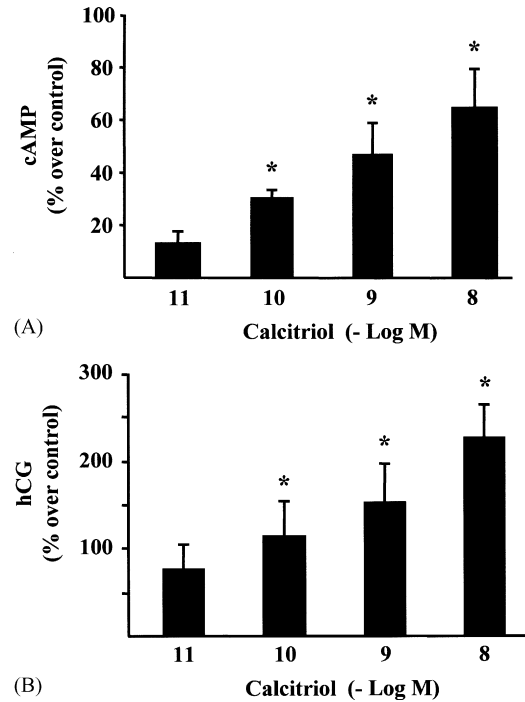


Fig. 2. Dose-dependent effects of calcitriol on intracellular cAMP levels (A) and hCG secretion (B) by cultured trophoblasts. Intracellular cAMP was measured by specific RIA after 10 min incubation in the presence or absence of increasing concentrations of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Immunoassayable hCG was measured after 3 h incubation with calcitriol as above indicated. Results were expressed as percent over ethanol-treated control cultures. cAMP and hCG concentrations in control cultures were 1.73 ± 0.21 pmol/mg prot and 1.9 ± 0.05 IU/mg prot, respectively. Each bar represents the mean \pm S.D. of three cell cultures. * $P < 0.05$ vs. control.

from cells treated with 8-Br-cAMP. As depicted, CYP27B1 was expressed in the absence of 8-Br-cAMP and its expression was substantially inhibited in a dose-dependent manner by the cyclic nucleotide analog. On the contrary, incubations of cells in the presence of increasing concentrations of 8-Br-cAMP resulted in upregulation of CYP24A1 gene expression. Next, the role of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on placental CYP27B1 and CYP24A1 expression was studied. As shown in Fig. 3B, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ suppressed expression of CYP27B1 gene in a dose-dependent manner. At the same time, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ strongly increased CYP24A1 transcription even at the lowest dose used (Fig. 3B). Parallel amplifications of the house-keeping gene cyclophilin were used as internal and loading controls.

Our results with calcitriol and 8-Br-cAMP on Vitamin D hydroxylases expression may indicate that calcitriol, by a mechanism probably linked to cAMP signaling, modulates both hydroxylase genes. In order to support this observation, placental cells were treated with calcitriol in the presence of the PKA inhibitor H-89. As shown in Fig. 4, inhibition of CYP27B1 expression by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ was prevented in the presence of H-89 with no effects on calcitriol-mediated upregulation of CYP24A1. On this regard, and in order to investigate the role of a VDR-dependent mechanism, the

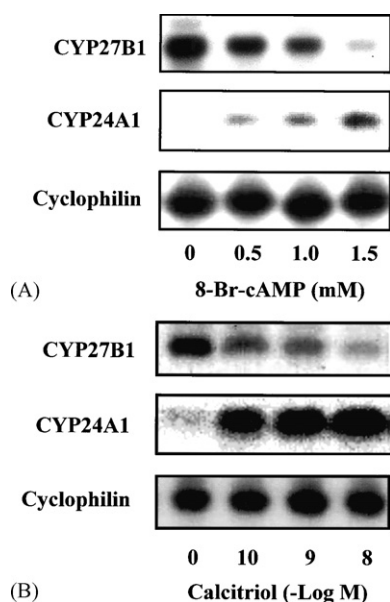


Fig. 3. Dose-dependent effects of 8-Br-cAMP (A) and calcitriol (B) on CYP27B1 and CYP24A1 gene expression in cultured trophoblasts. Total RNA was obtained from cells treated during 18 h with different concentrations of 8-Br-cAMP or calcitriol and subjected to RT-PCR and Southern blot analysis as described in Section 2. RT-PCR products were hybridized with (32 P)-labeled nested probes for CYP27B1, CYP24A1 and cyclophilin, respectively. Figure shows a representative result from at least three experiments.

effects of ZK 159222, a specific antagonist of VDR, were studied. Fig. 4 shows that preincubation with ZK 159222 during 2 h decreased $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimulation of placental CYP24A1 gene expression. In contrast, the presence of the VDR antagonist did not affect calcitriol suppressive effects on CYP27B1. ZK 159222 alone resulted in a slight increase on CYP24A1 and decrease on CYP27B1 mRNA (Fig. 4).

In order to identify natural hormone regulators of calcitriol production in placenta acting through a G protein coupled receptors pathway, trophoblasts were incubated in the pres-

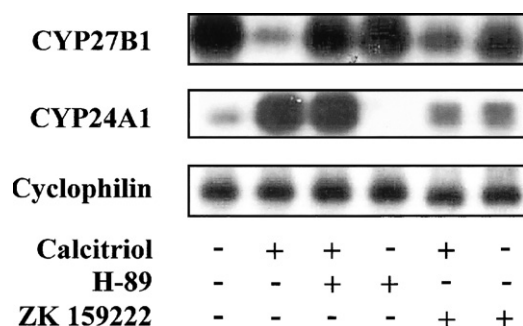


Fig. 4. Effects of a PKA inhibitor and a VDR antagonist on calcitriol-induced regulation of CYP27B1 and CYP24A1 genes. Cultured cells were preincubated during 2 h in the absence or presence of H-89 ($5 \mu\text{M}$) or ZK 159222 ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) prior the addition of calcitriol ($1 \times 10^{-10} \text{M}$). After 18 h incubation period, total RNA was extracted for RT-PCR and Southern blot analysis. RT-PCR products were hybridized with the corresponding (32 P)-labeled nested probes. Figure shows a representative result from three experiments.

ence of human PTH and calcitonin, two hormones known to regulate calcitriol synthesis and metabolism in the kidney. As depicted in Fig. 5A, PTH, calcitonin and calcitriol were able to significantly rise intracellular cAMP content in a short period of time (10 min), being calcitonin the most potent activator of adenylate cyclase in this system. ZK 159222 alone was able to induce cAMP accumulation, and its coincubation with calcitriol increased even more the cAMP synthesis. These effects were also observed on hCG secretion (Fig. 5B), used as a marker of cAMP biological actions at the placental level. As in the case of cAMP, calcitonin provoked the highest stimulation on hCG secretion. In addition, these hormones, as shown in Fig. 5C, decreased and increased CYP27B1 and CYP24A1 gene expression, respectively, in a similar manner than $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

4. Discussion

Cultured human syncytiotrophoblast cells have proved to be a useful model to study placental physiology [4,17–19]. Our group has reported the ability of this culture system to synthesize $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, as well as the presence of transcriptional products of CYP27B1, CYP24A1 and VDR genes [4,17,18]. It is now generally accepted that the majority of circulating $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ is made by the kidney and that extrarenal $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ production most likely has a local autocrine/paracrine function [1]. It is noteworthy to mention that in some cases extrarenal 1α -hydroxylation of $25\text{OH}\text{D}_3$ is not influenced by the same mechanism that controls enzyme activity and gene expression in kidney [17,22,23]. This is not due to differences in gene structure, since placental CYP27B1 gene products are identical to those from kidney [4]. In this study, we have examined the effects of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on cAMP, a second messenger of PTH and calcitonin action, and their effects on both 1α -hydroxylase and 24 -hydroxylase gene expression. Our results demonstrated an elevation of intracellular cAMP levels within 10 min of treatment with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in a dose-dependent manner. Moreover, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and 8-Br-cAMP inhibited 1α -hydroxylase and stimulated 24 -hydroxylase transcription, which indicated the presence in the placenta of a negative feedback regulatory mechanism of calcitriol on its own production. Rapid actions of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ by transcription-independent mechanisms have been previously shown. These membrane effects are thought to be mediated via calcitriol binding to VDR or to other surface membrane binding proteins [20]. Although there is no evidence for the interaction of VDR with G-proteins, recent studies have suggested the association of VDR with lipid-raft-rich areas in the plasma membrane that are involved in G-protein- $\text{G}\alpha$ subunit activation [24].

It is generally accepted that PTH and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ are the most important physiological regulators of 1α -hydroxylase expression. In the kidney, PTH causes an upregulation of 1α -hydroxylase through a cAMP-dependent process, which

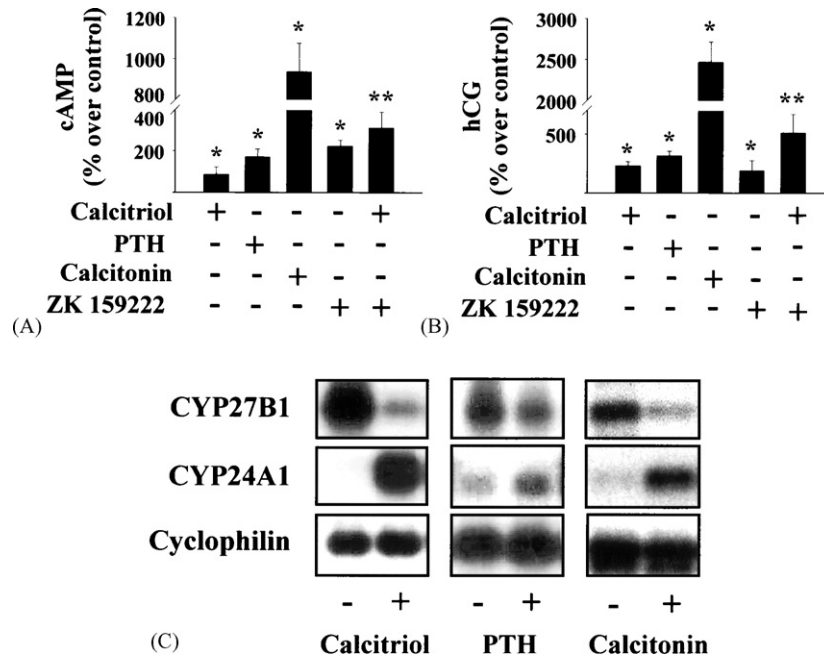


Fig. 5. Effects of calcitropic hormones on intracellular cAMP content (A), hCG secretion (B), and CYP27B1 and CYP24A1 gene expression (C) in human cultured syncytiotrophoblast cells. cAMP was measured after 10 min incubation in the presence or absence of calcitriol (1×10^{-7} M), PTH (1×10^{-7} M), calcitonin (1×10^{-7} M), ZK 159222 (1×10^{-7} M) or the vehicle alone. hCG secretion and Vitamin D hydroxylases gene transcription were evaluated in cultures incubated as above during 18 h. Results were expressed as percent over vehicle-treated control cultures. Each bar represents the mean \pm S.D. of three cell cultures. * $P < 0.05$ vs. vehicle; ** $P < 0.05$ vs. calcitriol.

leads to recruitment of coactivators and transactivation of the CYP27B1 gene [9]. Calcitriol exerts its inhibitory effect on 1α -hydroxylase gene by binding to the VDR, which is associated indirectly to the promoter through an atypical VDRE. This process involves the interaction of the liganded VDR to the intermediate molecule VDIR (VDR interacting repressor) leading to dissociation of coactivator complexes and recruitment of corepressors, to finally transrepress CYP27B1 gene [9]. Huening et al. [25] provided evidence in osteoblastic cells of a PKA-dependent cAMP early repressor (ICER) that downregulates PKA-mediated VDR transcription. ICER binds to CREs in cAMP-responsive genes not allowing recruitment of CRE-binding protein (CREB) and/or related factors needed to activate transcription. It was of interest in this study the observation that other cAMP-mediated processes such as 24-hydroxylase expression and hCG secretion were rather stimulated than inhibited by the cyclic nucleotide analog, which may suggest specific regulatory mechanisms for ICER on some cAMP-dependent process or the presence of a different regulatory mechanism for placental Vitamin D metabolism. Recently, Ebert et al. [26] showed that 1α -hydroxylase promoter is suppressed by NF κ B and the use of sulfasalazine, an inhibitor of NF κ B, stimulates endogenous 1α -hydroxylase mRNA expression in HEK-293 cells. In addition, consensus sequences for NF κ B in 1α -hydroxylase promoter have been identified [26], and both cAMP analogs and agents that stimulates cAMP production induced NF κ B DNA-binding activity in human myeloid cells [27]. These observations suggest that regulation of pla-

cental 1α -hydroxylase by cAMP may be a tissue selective mechanism mediated via CRE or through additional transcription factors at the level of promoters.

Herein, we present evidence showing that calcitriol and cAMP downregulate CYP27B1 through a PKA signaling pathway. In this regard, the PKA selective inhibitor H-89 but not the VDR antagonist prevented the calcitriol-mediated CYP27B1 inhibition. Although no effects with the VDR antagonist were observed, the participation of VDR-mediated calcitriol actions on CYP27B1 cannot be totally excluded, considering that intracellular cAMP raised with the VDR antagonist alone. The increase of hCG secretion with the VDR antagonist by itself further supported these observations.

Calcitriol and cAMP increased in a dose-dependent manner CYP24A1 mRNA levels. Incubations in the presence of H-89 or ZK 159222 alone completely inhibited or increased, respectively, the basal expression of this gene. These observations are in line with the concept that the PKA-signaling pathway, in addition to the VDR-dependent mechanism, also contributes to control 24-hydroxylase expression by calcitriol or other calcitropic hormones [28]. cAMP effects on CYP24A1 are probably mediated by phosphorylation of CREB and binding to putative CRE sites at the promoter level [29,30]. In addition, the observation that calcitriol induced the strongest transcriptional response on CYP24A1 gene, suggested, as previously shown in kidney [31], that cAMP upregulation of VDR is probably one mechanism involved in cAMP-mediated modulation of CYP24A1 transcription

[31,32]. Furthermore, Dhawan et al. [33] recently established in osteoblastic cells the functional cooperation between the C/EBP family of transcription factors and VDR on calcitriol-induced CYP24A1 transcription. CCAAT enhancer binding protein β (C/EBP β) increased 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -mediated CYP24A1 and PKA-mediated VDR gene expression. In addition, both PTH and calcitriol induced C/EBP β . These observations, together with those demonstrating the placenta as a source of C/EBP β [34], suggest the presence of a similar mechanism of cross-talking between cAMP and 1,25(OH) $_2$ D $_3$ upon VDR-dependent CYP24A1 gene regulation in placenta.

It was of interest to note that the two natural occurring calcitropic hormones such as PTH and calcitonin used in this study induced the same Vitamin D $_3$ hydroxylases gene expression patterns as those obtained with 8-Br-cAMP and calcitriol. These results indicate and support the presence of functional G-protein coupled receptors for PTH and calcitonin [35,36] and may also help to establish their role on placental physiology.

In summary, the results presented herein indicate that in cultured human syncytiotrophoblast cells both 1,25(OH) $_2$ D $_3$ and cAMP modulate transcription of CYP27B1 and CYP24A1. Calcitriol and cAMP suppressed 1 α -hydroxylase expression, whereas both of them upregulated 24-hydroxylase mRNA. The mechanistic differences in gene transcription regulation of these two key enzymes between placenta and kidney are probably mediated via tissue specific transcription factors at the level of individual promoters.

Acknowledgments

E.A. is a Ph.D. student from Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM, under a fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México, no. 90449). The authors acknowledge to Hospital de Gineco-Obstetricia Luis Castelazo Ayala, México D.F., and volunteers for placenta donation. We thank Dr. L. D' Ambrosio and Dr. A. Perrin from Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland for calcitriol donation. This work was supported by a grant from CONACyT (México).

References

- [1] A.S. Dusso, A.J. Brown, E. Slatopolsky, Vitamin D, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 289 (1) (2005) F8–F28.
- [2] J.L. Omdahl, H.A. Morris, B.K. May, Hydroxylase enzymes of the Vitamin D pathway: expression, function, and regulation, *Annu. Rev. Nutr.* 22 (2002) 139–166.
- [3] L. Diaz, C. Carino, I. Mendez, Vitamin D: implications for health and pregnancy, *Rev. Invest. Clin.* 53 (1) (2001) 77–85.
- [4] L. Diaz, I. Sanchez, E. Avila, A. Halhali, F. Vilchis, F. Larrea, Identification of a 25-hydroxyvitamin D $_3$ 1 α -hydroxylase gene transcription product in cultures of human syncytiotrophoblast cells, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (7) (2000) 2543–2549.
- [5] D. Zehnder, R. Bland, M.C. Williams, R.W. McNinch, A.J. Howie, P.M. Stewart, M. Hewison, Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin D(3)-1 α -hydroxylase, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2) (2001) 888–894.
- [6] D. Zehnder, K.N. Evans, M.D. Kilby, J.N. Bulmer, B.A. Innes, P.M. Stewart, M. Hewison, The ontogeny of 25-hydroxyvitamin D(3) 1 α -hydroxylase expression in human placenta and decidua, *Am. J. Pathol.* 161 (1) (2002) 105–114.
- [7] H.L. Henry, The 25(OH)D(3)/1 α ,25(OH)(2)D(3)-24R-hydroxylase: a catabolic or biosynthetic enzyme? *Steroids* 66 (3–5) (2001) 391–398.
- [8] H.L. Henry, C. Dutta, N. Cunningham, R. Blanchard, R. Penny, C. Tang, G. Marchetto, S.Y. Chou, The cellular and molecular regulation of 1,25(OH) $_2$ D $_3$ production, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 41 (3–8) (1992) 401–407.
- [9] A. Murayama, M.S. Kim, J. Yanagisawa, K. Takeyama, S. Kato, Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching, *EMBO J.* 23 (7) (2004) 1598–1608.
- [10] C. Zierold, J.A. Mings, H.F. DeLuca, Regulation of 25-hydroxyvitamin D $_3$ -24-hydroxylase mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$ and parathyroid hormone, *J. Cell. Biochem.* 88 (2) (2003) 234–237.
- [11] A. Halhali, G.M. Acker, M. Garabedian, 1,25-Dihydroxyvitamin D $_3$ induces in vivo the decidualization of rat endometrial cells, *J. Reprod. Fertil.* 91 (1) (1991) 59–64.
- [12] A. Stephanou, R. Ross, S. Handwerger, Regulation of human placental lactogen expression by 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$, *Endocrinology* 135 (6) (1994) 2651–2656.
- [13] K.N. Evans, J.N. Bulmer, M.D. Kilby, M. Hewison, Vitamin D and placental-decidual function, *J. Soc. Gynecol. Invest.* 11 (5) (2004) 263–271.
- [14] H.J. Kliman, J.E. Nestler, E. Sermasi, J.M. Sanger, J.F. Strauss III, Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae, *Endocrinology* 118 (4) (1986) 1567–1582.
- [15] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [16] L.A. Villanueva, I. Mendez, S. Ampuero, F. Larrea, The prolactin inhibition of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in cultured rat granulosa cells is in part tyrosine kinase and protein kinase-C dependent, *Mol. Hum. Reprod.* 2 (10) (1996) 725–731.
- [17] E. Avila, L. Diaz, A. Halhali, F. Larrea, Regulation of 25-hydroxyvitamin D $_3$ 1 α -hydroxylase, 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$ 24-hydroxylase and Vitamin D receptor gene expression by 8-bromo cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblast cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 89/90 (1–5) (2004) 115–119.
- [18] A. Halhali, L. Diaz, I. Sanchez, M. Garabedian, H. Bourges, F. Larrea, Effects of IGF-I on 1,25-dihydroxyvitamin D(3) synthesis by human placenta in culture, *Mol. Hum. Reprod.* 5 (8) (1999) 771–776.
- [19] L. Diaz, C. Arranz, E. Avila, A. Halhali, F. Vilchis, F. Larrea, Expression and activity of 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase are restricted in cultures of human syncytiotrophoblast cells from preclamptic pregnancies, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (8) (2002) 3876–3882.
- [20] J.C. Fleet, Rapid, membrane-initiated actions of 1,25 dihydroxyvitamin D: what are they and what do they mean? *J. Nutr.* 134 (12) (2004) 3215–3218.
- [21] E. Falkenstein, H.C. Tillmann, M. Christ, M. Feuring, M. Wehling, Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects, *Pharm. Rev.* 52 (4) (2000) 513–556.
- [22] J.N. Flanagan, L. Wang, V. Tangpricha, J. Reichrath, T.C. Chen, M.F. Holick, Regulation of the 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase gene and its splice variant, *Recent Results Cancer Res.* 164 (2003) 157–167.
- [23] M. Hewison, D. Zehnder, R. Bland, P.M. Stewart, 1 α -Hydroxylase and the action of Vitamin D, *J. Mol. Endocrinol.* 25 (2) (2000) 141–148.
- [24] J.A. Huhtakangas, C.J. Olivera, J.E. Bishop, L.P. Zanello, A.W. Norman, The Vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma

- membranes and binds 1 α ,25(OH)₂-Vitamin D₃ in vivo and in vitro, *Mol. Endocrinol.* 18 (11) (2004) 2660–2671.
- [25] M. Huening, G. Yehia, C.A. Molina, S. Christakos, Evidence for a regulatory role of inducible cAMP early repressor in protein kinase a-mediated enhancement of Vitamin D receptor expression and modulation of hormone action, *Mol. Endocrinol.* 16 (9) (2002) 2052–2064.
- [26] R. Ebert, M. Jovanovic, M. Ulmer, D. Schneider, J. Meissner-Weigl, J. Adamski, F. Jakob, Down-regulation by nuclear factor kappaB of human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase promoter, *Mol. Endocrinol.* 18 (10) (2004) 2440–2450.
- [27] E. Serkkola, M. Hurme, Activation of NF-kappa B by cAMP in human myeloid cells, *FEBS Lett.* 334 (3) (1993) 327–330.
- [28] H.J. Armbrecht, T.L. Hodam, M.A. Boltz, N.C. Partridge, A.J. Brown, V.B. Kumar, Induction of the Vitamin D 24-hydroxylase (CYP24) by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is regulated by parathyroid hormone in UMR106 osteoblastic cells, *Endocrinology* 139 (8) (1998) 3375–3381.
- [29] C. Zierold, H.M. Darwish, H.F. DeLuca, Identification of a Vitamin D-response element in the rat calcidiol (25-hydroxyvitamin D₃) 24-hydroxylase gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (3) (1994) 900–902.
- [30] K.S. Chen, H.F. DeLuca, Cloning of the human 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase gene promoter and identification of two Vitamin D-responsive elements, *Biochim. Biophys. Acta* 1263 (1) (1995) 1–9.
- [31] W. Yang, P.A. Friedman, R. Kumar, J.L. Omdahl, B.K. May, M.L. Siu-Caldera, G.S. Reddy, S. Christakos, Expression of 25(OH)D₃ 24-hydroxylase in distal nephron: coordinate regulation by 1,25(OH)₂D₃ and cAMP or PTH, *Am. J. Physiol.* 276 (4 Pt 1) (1999) E793–E805.
- [32] A.V. Krishnan, D. Feldman, Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate up-regulates 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor gene expression and enhances hormone action, *Mol. Endocrinol.* 6 (2) (1992) 198–206.
- [33] P. Dhawan, X. Peng, A.L. Sutton, P.N. MacDonald, C.M. Croniger, C. Trautwein, M. Centrella, T.L. McCarthy, S. Christakos, Functional cooperation between CCAAT/enhancer-binding proteins and the Vitamin D receptor in regulation of 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase, *Mol. Cell. Biol.* 25 (1) (2005) 472–487.
- [34] A.M. Bamberger, A. Makrigiannakis, M. Schroder, C.M. Bamberger, C. Relakis, B. Gellersen, K. Milde-Langosch, T. Loning, Expression pattern of the CCAAT/enhancer-binding proteins C/EBP-alpha, C/EBP-beta and C/EBP-delta in the human placenta, *Virchows. Arch.* 444 (2) (2004) 149–152.
- [35] J. Lafond, D. Auger, J. Fortier, M.G. Brunette, Parathyroid hormone receptor in human placental syncytiotrophoblast brush border and basal plasma membranes, *Endocrinology* 123 (6) (1988) 2834–2840.
- [36] J. Lafond, L. Simoneau, R. Savard, D. Lajeunesse, Calcitonin receptor in human placental syncytiotrophoblast brush border and basal plasma membranes, *Mol. Cell. Endocrinol.* 99 (2) (1994) 285–292.

Metabolism of vitamin D in the human choriocarcinoma cell line JEG-3

Euclides Avila^a, Lorenza Díaz^{a,*}, David Barrera^a,
Celeste Arranz^b, Ali Halhali^a, Fernando Larrea^a

^a Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14000, Mexico, D.F., Mexico

^b Instituto Nacional de Endocrinología, Hospital Comandante “Manuel Fajardo”, Zapata y D, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba

Abstract

Calcitriol is an antiproliferative prodifferentiating secosteroid that exerts a protective role for some kinds of cancer. Alterations in 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase (CYP27B1) activity have been found in some tumor cells, but there are no studies performed in human choriocarcinoma. In the present work, calcitriol production and CYP27B1 gene regulation were studied in the human choriocarcinoma cell line JEG-3, and compared with normal human syncytiotrophoblasts (hS) in culture. In JEG-3 cells, secretion of [³H]calcitriol was significantly less ($P < 0.001$) than in hS (45 ± 17 fmol/mg protein versus 174 ± 87 fmol/mg protein, respectively; $n = 8$). CYP27B1 mRNA was similar in both JEG-3 and hS cells; but the protein was detected only in hS extracts. In contrast to the hS, JEG-3 CYP27B1 gene expression was not regulated by calcitriol or by a cAMP analogue. Our results indicate that in JEG-3 cells calcitriol production is diminished due to CYP27B1 dysregulation and low protein content, and suggest that hyperproliferation could be a consequence of these alterations.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Trophoblast; Placenta; CYP27B1; Calcitriol; cAMP; Cancer

1. Introduction

Vitamin D₃ derived from 7-dehydrocholesterol is activated to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃ or calcitriol) after two successive hydroxylations in the liver and kidney [1]. The rate-limiting step for calcitriol production is the 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase (1 α -hydroxylase, CYP27B1). Most of calcitriol effects are mediated by the vitamin D receptor (VDR), regulating the expression of genes whose promoters contain specific vitamin D response elements (VDREs). During gestation, placenta is an important extrarenal source of calcitriol [2,3]. Human syncytiotrophoblasts (hS) synthesize calcitriol from 25-hydroxyvitamin D₃ [4], and express CYP27B1 and VDR [5]. The rates of extrarenal calcitriol synthesis and degrada-

tion are under the control of local factors, which optimize the levels of the secosteroid for cell-specific actions. Consequently, the regulation of extrarenal CYP27B1 may be different from that of the renal enzyme [1]. In the normal trophoblast, calcitriol production is inhibited by cAMP and is produced in a lesser amount as the cell differentiates into syncytium [5]. Extrarenal calcitriol seems to accomplish autocrine/paracrine functions; however, little is known about the actions of this hormone in the placenta [2], and nothing is known about how placental calcitriol production is affected in the malignant transformation of the trophoblast. In the present work we studied calcitriol production and CYP27B1 abundance in choriocarcinoma cells and results were compared with normal hS. Additionally, the effects of calcitriol and cAMP upon CYP27B1 expression in the human choriocarcinoma cell line JEG-3 were also studied. The results of this study will help to understand the biological function of locally produced calcitriol, including the role of vitamin D metabolism under normal and pathological conditions.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 55 73 11 60;
fax: +52 55 56 55 98 59.

E-mail address: lorenzadiaz@gmail.com (L. Díaz).

2. Material and methods

2.1. Cell culture

This study was approved by the Institutional Human Ethical Committee. The human choriocarcinoma JEG-3 cell line was from the American Type Culture Collection (Rockville, MD) and cells were cultured in supplemented medium [Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen, Grand Island, NY), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml anfotericin B] containing 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). Normal human trophoblasts were cultured as previously described [4,6]. Briefly, villous tissue from term placentas was enzymatically dispersed and cells were separated on density Percoll gradients. Trophoblasts were plated at a density of 8×10^5 cells/ml in supplemented medium with 20% FBS; in humidified 5% CO₂–95% air at 37 °C. Culture viability was evaluated by radioimmunoassayable hCG in culture media in the presence or absence of 8-bromoadenosine 3′/5′-cAMP (8-Br-cAMP, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO). Total protein content was determined by the method of Bradford [7] and results were expressed as IU/mg protein.

2.2. CYP27B1 activity in JEG-3 cells and cultured human syncytiotrophoblasts

Confluent JEG-3 cells and 48 h hS were incubated in serum-free D-MEM/F12 in the presence of 3 nM 25-hydroxy-[26,27-methyl-³H]cholecalciferol ([³H]25OHD₃; specific activity: 30 Ci/mmol, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) during 60 min. After incubation, dried lipidic extracts were dissolved in chromatographic phase containing unlabeled 1,25(OH)₂D₃ (Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) and [³H]25OHD₃ metabolites were separated by HPLC (Model 1100, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) using a Zorbax SIL column (4.6 mm × 250 mm, 5 µm) as previously described [4,6]. Enzymatic activity was calculated by estimating the percentage of conversion of [³H]25OHD₃ into putative [³H]1,25-(OH)₂D₃. Results were expressed as fmol/mg protein.

2.3. RT-PCR and Southern blots

cDNA was prepared from total cellular RNA and the following primers were used for PCR amplifications: CYP27B1: 5′-ACCAGATGTTTGCATTTGCTC-3′ and 5′-GGACGAAAAGAATTTGGCTCT-3′. The 517-bp CYP27B1 RT-PCR products were separated in agarose gels, blotted onto nylon membranes and hybridized with [³²P]-dCTP probes as previously described [5]. Normalization was done by parallel amplifications of the housekeeping gene cyclophilin.

2.4. Western blotting

Cells were homogenized at 4 °C in RIPA buffer (PBS, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, protease inhibitors). Aliquots of 75 µg of protein were separated on 10% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane by electroblotting. Final antibody dilutions were: sheep anti-murine CYP27B1 1:500 (The Binding Site, Birmingham, UK); and rabbit anti-sheep-horseradish peroxidase 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Immunocomplexes were visualized with 3,3′-diaminobenzidine and hydrogen peroxide.

2.5. Statistical analysis

Statistical significance among comparisons was established using Student's *t* test. A *P* value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Morphological and functional evaluation of cultured cells

Cultured Percoll-purified human cytotrophoblasts aggregated and formed syncytia in a time dependent manner. The presence of 8-Br-cAMP increased significantly the content of hCG in the culture media. Control cells grown in the absence of 8-Br-cAMP secreted less hCG; however, a progressive and spontaneous increase was observed during the cytodifferentiation process (Fig. 1). JEG-3 cells also secreted hCG to the culture media (data not shown).

3.2. Comparison of CYP27B1 activity in JEG-3 cells and hS

Lipidic extracts analysis from JEG-3 and hS cultures by HPLC showed the presence of a radioactive polar metabolite that co-eluted as a single peak with authentic unlabeled

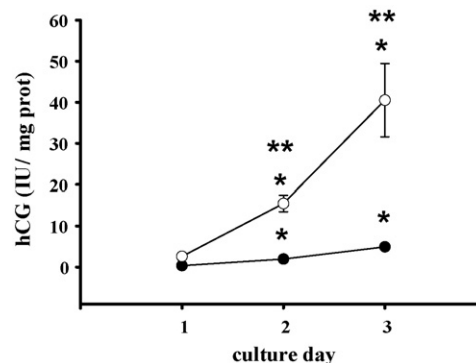


Fig. 1. Temporal pattern of hCG secretion by cultured hS. Mononuclear cells were incubated for 3 days in the absence (closed circles) or presence (open circles) of 8-Br-cAMP (1.5 mM). hCG in culture media was measured daily and data are presented as the mean \pm S.D. of three cultures. **P* < 0.001 vs. day 1; ***P* < 0.005 vs. control.

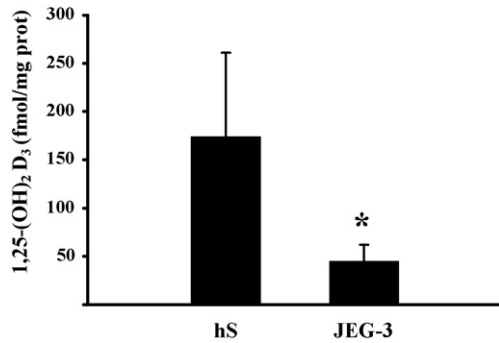


Fig. 2. Enzymatic activity of CYP27B1 in hS and in JEG-3. Cells in serum-free D-MEM/F-12 were incubated in the presence of 3 nM [³H]25OHD₃ during 1 h. Bars represent the mean ± S.D. of eight different cell cultures. **P* < 0.05 vs. hS.

beled calcitriol. In JEG-3, bioconversion of [³H]25OHD₃ into [³H]1,25-(OH)₂D₃ was significantly less (*P* < 0.05) than in normal hS cells (45 ± 17 fmol/mg protein versus 174 ± 87 fmol/mg protein, respectively; *n* = 8) (Fig. 2).

3.3. Expression of CYP27B1 in JEG-3 cells and hS

Considering the former results, we speculated that CYP27B1 expression could be altered in JEG-3 cells. Therefore, CYP27B1 abundance and mRNA were investigated. Immunoreactive CYP27B1 enzyme was detected in hS homogenates but not in JEG-3 extracts (Fig. 3A). CYP27B1 mRNA was expressed in both kinds of cells, but more strongly in JEG-3 (Fig. 3B).

3.4. Effects of 8-Br-cAMP and calcitriol on CYP27B1 gene expression

As previously shown by our group, CYP27B1 gene expression in normal hS is down-regulated by 8-Br-cAMP;

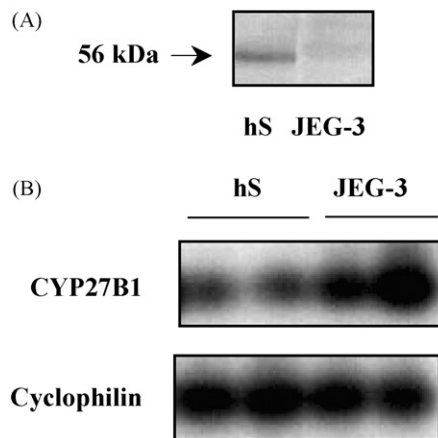


Fig. 3. CYP27B1 expression in hS and in JEG-3. Confluent JEG-3 and 48 h cultured hS were lysed with RIPA buffer for Western blot (A) or used for RNA extraction and RT-PCR analysis (B). (A) Shows representative results from three different experiments. (B) Shows duplicate experiments for each cell type.

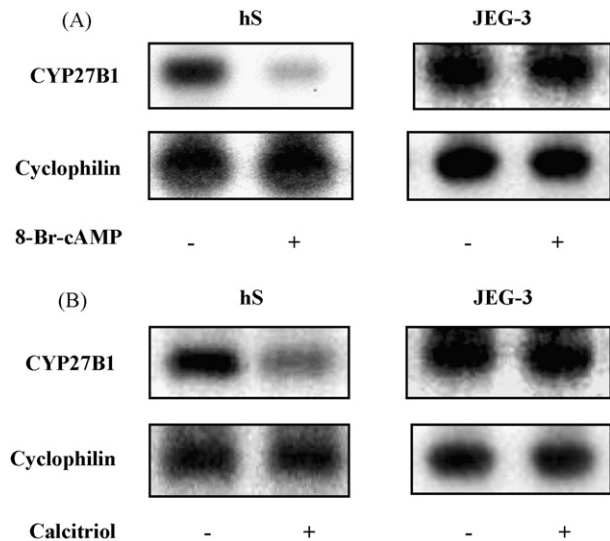


Fig. 4. Effects of 8-Br-cAMP (A) and calcitriol (B) on CYP27B1 gene expression in hS and JEG-3. Total RNA was obtained from cells treated during 18 h in the presence of 8-Br-cAMP (1.5 mM) or calcitriol (1×10^{-8} M) and subjected to RT-PCR and Southern blot. RT-PCR products were hybridized with CYP27B1 or cyclophilin [³²P]-labeled probes. Figure shows a representative result from three experiments.

therefore, the effects of the cyclic nucleotide analog in JEG-3 cells were investigated. As depicted in Fig. 4, basal CYP27B1 gene expression was detected in both kinds of cells. In contrast to normal hS cells, addition of 8-Br-cAMP did not affect CYP27B1 gene expression in JEG-3 cells (Fig. 4A). Similar results upon gene transcription were obtained when cells were incubated in the presence of calcitriol (Fig. 4B).

4. Discussion

Local calcitriol inhibits proliferation and promotes cell differentiation, exerting a protective effect against different cancer types [8]. Studies in cells of the monocyte-macrophage lineage have demonstrated that calcitriol induced the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 [9], and that this induction arrests growth [10]. In kidney cells [11], osteoblasts [12], and the monocytic cell line HL60 [13], calcitriol induced C/EBP β expression, a transcription factor identified as a potent suppressor of the oncogenic-cyclin D1 in human epithelial tumors [14]. In addition, studies in prostate cancer cells have shown a marked decrease in CYP27B1 activity compared with normal prostatic cells [15]. In the present study we found very low CYP27B1 activity in JEG-3 cells, which was explained by the absence of immunoreactive CYP27B1. This finding could reside at the translational level or be due to increased protein turnover. In this regard, abnormal translational regulation of 1 α -hydroxylase has been described in kidney of hyp-mouse, a murine model of human X-linked hypophosphatemia [16].

Trophoblast invasion share common biochemical mechanisms with those of cancer; however, normal invasion of the

endometrium is strictly regulated by autocrine and paracrine factors derived from the decidua and the trophoblast itself [17]. We believe that locally produced calcitriol could be an important cell growth regulatory factor in the placenta, and changes in its synthesis and metabolism may alter cell proliferation as in the case of cancer cells [1]. Indeed, in this study both expression and regulation of CYP27B1 by cAMP and calcitriol were altered in JEG-3 cells. Full characterization of the molecular mechanism underlying CYP27B1 regulation by cAMP and calcitriol remained elusive for some time. Recently, Murayama et al., described the mechanism by which calcitriol and parathyroid hormone regulate CYP27B1 gene expression in normal kidney cells [18]. CYP27B1 promoter has an atypical VDRE, which drives calcitriol-induced transrepression or cAMP-stimulation, by coupling to the VDR interacting repressor. The presence of liganded-VDR is mandatory for CYP27B1 repression. In as much as VDR functionality and expression have been demonstrated in JEG-3 [11,19], our results of a CYP27B1 dysregulation in these cells could be better explained on the basis of an abnormal promoter activity as suggested by Chen et al. [20]. These authors reported a marked decrease in 1α -hydroxylase activity in cultured prostate cancer cells, a defect that resulted from decreased promoter activity.

Additionally, cAMP response elements in CYP27B1 promoter have been described [21]. As previously shown by our group [5], incubations of hS in the presence of 8-Br-cAMP resulted in CYP27B1 inhibition, an effect that was not observed in the present study in the case of JEG-3 cells, which might probably be explained by specific availability of nuclear CYP27B1 transcriptional modulators. Further support to this concept was derived from the observation that 8-Br-cAMP increased hCG in culture media from JEG-3 cultures (data not shown).

Finally, the fact that no immunoreactive CYP27B1 was found in JEG-3 cells could be explained by posttranscriptional abnormalities such as aberrant mRNA translation, enhanced protein degradation, or deranged posttranslational modifications, resulting in low calcitriol production. Indeed, further studies are needed in order to understand the causes of CYP27B1 dysregulation and the mechanism underlying the altered CYP27B1 translational process.

In summary, the results presented in this study clearly point out that in JEG-3, as in other cancer cell lines, the local vitamin D metabolism is abnormal, which suggest that hyperproliferation could be a consequence of these alterations.

Acknowledgments

We acknowledge with thanks to Dr. A. Perrin from Hoffmann-La Roche Ltd (Basel, Switzerland) for the donation of authentic $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ used in this study.

This work was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México).

References

- [1] A.S. Dusso, A.J. Brown, E. Slatopolsky, Vitamin D, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 289 (1) (2005) F8–F28.
- [2] L. Diaz, C. Carino, I. Mendez, Vitamin D: implications for health and pregnancy, *Rev. Invest. Clin.* 53 (1) (2001) 77–85.
- [3] K.N. Evans, J.N. Bulmer, M.D. Kilby, M. Hewison, Vitamin D and placental-decidual function, *J. Soc. Gynecol. Invest.* 11 (5) (2004) 263–271.
- [4] L. Diaz, I. Sanchez, E. Avila, A. Halhali, F. Vilchis, F. Larrea, Identification of a 25-hydroxyvitamin D₃ 1alpha-hydroxylase gene transcription product in cultures of human syncytiotrophoblast cells, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (7) (2000) 2543–2549.
- [5] E. Avila, L. Diaz, A. Halhali, F. Larrea, Regulation of 25-hydroxyvitamin D₃ 1alpha-hydroxylase, 1,25-dihydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression by 8-bromo cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblast cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 89–90 (1–5) (2004) 115–119.
- [6] L. Diaz, C. Arranz, E. Avila, A. Halhali, F. Vilchis, F. Larrea, Expression and activity of 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase are restricted in cultures of human syncytiotrophoblast cells from preeclamptic pregnancies, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (8) (2002) 3876–3882.
- [7] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [8] K. Townsend, K.N. Evans, M.J. Campbell, K.W. Colston, J.S. Adams, M. Hewison, Biological actions of extra-renal 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase and implications for chemoprevention and treatment, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 97 (1–2) (2005) 103–109.
- [9] M. Liu, M.H. Lee, M. Cohen, M. Bommakanti, L.P. Freedman, Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D₃ leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937, *Genes Dev.* 10 (2) (1996) 142–153.
- [10] N.Y. Rots, A. Iavarone, V. Bromleigh, L.P. Freedman, Induced differentiation of U937 cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ involves cell cycle arrest in G1 that is preceded by a transient proliferative burst and an increase in cyclin expression, *Blood* 93 (8) (1999) 2721–2729.
- [11] P. Dhawan, X. Peng, A.L. Sutton, P.N. MacDonald, C.M. Croniger, C. Trautwein, M. Centrella, T.L. McCarthy, S. Christakos, Functional cooperation between CCAAT/enhancer-binding proteins and the vitamin D receptor in regulation of 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase, *Mol. Cell. Biol.* 25 (1) (2005) 472–487.
- [12] S. Gutierrez, A. Javed, D.K. Tennant, M. van Rees, M. Montecino, G.S. Stein, J.L. Stein, J.B. Lian, CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) beta and delta activate osteocalcin gene transcription and synergize with Runx2 at the C/EBP element to regulate bone-specific expression, *J. Biol. Chem.* 277 (2) (2002) 1316–1323.
- [13] Y. Ji, G.P. Studzinski, Retinoblastoma protein and CCAAT/enhancer-binding protein beta are required for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced monocytic differentiation of HL60 cells, *Cancer Res.* 64 (1) (2004) 370–377.
- [14] J. Lamb, S. Ramaswamy, H.L. Ford, B. Contreras, R.V. Martinez, F.S. Kittrell, C.A. Zahnow, N. Patterson, T.R. Golub, M.E. Ewen, A mechanism of cyclin D1 action encoded in the patterns of gene expression in human cancer, *Cell* 114 (3) (2003) 323–334.
- [15] G.G. Schwartz, L.W. Whitlatch, T.C. Chen, B.L. Lokeshwar, M.F. Holick, Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D₃ from 25-hydroxyvitamin D₃, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7 (5) (1998) 391–395.
- [16] B. Yuan, Y. Xing, R.L. Horst, M.K. Drezner, Evidence for abnormal translational regulation of renal 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase activity in the hyp-mouse, *Endocrinology* 145 (8) (2004) 3804–3812.
- [17] J. Pollheimer, M. Knofler, Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review, *Placenta* 26 (Suppl. A) (2005) S21–S30.

- [18] A. Murayama, M.S. Kim, J. Yanagisawa, K. Takeyama, S. Kato, Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching, *EMBO J.* 23 (7) (2004) 1598–1608.
- [19] M. Huening, G. Yehia, C.A. Molina, S. Christakos, Evidence for a regulatory role of inducible cAMP early repressor in protein kinase a-mediated enhancement of vitamin D receptor expression and modulation of hormone action, *Mol. Endocrinol.* 16 (9) (2002) 2052–2064.
- [20] T.C. Chen, L. Wang, L.W. Whitlatch, J.N. Flanagan, M.F. Holick, Prostatic 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase and its implication in prostate cancer, *J. Cell. Biochem.* 88 (2) (2003) 315–322.
- [21] X.F. Kong, X.H. Zhu, Y.L. Pei, D.M. Jackson, M.F. Holick, Molecular cloning, characterization, and promoter analysis of the human 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (12) (1999) 6988–6993.

Acciones calciotrópicas de la hormona paratiroidea y del sistema endocrino de la vitamina D

Euclides Avila,* David Barrera,* Lorenza Díaz*

* Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Calcitropic actions of parathyroid hormone and vitamin D-endocrine system

RESUMEN

ABSTRACT

Parathyroid hormone (PTH) and 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25-(OH)₂D] participate in systemic regulation of calcium homeostasis through endocrine effects mediated via the specific receptors PTHR1 and VDR, expressed in bone, kidney, intestine and parathyroid glands. In bone, both hormones PTH and 1,25-(OH)₂D promote calcium release into the circulation; however, they also have anabolic effects in this tissue. In kidney, PTH controls 1,25-(OH)₂D synthesis, and together both hormones stimulate calcium reabsorption. The most important calcitropic action of 1,25-(OH)₂D is stimulation of intestinal calcium absorption. In the parathyroid glands, 1,25-(OH)₂D regulates PTH synthesis through a negative feedback mechanism, while modulating the gland growth. Finally, a general overview of the maternal adaptations regarding calcium homeostasis during pregnancy and lactation is presented.

Key words. Intestine. Bone. Kidney. Parathyroid gland. VDR. Calcium. Calcitriol. Pregnancy. Lactation.

La hormona paratiroidea (PTH) y la 1,25-dihidroxitamina D [1,25-(OH)₂D] participan en la regulación sistémica de la homeostasis del calcio mediante efectos endocrinos secundarios a la unión a sus respectivos receptores PTHR1 y VDR en el hueso, el riñón, el intestino y las glándulas paratiroides. En el hueso, ambas hormonas favorecen la liberación de calcio a la circulación; sin embargo, también pueden ejercer efectos anabólicos. En el riñón, la PTH controla la producción de 1,25-(OH)₂D y ambas hormonas incrementan la reabsorción de calcio mediante la regulación de la actividad y la síntesis de la maquinaria de transporte de calcio en los túbulos distales. La principal acción calciotrópica de la 1,25-(OH)₂D es la estimulación de la absorción de calcio en el intestino delgado. En las glándulas paratiroides, la 1,25-(OH)₂D controla la síntesis de la PTH mediante un mecanismo de retroalimentación negativa y funciona como un factor regulador del crecimiento de las glándulas. Finalmente, se presenta un panorama general de las adaptaciones del organismo materno en la homeostasis del calcio durante el embarazo y la lactancia.

Palabras clave. Intestino. Hueso. Riñón. Glándulas paratiroides. VDR. Calcio. Calcitriol. Embarazo. Lactancia.

INTRODUCCIÓN

El calcio es un elemento de gran importancia en la fisiología humana. Este elemento representa el 52% del contenido mineral corporal y es el nutriente inorgánico más abundante en el organismo. En promedio, el ser humano contiene 1 kg de calcio, del cual 99% está depositado como hidroxapatita en la fase mineral del hueso. El 1% restante se encuentra en el fluido extracelular y en reservas intracelulares. En la sangre, la concentración de calcio total oscila entre 9 y 11 mg/dL, de los cuales el 47.5% se encuentra en forma iónica, 46% se fija a proteínas y el resto circula como diversos complejos de calcio. El

calcio iónico representa la forma biológicamente activa y constituye la fracción de calcio ultrafiltrable. Dentro de las células, la gran mayoría del calcio se encuentra almacenado en las mitocondrias y en los retículos endoplásmico y sarcoplásmico.

El mantenimiento de la concentración normal de calcio en la sangre es crucial para el organismo, ya que sus desviaciones están asociadas a problemas de salud. El ajuste de la calcemia se lleva a cabo por flujos frecuentes de calcio entre la sangre y otros compartimientos corporales como el hueso, que funciona como un gran reservorio de calcio; el riñón, donde se efectúa la reabsorción del calcio, y el intestino delgado, donde el calcio dietario se absorbe

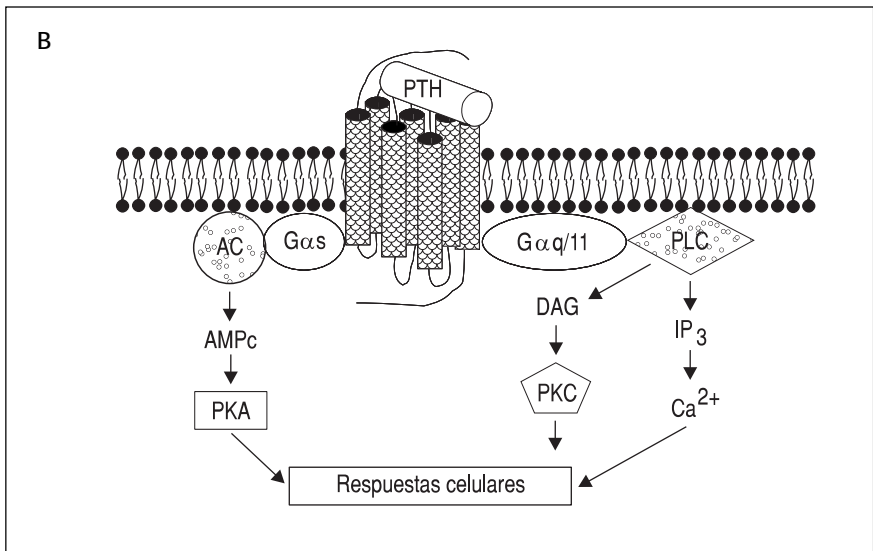
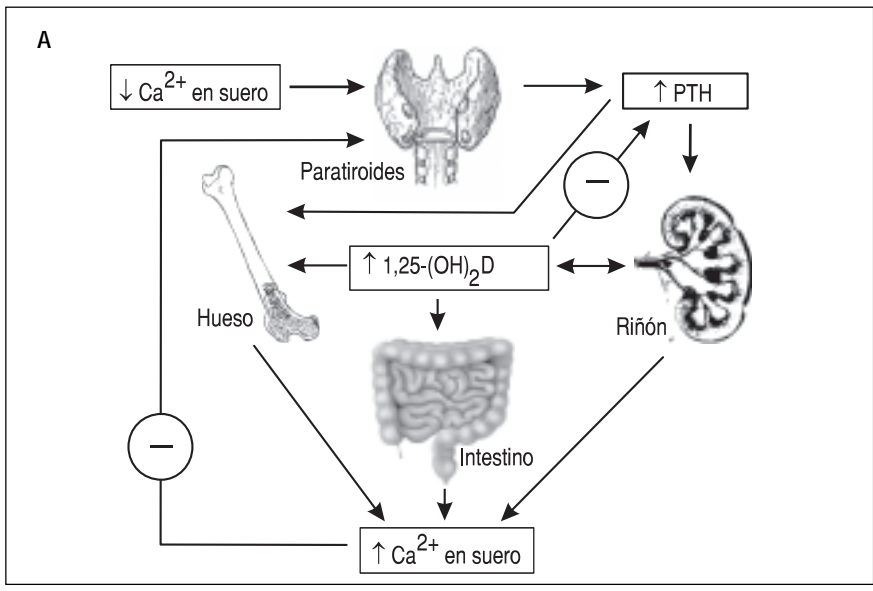


Figura 1. La PTH y el sistema endocrino de la vitamina D en la homeostasis del calcio.

A. Las glándulas paratiroides responden a la baja concentración de calcio en la sangre secretando PTH. Esta hormona estimula la resorción ósea, la reabsorción tubular de calcio y la síntesis de 1,25-(OH)₂D. La principal función endocrina de la 1,25-(OH)₂D es el incremento de la absorción intestinal de calcio. Además, la 1,25-(OH)₂D también favorece la movilización de Ca²⁺ del hueso y estimula la reabsorción de Ca²⁺ en el riñón. Todos estos mecanismos restauran la concentración de calcio en la circulación.

B. Principales vías de señalización del PTHR1. En ciertos tejidos, el PTHR1 activado estimula solamente a la adenilato ciclasa (AC), efecto mediado por la proteína G estimuladora, Gαs, resultando en la formación de AMP cíclico, la activación de la PKA y la estimulación de otros efectores que conducen a las principales respuestas celulares que controlan la homeostasis del calcio. En otras células, la PTH están mediadas por la fosfolipasa C (PLC) posterior a la activación de la proteína Gαq/11. La activación de la PLC resulta en la formación de diacilglicerol (DAG) y 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃); segundos mensajeros que permiten la activación de la PKC, la liberación de Ca²⁺ de reservas intracelulares y finalmente respuestas celulares.

(Figura 1A). La ingestión diaria promedio de calcio es de 1 g; sin embargo, puesto que el calcio se absorbe pobremente, sólo el 35% (350 mg/día) se encuentra biodisponible y el calcio restante es eliminado con las heces. Tomando en cuenta lo anterior, el 23% (230 mg/día) del calcio consumido diariamente se excreta en la orina.¹

Las variaciones de la función intestinal, ósea y renal necesarias para la homeostasis del calcio son controladas por los efectos concertados de la hormona paratiroidea (PTH) y la 1,25-dihidroxitamina D [1,25-(OH)₂D], el metabolito activo de la vitamina D. La calcitonina contribuye de manera importante en la homeostasis del calcio únicamente en la lactancia.² En términos generales, la PTH es

la hormona involucrada en la regulación minuto a minuto del calcio ionizado en el fluido extracelular mientras que la 1,25-(OH)₂D controla el balance del calcio en el organismo día a día.³ Los efectos biológicos de la 1,25-(OH)₂D son el resultado de la acción coordinada de proteínas transportadoras, hidroxilasas mitocondriales, receptores nucleares y proteínas efectoras en distintos órganos que conforman el sistema endocrino de la vitamina D.⁴ Esta revisión se enfoca en el conocimiento reciente de los efectos de la PTH y la 1,25-(OH)₂D en los órganos clásicos que participan en la homeostasis del calcio. Adicionalmente, se presentan las adaptaciones del metabolismo del calcio durante el embarazo y la lactancia.

LA PTH

En los mamíferos, la PTH es el regulador más importante de la homeostasis del calcio.³ La PTH se produce en las glándulas paratiroides como una pre-pro-hormona de 115 aminoácidos. En el retículo endoplásmico se eliminan los 25 aminoácidos del extremo amino terminal y la pro-PTH resultante se transfiere al aparato de Golgi, lugar donde endopeptidasas hidrolizan el hexapéptido remanente de la prosequencia. La PTH madura de 84 aminoácidos PTH(1-84) se empaqueta en gránulos de secreción que pueden ser de dos tipos: aquellos que contienen solamente a la PTH(1-84) y otros que incluyen a las catepsinas B y H junto con la PTH(1-84).⁵ El metabolismo y la secreción de la PTH a la circulación depende de la concentración extracelular de calcio ionizado, la cual es monitoreada permanentemente por el receptor sensor de calcio localizado en las glándulas paratiroides.⁶ Cuando la concentración de calcio es baja, el receptor sensor de calcio permite la síntesis y la liberación de la PTH(1-84).⁷ En cambio, con alta concentración de calcio se activa el receptor sensor de calcio, lo cual favorece la liberación de calcio de las reservas intracelulares y se inhibe la secreción de la PTH(1-84). Asimismo, la alta concentración intracelular de calcio activa a las catepsinas presentes en los gránulos de secreción, las cuales hidrolizan el extremo amino terminal de la PTH(1-84).⁵ Es claro entonces que los cambios en la concentración extracelular de calcio no sólo regulan la secreción de la PTH(1-84) por las glándulas paratiroides, sino que también modulan la abundancia relativa de varias formas moleculares de la PTH en la circulación.

Las acciones calciotrópicas de la PTH(1-84), así como las del péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP), están mediadas por la activación de un receptor común de 7 dominios transmembrana acoplado a proteínas G llamado PTHR1.⁸ El PTHrP es un factor paracrino que tiene importantes papeles fisiológicos que incluyen la morfogénesis del tejido mamario, la regulación del metabolismo óseo y el transporte de calcio desde la circulación materna hacia el feto y hacia la leche durante la lactancia.⁵ El PTHrP comparte similitud en su secuencia de aminoácidos con el dominio amino terminal de la PTH(1-84), el cual es el responsable de la homeostasis del calcio.⁸ En efecto, el PTHrP, la PTH(1-84) y el análogo sintético PTH(1-34) son capaces de unirse con alta afinidad al PTHR1. El PTHR1 activado por la PTH(1-84) utiliza distintas vías de señalización intracelular; sin embargo, las

acciones calciotrópicas más relevantes se llevan a cabo a través de la generación de AMP cíclico y la activación de la proteína cinasa A (PKA) (Figura 1B).⁵ Algunos fragmentos proteolíticos del extremo amino de la PTH(1-84) como la PTH(7-84), impiden la formación de AMP cíclico y favorecen la internalización del PTHR1, resultando en la atenuación de los efectos calciotrópicos de la PTH(1-84).⁹ Estas observaciones son interesantes dado que los fragmentos PTH(7-84) circulan en la sangre periférica y se incrementan en las enfermedades terminales del riñón, lo cual podría explicar la resistencia a la PTH en la falla renal a través de la internalización y actividad deficiente del receptor PTHR1.⁵

El papel central del PTHR1 en la homeostasis del calcio se ilustra por algunas patologías que perturbaban la función normal de este receptor. Entre ellas destacan la condrodisplasia letal tipo Blomstrand y la condrodisplasia metafisaria tipo Jansen, ocasionadas por inactivación o activación permanente del PTHR1, respectivamente.⁸ Es por ello factible que ciertas patologías asociadas con trastornos de la homeostasis del calcio y del esqueleto sean tratadas con intervenciones farmacológicas dirigidas hacia el PTHR1. A este respecto, la activación pulsátil del PTHR1 debido a la administración intermitente de PTH(1-34) tiene efectos benéficos en la osteoporosis debido a acciones anabólicas en el hueso.¹⁰ Por otra parte, el hiperparatiroidismo y la hipercalcemia humoral maligna ocasionada por la elevada secreción de PTHrP, podrían ser tratados eficazmente con antagonistas o agonistas inversos del PTHR1.⁸

La estimulación del PTHR1 por la PTH pone en marcha varias acciones encaminadas a normalizar la calcemia, tales como: 1) mayor resorción ósea, 2) mayor reabsorción renal y 3) mayor absorción intestinal de calcio. Además, en el riñón la PTH regula la expresión de la 25-hidroxivitamina D 1 α -hidroxilasa (1 α -hidroxilasa), la enzima crítica de la síntesis de la 1,25-(OH)₂D.¹¹

EL SISTEMA ENDOCRINO DE LA VITAMINA D

El término vitamina D se usa para describir colectivamente al ergocalciferol (vitamina D₂) y al colecalciferol (vitamina D₃). La vitamina D₂ se obtiene de la dieta, mientras que la principal fuente de vitamina D₃ es la fotosíntesis endógena a partir del 7-dehidrocolesterol. Ambas formas de la vitamina D son biológicamente inertes y requieren de procesos metabólicos en el hígado y el riñón para convertirse

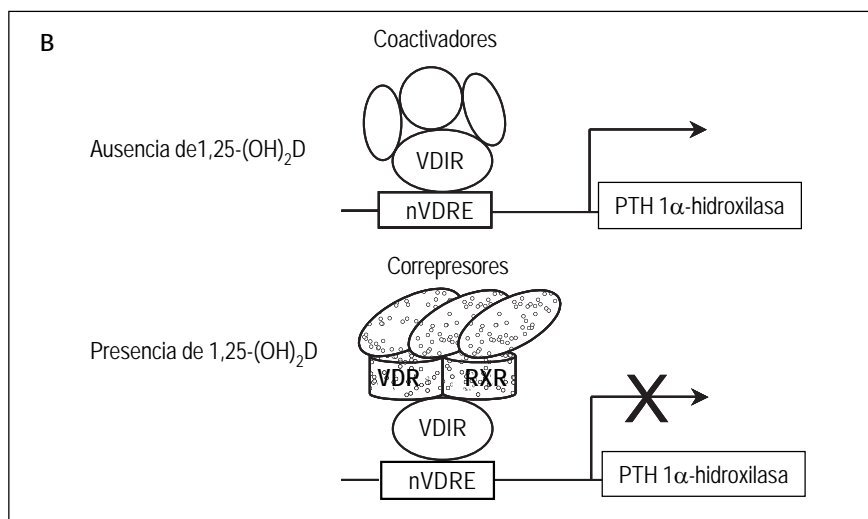
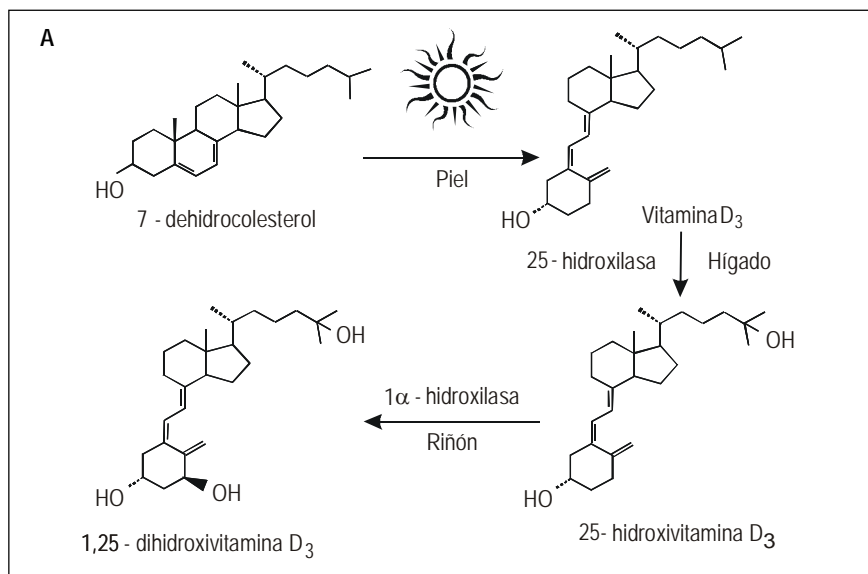


Figura 2. Síntesis de 1,25-(OH)₂D₃. **A.** Por efecto de la luz solar, el 7-dehidrocolesterol presente en la piel se transforma en vitamina D₃. En el hígado, la 25-hidroxilasa convierte a la vitamina D₃ en 25-hidroxivitamina D₃, el metabolito de la vitamina D más abundante en la circulación. La activación final ocurre en el riñón, donde la 1α-hidroxilasa sintetiza la 1,25-(OH)₂D₃, el metabolito con actividad hormonal. **B.** Mecanismo de represión de la síntesis de la 1α-hidroxilasa y de la PTH por la 1,25-(OH)₂D. Los promotores de los genes de la 1α-hidroxilasa y la PTH contienen elementos de respuesta negativos para la 1,25-(OH)₂D (nVDRE), a los cuales se une el factor llamado VDIR. En ausencia de 1,25-(OH)₂D el VDIR recluta a proteínas coactivadoras que facilitan el inicio de la transcripción. En presencia de 1,25-(OH)₂D, este secosteroide se une a su receptor, el cual en forma dimérica con el RXR se acopla con VDIR y los coactivadores son desplazados. En su lugar se reclutan una serie de correpresores que bloquean la transcripción de ambos genes.

en moléculas bioactivas (Figura 2A). La vitamina D es llevada al hígado por la proteína transportadora de vitamina D (DBP), donde se hidroxila enzimáticamente en la posición 25 y se forma 25-hidroxivitamina D (25OHD), el metabolito de la vitamina D más abundante en la circulación y cuya concentración oscila entre 10 y 50 ng/mL.¹ La 25OHD es transportada al riñón por la DBP y en los túbulos proximales el complejo 25OHD-DBP es reconocido por un receptor membranar inespecífico llamado megalina, la cual favorece la endocitosis del complejo.¹² Una vez dentro de las células, la DBP se degrada en los lisosomas y la 25OHD entra en las mitocondrias donde es convertido a 1,25-(OH)₂D por la 1α-hidroxilasa. La 1,25-(OH)₂D circula en la sangre en concentraciones que oscilan entre 15-60 pg/mL.¹¹ Se considera

que la 1,25-(OH)₂D es la forma hormonal activa de la vitamina D¹³ en virtud de que se une al receptor de la vitamina D (VDR) con alta afinidad (Kd = 1 x 10⁻¹⁰ M) en comparación con las menores afinidades de unión de otros metabolitos de la vitamina D; y debido a que la 1,25-(OH)₂D se encuentra libre en contraste con su precursor, que se encuentra casi totalmente secuestrado por la DBP.¹³

Por otra parte, el VDR es un factor de transcripción dependiente de la 1,25-(OH)₂D que pertenece a la superfamilia de receptores para hormonas esteroideas.¹³ El VDR es un regulador transcripcional que facilita o impide el ensamblaje de la maquinaria general de la transcripción por la RNA polimerasa II.¹⁴ El VDR actúa sobre los genes regulados por la 1,25-(OH)₂D como un heterodímero con el receptor X

para retinoides (RXR). Los genes que se inducen por la 1,25-(OH)₂D contienen en sus promotores secuencias cortas conocidas como elementos positivos de respuesta a la vitamina D (VDREs), los cuales son el sitio de interacción del heterodímero VDR-RXR.¹⁴ Recientemente se ha caracterizado un segundo tipo de secuencias que funcionan en genes reprimidos por la 1,25-(OH)₂D a través del complejo ternario VDR, RXR y un nuevo factor de transcripción llamado VDIR (Figura 2B).^{15,16} De manera global, la 1,25-(OH)₂D dispara la activación o la represión de la transcripción a través del remodelamiento local de la cromatina en los genes regulados por esta hormona.¹⁴

La 1,25-(OH)₂D es una molécula crucial en la homeostasis del calcio. Baste señalar que las mutaciones inactivantes en los genes de la 1 α -hidroxilasa y del VDR son responsables del raquitismo tipo I y tipo II, respectivamente, en los que se presentan profundas alteraciones en el metabolismo del calcio.¹³

EFFECTOS DE LA PTH Y LA 1,25-(OH)₂D EN EL HUESO

El incremento sostenido de la PTH favorece la movilización de calcio y fosfato del hueso a través de la estimulación de la diferenciación de los osteoclastos.³ Este proceso es indirecto y depende de la unión de la PTH al PTHR1 presente en los osteoblastos. Tanto la PTH como la 1,25-(OH)₂D aumentan la expresión del ligando activador del receptor NF- κ B (RANKL) en los osteoblastos.^{17,18} La unión de RANKL a su receptor RANK presente en los preosteoclastos promueve su diferenciación a osteoclastos activos. Además, la 1,25-(OH)₂D incrementa la osteoclastogénesis al inhibir la expresión de la osteoprotegerina, un receptor soluble del osteoblasto que compete con RANK por la unión de RANKL.¹⁹ De esta forma, la PTH y la 1,25-(OH)₂D aumentan la calcemia al incrementar los osteoclastos activos en el hueso.

De manera paradójica, la administración pulsátil de la PTH resulta en la formación del hueso al fomentar la actividad y la vida del osteoblasto.¹⁰ Este efecto anabólico es la base para el uso clínico de la PTH(1-34) en el tratamiento de la osteoporosis. La PTH(1-34) administrada de manera pulsátil incrementa la densidad mineral ósea en modelos animales y en pacientes con osteoporosis y también reduce la incidencia de las fracturas al mejorar la arquitectura ósea.²⁰ La PTH ha sido aprobada para su uso en EE.UU. en mujeres y hombres con alto riesgo de fractura, como los que han tenido fractu-

ras previas debidas a la osteoporosis o aquellos en los que han fracasado otros regímenes terapéuticos. El tratamiento con la PTH debe ser reservado a pacientes con alto riesgo debido a la necesidad de una inyección subcutánea diaria, al costo elevado y debido a que no se conoce el margen de seguridad del tratamiento a largo plazo.²⁰ Una alternativa terapéutica para obtener los efectos benéficos de la PTH en la osteoporosis es la inducción de la secreción intermitente de la PTH endógena bloqueando al receptor sensor de calcio con compuestos antagonistas de este receptor conocidos como calcilíticos.²¹

Por su parte, la 1,25-(OH)₂D es esencial para el desarrollo y el mantenimiento del esqueleto, ya que su deficiencia provoca raquitismo en los jóvenes y osteomalacia en los adultos.²² En personas mayores a 50 años, en las que la deficiencia de vitamina D es frecuente por la menor síntesis cutánea,²³ la administración de 1,25-(OH)₂D incrementa la densidad mineral del hueso y en combinación con la suplementación con calcio disminuye la incidencia de fracturas de cadera.²⁴ Parte de los efectos benéficos de la 1,25-(OH)₂D en el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusicas se atribuyen a la normalización de la absorción intestinal de calcio.²⁵

En los últimos años se han utilizado extensivamente ratones con diversas ablaciones genéticas con la finalidad de explorar la función y la regulación de las proteínas clave de la homeostasis del calcio. Por ejemplo, los ratones carentes de 1 α -hidroxilasa y del VDR presentan hipocalcemia e hiperparatiroidismo secundario de manera similar a lo observado en el raquitismo tipo I y II, respectivamente.²⁶⁻²⁸ Estos animales presentan volumen óseo elevado y aumento del número de osteoblastos y dichas anomalías se corrigen al alimentar a estos ratones con dietas ricas en calcio.^{29,30} De igual manera, los ratones carentes de 1 α -hidroxilasa tratados con 1,25-(OH)₂D normalizan su función ósea, indicando que la 1,25-(OH)₂D tiene un papel anabólico en el hueso *in vivo*.³¹ En particular, la placa de crecimiento ósea requiere la acción coordinada del calcio y la 1,25-(OH)₂D para su adecuado desarrollo.²⁵ La administración de 1,25-(OH)₂D en ratones con doble ablación genética de la 1 α -hidroxilasa y la PTH normaliza la concentración sanguínea de calcio a través del aumento en la absorción intestinal del calcio y mediante la mayor reabsorción renal de calcio, sin movilizar el calcio depositado en el hueso.³² Estos resultados refuerzan el concepto de que la 1,25-(OH)₂D es un agente anabólico para el hueso.

EFFECTOS DE LA PTH Y LA 1,25-(OH)₂D EN EL RIÑÓN

La PTH actúa en el riñón regulando tres procesos relacionados con el metabolismo mineral: 1) bloqueando la reabsorción del fosfato, 2) incrementando la reabsorción de calcio y 3) favoreciendo la síntesis de 1,25-(OH)₂D.

La PTH contribuye a la homeostasis del fosfato al inhibir la actividad y la expresión de los transportadores de este nutrimento en las membranas vellosas de los túbulos proximales.³ Con respecto a la reabsorción del calcio en el riñón, aproximadamente 80% de este ión se reabsorbe en el túbulo proximal y en la parte ascendente del asa de Henle mediante transporte pasivo independiente de la PTH. El ajuste fino de la excreción de calcio se lleva a cabo principalmente en el túbulo distal por transporte activo dependiente de la PTH, donde se reabsorbe 20% del calcio filtrado.¹ La reabsorción activa de calcio en las células del túbulo distal se lleva a cabo en los siguientes pasos: a) entrada del calcio en el lado apical mediante el canal selectivo TRPV5, b) unión del calcio a la calbindina D28K, la cual traslada el calcio hacia el lado basolateral, y c) liberación del calcio hacia la circulación sanguínea por acción conjunta del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (NCX1) y la ATPasa de la membrana plasmática PMCA1b³³ (Figura 3).

El PTHR1 se expresa en diferentes sitios de la nefrona incluyendo al túbulo distal.⁸ En este segmento, la unión de la PTH al PTHR1 promueve acciones no genómicas destinadas a realizar ajustes inmediatos en la reabsorción tubular de calcio. Adicionalmente, la PTH opera en una escala de tiempo mayor regulando la dinámica del proceso de reabsorción de calcio a través de efectos genómicos.³⁴

El principal efecto rápido de la PTH es la estimulación del transporte transepitelial de calcio por la activación de vías de señalización dependientes de la PKA y de la proteína cinasa C (PKC).^{35,36} En los efectos rápidos de la PTH participa la hiperpolarización de la membrana por el aumento de la permeabilidad al cloruro, la reinsertión a la membrana de canales de calcio latentes en vesículas intracelulares y la activación de la bomba de calcio PMCA1b.³⁴

Los efectos a largo plazo de la PTH sobre la reabsorción renal de calcio se han estudiado tanto con intervenciones nutricionales y farmacológicas como con la ablación genética de moléculas críticas en la homeostasis del calcio. En ratas paratiroidectomizadas se observa expresión reducida de TRPV5, calbindina D28K y NCX1 en los túbulos distales.³⁷ Resultados similares se obtuvieron en ratones tratados con un calcimimético, un compuesto que bloquea la secreción de la PTH. Como resultado de la ausencia de la PTH, los animales presentan baja reabsorción renal de calcio y desarrollan hipocalcemia. La administración de PTH en las ratas paratiroidectomizadas corrige la expresión renal de las proteínas de transporte de calcio y normaliza la calcemia.³⁷ Por otro lado, los ratones con ablación genética para el receptor sensor de calcio presentan hiperparatiroidismo e hipercalcemia y sobreexpresión de TRPV5 en el riñón.³⁸ En cultivos celulares de túbulos conectores tratados con PTH, aumenta la expresión de TRPV5, calbindina D28K, NCX1 y PMCA1b.³⁷ Estas observaciones en conjunto demuestran que la PTH incrementa la reabsorción renal de calcio a largo plazo a través de la expresión coordinada de la maquinaria de transporte de calcio en el túbulo distal.

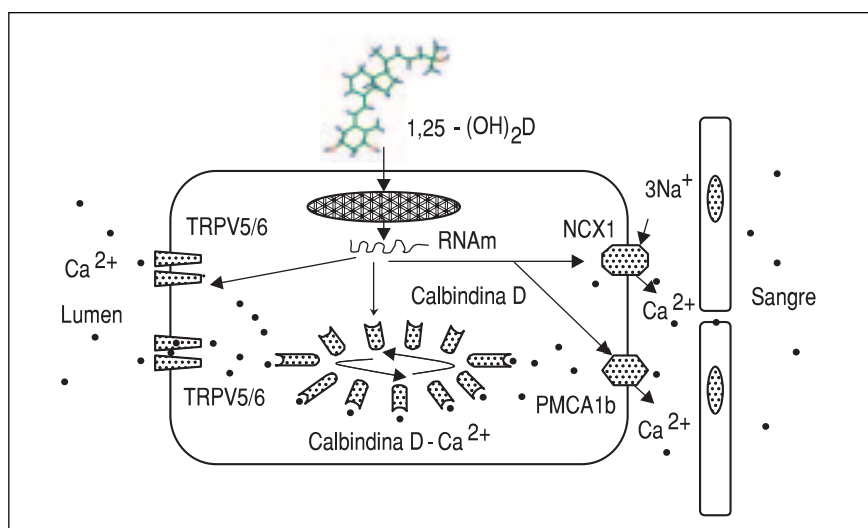


Figura 3. Mecanismo de transporte epitelial de calcio (•) en el intestino y el riñón. El canal TRPV5 es la principal vía de entrada del calcio en el epitelio renal, mientras que TRPV6 actúa predominantemente en el intestino. Dentro de las células epiteliales, el calcio unido a la calbindina D difunde hacia la membrana basolateral y es extruido por la PMCA1b (ATPasa de la membrana plasmática) y por NCX1 (intercambiador Na⁺/Ca²⁺). La 1,25-(OH)₂D estimula el transporte de Ca²⁺ incrementando la expresión de los canales de calcio TRPV5/6, de la calbindina D, la PMCA1b y NCX1.

Otro de los efectos de la PTH en el riñón es la regulación de la síntesis de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ en los túbulo proximales. La producción de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ en el riñón depende del balance de calcio en el organismo.¹³ Cuando el calcio es suficiente, la actividad de la 1α -hidroxilasa es mínima debido a la baja concentración de PTH en la circulación. Bajo estas circunstancias, el promotor del gen de la 1α -hidroxilasa se encuentra bajo represión transcripcional de manera independiente de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$.¹⁵ Sin embargo, cuando el calcio es insuficiente, la PTH incrementa la actividad y la expresión de la 1α -hidroxilasa para producir $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ y así asegurar una mayor absorción de calcio en el tracto gastrointestinal.⁴ La síntesis *de novo* de la 1α -hidroxilasa por efecto de la PTH se lleva a cabo mediante un mecanismo dependiente de AMP cíclico y del VDR.¹⁵ Es interesante destacar que elevadas concentraciones de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ inhiben la expresión del gen de la 1α -hidroxilasa a través de efectos en el promotor que son mediados por el VDR (Figura 2B).¹⁵ Por el contrario, la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ es un inductor muy potente de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ 24-hidroxilasa (24-hidroxilasa), la enzima mitocondrial que cataboliza a la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$.¹³ Los túbulo proximales ofrecen un microambiente permisivo para la síntesis de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ debido a la baja expresión de la 24-hidroxilasa y del VDR. La PTH reduce la expresión de la 24-hidroxilasa aún en presencia de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$, a través de reducir la estabilidad de los transcritos de esta enzima.³⁹

Además de participar en el circuito que controla su propia síntesis, la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$, a semejanza de la PTH, también presenta efectos reguladores sobre la reabsorción de calcio. Las ratas deficientes en vitamina D desarrollan hipocalcemia originada por la baja expresión renal de TRPV5.⁴⁰ Los ratones con ablación genética de la 1α -hidroxilasa presentan hiperparatiroidismo, anomalías óseas e hipocalcemia severa ocasionada por la baja reabsorción de calcio secundaria a la menor expresión de TRPV5, calbindina D28K y NCX1.^{26,41} Estos ratones corrigen estos defectos tras la administración de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$.⁴¹ Por lo tanto, la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ es un factor de importancia capital en la regulación concertada de las proteínas de transporte renal de calcio y para el mantenimiento del balance normal de este elemento.

Recientemente se describió que TRPV5 es el factor limitante del transporte activo de calcio en los túbulo distales renales.³⁴ La entrada de calcio a través de TRPV5 está controlada a varios niveles: a) la expresión génica de este canal se regula por hormonas calciotrópicas como la PTH y la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$, b) la

regulación de la actividad del canal por el calcio intracelular a través de retroalimentación negativa, c) el control del tráfico de vesículas hacia la membrana plasmática por fluctuaciones en el pH del microambiente y d) por modificaciones a la estructura del canal presente en la membrana plasmática.⁴² Con respecto a este último punto, la hormona urinaria antienvjecimiento *klotho* posee actividad de β -glucuronidasa sobre TRPV5.⁴³ La desglicosilación del dominio extracelular de TRPV5 por efecto de *klotho* estabiliza el canal sobre la membrana prolongando su actividad y tiempo de vida media.⁴³ Esta información destaca a TRPV5 como el blanco crítico en la regulación hormonal de la reabsorción tubular de calcio.

Por otro lado, la inactivación genética de TRPV5 en ratones provoca alta excreción renal de calcio causada por la reabsorción defectuosa de este ión.⁴⁴ Sin embargo, en estos animales no se desarrolla hipocalcemia debido a la entrada en operación de un mecanismo compensatorio dependiente de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$.⁴⁵ La alta concentración de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ en estos animales favorece la utilización de las reservas de calcio en el hueso, pero sobre todo, incrementa la absorción intestinal de calcio a través de la mayor expresión de las proteínas de transporte de calcio en el intestino.⁴⁵ Este hallazgo indica que una fuga renal de calcio debida a la ausencia de TRPV5 dispara un mecanismo de rescate que resulta en el incremento neto de la absorción de calcio dependiente de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$.

Es interesante señalar que en los riñones de los ratones mutantes nulos para TRPV5, se observa expresión baja de la calbindina D28K y NCX1, a pesar de que existe alta concentración de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ en la circulación de estos animales.³⁴ La conclusión de estos resultados es que TRPV5 participa en la regulación de las proteínas transportadoras de calcio en el riñón de manera independiente de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$. Debido a que TRPV5 es la puerta de entrada apical de calcio, es factible que el flujo de calcio a través de TRPV5 determine la expresión de las proteínas de transporte de calcio en el riñón.³⁴ Esta hipótesis fue recientemente investigada utilizando cultivos primarios de ductos colectores corticales y de túbulo conectores de conejo. El tratamiento de estas células con PTH aumenta el transporte transepitelial de calcio e induce la mayor expresión de TRPV5, calbindina D28K y NCX1.³⁷ El bloqueo de la actividad de TRPV5 por el rojo de rutenio elimina el transporte de calcio estimulado por la PTH y suprime la expresión de la calbindina D28K y NCX1.³⁷ Estos ha-

llazgos indican que efectivamente la entrada de calcio a través de TRPV5 también controla la expresión de las proteínas de transporte de calcio. En la actualidad se está explorando el mecanismo molecular que explique la conexión funcional entre el flujo de calcio a través de TRPV5 y la regulación de la transcripción de los genes que codifican para la maquinaria de transporte de calcio en el riñón.

EFFECTOS DE LA PTH Y LA 1,25-(OH)₂D EN EL INTESTINO

La absorción intestinal de calcio involucra dos procesos: uno pasivo que se realiza principalmente en el yeyuno e íleon y por transporte activo en el duodeno y la parte proximal del yeyuno, el cual es responsable de la absorción del 90% del calcio.¹ La PTH participa indirectamente en la absorción intestinal de calcio a través de la 1,25-(OH)₂D. Puesto que la absorción de calcio es poco eficiente, la 1,25-(OH)₂D tiene un efecto estimulador mediado principalmente por respuestas genómicas.⁴⁶ Adicionalmente, la 1,25-(OH)₂D incrementa de manera aguda la absorción de calcio en el intestino, sin embargo, estos efectos no genómicos parecen no tener gran impacto *in vivo* en la absorción global de calcio.¹³

El mecanismo general de la absorción intestinal de calcio es similar al descrito en los túbulos distales del riñón, donde participan canales selectivos para el calcio, calbindinas y proteínas extrusoras de calcio (Figura 3). A diferencia del riñón, en el epitelio intestinal la principal ruta de entrada de calcio es mediada por el canal TRPV6.³³ El papel crítico de TRPV6 en la absorción intestinal de calcio se encuentra ilustrado por el fenotipo del ratón con ablación genética de este canal.⁴⁷ Estos ratones presentan mayor excreción urinaria de calcio y baja densidad mineral ósea; sin embargo, la alteración más importante es la restringida capacidad de absorción de calcio en el intestino.⁴⁷ Este fenotipo se observa aún a pesar del incremento de la PTH y la 1,25-(OH)₂D en la sangre de estos animales.

La entrada del calcio a las células epiteliales del intestino constituye el paso limitante de la absorción del calcio y es dependiente de 1,25-(OH)₂D.⁴⁷ El análisis con microarreglos de DNA ha mostrado que TRPV6 es uno de los genes con mayor respuesta transcripcional a la 1,25-(OH)₂D.⁴⁸ Tanto TRPV6 como TRPV5 incrementan su expresión en el intestino de ratones suplementados con vitamina D y la síntesis de ambos canales se encuentra severamente comprometida en los ratones con ablación genética del VDR.⁴⁶ Interesantemente, algunos análogos de la

1,25-(OH)₂D con reducida acción calcémica son pobres activadores de la expresión de los canales TRPV6 y TRPV5.³³

Por otro lado, el envejecimiento está asociado con alteraciones en la homeostasis del calcio, lo cual predispone a las personas mayores al hiperparatiroidismo y a la osteoporosis. La absorción intestinal de calcio disminuye con la edad, probablemente como consecuencia de la menor expresión de TRPV6 y TRPV5.⁴⁹ Recientemente se demostró en ratones que la alta expresión del VDR en el duodeno protege a la maquinaria de absorción de calcio contra la pérdida de la función dependiente de la edad.⁵⁰ No obstante, se observó que la expresión duodenal de TRPV6 y del VDR no depende de 1,25-(OH)₂D en las mujeres mayores, lo cual puede explicar la menor absorción fraccional de calcio en mujeres posmenopáusicas.⁵¹

La 1,25-(OH)₂D controla además la síntesis de otras proteínas duodenales que participan en la absorción de calcio, como las calbindinas, NCX1 y la ATPasa PMCA1b.³³ Durante décadas se consideró que la calbindina D9K era la acarreadora intracelular de calcio en el epitelio intestinal. Recientemente se obtuvo un ratón con ablación genética de la calbindina D9K y se demostró que este animal no presenta ninguna alteración de la homeostasis del calcio.⁵² Esta evidencia indica que la calbindina D9K no se requiere para la absorción de calcio dependiente de la 1,25-(OH)₂D y plantea la interrogante acerca de la identidad del transportador intracelular de calcio en las microvellosidades intestinales.

EFFECTOS DE LA PTH Y LA 1,25-(OH)₂D EN LAS GLÁNDULAS PARATIROIDES

Como se mencionó anteriormente, las glándulas paratiroides juegan un papel vital en el mantenimiento de la calcemia a través de su capacidad para monitorear permanentemente la concentración extracelular de calcio por el receptor sensor de calcio y por sus efectos endocrinos mediados por la PTH.⁶ No se han descrito acciones biológicas de la PTH en las glándulas paratiroides. Sin embargo, la 1,25-(OH)₂D secretada por el riñón ejerce efectos calciotrópicos en estas glándulas, principalmente controlando la síntesis de la PTH y el receptor sensor de calcio.¹¹

La 1,25-(OH)₂D incrementa la expresión del receptor sensor de calcio a través de 2 VDREs presentes en la región promotora del gen.⁴⁸ Por el contrario, la 1,25-(OH)₂D suprime la síntesis *de novo* de la PTH mediante represión transcripcional dependiente del VDR de manera similar a lo que se

observa en el gen de la 1α -hidroxilasa de los túbulos proximales (Figura 2B).¹⁶ La represión de la síntesis de la PTH ocurre cuando la concentración de calcio en el medio extracelular es normal.⁵ Aunque las glándulas paratiroides pueden producir $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ para efectos autocrinos,⁵³ las acciones reguladoras sobre los genes del receptor sensor de calcio y de la PTH se lleva a cabo por la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ sintetizada en el riñón y transportada hasta las glándulas paratiroides por la circulación sistémica.⁴

Por otro lado, los ratones con ablación genética de la 1α -hidroxilasa y el VDR alimentados con dietas ricas en calcio corrigen el hiperparatiroidismo,^{29,30} lo cual indica que además de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$, el calcio participa en la supresión de la síntesis y liberación de la PTH. Estas observaciones señalan que la síntesis y liberación de la PTH en las glándulas paratiroides depende de la cooperación funcional entre el calcio y la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$.⁵⁴

Adicionalmente, la deficiencia de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ causa hiperplasia de las glándulas paratiroides e hiperparatiroidismo secundario mientras que la administración de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ evita la hiperplasia de las glándulas paratiroides observada en ciertas patologías renales.^{4,13} Interessantemente, la normalización de la calcemia en los ratones mutantes nulos para la 1α -hidroxilasa no suprime la hiperplasia de las glándulas paratiroides.³¹ Los mecanismos por los cuales la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ detiene el crecimiento de las glándulas paratiroides incluyen: a) inhibición de la síntesis y la actividad del factor de crecimiento transformante α y del receptor para el factor de crecimiento epidérmico, los cuales conforman el circuito regulador que dispara la mitosis y b) mayor biodisponibilidad de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas, los cuales son potentes supresores de la proliferación celular.²² Es interesante que la alta ingesta de calcio en ratones mutantes nulos para el VDR detiene el crecimiento de las glándulas paratiroides.²⁹ Debido a que en este modelo se incrementa la concentración de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$, es probable que los efectos sobre el crecimiento de las glándulas paratiroides sean debidos a acciones directas del calcio o a efectos de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ independientes del VDR.²²

EL CALCIO EN EL EMBARAZO Y LA LACTANCIA

Durante eventos reproductivos la homeostasis de calcio muestra ajustes radicales, ya que la placenta y las glándulas mamarias son órganos que transportan cantidades considerables de calcio fuera del organismo materno. La gran demanda de calcio en el

embarazo responde a la necesidad de mineralizar el esqueleto fetal, el cual llega a acumular 30 g de este elemento a término. Aproximadamente 80% de esta cantidad se transfiere hacia el feto durante el tercer trimestre del embarazo a razón de 250-300 mg/día.⁵⁵ En la circulación materna el calcio ionizado permanece constante, el PTHrP aumenta progresivamente durante el embarazo, mientras que la PTH disminuye moderadamente durante el primer trimestre pero alcanza cifras normales al término.⁵⁵ La $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ en la sangre materna se incrementa al doble de sus valores normales durante el primer trimestre del embarazo hasta el término, aun sin concentraciones altas de PTH.⁵⁶ La principal adaptación materna para proveer los requerimientos fetales de calcio requiere de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ elevada para aumentar la capacidad de absorción del calcio de la dieta a partir de la semana 12 de gestación. Los riñones maternos son la principal fuente de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ probablemente debido al efecto estimulador del PTHrP sobre la 1α -hidroxilasa renal.⁵⁷ No obstante, la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ producida por la placenta y la decidua es otra fuente importante para regular procesos clave del embarazo como la implantación y aceptación del aloinjerto fetal mediante efectos autocrinos y paracrinos independientes del calcio.^{58,59}

Cabe mencionar que la preeclampsia es una patología hipertensiva del embarazo asociada con alteraciones del metabolismo del calcio, como hipocalciuria y baja producción de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$.¹ No se conoce si el riñón disminuye la producción de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ en la preeclampsia; sin embargo, nuestro grupo ha descrito que las células placentarias tienen capacidad restringida de síntesis de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ en esta patología.⁶⁰ Recientemente se demostró que la suplementación de mujeres embarazadas con calcio durante todo el embarazo no previene la preeclampsia pero reduce su severidad y la mortalidad materna y neonatal.⁶¹

Por otra parte, la lactancia causa la pérdida diaria de aproximadamente 280-400 mg de calcio por día.⁵⁵ La lactancia se caracteriza por los siguientes ajustes en la circulación materna: a) concentración normal de fosfato, calcio ionizado y $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$, b) baja concentración de PTH y estradiol y c) elevada concentración de prolactina, calcitonina y PTHrP.⁵⁶ La hiperprolactinemia durante la lactancia suprime la síntesis de estradiol en los ovarios y estimula la producción de PTHrP en las glándulas mamarias, lo cual incrementa la resorción ósea. En efecto, la mayoría del calcio transferido a la leche proviene del esqueleto materno, el cual se desmineraliza rápidamente durante la lactancia. Las mujeres pierden hasta 10% del contenido mineral trabecular durante

seis meses de lactancia.⁵⁷ La calcitonina protege el esqueleto materno de la desmineralización excesiva mediante la inhibición de la actividad de los osteoclastos, bloqueando la liberación de la prolactina o suprimiendo la síntesis de PTHrP en el tejido mamario.² De manera interesante, tras el destete la densidad mineral se incrementa a razón de 0.5-2% al mes, retornando a los valores normales en un período de tres a seis meses.⁵⁷

CONSIDERACIONES FINALES

Hasta finales de los ochenta, se consideraba que la 1,25-(OH)₂D poseía acciones biológicas exclusivamente relacionadas con el metabolismo del calcio. Este concepto ha cambiado y actualmente se considera a la 1,25-(OH)₂D como el modulador central de un sistema hormonal que controla funciones tan diversas como la modulación de la respuesta inmune, la regulación del ciclo celular y el control de la secreción hormonal.¹¹ En términos generales, estos efectos no relacionados con la homeostasis del calcio son producto de la acción paracrina o autocrina de la 1,25-(OH)₂D producida extrarrenalmente, cuya regulación es independiente del calcio.

Un gran número de estudios han revelado que la deficiencia de vitamina D es común alrededor del mundo.²³ Los factores principales que predisponen a la deficiencia de vitamina D son la falta de exposición a la luz solar y el uso de bloqueadores solares. La deficiencia de vitamina D es un factor de riesgo para el desarrollo de algunos tipos de cáncer, de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, hipertensión y diabetes.²³ En virtud de sus propiedades antiproliferativas y prodiferenciales, se ha utilizado a la 1,25-(OH)₂D como tratamiento para la psoriasis.¹³ Sin embargo, los potentes efectos calcémicos de la 1,25-(OH)₂D han limitado su uso con fines terapéuticos. Desde hace años se ha desarrollado una serie de análogos sintéticos de la 1,25-(OH)₂D que funcionan como agonistas o antagonistas del VDR pero que poseen menores efectos calcémicos que la 1,25-(OH)₂D. Algunos de estos análogos se usan para el tratamiento de pacientes con hiperparatiroidismo secundario a la insuficiencia renal en virtud de que pueden suprimir la síntesis de la PTH y la hiperplasia de las glándulas paratiroides.⁶² Sin embargo, este tratamiento no es efectivo en pacientes sometidos a diálisis que presentan hiperparatiroidismo secundario prolongado e hiperplasia nodular debido probablemente a la baja expresión del receptor sensor de calcio y del VDR en las glándulas paratiroides.⁵⁴

CONCLUSIONES

El sistema endocrino de la vitamina D es esencial en la interacción entre el riñón, el hueso, el intestino y las glándulas paratiroides, que en conjunto mantienen la concentración extracelular de calcio en límites estrechos. De manera general, la calcemia es regulada por la acción secuencial de tres primeros mensajeros. El primero de ellos es el calcio, que modula la actividad del receptor sensor de calcio. La segunda hormona que se secreta en respuesta a la hipocalcemia es la PTH, la cual posee numerosos efectos calciotrópicos a corto y largo plazo en el riñón y el hueso. La 1,25-(OH)₂D es la tercera hormona reguladora de la calcemia cuyos efectos calciotrópicos se llevan a cabo por varios mecanismos. La 1,25-(OH)₂D induce la síntesis de las proteínas que participan en el transporte activo de calcio en el intestino. La PTH y la 1,25-(OH)₂D son los mediadores de la movilización de calcio en el hueso en situaciones de deficiencia nutricional de este elemento. Además, la reabsorción de calcio en los túbulos distales es modulada positivamente por la PTH y la 1,25-(OH)₂D. Otro efecto importante de la 1,25-(OH)₂D es la retroalimentación negativa de la síntesis y la secreción de la PTH en las glándulas paratiroides. Los efectos calciotrópicos de la 1,25-(OH)₂D son ejercidos principalmente a través del control de la expresión de genes blanco dependientes del VDR. Sin embargo, se han descrito efectos calciotrópicos de la 1,25-(OH)₂D en el intestino debidos a acciones no genómicas. Finalmente, la 1,25-(OH)₂D es capaz de regular la proliferación celular en las glándulas paratiroides a través de efectos sobre el ciclo celular que son independientes del metabolismo del calcio. Todas estas observaciones ilustran la versatilidad funcional de la 1,25-(OH)₂D en el organismo y destacan la importancia que el sistema endocrino de la vitamina D tiene sobre la salud.

REFERENCIAS

1. Halhali A, Díaz L, Ávila E, Larrea F. Calcio, fósforo y vitamina D. En: Tovar AR (eds.). Los micronutrientos. Aspectos teóricos y prácticos. México: Fundación Mexicana para la Salud; 2006, p. 111-31.
2. Woodrow JP, Sharpe CJ, Fudge NJ, Hoff AO, Gagel RF, Kovacs CS. Calcitonin plays a critical role in regulating skeletal mineral metabolism during lactation. *Endocrinology* 2006; 147: 4010-21.
3. Potts JT. Parathyroid hormone: past and present. *J Endocrinol* 2005; 187: 311-25.
4. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1689S-96S.
5. Friedman PA, Goodman WG. PTH(1-84)/PTH(7-84): a balance of power. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F975-F84.

6. Breitwieser GE. Calcium sensing receptors and calcium oscillations: calcium as a first messenger. *Curr Top Dev Biol* 2006; 73: 85-114.
7. Moallem E, Kilav R, Silver J, Naveh-Many T. RNA-Protein binding and post-transcriptional regulation of parathyroid hormone gene expression by calcium and phosphate. *J Biol Chem* 1998; 273: 5253-9.
8. Gensure RC, Gardella TJ, Juppner H. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 666-78.
9. Sneddon WB, Magyar CE, Willick GE, Syme CA, et al. Ligand-selective dissociation of activation and internalization of the parathyroid hormone (PTH) receptor: conditional efficacy of PTH peptide fragments. *Endocrinology* 2004; 145: 2815-23.
10. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001; 344: 1434-41.
11. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92: 4-8.
12. Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, et al. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D₃. *Cell* 1999; 96: 507-15.
13. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F8-F28.
14. Demay MB. Mechanism of vitamin D receptor action. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068: 204-13.
15. Murayama A, Kim MS, Yanagisawa J, Takeyama K, Kato S. Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO J* 2004; 23: 1598-608.
16. Kim MS, Fujiki R, Murayama A, Kitagawa H, et al. 1 α ,25(OH)₂D₃-induced transrepression by vitamin D receptor through E-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 334-42.
17. Kitazawa R, Kitazawa S. Vitamin D₃ augments osteoclastogenesis via vitamin D-responsive element of mouse RANKL gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 650-5.
18. Ma YL, Cain RL, Halladay DL, Yang X, Zeng Q, et al. Catabolic effects of continuous human PTH (1-38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology* 2001; 142: 4047-54.
19. Kondo T, Kitazawa R, Maeda S, Kitazawa S. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ rapidly regulates the mouse osteoprotegerin gene through dual pathways. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 1411-9.
20. Dempster DW, Cosman F, Kurland ES, Zhou H, et al. Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone microarchitecture and turnover in patients with osteoporosis: a paired biopsy study. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 1846-53.
21. Gowen M, Stroup GB, Dodds RA, James IE, et al. Antagonizing the parathyroid calcium receptor stimulates parathyroid hormone secretion and bone formation in osteopenic rats. *J Clin Invest* 2000; 105: 1595-604.
22. Christakos S, Dhawan P, Shen Q, Peng X, Benn B, Zhong Y. New insights into the mechanisms involved in the pleiotropic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068: 194-203.
23. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest* 2006; 116: 2062-72.
24. Boonen S, Lips P, Bouillon R, Bischoff-Ferrari HA, Vanderschueren D, Haentjens P. Need for additional calcium to reduce the risk of hip fracture with vitamin D supplementation: evidence from a comparative metaanalysis of randomized controlled trials. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1415-23.
25. Riggs BL. Role of the vitamin D-endocrine system in the pathophysiology of postmenopausal osteoporosis. *J Cell Biochem* 2003; 88: 209-15.
26. Dardenne O, Prud'homme J, Arabian A, Glorieux FH, St-Arnaud R. Targeted inactivation of the 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase gene (CYP27B1) creates an animal model of pseudovitamin D-deficiency rickets. *Endocrinology* 2001; 142: 3135-41.
27. Panda DK, Miao D, Tremblay ML, Sirois J, Farookhi R, Hendy GN, Goltzman D. Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase enzyme: evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 7498-503.
28. Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, et al. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet* 1997; 16: 391-6.
29. Li YC, Amling M, Pirro AE, Priemel M, et al. Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice. *Endocrinology* 1998; 139: 4391-6.
30. Dardenne O, Prud'homme J, Glorieux FH, St-Arnaud R. Rescue of the phenotype of CYP27B1 (1 α -hydroxylase)-deficient mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90: 327-30.
31. Panda DK, Miao D, Bolivar I, Li J, Huo R, Hendy GN, Goltzman D. Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis. *J Biol Chem* 2004; 279: 16754-66.
32. Xue Y, Karaplis AC, Hendy GN, Goltzman D, Miao D. Exogenous 1,25-dihydroxyvitamin D₃ exerts a skeletal anabolic effect and improves mineral ion homeostasis in mice that are homozygous for both the 1 α -hydroxylase and parathyroid hormone null alleles. *Endocrinology* 2006; 147: 4801-10.
33. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 2005; 85: 373-422.
34. Lambers TT, Bindels RJ, Hoenderop JG. Coordinated control of renal Ca²⁺ handling. *Kidney Int* 2006; 69: 650-4.
35. Lau K, Bourdeau JE. Evidence for cAMP-dependent protein kinase in mediating the parathyroid hormone-stimulated rise in cytosolic free calcium in rabbit connecting tubules. *J Biol Chem* 1989; 264: 4028-32.
36. Hoenderop JG, De Pont JJ, Bindels RJ, Willems PH. Hormone-stimulated Ca²⁺ reabsorption in rabbit kidney cortical collecting system is cAMP-independent and involves a phorbol ester-insensitive PKC isotype. *Kidney Int* 1999; 55: 225-33.
37. van Abel M, Hoenderop JG, van der Kemp AW, et al. Coordinated control of renal Ca²⁺ transport proteins by parathyroid hormone. *Kidney Int* 2005; 68: 1708-21.
38. Kos CH, Karaplis AC, Peng JB, Hediger MA, et al. The calcium-sensing receptor is required for normal calcium homeostasis independent of parathyroid hormone. *J Clin Invest* 2003; 111: 1021-8.
39. Zierold C, Mings JA, DeLuca HF. Parathyroid hormone regulates 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase mRNA by altering its stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13572-6.
40. Hoenderop JG, Muller D, Van Der Kemp AW, et al. Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1342-9.
41. Hoenderop JG, Dardenne O, Van Abel M, et al. Modulation of renal Ca²⁺ transport protein genes by dietary Ca²⁺ and 1,25-di-

- hydroxyvitamin D3 in 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase knockout mice. *FASEB J* 2002; 16: 1398-406.
42. Mensenkamp AR, Hoenderop JG, Bindels RJ. TRPV5, the gateway to Ca²⁺ homeostasis. *Handb Exp Pharmacol* 2007; 179: 207-20.
 43. Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG. The β -glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science* 2005; 310: 490-3.
 44. Hoenderop JG, van Leeuwen JP, van der Eerden BC, Kersten FF, et al. Renal Ca²⁺ wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5. *J Clin Invest* 2003; 112: 1906-14.
 45. Renkema KY, Nijenhuis T, van der Eerden BC, et al. Hypervitaminosis D mediates compensatory Ca²⁺ hyperabsorption in TRPV5 knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3188-95.
 46. van Cromphaut SJ, Dewerchin M, Hoenderop JG, et al. Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13324-9.
 47. Bianco SD, Peng JB, Takanaga H, Suzuki Y, et al. Marked disturbance of calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the Trpv6 calcium channel gene. *J Bone Miner Res* 2007; 22: 274-85.
 48. Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, et al. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 2685-95.
 49. van Abel M, Huybers S, Hoenderop JG, van der Kemp AW, van Leeuwen JP, Bindels RJ. Age-dependent alterations in Ca²⁺ homeostasis: role of TRPV5 and TRPV6. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291: F1177-F1183.
 50. Marks HD, Fleet JC, Peleg S. Transgenic expression of the human vitamin D receptor (hVDR) in the duodenum of VDR-null mice attenuates the age-dependent decline in calcium absorption. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103: 513-6.
 51. Walters JR, Balesaria S, Chavele KM, Taylor V, et al. Calcium channel TRPV6 expression in human duodenum: different relationships to the vitamin D system and aging in men and women. *J Bone Miner Res* 2006; 21: 1770-7.
 52. Kutuzova GD, Akhter S, Christakos S, Vanhooke J, Kimmel-Jehan C, Deluca HF. Calbindin D9k knockout mice are indistinguishable from wild-type mice in phenotype and serum calcium level. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 12377-81.
 53. Segersten U, Correa P, Hewison M, Hellman P, et al. 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase expression in normal and pathological parathyroid glands. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2967-72.
 54. Rodriguez M, Nemeth E, Martin D. The calcium-sensing receptor: a key factor in the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: F253-F264.
 55. Kovacs CS, Kronenberg HM. Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. *Endocr Rev* 1997; 18: 832-72.
 56. Weisman Y. Maternal, fetal and neonatal vitamin D and calcium metabolism during pregnancy and lactation. *Endocr Rev* 2003; 6: 34-49.
 57. Kovacs CS. Calcium and bone metabolism during pregnancy and lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005; 10: 105-18.
 58. Diaz L, Sanchez I, Avila E, Halhali A, Vilchis F, Larrea F. Identification of a 25-hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase gene transcription product in cultures of human syncytiotrophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2543-9.
 59. Barrera D, Avila E, Hernandez G, Halhali A, et al. Estradiol and progesterone synthesis in human placenta is stimulated by calcitriol. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103: 529-32.
 60. Diaz L, Arranz C, Avila E, Halhali A, Vilchis F, Larrea F. Expression and activity of 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase are restricted in cultures of human syncytiotrophoblast cells from preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3876-82.
 61. Villar J, Abdel-Aleem H, Merialdi M, Mathai M, et al. World Health Organization randomized trial of calcium supplementation among low calcium intake pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194: 639-49.
 62. Brown AJ, Slatopolsky E. Drug insight: vitamin D analogs in the treatment of secondary hyperparathyroidism in patients with chronic kidney disease. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007; 3: 134-44.

Reimpresos:

Dr. Euclides Avila

Departamento de Biología de la Reproducción.
 Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
 Salvador Zubirán
 Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan
 14000 México, D.F.
 Tel.: 5573-1160, Fax: 5655-9859
 Correo electrónico: euclides@quetzal.innsz.mx

Recibido el 8 de agosto de 2006.
 Aceptado el 6 de junio de 2007.