



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTOS DEL CALCITRIOL SOBRE LA
EXPRESIÓN DEL TGF- β Y SUS RECEPTORES EN
CULTIVO DE TROFOBLASTO HUMANO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA
P R E S E N T A:**

**JOSELIN ESTEFANIA ESCAMILLA
BUCIO**



**DIRECTOR DE TESIS:
DAVID BARRERA HERNÁNDEZ
CDMX, 2021**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I. ABREVIACIONES

BSA: albumina sérica bovina (por sus siglas en inglés: Bovine Serum Albumin)

cm²: centímetros cuadrados

CO₂: dióxido de carbono

°C: grados centígrados

DBP: proteína de unión a la vitamina D (por sus siglas en inglés: vitamin D-binding protein)

DEPC: dietil-pirocarbonato (por sus siglas en inglés: diethyl pyrocarbonate)

DNA: ácido desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés: deoxyribonucleic acid)

DNAC: ácido desoxirribonucleico complementario (por sus siglas en inglés: deoxyribonucleic acid complementary)

EDTA: ácido dietildiaminotetraacético (por sus siglas en inglés: ethylenediaminetetraacetic acid)

E₂: Estradiol

g: gramo

GADPH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (por sus siglas en inglés: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

h: horas

HBSS: solución salina balanceada de Hank's (por sus siglas en inglés: Hanks' balanced salt solution)

hCG: gonadotropina coriónica humana (por sus siglas en inglés: human chorionic gonadotropin)

hLP: lactógeno placentario humano (por sus siglas en inglés: human placental lactogen)

L: litro

mg: miligramo

min: minuto

mL: mililitro

μL: microlitro

MEC: matriz extracelular

n: número de muestra

ng: nanogramo

nm: nanómetro

PBS: solución amortiguadora de fosfatos (por sus siglas en inglés: phosphate-buffered saline)

P₄: progesterona

PE: preeclampsia

pg: picogramo

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (por sus siglas en inglés: real-time-polymerase chain reaction)

RNA: ácido ribonucleico (por sus siglas en inglés: ribonucleic acid)

RNA_m: ácido ribonucleico mensajero (por sus siglas en inglés: ribonucleic acid messenger)

rpm: revoluciones por minuto

SFT: suero fetal de ternera

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta (por sus siglas en inglés: transforming growth factor beta)

TGF β R: receptor del factor de crecimiento transformante beta (por sus siglas en inglés: transforming growth factor beta receptor)

VDR: receptor a la vitamina D (por sus siglas en inglés: vitamin D receptor)

VDREs: elementos de respuesta a la vitamina D (por sus siglas en inglés: vitamin D response element)

VDIR: elementos de regulación negativa a la vitamina D (por sus siglas en inglés: vitamin D inhibitor receptor)

Vh: vehículo

II. FIGURAS

Figura 1. Biosíntesis del calcitriol

Figura 2. Vía canónica de señalización del TGF- β

Figura 3. Gradiente de percoll

Figura 4. Diferenciación del citotrofoblasto hacia sinciotrofoblasto

Figura 5. Expresión génica de la hCG durante tres días de cultivo celular

Figura 6. Expresión basal de las isoformas de los 3 TGF- β s durante 3 días de diferenciación

Figura 7. Comparación de la expresión basal de los TGF- β s y sus receptores en sinciotrofoblastos

Figura 8. Expresión génica de los TGF- β s en ausencia y presencia de calcitriol

Figura 9. Expresión génica del TGF β R1 y TGF β R2 en ausencia y presencia del calcitriol

III. TABLAS

Tabla 1. Digestiones enzimáticas

Tabla 2. Gradiente de percoll

Tabla 3. Diseño experimental para los tratamientos en el cultivo primario

Tabla 4. Mezcla de reacción para la obtención de DNAC

Tabla 5. Mezcla de reacción para realizar la qPCR

Tabla 6. Protocolo de la qPCR

IV. RESUMEN

El éxito de un embarazo implica la adaptación materna a los cambios que se van generando día tras día desde la implantación así como durante el desarrollo y crecimiento de la placenta y del nuevo individuo a lo largo de la gestación. Durante este periodo, la placenta es crucial para llevar a cabo el intercambio de nutrientes, oxígeno, gases y desechos entre la parte materna y fetal. Asimismo, este órgano es el principal responsable de producir las fluctuaciones tanto de hormonas glicoprotéicas como esteroides, factores de crecimiento, citocinas y péptidos entre otros, que regulan eventos de gran relevancia para evitar el rechazo materno. No obstante, para mantener en equilibrio estos cambios, la presencia de moléculas clave es requerida. Entre ellas, se sabe que el calcitriol (metabolito bioactivo de la vitamina D), está involucrado en la regulación de la síntesis de hormonas así como de citocinas tanto pro- como anti-inflamatorias en el trofoblasto placentario. Sin embargo, existen complicaciones del embarazo como la preeclampsia, en la cual hay deficiencia del calcitriol y exacerbada producción de moléculas como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), condiciones que se han relacionado con este padecimiento. Por lo tanto, es de interés determinar el potencial efecto del calcitriol sobre la expresión génica tanto del TGF- β 1, - β 2 y - β 3 y de los receptores al TGF- β en el cultivo primario de trofoblasto humano a término. Para ello, las células de trofoblasto se obtuvieron de placentas recolectadas por operación cesárea de mujeres gestantes clínicamente sanas y los efectos del calcitriol sobre la expresión génica se evaluaron mediante la técnica de PCR en tiempo real. Los resultados obtenidos mostraron que: 1) la expresión basal de los tres TGF- β s disminuye conforme avanza la diferenciación celular, 2) la expresión basal de la isoforma TGF- β 1 es mayor que la del TGF- β 2 y TGF- β 3 respectivamente, 3) la expresión basal del receptor TGF β R2 es mayor que la del TGF β R1, 4) la expresión génica de las tres isoformas del TGF- β fueron inhibidas por el calcitriol y 5) la expresión génica de ambos receptores también se inhibieron por el calcitriol. En conclusión, el calcitriol disminuye significativamente la expresión tanto de los TGF- β s como de sus receptores en el trofoblasto en cultivo. Lo anterior sugiere que la suplementación con vitamina D resultaría benéfica para aquellas pacientes con predisposición a desarrollar preeclampsia, en las cuales se ha evaluado deficiencia de calcitriol y exacerbadas concentraciones del TGF- β .

ÍNDICE

I.	Abreviaciones.....	I
II.	Figuras.....	IV
III.	Tablas.....	IV
IV.	Resumen.....	V

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.-	Generalidades.....	1
1.2.-	Funciones del calcitriol.....	3
1.3.-	Calcitriol, síntesis y transporte.....	5
1.4.-	Mecanismo de acción del calcitriol.....	7
1.5.-	TGF- β generalidades.....	8
1.6.-	Mecanismo de acción del TGF- β	9
1.7.-	Funciones del TGF- β	10

2.- HIPÓTESIS.....12

3.- OBJETIVOS.....13

3.1.- Objetivo general

3.2.- Objetivos específicos

4.- MATERIALES Y MÉTODO

4.1.-	Criterios de inclusión.....	14
4.2.-	Criterios de exclusión.....	14
4.3.-	Criterios de eliminación.....	15
4.4.-	Cultivo primario de trofoblasto humano.....	15
4.5.-	Extracción del RNA total.....	19
4.6.-	Cuantificación del RNA total.....	20
4.7.-	Retrotranscripción.....	21
4.8.-	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	22

5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	24
6.- RESULTADOS	
6.1.- Cultivo primario de trofoblasto humano.....	25
6.2.- Expresión génica de la hCG a tres días de diferenciación celular.....	26
6.3.- Perfil de la expresión basal génica del TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 durante la diferenciación celular del trofoblasto en cultivo.....	27
6.4.- Comparación de la expresión génica de los TGF- β s y sus receptores en el trofoblasto en cultivo.....	28
6.5.- Efecto del calcitriol sobre la expresión génica del TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3.....	29
6.6.- Efecto del calcitriol sobre la expresión génica del receptor TGF β R1 y el TGF β R2.....	30
7.- DISCUSIÓN.....	31
8.- CONCLUSIONES.....	36
9.- PERSPECTIVAS.....	37
10.- BIBLIOGRAFÍA.....	38
11.- ANEXO 1.....	48
12- ANEXO 2.....	49

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

Se denomina embarazo o gestación al periodo que transcurre desde la implantación del óvulo fecundado en el útero hasta el momento del parto. Este periodo comprende el desarrollo y crecimiento tanto de la placenta como del feto dentro del útero, así como los cambios metabólicos y fisiológicos de la madre que están encaminados a proteger, nutrir y desarrollar al feto [NOM-007-SSA2-1993,1993].

Lo anterior, inicia tras la unión del espermatozoide con el óvulo continuando con la embriogénesis, la cual se compone de distintas etapas sucesivas: 1) segmentación, proceso en el cual se divide el embrión en un conjunto de células hasta un estado conocido como mórula, que subsecuentemente da lugar a la blastulación, donde la mórula se diferencia a blastocisto, que contiene una cavidad denominada blastocelo, 2) implantación, el blastocisto que se introduce entre la mucosa uterina y el estroma endometrial mantiene un proceso denominado decidualización, que abarca cambios morfológicos, bioquímicos y génicos en las células estromales, que se acompañan de un enriquecimiento de material nutritivo en respuesta a la acción hormonal, principalmente inducido por el efecto de la progesterona (P_4) y 3) gastrulación, cuando comienzan los procesos para la formación de las capas germinales, adicional a la formación del tubo neural, conocido también como neurulación [Palomero *et al.*, 2000; Rodríguez-Cortés y Mendieta-Zerón, 2014].

Alrededor del 5º y 6º día después de la fertilización, se distinguen dos capas, el trofoblasto y la masa celular interna. Del trofoblasto derivarán la placenta y el cordón

umbilical y de la masa celular interna todos los tejidos que formarán al embrión [De la Fuente Hernández, 2015; Blanes y Vaca, 2015].

La formación de la placenta es un proceso complejo que comprende la diferenciación de las células trofoblásticas, la cual inicia cuando el trofoblasto se diferencia en 2 capas, una interna denominada citotrofoblasto y otra externa denominada sinciotrofoblasto. El sinciotrofoblasto multinucleado desarrolla lagunas que proyectan algunas vellosidades del citotrofoblasto, luego el sinciotrofoblasto se comprime progresivamente hasta convertirse en una capa que cubre la vellosidad y separa la capa del citotrofoblasto para formar el espacio intervilloso. A la par, enzimas generadas por el trofoblasto ayudan a generar ramificaciones vasculares con sangre materna y las células fetales mesenquimales invaden las vellosidades generando redes vasculares que conectan a la vena y arterias umbilicales. Por lo tanto, aunque comunicadas, la circulación materna y fetal están separadas en áreas especializadas de transferencia [Donnelly y Campling, 2011]. El sinciotrofoblasto se renueva por un recambio continuo en el cual hay proliferación de los citotrofoblastos mononucleares subyacentes, seguido de una fusión celular [Rodríguez-Cortés y Mendieta-Zerón, 2014]. Durante las primeras semanas del embarazo se desarrolla la estructura vellosa de la placenta, las proyecciones vellosas revestidas con sinciotrofoblastos incluyen los capilares fetales y a partir del segundo trimestre del embarazo, se convierten en la ruta principal de intercambio gaseoso y de nutrientes entre el feto y la madre [Hamilton y Boyd, 1960; Zhou *et al.*, 1997]. Cabe señalar que la placenta es un órgano con un alto potencial para producir hormonas glicoprotéicas, esteroides y secoesteroides,

factores de crecimiento, proteínas, citocinas y péptidos a lo largo de la gestación. Estas adaptaciones son requeridas para evitar el rechazo del alo-injerto fetal y así, favorecer su implantación, desarrollo y crecimiento [Barrera *et al.*, 2007a; Barrera *et al.*, 2007b; Noyola-Martínez *et al.*, 2019; Olvera-Sánchez *et al.*, 2019].

Considerando lo anterior, en el que se destaca que la placenta es un órgano exclusivo del embarazo y de vital importancia para sostener el desarrollo de un nuevo individuo, el conocer a fondo cómo se regulan diversas moléculas producidas por el trofoblasto placentario como el calcitriol y/o el TGF- β , es motivo de estudio por nuestro grupo de trabajo.

1.2. Funciones del calcitriol

La 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (calcitriol), es un secoesteroide que es ampliamente conocido por mantener la homeostasis del calcio y fósforo en el organismo [Ávila *et al.*, 2007]. Sin embargo, en las últimas décadas, se ha demostrado que está involucrado en la regulación de procesos no relacionados a la calcemia, ya que regula la transcripción de una amplia variedad de genes de manera tejido específico, la diferenciación y proliferación de células normales y malignas, así como media los sistemas tanto endocrino como inmunológico en diferentes tipos celulares [Olmos-Ortiz *et al.*, 2015a].

Asimismo se ha demostrado, usando ratas como modelo biológico, que el calcitriol participa en la decidualización del endometrio, lo que representa un evento crucial para la implantación del blastocisto [Halhali *et al.*, 1991]. Además, se ha reportado

que el calcitriol promueve el transporte de calcio en la placenta, estimula la expresión del lactógeno placentario y regula la expresión del gen HOXA10 [Díaz *et al.*, 2001; Stephanou *et al.*, 1994; Du *et al.*, 2005].

En particular utilizando trofoblasto humano en cultivo se mostró que el calcitriol media la síntesis de hormonas glicoprotéicas como la gonadotropina coriónica humana (hCG) y de esteroides como la P₄ y el estradiol (E₂) [Barrera *et al.*, 2008a; Barrera *et al.*, 2007b], regula de una manera dependiente del tiempo la expresión de las enzimas esteroideogénicas, estimula la expresión génica de péptidos antimicrobianos y de proteínas implicadas en el transporte de calcio como las calbindinas D9k y D28k [Noyola-Martínez *et al.*, 2017a; Olmos-Ortiz *et al.*, 2015b; Halhali *et al.*, 2010]. Además, el calcitriol regula la síntesis de citocinas tanto pro- como anti- inflamatorias en células de trofoblasto en cultivo obtenidas de mujeres sanas y con preeclampsia [Díaz *et al.*, 2009; Noyola-Martínez *et al.*, 2014]. Con base en lo anterior se destaca la participación del calcitriol como molécula reguladora de diversos factores producidos por el trofoblasto placentario.

1.3. Calcitriol, síntesis y transporte

El calcitriol se produce principalmente en el riñón. No obstante, su síntesis ha sido también demostrada en diferentes tejidos incluyendo el trofoblasto placentario. En principio, la ruta de síntesis del calcitriol comienza en la piel a partir del 7-dehidrocolesterol (Figura 1), que por acción de la radiación UV (290-315 nm) provenientes de la luz del sol, ésta rompe el enlace ubicado entre el carbono 9 y 10 del anillo B de la molécula, originando a la pre-vitamina D, una molécula inestable que por un proceso fototérmico se isomeriza y forma al colecalciferol, el cual, es colectado y transportado por la proteína de unión a vitamina D (DBP) hasta el hígado, lugar donde se hidroxila por la enzima vitamina D-25-hidroxilasa (CYP2R1) para formar a la 25-hidroxivitamina D₃ (calcidiol) el compuesto más abundante de la vitamina D en el flujo sanguíneo (10-50 ng/mL) [Holick *et al.*, 1980]. Posteriormente, el calcidiol se transporta unida a la DBP hasta el riñón o durante el embarazo hacia la placenta para hidroxilarse en el carbono 1, por acción de la enzima 25-hidroxivitamina D₃-1 α hidroxilasa (CYP27B1) mitocondrial, obteniendo así localmente al calcitriol [Holick *et al.*, 1980].

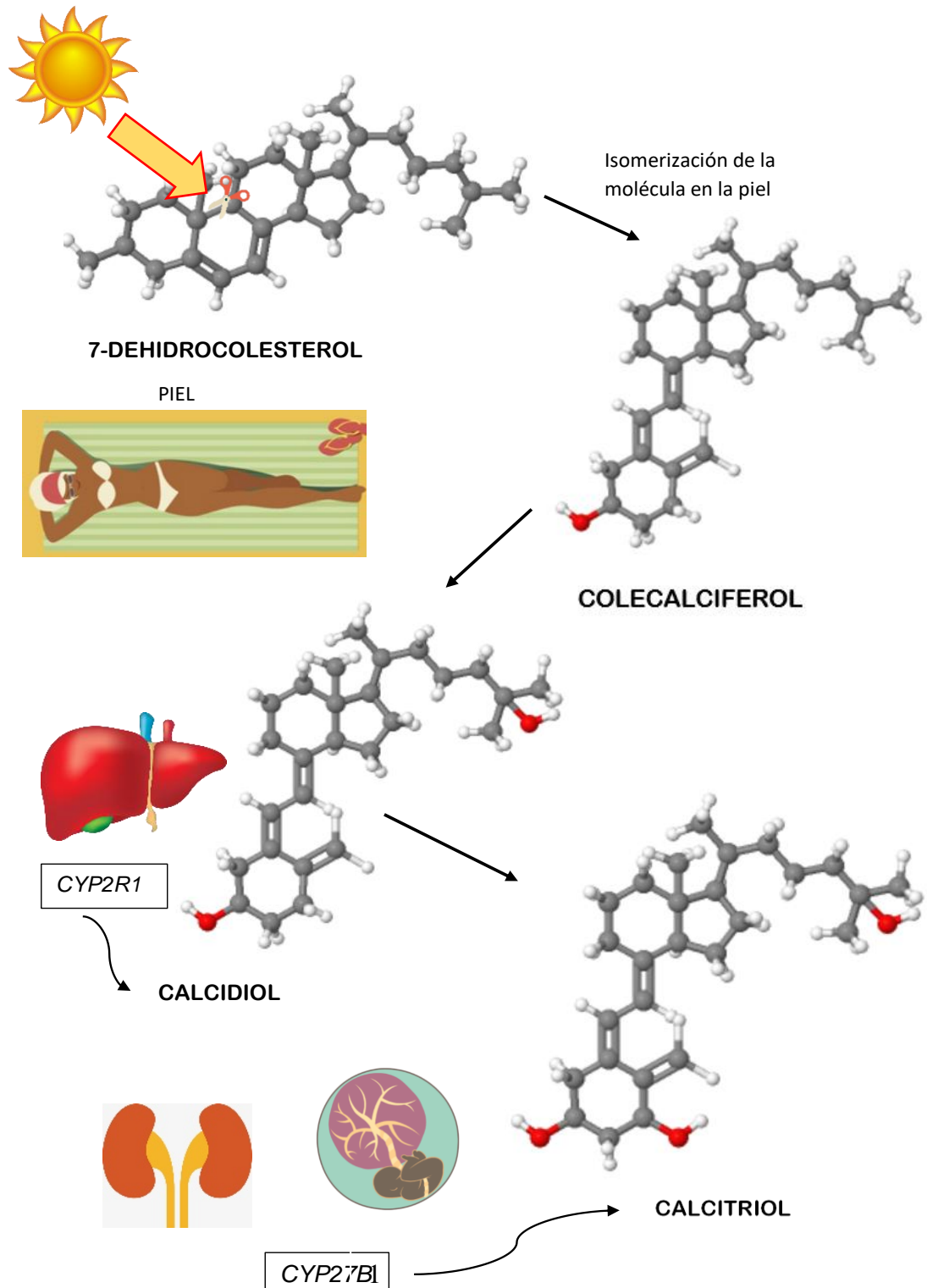


Figura 1. Biosíntesis del calcitriol. Por acción de la luz UV del sol, se rompe el anillo B del precursor 7-dehidrocolesterol para dar lugar a la pre-vitamina D (colexcalciferol), la cual se isomeriza y se transporta al hígado para formar al calcidiol, que se transporta al riñón o hacia la placenta para sintetizar al calcitriol por acción del CYP27B1.

1.4. Mecanismo de acción del calcitriol

El calcitriol ejerce sus efectos a través de dos modos de acción:

1) El mecanismo clásico de acción genómica del calcitriol, el cual se lleva a cabo por la unión del calcitriol con su receptor específico (VDR) que pertenece a la familia de receptores nucleares que se encuentran en diversos tejidos incluyendo la placenta [Stumpf, 1995]. El calcitriol tiene una constante de disociación de 0.1 nM y posee una afinidad por el VDR 1000 veces mayor que el calcidiol. Así, tras la unión del calcitriol con el VDR se recluta al receptor de retinoide X (RXR), formando un heterodímero que se une a elementos de respuesta para la vitamina D (VDRE) en la región promotora de los genes blanco para la activación o represión transcripcional [Li *et al.*, 2008; Barrera, 2013].

2) El mecanismo de acción no genómico, que involucra proteínas de membrana capaces de activar diferentes vías de señalización de respuesta rápida [Lösel y Wehling, 2003], en las que se generan segundos mensajeros como Ca^{2+} , AMPc, ácidos grasos y 3-fosfoinositidos, como el fosfatidilinositol 3,4,5 trisfosfato, entre otros. Este proceso es precedido por la activación de las proteínas cinasas tales como la proteína cinasa A (PKA), la proteína cinasa activada por mitógeno (MAP), la proteína cinasa C (PKC) y la Ca^{2+} -calmodulina cinasa. Además, las acciones no genómicas pueden incluir también la apertura de canales iónicos, entre otros [Hii y Ferrante, 2016].

1.5. TGF- β generalidades

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), aunque pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento, es considerada una citocina. En particular, los TGF- β s incluyen tres isoformas el TGF- β 1, - β 2 y - β 3, los cuales son codificados por tres genes localizados sobre diferentes cromosomas (19q13.1, 1q41 y 14q24, respectivamente) [Luo *et al.*, 2002; Cheifetz *et al.*, 1990; Cheruku *et al.*, 2015]. Los TGF- β s son producidos y secretados como zimógenos cuya activación es mediada por proteólisis llevada a cabo por proteasas como la plasmina y/o por varias metaloproteinasas de matriz [Cheruku *et al.*, 2015].

El TGF- β es un factor polipéptidico dimérico que se une con alta afinidad a su receptor tipo I (TGF β R1) y tipo II (TGF β R2) conocidos como receptores de señalamiento [Luo *et al.*, 2002]. Otras dos glicoproteínas transmembranales, el betaglicano (TGF β R3) y la endoglina, fungen como co-receptores del TGF- β , ya que no son requeridas para la generación de su señal, pero son capaces de mediar la interacción del TGF- β con los receptores de señalamiento [Massagué *et al.*, 1994; López-Casillas y Massagué, 2003; Cheruku *et al.*, 2015].

Los receptores TGF β R1 y TGF β R2 son proteínas con un pase transmembranal cuyas porciones extracelulares unen al TGF- β mientras que sus regiones intracelulares son cinasas de proteínas que fosforilan residuos serina y treonina.

1.6.- Mecanismo de acción del TGF- β

La unión del TGF- β al TGF β R2 induce la formación de un complejo con el TGF β R1. Esta asociación permite que la cinasa del TGF β R2 fosforile una importante región reguladora exclusiva del TGF β R1, la región GS, llamada así por su alto contenido de glicinas y serinas. La fosforilación de GS resulta en la activación de su cinasa y en la propagación de la señal del TGF- β [Lutz y Knaus, 2002; Wrana *et al.*, 1994].

Así, después de la unión del ligando, las señales se transmiten por el TGF β R1 que fosforila a las proteínas Smad, efectores intracelulares que al momento de la oligomerización entran en el núcleo para regular la transcripción después del ensamblaje con co-moduladores transcripcionales (Figura 2) [Lutz y Knaus, 2002; Wrana *et al.*, 1994].

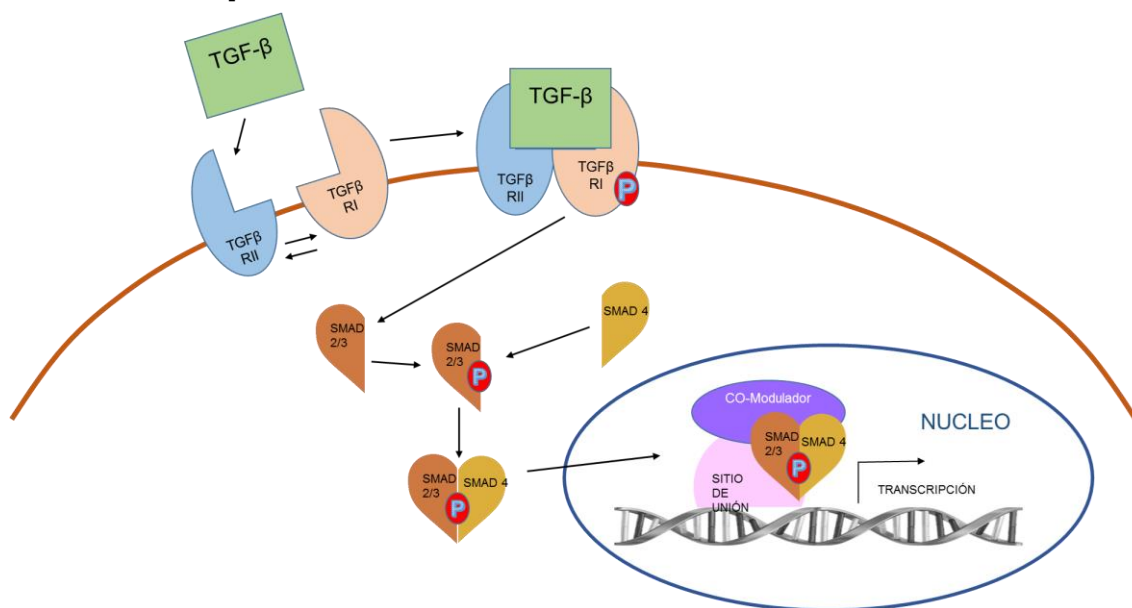


Figura 2. Vía canónica de señalización del TGF- β . El TGF- β , se une primero al TGF β R2, el cual una vez unido al ligando, recluta al TGF β R1, quien es fosforilado en el residuo serina del grupo carboxilo-terminal para subsecuentemente fosforilar las Smad 2 y 3 que reclutan a la Smad 4 para formar el complejo Smad, que se transloca al núcleo para regular la transcripción de genes blanco.

1.7 Funciones del TGF- β

El TGF- β es sintetizado por muchos tipos celulares como plaquetas, células endoteliales, linfocitos y macrófagos, así como por las células trofoblásticas [Peralta *et al.*, 2001]. Asimismo, estudios previos han demostrado la presencia de de sus tres isoformas y sus receptores TGF β R1 y TGF β R2 en células de la placenta [Schilling y Yeh, 2000; Jones *et al.*, 2006].

En general, el TGF- β en concentraciones adecuadas es fundamental para regular procesos celulares como la proliferación, la diferenciación, el desarrollo embrionario, la reparación tisular, la respuesta inmune y la invasión celular [Albers *et al.*, 2018]. Además, se sugiere que el TGF- β secretado por linfocitos T reguladores, ejerce un efecto antiinflamatorio que ayuda a mantener la tolerancia materno fetal [Li *et al.*, 2017; Darmochwal-Kolarz *et al.*, 2017]. Sin embargo, se ha reportado *in vitro* que el TGF- β inhibe la migración e invasión del trofoblasto mediante diversos mecanismos tales como: la hipoxia, el estímulo del factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), el incremento de la expresión del TIMP1, un inhibidor natural de las metaloproteinasas de matriz, la inducción de la expresión de COX-2, al disminuir la colagenasa tipo IV, que contribuye a la supresión de la invasión del trofoblasto y recientemente se ha reportado que entre sus efectos regula la biosíntesis de microRNAs específicos [Zhao *et al.*, 2012; Caniggia *et al.*, 2000; Prossler *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2017; Graham y Lala, 1991; Librach *et al.*, 1994; Yi *et al.*, 2018; Cheng *et al.*, 2013; Shih *et al.*, 2019].

Adicionalmente, se ha reportado usando líneas celulares de placenta, que el TGF- β afecta tanto la diferenciación como la fusión celular del trofoblasto en cultivo [Xu *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2015]. Además inhibe la síntesis de P₄ y E₂ así como disminuye la expresión y actividad del CYP19A1, enzima que está implicada en la síntesis de estrógenos por la placenta [Luo *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2009; Noyola-Martinez *et al.*, 2017a].

De manera interesante, la exacerbada síntesis del TGF- β se ha asociado con patologías del embarazo tales como abortos, preeclampsia, restricción del crecimiento intrauterino, síndrome de HELLP, parto prematuro y baja oxigenación intrauterina [Ogasawara *et al.*, 2000; Lyall *et al.*, 2001; Peraçoli *et al.*, 2008; Shaarawy *et al.*, 2001; Emanuelli *et al.*, 2008; Cecati *et al.*, 2017].

Considerando los antecedentes descritos, en el presente estudio es de interés indagar si el calcitriol afecta la expresión génica de las diferentes isoformas del TGF- β y sus receptores en el cultivo primario de trofoblasto, con la finalidad de conocer cuál sería el efecto regulador del calcitriol sobre el TGF- β en este tejido.

2. HIPÓTESIS

Considerando el efecto mostrado por el calcitriol en el trofoblasto placentario sobre la expresión génica y proteica de hormonas y citocinas, entonces es factible que este secoesteroide inhiba la expresión del TGF- β y sus receptores en este tejido como modo de regulación.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general:

Evaluar el efecto del calcitriol sobre la expresión génica de los TGF- β s y sus receptores en células de trofoblasto en cultivo.

3.2. Objetivos específicos:

- Analizar el perfil de expresión basal génica del TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 durante 3 días de diferenciación celular.

- Comparar la expresión génica del TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 y de los receptores TGF β R1 y TGF β R2 en los sinciotrofoblastos.

- Evaluar el efecto del calcitriol sobre la expresión génica del TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF β R1 y TGF β R2 en los sinciotrofoblastos.

4. MATERIALES Y MÉTODO

En este estudio se utilizaron placentas humanas de mujeres sanas como muestra biológica, las cuales sirvieron para llevar a cabo el cultivo primario de trofoblasto. Las muestras fueron obtenidas, mediante consentimiento informado de las pacientes con la aprobación de los comités de ética (Anexos I y II) del Hospital General Dr. Manuel Gea González, lugar donde fueron colectadas las placentas y del Instituto Nacional en Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, lugar donde se realizaron los cultivos primarios y el procesamiento de las muestras con número de registro 11-57-2016 y CONBIOÉTICA-09-CEI-011-20160627, respectivamente.

Para la selección de la muestra se determinaron los siguientes criterios:

4.1. Criterios de inclusión.

Mujeres embarazadas clínicamente sanas con edad biológica entre 18 a 40 años y edad gestacional ≥ 37 semanas, que hayan cursado embarazos normo evolutivos sometidas a operación cesárea y cuyo embarazo presentó un solo producto.

4.2. Criterios de exclusión.

Placentas de mujeres con antecedentes o diagnóstico de enfermedades hepáticas, cardíacas, diabéticas, inmunológicas, con tratamiento hormonal previo y/o cáncer, así como aquellas que tenían alguna patología del embarazo como amenaza de aborto, preeclampsia y/o diabetes gestacional.

4.3. Criterios de eliminación.

Placentas provenientes de mujeres que fueran alérgicas a la penicilina o estuvieran recibiendo tratamientos que interfirieran con el metabolismo de la vitamina D y el calcio o que presentaron alteraciones estructurales en sus placentas. Cabe mencionar que también se eliminaron de este estudio: 1) los cultivos celulares en los cuales las células no se adhirieron correctamente en las cajas de cultivo, 2) no se diferenciaron de cito- a sinciciotrofbastos *in vitro*, y 3) presentaron alguna contaminación y/o el porcentaje de trofoblasto no era el adecuado para realizar los experimentos.

4.4. Cultivo primario de trofoblasto humano

El cultivo de trofoblasto se llevó a cabo mediante la técnica modificada de Kliman *et al.*, 1986. 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 lavados con solución salina al 0.9 % a temperatura ambiente con la finalidad de eliminar el exceso de sangre. Enseguida se separaron las membranas corioamnióticas, el tejido decidual y los vasos sanguíneos. Inmediatamente, se pesaron entre 35-40 g del tejido y se procesaron en matraces mediante 3 digestiones enzimáticas con tripsina y DNasa I en HBSS libre de Ca^{2+} y magnesio a 37°C por 20 min, cada digestión se realizó con la cantidad de reactivo tal como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Digestiones enzimáticas			
Digestión	HBSS 1X	Tripsina (1 mg / 5µL)	DNAsa
1	150 mL	750 µL	100 µL
2	100 mL	500 µL	75 µL
3	75 mL	350 µL	75 µL

Para recuperar las células se colectó el sobrenadante de las digestiones, colocando el matraz semi-acostado. Para las 2 primeras digestiones, se tomó la muestra hasta completar el llenado de 6 tubos falcon de 50 mL hasta completar 45 mL de muestra (2 por cada matraz), mientras que para la tercera digestión se tomó el resto de la muestra en los tubos que fueran necesarios. Durante cada colecta, a cada tubo se le adicionaron 3.5 mL de SFB inactivado y después se centrifugaron a 3000 rpm a 37° C. Al término de cada centrifugación, se aspiró el sobrenadante con ayuda de una bomba de vacío y se agregó 600 µL de medio F12. De cada digestión, se tomó el botón celular completo (fase blanca y roja) de la mitad de los tubos mientras que de la otra mitad solo se tomó la fase blanca, la muestra se colectó en un nuevo tubo.

El volumen total de la muestra colectada fue repartido por igual sobre 3 gradientes de percoll previamente elaborados en 3 tubos falcon de 50 mL (Tabla 2), después de depositar la muestra con ayuda de un pipetor en la parte superior del percoll, se sometieron a una nueva centrifugación a 3000 rpm durante 20 min a 37°C.

Tabla 2. Gradiente de percoll			
% de Percoll	Percoll al 90% * (mL)	HBSS 1x (mL)	N° de tubo
70	2.33	0.67	1
65	2.17	0.83	2
60	2.00	1.00	3
55	1.83	1.17	4
50	1.67	1.33	5
45	1.50	1.50	6
40	1.33	1.67	7
35	1.17	1.83	8
30	1.00	2.00	9
25	0.83	2.17	10
20	0.67	2.33	11
15	0.50	2.50	12
10	0.33	2.67	13
5	0.17	2.83	14

Para obtener el percoll al 90% con un gradiente de densidades del 5% al 70%, se colocan 18 mL de percoll al 100% en un tubo cónico de 50 mL estéril, y se agregan 2 mL de HBSS 10x, esto por triplicado.

Después de la centrifugación, se recuperaron las células de citotrofoblasto ubicadas a una densidad entre 1.048 g/mL a 1.062 g/mL, con ayuda de una bomba de vacío se succionó la parte superior hasta aproximadamente el valor de 25 mL marcado en el tubo y con ayuda de una pipeta serológica se recuperó la banda de interés (ubicada entre los 25 a 15 mL del tubo) en nuevos tubos falcon, el resto del percoll se desechó.

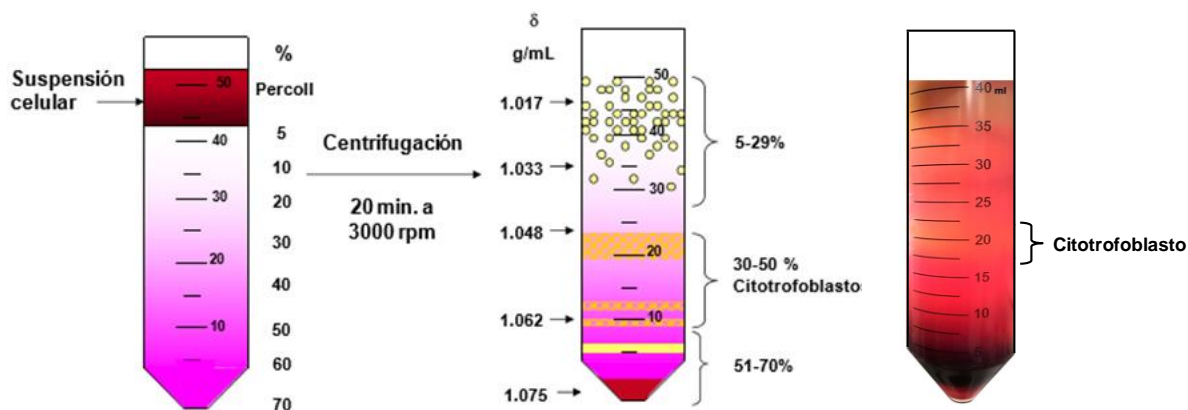


Figura 3. Gradiente de percoll. Los dibujos muestran la ubicación de las células de interés, las cuales se ubican entre 1.062-1.048 g/mL del gradiente. Como se aprecia en la imagen, la banda celular de citotrofoblastos se encuentra alrededor de los 20 mL del tubo de falcón (Noyola, 2011).

Una vez recuperadas las células de citotrofoblasto, se lavaron con la adición de medio F12 a cada tubo hasta completar los 45 mL, se balancearon los 3 tubos y se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min a 37°C. Después de este lavado, la muestra se trasladó al cuarto de cultivo, se decantó el sobrenadante en un vaso de precipitado y el botón celular de los tres tubos se re-suspendieron y juntaron en un volumen total de 20 mL de medio de siembra DMEM-HG suplementado al 10 % con SFT y 100 unidades de penicilina y estreptomina.

De la muestra, se realizó una dilución 1 en 10 con azul tripano, y se contaron las células obtenidas con ayuda de una cámara de Neubauer. Para determinar la cantidad total de células, se contaron las células de tres cuadrantes de la cámara, se promedió el número celular, el cual fue multiplicado por diez (dilución), por diez mil (constante) y por el volumen en el que se re-suspendió (20 mL).

Con el número total obtenido, se sembraron a razón de 2, 500, 000 células por pozo en cajas de cultivo de 6 pozos con 2 mL de medio y se incubaron durante 24 horas, transcurrido este tiempo se realizaron lavados con medio F12 con la finalidad de retirar las células no adherentes. A las 48 h de siembra, se realizaron los tratamientos correspondientes con calcitriol incubando los cultivos por 24 h más (Tabla 3).

Tabla 3. Diseño experimental para los tratamientos en el cultivo primario	
Tratamiento	N° de pozo
Vehículo (etanol 0.1 %)	1-3
Calcitriol [10 nM]	4-6
Calcitriol [100 nM]	7-9

Transcurrido el tiempo de incubación con los tratamientos, las cajas se retiraron de la incubadora y se llevaron al laboratorio para llevar a cabo las técnicas de biología molecular correspondientes:

4.5. Extracción del RNA total

Para la extracción del RNA total, se succionó el medio con una trampa de vacío. A los pozos sin medio pero aún con las células adheridas al fondo, se les agregó 500 μ L de trizol, un reactivo comercial que rompe el contenido celular, liberando y preservando la integridad del RNA. Con ayuda de scrapers se raspó cada pozo y con una micropipeta se colectó la muestra en tubos eppendorf de 1.5 mL estériles. Inmediatamente, se agregó a cada tubo 200 μ L de cloroformo, se homogenizaron por agitación y se centrifugaron a 12, 000 rpm durante 20 min a 4°C.

Mediante este procesamiento se obtuvieron 3 fases acuosas, la fase superior transparente que contenía el RNA total, se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL y el resto se desechó. A la muestra transferida se le agregaron 500 μ L de isopropanol, se agitaron y se dejaron precipitar por 24 horas a -20°C . Transcurrido el tiempo, las muestras se volvieron a agitar y se centrifugaron a 13, 200 rpm por 20 min a 4°C . Después, de un solo golpe suave se decantaron los tubos cuidando de no perder el botón celular, se reincorporó el tubo y se agregó 1 mL de etanol al 70 % tratado con dietil-pirocarbonato (DEPC). Se agitaron los tubos y se centrifugaron nuevamente a 13, 200 rpm durante 20 min. En la etapa final, se volvió a decantar el sobrenadante y dejando invertido cada tubo sobre una gasa estéril, se dejaron para que por evaporación se perdiera el etanol residual. Al final a cada muestra se le agregó 22 μ L de agua tratada con DEPC y se guardaron hasta leer su absorbancia a -70°C [Chomczynski y Sacchi, 1987].

4.6. Cuantificación del RNA total

Para la cuantificación del RNA total, se utilizó el espectrofotómetro Synergy y el programa de análisis Gene 5. Se calibró el aparato usando una placa de 16 pozos poniendo 2 μ L de agua tratada con DPEC como muestra blanco y posteriormente después de limpiar la placa, se leyeron las muestras correspondientes. Los resultados se cuantificaron a una longitud de onda de 260 y 280 nm, esta relación (260/280), nos indica la calidad de la muestra, teniendo una mayor pureza cuando se obtiene un valor cercano a 2.0, mientras que las muestras con un valor menor de 1.6 se descartaron del estudio.

4.7. Retrotranscripción

La retrotranscripción, o transcripción reversa es una técnica que permite sintetizar DNA complementario (cDNA) a partir de moléculas de RNA mediante el uso de la enzima transcriptasa reversa. Así, el cDNA obtenido es la cadena complementaria de la cadena molde de RNA. Para ello, se usó el estuche comercial Transcriptor First Strand cDNA Synthesis de Roche y se siguieron las indicaciones del fabricante. En tubos eppendorf de 200 μL estériles se depositaron los μL necesarios para cubrir 1 μg de RNA total de cada muestra, luego se agregó 1 μL de oligo dT 50 pmol/ μL y se ajustó a un volumen de 15 μL por tubo con agua grado PCR (mix 1). Se colocaron los tubos dentro del termociclador previamente calibrado durante 10 min a 65°C, con la finalidad de eliminar estructuras secundarias, posteriormente los tubos se colocaron en una placa fría durante 1 min y se agregaron 7 μL de la mezcla de reacción 2 (Tabla 4), después las muestras se regresaron nuevamente al termociclador durante 30 min a 55°C, a 85°C durante 5 min y finalmente a 4°C. Los tubos se colocaron en una gradilla y se conservaron a -20°C hasta su uso.

Tabla 4. Mezcla de reacción para la obtención de DNAc	
Reactivo	Cantidad por tubo μL
Solución amortiguadora 5 X	4 μL
Inhibidor de RNAsas	0.5 μL
Mezcla de desoxinucleótidos	2 μL
Transcriptasa reversa	0.5 μL

4.8. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

La técnica de qPCR se llevó a cabo usando el estuche LightCycler Taqman Master con el sistema de sondas de hidrólisis Taqman. Las sondas de hidrólisis son oligonucleótidos muy pequeños que contienen un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia y un aceptor en el extremo 3' que absorbe dicha fluorescencia cuando la sonda está intacta. Durante la amplificación génica, la DNA polimerasa rompe la sonda desprendiendo el extremo aceptor y liberando al flourocromo, [Costa, 2004] la cantidad de fluorescencia emitida es detectada por el equipo siendo esta proporcional a la cantidad de amplicones presentes en cada ciclo, es decir, cuantas más réplicas de la cadena se obtengan más fluorescencia se registra.

Así, para llevar a cabo esta técnica, se usó el cDNA previamente obtenido por retrotranscripción, los oligos y la sonda marcada con el flourocromo de los genes de interés, agua y la enzima Taqman de acuerdo a la mezcla 1 descrita en la Tabla 5.

Tabla 5. Mezcla de reacción para realizar la qPCR			
MIX	1	37	333 / 37
H2O	7.2	266.4	
sonda	0.1	3.7	
upp	0.1	3.7	
low	0.1	3.7	
master	1.5	55.5	
Total	9	333	=9

Por cada 9 μL de mezcla se le añadió 1 μL de cDNA, los cuales fueron depositados en los pozos de la micro placa de 96 pozos para PCR. La placa fue cubierta con un plástico adherible y se centrifugó para llevar todo el material al fondo de cada pozo. La amplificación se llevó a cabo usando el termociclador Light Cycler 480 de Roche, con el protocolo indicado en la Tabla 6. Los resultados obtenidos fueron normalizados con el gen constitutivo gliceraldeído 3 fosfato (GAPDH).

Tabla 6. Protocolo de la qPCR			
	Ciclos	Temperatura °C	Segundos
Activación de la enzima "Taqman"	1	95	600
PCR	55		
Desnaturalización		95	10
Alineación		60	30
Elongación		72	1
Enfriamiento	1	40	30

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En este estudio se utilizaron 6 placentas diferentes, los tratamientos fueron por triplicado y se compararon contra el vehículo. Los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística de Análisis de Varianza (ANOVA), utilizando el software SigmaPlot 11.0 y se consideraron significativamente diferentes cuando el valor de $p \leq 0.05$. Los resultados se compararon y expresaron como la media \pm la desviación estándar (DE).

6.- RESULTADOS

6.1.- Cultivo primario de trofoblasto humano

Las células de citotrofoblasto en cultivo tienen la capacidad de realizar proyecciones citoplasmáticas, las cuales les sirven para fusionarse entre sí y formar células multinucleadas llamadas sinciciotrofoblastos. Este proceso se puede apreciar en la Figura 4, donde se muestran fotos de los cambios morfológicos de las células en cultivo desde el día de la siembra y a través de 3 días de cultivo celular, es decir, a las 24, 48 y 72 h de cultivo.

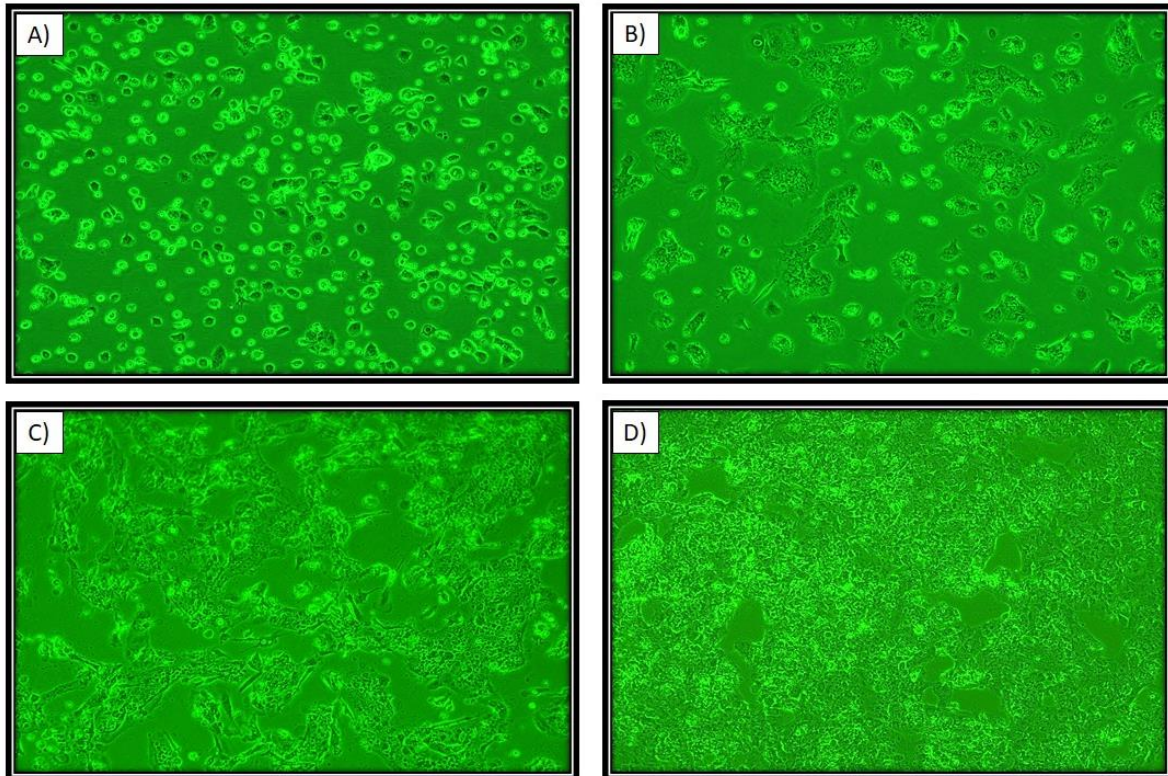


Figura 4. Diferenciación del citotrofoblasto hacia sinciciotrofoblasto. A) Células recién sembradas, tiempo 0, (citotrofoblastos) B) células con 24 h de cultivo, los citotrofoblastos empiezan las proyecciones citoplasmáticas, C) 48 h de cultivo, transición avanzada de cito a sincicios, D) 72 h del cultivo, formación de sinciciotrofoblastos (agregados celulares multinucleados). Imágenes tomadas con un objetivo al 10X.

6.2 Expresión génica de la hCG a tres días de diferenciación celular

Este evento corresponde al proceso de diferenciación que tienen estas células y que es acompañado por cambios no solo de forma sino endocrinológicos, ya que entre más diferenciado el trofoblasto tiene mayor producción de hormonas tanto glicoprotéicas como esteroides [Noyola-Martínez *et al.*, 2017b; Barrera *et al.*, 2008b].

Por lo tanto, como control adicional de nuestro modelo experimental, en la Figura 5 se muestra la expresión génica de la hCG a lo largo de tres días de diferenciación celular. Nótese que conforme avanzan los días, la expresión es mayor y significativamente diferente con respecto al día uno.

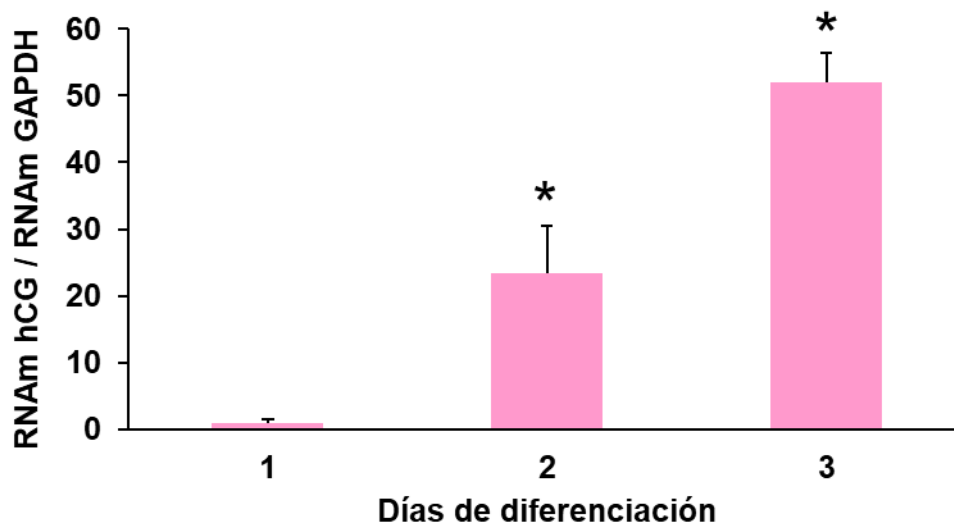


Figura 5. Expresión génica de la hCG durante tres días de cultivo celular. Los datos muestran la media \pm DE de $n=3$, * $p < 0.05$ vs día 1 al que se le dio el valor de 1.

6.3.- Perfil de la expresión basal génica del TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 durante la diferenciación celular del trofoblasto en cultivo

También se evaluó y comparó la expresión génica de las 3 isoformas del TGF- β a lo largo de 3 días de cultivo. Como se aprecia en la Figura 6, la expresión de las tres isoformas fue detectada en nuestro modelo biológico pero a diferencia de la hCG, los resultados mostraron que la expresión de las tres isoformas disminuye paulatinamente conforme avanzan los días de cultivo.

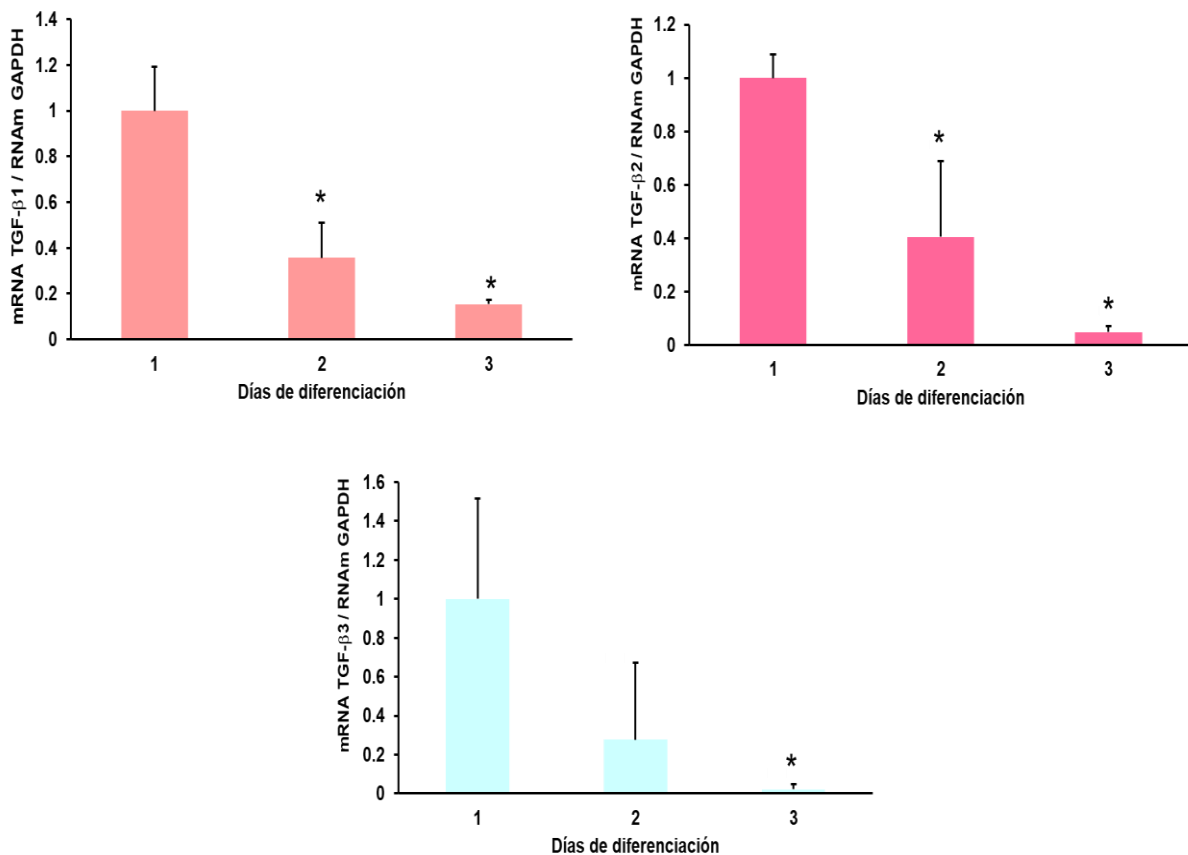


Figura 6. Expresión basal de las isoformas de los 3 TGF- β s durante 3 días de diferenciación. La expresión fue evaluada por qPCR. Los datos muestran la media \pm DE de n=3, *p < 0.05 respecto al día 1 al que se le atribuyó el valor de 1.

6.4.- Comparación de la expresión génica de los TGF- β s y sus receptores en el trofoblasto en cultivo

Al comparar la expresión entre los diferentes TGF- β s, se observó que el TGF- β 1 es la isoforma predominante seguida con diferencias significativas en menor orden de expresión por el TGF- β 2 y el TGF- β 3, respectivamente (Figura 7A).

Por otra parte, el análisis de los resultados mostró que el TGF β R2 tiene mayor expresión comparado con el TGF β R1 en los sinciotrofoblastos (Figura 7B).

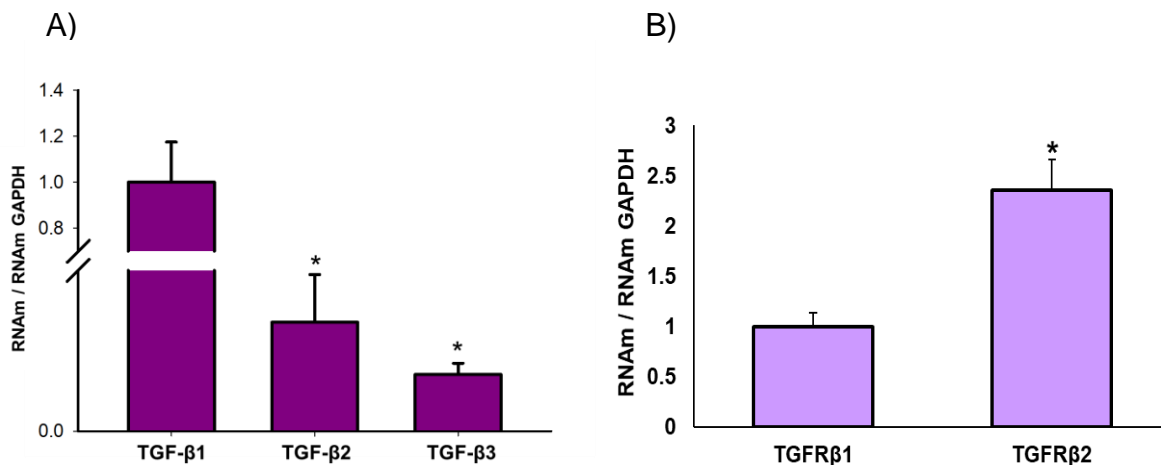


Figura 7. Comparación de la expresión basal de los TGF- β s y sus receptores en sinciotrofoblastos. A) Comparación de la expresión génica de los TGF- β 's y B) expresión diferencial entre los TGF β R's. Al dato del TGF- β 1 y del TGF β R1 se les atribuyó el valor de 1. Los datos muestran la media \pm DE de n=3, *p < 0.05 vs TGF- β 1 o TGF β R1.

6.5.- Efecto del calcitriol sobre la expresión génica del TGF- β 1, TGF- β 2 y

TGF- β 3

En la Figura 8, se muestra el efecto del calcitriol (10 y 100 nM) sobre la expresión génica de las tres isoformas del TGF- β . Como se aprecia, el calcitriol inhibe la expresión de las tres isoformas.

En particular, el efecto significativamente inhibitorio del calcitriol sobre el TGF- β 1 fue a la concentración de 10 nM mientras que para el TGF- β 2 la inhibición fue equipotencial. En cuanto al TGF- β 3, el efecto ejercido por el calcitriol fue dependiente de la concentración, es decir, a mayor concentración mayor efecto fue observado.

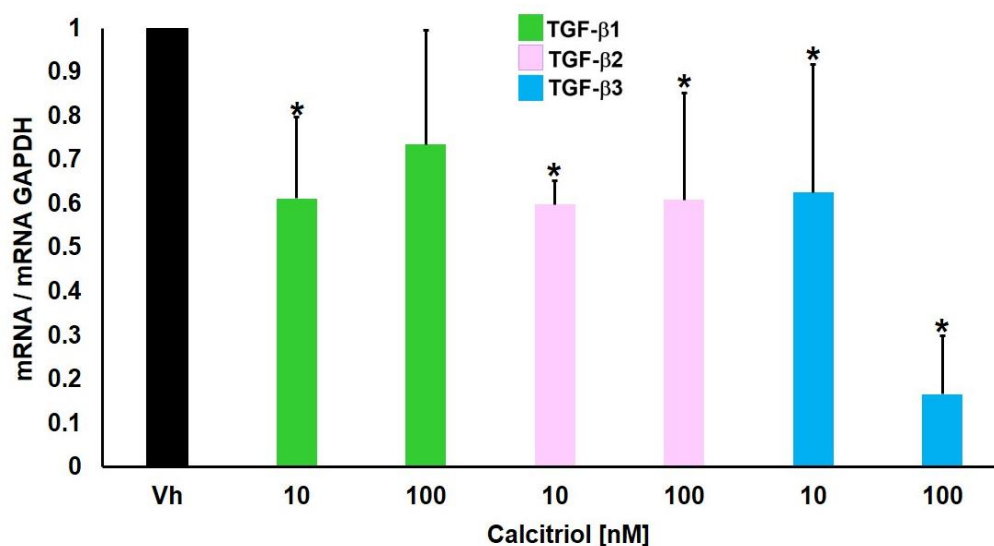


Figura 8. Expresión génica de los TGF- β s en ausencia y presencia de calcitriol. Las células fueron incubadas con calcitriol (10 y 100 nM) durante 24 horas. Al vehículo (vh) se les atribuyó el valor de 1. Los datos muestran la media \pm DE de n=3, *p < 0.05 vs vh.

6.6.- Efecto del calcitriol sobre la expresión génica del receptor TGFβR1 y el TGFβR2

En cuanto a la expresión génica del receptor TGFβR1 y el TGFβR2 en ausencia y presencia del calcitriol (10 y 100 nM), los resultados mostraron que, similar a los ligandos el calcitriol inhibe la expresión de ambos receptores de una manera dependiente de la concentración (Figura 9).

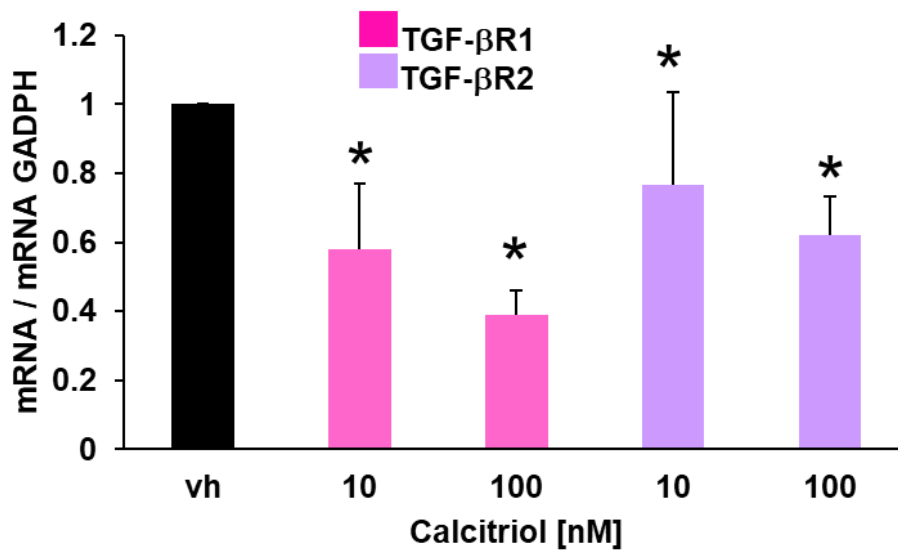


Figura 9. Expresión génica del TGFβR1 y TGFβR2 en ausencia y presencia del calcitriol. Las células fueron incubadas con calcitriol durante 24 horas. Al vehículo (vh) se les atribuyó el valor de 1. Los datos muestran la media ± DE de n=3, *p < 0.05 vs vh.

Nótese que los datos mostraron que el calcitriol inhibió la expresión del TGFβR1 y TGFβR2 en un 42 y 61 % y 23.3 y 38 % a las concentraciones de 10 y 100 nM, respectivamente, comparadas con el vh. Siendo así, la expresión génica del TGFβR1 más sensible al efecto inhibitorio del calcitriol que el TGFβR2.

7.- DISCUSIÓN

La placenta es un órgano indispensable para la sobrevivencia de un nuevo ser, en el cual, su adecuado desarrollo favorecerá su óptimo funcionamiento para llevar a cabo la gestación. Entre las múltiples moléculas producidas en el microambiente materno-placentario, las hormonas y los factores de crecimiento controlan y coordinan la formación placentaria de una manera dependiente del espacio y del tiempo [Noyola-Martínez *et al.*, 2019]. Por lo tanto, es interesante conocer y evaluar el efecto de los factores que regulan las fluctuaciones de hormonas, proteínas y diversas moléculas sintetizadas por el trofoblasto, lo que permitirá entender la compleja red de eventos involucrados en el desarrollo de la placenta.

En el presente trabajo, mostramos que el trofoblasto en cultivo de células obtenidas de placentas a término, se diferenciaron morfológicamente con el transcurso del tiempo, observándose un cambio paulatino de células mononucleares hacia agregados multinucleares, adquiriendo un fenotipo sincicial a los tres días de cultivo con características funcionales y endocrinológicas particulares como previamente ha sido descrito [Noyola-Martínez *et al.*, 2017b; Barrera, 2013], y corroborado con la determinación de la hCG, lo cual validó nuestro modelo experimental.

En general, se sabe que el calcitriol y el TGF- β son moléculas de familias no relacionadas que pueden tener acciones similares y en ocasiones opuestas sobre el crecimiento, la diferenciación, la migración y la invasión celular de manera tejido específico incluyendo el linaje trofoblástico. Sin embargo, a la fecha se desconocía

el perfil de expresión de las diferentes isoformas del TGF- β y sus receptores en las diferentes etapas de diferenciación del trofoblasto en cultivo obtenidas de placentas a término y la posible regulación de ellos por el calcitriol en este tejido.

Los resultados obtenidos en este estudio, mostraron que las tres isoformas del TGF- β se expresan tanto en células citotrofoblásticas como sinciotrofoblásticas. Además, se observó que la expresión génica de las tres isoformas disminuye significativamente conforme avanzan los días de diferenciación, lo cual concuerda con la reducción en la expresión génica reportada para citocinas de tipo pro-inflamatorio [Noyola-Martínez *et al.*, 2013].

Además, en esta tesis, la comparación en veces de expresión entre las 3 isoformas mostró que la isoforma predominante en el trofoblasto fue el TGF- β 1, seguida del TGF- β 2 y con menor expresión el TGF- β 3, resultados similares fueron previamente reportados [Schilling, B., y Yeh, J. 2000]. Considerando que las muestras de placenta fueron obtenidas de mujeres con embarazos normoevolutivos, estos datos son relevantes ya que contrastan con hallazgos mostrados en la literatura de placentas de mujeres con preeclampsia, en las cuales de manera opuesta se ha reportado un incremento del TGF- β 3 comparado con las otras isoformas [Caniggia *et al.*, 1999].

En cuanto a los receptores, se observó que el TGF β R2 tiene mayor expresión que el TGF β R1, aunque el significado biológico de este hallazgo es desconocido, es

probable que este dato esté relacionado directamente con la vía de señalización del TGF- β , ya que la unión inicial del ligando es con el TGF β R2 y secundado por la interacción con el TGF β R1, sugiriendo así, mayor oportunidad del ligando para interaccionar con el receptor primario.

De manera interesante, los resultados mostraron que el tratamiento con calcitriol inhibe la expresión génica tanto del TGF- β 1, TGF- β 2 y del TGF- β 3 así como de los receptores TGF β R1 y TGF β R2.

Estos resultados nos permiten hacer las siguientes consideraciones:

1) En el trofoblasto en cultivo, el calcitriol es un regulador negativo de las tres isoformas del TGF- β , siendo un mediador natural de la exacerbada síntesis de esta citocina en el microambiente placentario.

2) El calcitriol ejerce un efecto dependiente del tipo celular, ya que por el contrario, se ha reportado en la línea celular de cáncer de próstata PC-3, que el calcitriol induce la síntesis del TGF- β y mediante esta acción media los eventos anti proliferativos de este tipo celular. Si bien, las células trofoblásticas no son cancerígenas, sí comparten ciertas similitudes, como lo son los eventos proliferativos, de diferenciación, migración e invasión celular. Por lo cual, los resultados refuerzan el concepto de que el trofoblasto es un tipo celular altamente regulado que responde de manera diferencial a los compuestos.

3) El calcitriol regula la síntesis de los receptores evitando una sobre expresión de las vías de señalización utilizada por el TGF- β o por factores relacionados a esta familia de crecimiento, atenuando así, los efectos adversos que pudieran llevar a cabo una deficiente placentación asociada al incremento y/o exacerbadas concentraciones del TGF- β tal como se observa en mujeres con preeclampsia.

En efecto, en mujeres con preeclampsia, padecimiento en el cual se han evaluado concentraciones séricas incrementadas del TGF- β y deficiente producción de calcitriol comparadas con las de una mujer normotensa, existen problemas de placentación [Luo *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2012; Graham, 1997; Cheng *et al.*, 2017; Caniggia *et al.*, 1999; Prossler *et al.*, 2014; Yi *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2015; Ogasawara *et al.*, 2000; Peraçoli *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2015; Shaarawy *et al.*, 2001; Ávila *et al.*, 2007; Barrera *et al.*, 2007b; Olmos-Ortiz *et al.*, 2015a; Halhali *et al.*, 1991; Stephanou *et al.*, 1994; H. Du *et al.*, 2005; Halhali *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2009; Barrera, 2013; Li *et al.*, 201, Noyola-Martínez *et al.*, 2013.], por lo cual, restablecer el aporte de calcitriol en aquellas personas deficientes de esta vitamina podría ayudar en la regulación del TGF- β para prevenir o aminorar los efectos adversos que se pudieran dar por esta citocina. Aunque se desconoce si estos cambios son una causa o consecuencia de este padecimiento, es claro que estas moléculas se requieren en concentraciones adecuadas para el éxito del embarazo.

De lo anterior, no se descartan regulaciones adicionales producto de la interacción entre las vías de señalización del calcitriol con el TGF- β para mediar algunas funciones biológicas, ya que se ha descrito en otros tipos celulares que el VDR activado puede interaccionar con las proteínas Smad3, y en conjunto tener efectos sinérgicos o antagónicos sobre blancos moleculares específicos [Yanagisawa *et al.*, 1999; Solomon *et al.*, 2014]. Sin embargo, si este tipo de regulación existe en el trofoblasto aún no ha sido explorado.

Finalmente, los resultados permiten sugerir al calcidiol (precursor del calcitriol), como suplemento para prevenir y/o aminorar padecimientos en los cuales se ha reportado una deficiente placentación ocasionada en parte por las acciones no controladas del TGF- β , como ha sido sugerido en pacientes con preeclampsia.

8. - CONCLUSIONES

1. La expresión génica de los TGF- β s disminuye significativamente con la diferenciación del trofoblasto en cultivo.
2. La expresión génica del TGF- β 1 es predominante comparada con el TGF- β 2 y TGF- β 3, respectivamente.
3. La expresión génica del TGF β R2 es mayor que la del TGF β R1.
4. El calcitriol es un regulador negativo de la expresión génica de los TGF- β s y sus receptores.
5. Se recomienda la suplementación con vitamina D en aquellas mujeres embarazadas que cursen con deficiencia de esta vitamina.

9.- PERSPECTIVAS

Evaluar el efecto del calcitriol en combinación con el TGF- β sobre blancos moleculares relacionados con la proliferación, invasión y migración celular.

Estudiar si las vías de señalización inducidas por el TGF- β son afectadas en presencia del calcitriol.

Recíprocamente, evaluar si el TGF- β afecta las enzimas relacionadas con el metabolismo del calcitriol.

10. – BIBLIOGRAFIA

Albers, R., Selesniemi, K., Natale, D., y Brown, T. (2018). TGF- β induces Smad2 Phosphorylation, ARE Induction, and Trophoblast Differentiation. *International journal of stem cells*, 11(1), 111-120.

Ávila E., Barrera D. y Díaz L. (2007). Acciones calciotrópicas de la hormona paratiroidea y del sistema endocrino de la vitamina D. *Revista de Investigación Clínica*, 59(4), 306-317.

Barrera, D., Avila, E. y Díaz, L. (2007a). Papel inmunológico de la progesterona en el mantenimiento del embarazo. *Revista de investigación clínica*, 59(2), 139-145.

Barrera D., Ávila E., Hernández G, Halhali A., Biruete B., Larrea F. y Díaz L. (2007b). Estradiol and progesterone synthesis in human placenta is stimulated by calcitriol. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 103, 529–532.

Barrera Hernández, D. (2013). *Acciones biológicas del calcitriol en la placenta humana* (Primera ed). México, UNAM, Coordinación de estudios de posgrado, 1-88.

Barrera, D., Avila, E., Hernández, G., Méndez, I., González, L., Halhali, A., Larrea, F., Morales I., y Díaz, L. (2008a). Calcitriol affects hCG gene transcription in cultured human syncytiotrophoblasts. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 6(1), 3.

Barrera, D., Chirinos, M., y Garcia-Becerra, R. (2008b). Mechanism of regulation of synthesis and secretion of human Chorionic Gonadotropin (hCG) during pregnancy. *Revista de Investigación Clínica*, 60(2), 124-132.

Blanes, R. y Vaca, R. (2015). Tratado de Reproducción Humana para Enfermería. Fecundación, desarrollo embrionario e implantación, 55-67. Sociedad española de fertilidad.

Caniggia, I., Grisaru-Gravnosky, S., Kuliszewsky, M., Post, M., y Lye, S. (1999). Inhibition of TGF- β 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *The Journal of clinical investigation*, 103(12), 1641-1650.

Caniggia, I., Winter, J., Lye, S., y Post, M. (2000). Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta*, 21, S25-S30.

Cecati, M., Sartini, D., Campagna, R., Biagini, A., Ciavattini, A., Emanuelli, M., y Giannubilo, S. (2017). Molecular analysis of endometrial inflammation in preterm birth. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 63(3), 51-57.

Cheifetz, S., Hernandez, H., Laiho, M., Ten Dijke, P., Iwata, K., y Massagué, J. (1990). Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 265(33), 20533-20538.

Cheng, J., Chang, H., y Leung, P. (2017). TGF- β 1 Inhibits Human Trophoblast Cell Invasion by Upregulating Connective Tissue Growth Factor Expression. *Endocrinology*, 158(10), 3620-3628.

Cheng, J., Chang, H., Fang, L., Sun, Y., y Leung, P. (2015). TGF- β 1 up-regulates connexin43 expression: A potential mechanism for human trophoblast cell differentiation. *Journal of cellular physiology*, 230(7), 1558-1566.

Cheng, J., Chang, H., y Leung, P. (2013). Transforming growth factor- β 1 inhibits trophoblast cell invasion by inducing Snail-mediated down-regulation of vascular endothelial-cadherin protein. *Journal of Biological Chemistry*, 288(46), 33181-33192.

Cheruku, R., Mohamedali, A., Cantor D., Tan S., Nice, E., y Baker, M. (2015). Transforming growth factor- β , MAPK and Wnt signaling interactions in colorectal cáncer. *EuPA Open Proteomics*, 8, 104-115.

Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1), 156-159.

Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(5), 299-305.

Darmochwal-Kolarz, D., Michalak, M., Kolarz, B., Przegalinska-Kalamucka, M., Bojarska-Junak, A., Sliwa, D., y Oleszczuk, J. (2017). The Role of Interleukin-17, Interleukin-23, and Transforming Growth Factor- β in Pregnancy Complicated by Placental Insufficiency. *BioMed research international*, 2017.

De la Fuente Hernández, L. A. (2015). *Tratado de Reproducción Humana para Enfermería*. Gametogénesis, fecundación, determinación del sexo, nidación y placentación, 43-53. Sociedad española de fertilidad.

Díaz L., Cariño C., Méndez I. (2001). La vitamina D: implicaciones en la salud y el embarazo. *La Revista de Investigación Clínica* 53(1), 77-85.

Díaz L., Noyola-Martinez N., Barrera D., Hernandez G., Avila E., Halhali A. y Larrea F. (2009). Calcitriol inhibits TNF- α -induced inflammatory cytokines in human trophoblasts. *Journal of Reproductive Immunology*, 81 (1),17-24.

Donnelly, L., y Campling, G. (2011). Functions of the placenta. *Anaesthesia & intensive care medicine*, 12(3), 111-115.

Emanuelli, M., Giannubilo, S., Landi, B., Sartini, D., Pierella, F., Corradetti, A., y Tranquilli, A. (2008). Placental overexpression of transforming growth factor- β 3 in the HELLP syndrome. *Gynecologic and obstetric investigation*, 65(1), 1-5.

Graham, C., y Lala, P. (1991). Mechanism of control of trophoblast invasion in situ. *Journal of cellular physiology*, 148(2), 228-234.

Graham, C. (1997). Effect of transforming growth factor- β on the plasminogen activator system in cultured first trimester human cytotrophoblasts. *Placenta*, 18(2-3), 137-143.

H. Du, G.S. Daftary, S.I. Lalwani, H.S. Taylor, (2005). Direct regulation of HOXA10 by 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ in human myelomonocytic cells and human endometrial stromal cells. *Mol. Endocrinol*, 19(9) 2222-2233.

Halhali A., Acker GM, y Garabédian M. (1991). 1.25-dihydroxyvitamin D $_3$ induces in vivo the decidualization of rat endometrial cells. *J Reprod-Fert*, 91(1), 59-64.

Halhali A., Figueras A. G., Díaz L., Avila E., Barrera D., Hernández G. y Larrea F. (2010). Effects of calcitriol on calbindins gene expression and lipid peroxidation in human placenta. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 121(1-2), 448-451.

Hamilton, W. J., y Boyd, J. D. (1960). Development of the human placenta in the first three months of gestation. *Journal of anatomy*, 94(Pt 3), 297-328.

Hii, C., y Ferrante, A. (2016). The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients*, 8(3), 135.

Holick, M. F., MacLaughlin, J. A., Clark, M. B., Holick, S. A., Potts, J. T., Anderson, R. R., ... y Elias, P. (1980). Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science*, 210(4466), 203-205.

Jones, R., Stoikos, C., Findlay, J., y Salamonsen, L. (2006). TGF- β superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction*, 132(2), 217-232.

Kliman, H. J., Nestler, J. E., Sermasi, E., Sanger, J., y Strauss III, J. (1986). Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*, 118(4), 1567-1582.

Li, J., Byrne, M., Chang, E., Jiang, Y., Donkin, S., Buhman, K., ... y Teegarden, D. (2008). 1α , 25-dihidroxivitamina D hidroxilasa en adipocitos. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 112 (1-3), 122-126.

Li, N., Wu, H., Hang, F., Zhang, Y., y Li, M. (2017). Women with recurrent spontaneous abortion have decreased 25 (OH) vitamin D and VDR at the fetal-maternal interface. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 50(11), 1-6.

Librach, C., Feigenbaum, S., Bass, K., Cui, T., Verastas, N., Sadovsky, Y., ... y Fisher, S. (1994). Interleukin-1 beta regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 269(25), 17125-17131.

López-Casillas F. y Massagué J. (2003). TGF- β : receptores, señales y acciones. *Gac Méd Méx.*, 139(2), 139-143.

Lösel, R., y Wehling, M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(1), 46-55.

Luo, S., Yu, H., Wu, D., y Peng, C. (2002). Transforming growth factor- β 1 inhibits steroidogenesis in human trophoblast cells. *Molecular human reproduction*, 8(4), 318-325.

Lutz, M., y Knaus, P. (2002). Integration of the TGF- β pathway into the cellular signalling network. *Cellular signalling*, 14(12), 977-988.

Lyall, F., Simpson, H., Bulmer, J., Barber, A., y Robson, S. (2001). Transforming growth factor-beta expression in human placenta and placental bed in third trimester normal pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction. *The American journal of pathology*, 159(5), 1827-1838.

Martin, E., Ray, P., Smeester, L., Grace, M., Boggess, K., y Fry, R. (2015). Epigenetics and preeclampsia: defining functional epimutations in the preeclamptic placenta related to the TGF- β pathway. *PLoS One*, 10(10).

Massagué, J., Attisano, L., y Wrana, J. (1994). The TGF- β family and its composite receptors. *Trends in Cell Biology*, 4(5), 172-178.

Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA2-1993. Atención de la mujer durante el embarazo, parto y puerperio y del recién nacido. Criterios y procedimientos para la prestación del servicio.

Noyola Martínez, Nancy. (2011). *Efecto del calcitriol sobre la síntesis placentaria de citocinas pro-inflamatorias en la preeclampsia y regulación de CYP27B1 y CYP24A1 por TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β* (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Medicina.

Noyola-Martínez, N., Díaz, L., Ávila, E., Halhali, A., Larrea, F. y Barrera, D. (2013). Calcitriol downregulates TNF- α and IL-6 expression in cultured placental cells from preeclamptic women. *Cytokine*, 61 (1), 245-250.

Noyola-Martínez, N., Díaz, L., Zaga-Clavellina, V., Avila, E., Halhali, A., Larrea, F., y Barrera, D. (2014). Regulation of CYP27B1 and CYP24A1 gene expression by recombinant pro-inflammatory cytokines in cultured human trophoblasts. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 144, 106-109.

Noyola-Martínez, N., Halhali, A., Zaga-Clavellina, V., Olmos-Ortiz, A., Larrea, F., y Barrera, D. (2017a). A time-course regulatory and kinetic expression study of steroid metabolizing enzymes by calcitriol in primary cultured human placental cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 167, 98-105.

Noyola-Martínez, N., Halhali, A., Zaga-Clavellina, V., Olmos-Ortiz, A., Larrea, F., y Barrera, D. (2017b). A time-course regulatory and kinetic expression study of steroid metabolizing enzymes by calcitriol in primary cultured human placental cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 167, 98-105.

Noyola-Martínez, N., Halhali, A. y Barrera, D. (2019). Steroid hormones and pregnancy. *Gynecological Endocrinology* 35(5). 376-384.

Ogasawara, M., Aoki, K., Aoyama, T., Katano, K., Iinuma, Y., Ozaki, Y., y Suzumori, K. (2000). Elevation of transforming growth factor- β 1 is associated with recurrent miscarriage. *Journal of clinical immunology*, 20(6), 453-457.

Olmos-Ortiz, A., Ávila, E., Durand-Carbajal, M., y Díaz, L. (2015a). Regulation of calcitriol biosynthesis and activity: focus on gestational vitamin D deficiency and adverse pregnancy outcomes. *Nutrients*, 7(1), 443-480.

Olmos-Ortiz, A., Noyola-Martínez, N., Barrera, D., Zaga-Clavellina, V., Ávila, E., Halhali, A., ... y Díaz, L. (2015b). IL-10 inhibits while calcitriol reestablishes placental antimicrobial peptides gene expression. *The Journal of steroid biochemistry and*

molecular biology, 148, 187-193.

Olvera-Sánchez, S., Esparza- Perrusquía, M., Flores- Herrera, O., Urban-Sosa V. A. y Martínez, F. (2019). Aspectos generales del transporte de colesterol en la esteroidogénesis de la placenta humana. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico- Biológicas*, 22.

Palomero, G., Vázquez M., Vega J., Naves F. y Rodríguez C. (2000). *Lecciones de embriología*. Capítulo IV. Primera semana del desarrollo. Periodo de implantación, 46-55. Universidad de Oviedo.

Peraçoli, M., Menegon, F., Borges, V., de Araújo Costa, R., Thomazini-Santos, I., y Peraçoli, J. (2008). Platelet aggregation and TGF-beta1 plasma levels in pregnant women with preeclampsia. *Journal of reproductive immunology*, 79(1), 79-84.

Peralta-Zaragoza O., Lagunas-Martínez A., y Madrid-Marina V. (2001). Factor de crecimiento transformante beta -1: Estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. *Salud Publica de México*, 43(4).

Prossler, J., Chen, Q., Chamley, L., y James, J. (2014). The relationship between TGFβ, low oxygen and the outgrowth of extravillous trophoblasts from anchoring villi during the first trimester of pregnancy. *Cytokine*, 68(1), 9-15.

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

Schilling, B., y Yeh, J. (2000). Transforming growth factor-β1,-β2,-β3 and their type I and II receptors in human term placenta. *Gynecologic and obstetric investigation*, 50(1), 19-23.

Shaarawy, M., Meleigy, M., y Rasheed, K. (2001). Maternal serum transforming growth factor beta-2 in preeclampsia and eclampsia, a potential biomarker for the assessment of disease severity and fetal outcome. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 8(1), 27-31.

Shih, J. C., Lin, H. H., Hsiao, A. C., Su, Y. T., Tsai, S., Chien, C. L., y Kung, H. N. (2019). Unveiling the role of microRNA-7 in linking TGF- β -Smad-mediated epithelial-mesenchymal transition with negative regulation of trophoblast invasion. *The faseb journal*, 33, 1-15.

Solomon, J. D., Heitzer, M. D., Liu, T. T., Beumer, J. H., Parise, R. A., Normolle, D. P., ... y De Franco, D. B. (2014). VDR activity is differentially affected by Hic-5 in prostate cancer and stromal cells. *Molecular Cancer Research*, 12(8), 1166-1180.

Stephanou, A., Ross, R., y Handwerger, S. (1994). Regulation of human placental lactogen expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology*, 135(6), 2651-2656.

Stumpf, W.E. (1995). Vitamin D sites and Mechanism of action: A histochemical perspective. Reflections on the utility of autoradiography and cytopharmacology for drug targeting. *Histochem cell biol*, 104, 417-427.

Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., y Massagué, J. (1994). Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature*, 370(6488), 341-347.

Xu, J., Sivasubramaniyam, T., Yinon, Y., Tagliaferro, A., Ray, J., Nevo, O., ... y Caniggia, I. (2015). Aberrant TGF β signaling contributes to altered trophoblast differentiation in preeclampsia. *Endocrinology*, 157(2), 883-899.

Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Watanabe, M., Kashiwagi, K., ... y Kato, S. (1999). Convergence of transforming growth factor- β and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science*, 283(5406), 1317-1321.

Yi, Y., Cheng, J., Klausen, C., y Leung, P. (2018). TGF- β 1 inhibits human trophoblast cell invasion by upregulating cyclooxygenase-2. *Placenta*, 68, 44-51.

Zhao, H., Jiang, Y., Cao, Q., Hou, Y., y Wang, C. (2012). Role of integrin switch and transforming growth factor Beta 3 in hypoxia-induced invasion inhibition of human extravillous trophoblast cells. *Biology of reproduction*, 87(2):47, 1-7.

Zhou, Y., Fisher, S. J., Janatpour, M., Genbacev, O., Dejana, E., Wheelock, M., y Damsky, C. H. (1997). Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?. *The Journal of clinical investigation*, 99(9), 2139-2151.

Zhou, H., Fu, G., Yu, H., y Peng, C. (2009). Transforming growth factor-beta inhibits aromatase gene transcription in human trophoblast cells via the Smad2 signaling pathway. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7(1), 146.

Ciudad de México, 20 de julio de 2020
Oficio No. CI y CEI-236-2020
Asunto: Dictamen

DR. JUAN PABLO ARAGÓN HERNÁNDEZ
INVESTIGADOR PRINCIPAL INTERNO
DR. DAVID BARRERA HERNÁNDEZ
INVESTIGADOR PRINCIPAL EXTERNO
PRESENTE.

Se les comunica que en la Décima Sesión Ordinaria del Comité de Investigación y del Comité de Ética en Investigación, llevada a cabo el día 8 de julio del 2020, en relación con el protocolo titulado "Metabolismo y efectos de calcitriol en la placenta humana y líneas celulares: Efectos sobre la expresión del TGF- β y sus receptores en placenta" y registro 11-57-2016, se presentó solicitud de prórroga de doce meses, debido a la situación relacionada a la pandemia por SARS-COV-2

Los integrantes de los Comités dictaminaron su solicitud como:

Aprobada

La vigencia de este proyecto es hasta el 31 de agosto del 2021

PARA QUE PUEDA APLICAR ESTA PRÓRROGA ES INDISPENSABLE QUE ENTREGUE POR MEDIO DE UN OFICIO RESPUESTA LO SIGUIENTE:

- Calendario impreso apegándose al formato de la guía de protocolos de este Hospital, para ser incorporado al expediente del protocolo con esta nueva fecha de término.

SE LES RECUERDA QUE ES IMPORTANTE E INELUDIBLE SER PUNTUAL EN LA ENTREGA DE REPORTE TRIMESTRAL DE AVANCE EN EL FORMATO CORRESPONDIENTE (SE ANEXAN MES DE ENTREGA), DE LO CONTRARIO SE PUEDE REVOCAR LA PRORROGA OTORGADA.

Septiembre	2020
Diciembre	2020
Marzo	2021
Junio	2021
Agosto	Final 2021

Sin otro particular reciba un cordial saludo

ATENTAMENTE

Dr. Pablo Maravilla Campillo
Presidente
Comité de Investigación
MLR/fcv

Dr. Samuel Weingerz Mehl
Presidente
Comité de Ética en Investigación



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

CIUDAD DE MÉXICO, A 29 DE MAYO DE 2020
NO. OFICIO MCONTROL-589/2020
REG. CONBIOÉTICA-09-CEI-011-20160627

DR. DAVID BARRERA HERNÁNDEZ
INVESTIGADOR PRINCIPAL
DEPTO. BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN
AV. VASCO DE QUIROGA No. 15
COL. BELISARIO DOMÍNGUEZ SECCIÓN XVI
CIUDAD DE MÉXICO, C.P. 14080
P R E S E N T E

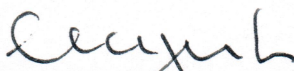
En respuesta a su atenta recibida el pasado 12 de mayo, con relación al Protocolo de Investigación Clínica, titulado:

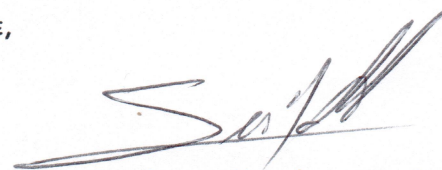
**"METABOLISMO Y EFECTOS DEL CALCITRIOL EN LA PLACENTA HUMANA Y LÍNEAS CELULARES:
EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN DEL TGF- β Y SUS RECEPTORES EN PLACENTA"
REF. 2510**

Le informamos que se toma conocimiento del estado actual del estudio, así mismo se **autoriza** la re-
aprobación anual, **con vigencia hasta el 29 de mayo de 2021.**

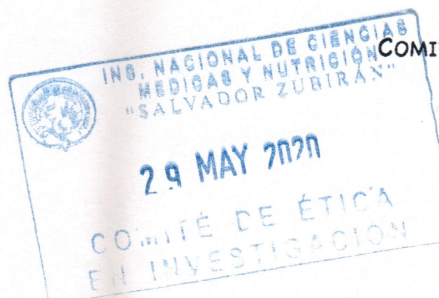
Sin más por el momento, quedamos de usted.

ATENTAMENTE,


DR. CARLOS ALBERTO AGUILAR SALINAS
PRESIDENTE
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN


DR. SERGIO HERNÁNDEZ JIMÉNEZ
SECRETARIO

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



Avenida Vasco de
Quiroga No. 15 CAAS/SHJ/ARV
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx