

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**Programa de Maestría y Doctorado
en Ciencias Bioquímicas**

**Regulación de las hidroxilasas de la vitamina D por el
calcitriol y el AMP cíclico en la placenta humana**

Tesis presentada por

Euclides Avila Chávez

Para optar al grado de Doctor en Ciencias (Bioquímicas)

Tutor: Dr. Fernando Larrea Gallo

México, D.F.

Noviembre 2006



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.

Regulación de las hidroxilasas de la vitamina D por el calcitriol y el AMP cíclico en la placenta humana

Reconocimientos

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Fernando Larrea Gallo en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

| | |
|-----------------------------|---|
| Dr. Fernando Larrea Gallo | Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán |
| Dra. Marta Menjívar Iraheta | Facultad de Química, UNAM |
| Dr. Diego González Halphen | Instituto de Fisiología Celular, UNAM |

El jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

| | | |
|------------|-----------------------------|---|
| Presidente | Dr. Edmundo Chávez Cossío | Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez |
| Vocal | Dra. Marta Menjívar Iraheta | Facultad de Química, UNAM |
| Vocal | Dr. Ignacio Camacho Arroyo | Facultad de Química, UNAM |
| Vocal | Dr. Armando Tovar Palacio | Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán |
| Secretario | Dr. Diego González Halphen | Instituto de Fisiología Celular, UNAM |
| Suplente | Dr. José Pedraza Chaverri | Facultad de Química, UNAM |
| Suplente | Dra. Martha Robles Flores | Facultad de Medicina, UNAM |

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 3 de noviembre de 2006.

Reconocimientos

Se reconoce al Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis.

Se agradece el apoyo incondicional del Dr. Fernando Larrea Gallo para realizar este proyecto. Es muy grato ser parte de su maravilloso grupo de trabajo.

Se agradece a los miembros de mi Comité Tutorial, Dra. Marta Menjívar Iraheta y Dr. Diego González Halphen por sus valiosas contribuciones para mejorar este trabajo.

Se reconoce el invaluable soporte técnico del M. en C. David Barrera Hernández y de los Doctores Lorenza Díaz Nieto y Ali Halhali Baghdad del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán durante el desarrollo de esta tesis.

Se reconoce la colaboración de la M. en C. Isabel Méndez Hernández y la Q.F.B. Leticia González Ibarra del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán en las mediciones de AMP cíclico.

Se reconoce la colaboración de la M. en C. Celeste Arranz del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán en la determinación de la actividad de la 1α -hidroxilasa en la línea celular JEG-3.

Se reconoce la colaboración del personal médico del Hospital de Gineco Obstetricia Luis Castelazo Ayala (IMSS) y del Hospital General Manuel Gea González (SSa) por la donación de las placentas.

Se reconoce a F. Hoffmann-La Roche LTD (Basilea, Suiza) por el donativo de los estándares de la vitamina D₃, así como a Schering AG (Berlín, Alemania) por el donativo del antagonista del VDR ZK 159222.

El proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 40979-M). Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de esta tesis (CONACyT 90449).

Se agradece a los integrantes del jurado por la revisión crítica de esta tesis.

Dedicatoria

Esta etapa de mi vida ha sido maravillosa porque ahora soy plenamente conciente de toda la enorme riqueza que me rodea. Tengo la suerte de disfrutar mas que nunca del amor infinito de mi familia. Además, durante mi andar por estos 35 años he cosechado amistades tan sólidas que estoy seguro seguirán cerca de mí el resto de mi vida. Sigamos caminando todos juntos, de manera armoniosa y llenos de amor.

Ahora que el día se ha fatigado,
que mi nostálgico deseo
sea acogido por la noche estrellada
como un niño cansado.

Manos, abandonad toda acción.
Mente, olvida todo pensamiento.
Ahora todos mis sentidos
quieren caer en el sueño.

Y el alma sin más guardián
quiere volar, liberadas sus alas,
en el círculo mágico de la noche,
para vivir profundamente mil veces.

(R. Strauss, tercera última canción)

Abreviaturas

| | |
|-------------------------|---|
| AMPc | monofosfato cíclico de 3,5-adenosina |
| 1 α -hidroxilasa | 25-hidroxicolecalciferol 1 α -hidroxilasa |
| 24-hidroxilasa | calcitriol 24-hidroxilasa |
| VDR | receptor del calcitriol |
| VDRE | elemento de respuesta al calcitriol |
| RXR | receptor X para retinoides |
| PTH | hormona paratiroidea |
| C/EBP β | proteína β de unión al potenciador CCAAT |
| PKA | proteína cinasa A |
| PKC | proteína cinasa C |
| H-89 | |
| ZK 159222 | |
| HBSS | solución salina balanceada de Hank |
| DMEM | medio de Eagle modificado por Dulbecco |
| SFB | suero fetal bovino |
| D-MEM/F-12 | mezcla nutritiva F-12 |
| hCG | gonadotropina coriónica humana |
| 8-Br AMPc | 8-Bromo AMPc |
| Ci | Curie |
| PVDF | fluoruro de polivinilideno |
| IBMX | 3-isobutil-1-metilxantina |
| RT-PCR | transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa |
| DNAc | DNA complementario |
| DE | desviación estándar |
| UI | unidades internacionales |
| fdx | ferredoxina |
| FR | ferredoxina reductasa |
| kDa | kilodalton |
| CRE | elemento de respuesta al AMPc |
| ICER | represor temprano inducible por AMPc |

Índice

| | |
|--|-----------|
| 1. Resumen | 1 |
| 2. Abstract | 2 |
| 3. Introducción | 3 |
| 3.1 La vitamina D | 3 |
| 3.2 Biosíntesis del calcitriol | 4 |
| 3.3 Catabolismo del calcitriol | 4 |
| 3.4 Acciones del calcitriol | 7 |
| 3.5 Regulación de la síntesis de los metabolitos del colecalciferol | 9 |
| 3.6 Regulación de la 1α-hidroxilasa y la 24-hidroxilasa del riñón por la calcemia y la fosfatemia | 10 |
| 3.7 Regulación de la 1α-hidroxilasa y la 24-hidroxilasa por el calcitriol | 12 |
| 3.8 El calcitriol y la función reproductiva | 12 |
| 3.9 Síntesis extrarrenal de calcitriol durante el embarazo | 12 |
| 3.10 La placenta y el calcitriol | 13 |
| 4. Justificación | 16 |
| 5. Objetivos | 17 |
| 6. Hipótesis | 17 |
| 7. Materiales y Métodos | 18 |
| 7.1 Material biológico | 18 |
| 7.2 Reactivos | 18 |
| 7.3 Cultivo celular | 18 |
| 7.4 Determinación de las actividades enzimáticas de la 1α-hidroxilasa y de la 24-hidroxilasa | 19 |
| 7.5 “Western blot” | 20 |
| 7.6 Determinación de AMPc | 21 |
| 7.7 Estudios de la expresión génica | 22 |
| 7.8 Obtención de las sondas moleculares | 23 |

| | |
|--|----|
| 7.9 Análisis estadístico | 24 |
| 8. Resultados | 25 |
| 8.1 Caracterización morfológica y funcional del cultivo primario de trofoblastos | 25 |
| 8.2 Efectos del AMPc sobre la expresión génica de proteínas implicadas en el metabolismo de la vitamina D ₃ en los trofoblastos en cultivo | 26 |
| 8.3 Efectos del calcitriol sobre la expresión y la actividad enzimática de la 1 α -hidroxilasa y la 24-hidroxilasa de la vitamina D ₃ en los trofoblastos en cultivo | 34 |
| 8.4 Efectos del AMPc sobre la regulación de la expresión de los genes de la 1 α -hidroxilasa y la 24-hidroxilasa mediada por el calcitriol | 34 |
| 8.5 Metabolismo de la vitamina D ₃ en la línea celular JEG-3 | 42 |
| 9. Discusión | 47 |
| 10. Conclusiones | 56 |
| 11. Perspectivas | 57 |
| 12. Referencias | 58 |
| 13. Anexos. Producción científica generada durante la realización de esta tesis | 73 |

1. Resumen

El calcitriol, la forma hormonal activa de la vitamina D₃, participa en múltiples procesos de gran importancia fisiológica. En varios modelos biológicos se ha demostrado que el calcitriol juega un papel relevante en la función reproductiva y que la placenta humana tiene la capacidad de sintetizar esta hormona. En el presente estudio investigamos los efectos regulatorios del AMP cíclico (AMPc) y el calcitriol en la síntesis de esta misma hormona usando como modelo trofoblastos humanos en cultivo. Se encontró que ambos factores disminuyeron la producción de calcitriol a través de la supresión del gen de la 1 α -hidroxilasa, la enzima encargada de la síntesis de esta hormona. Otro mecanismo por el cual se mantuvo la baja síntesis de calcitriol fue a través de la inducción de la expresión de la 24-hidroxilasa, la enzima que degrada al calcitriol. Demostramos además que estos efectos sobre las hidroxilasas de la vitamina D₃ se observan durante el proceso de diferenciación del trofoblasto *in vitro*, el cual depende de la acumulación intracelular de AMPc. El calcitriol produjo una rápida acumulación intracelular de AMPc, que a su vez estimuló la secreción de la gonadotropina coriónica humana (hCG), un marcador de la actividad endocrina del trofoblasto. Además presentamos evidencia de que el efecto inhibitor del calcitriol sobre el gen de la 1 α -hidroxilasa es mediado en parte por el AMPc. Con respecto a la 24-hidroxilasa, los resultados indicaron que el calcitriol fue el principal activador transcripcional a través del receptor de la vitamina D₃. Por otro lado, se demostró que la hormona paratiroidea y la calcitonina mimetizaron los efectos del AMPc sobre la expresión y la actividad enzimática de las hidroxilasas de la vitamina D₃. Finalmente, caracterizamos la regulación de la síntesis del calcitriol en las células JEG-3, utilizadas como un modelo de transformación neoplásica del trofoblasto. La síntesis de calcitriol en esta línea celular está abatida debido a alteraciones de la expresión de la 1 α -hidroxilasa. En conjunto, los resultados indican la regulación tejido-específica de las hidroxilasas de la vitamina D₃ en la placenta y apoyan el concepto de que la síntesis extrarrenal de calcitriol está relacionada con funciones autocrinas y/o paracrinas.

2. Abstract

The hormonally active form of vitamin D₃, calcitriol, is involved in many biological functions throughout the body, such as regulation of calcium homeostasis and cell proliferation. Several biological models have shown that calcitriol plays a key role in the reproductive function and it has been demonstrated that human placenta is able to synthesize calcitriol. In the present study we investigated the regulatory effects of calcitriol and cyclic AMP on calcitriol synthesis in cultured human trophoblasts. Calcitriol and activators of the protein kinase A signalling system decreased the enzyme activity and expression of 1 α -hydroxylase, the enzyme responsible of calcitriol synthesis. These factors also restricted calcitriol production through the induction of 24-hydroxylase, the major catabolic enzyme of calcitriol. The effects on vitamin D₃ hydroxylases were also shown during the cyclic AMP-dependent trophoblast differentiation *in vitro*. Furthermore, calcitriol rapidly generated intracellular cyclic AMP accumulation which in turn enhanced chorionic gonadotrophin secretion, a marker of trophoblast endocrine activity. We also presented evidence showing the participation of cyclic AMP in calcitriol-mediated downregulation of 1 α -hydroxylase gene expression. Calcitriol, acting through the vitamin D₃ receptor, was the most potent transcriptional inductor of trophoblastic 24-hydroxylase gene. In addition, our study also demonstrated a role of parathyroid hormone and calcitonin on vitamin D₃ hydroxylases gene regulation in placenta. Finally, we also studied the calcitriol metabolism in the choriocarcinoma cell line JEG-3 and found that calcitriol synthesis was restricted due to altered expression of 1 α -hydroxylase and 24-hydroxylase genes. The overall data suggest placental-specific vitamin D₃ endocrine system regulation and support the autocrine/paracrine actions of extrarenal calcitriol.

3. Introducción

El calcio es un elemento de gran importancia en la fisiología humana. Este elemento se localiza principalmente en el hueso, en reservas intracelulares y en el fluido extracelular. El mantenimiento de la concentración normal de calcio en la sangre es crucial para el organismo, ya que sus variaciones 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 intestino delgado, donde el calcio dietario se absorbe; el hueso, que funciona como un gran reservorio de calcio; y el riñón, donde se efectúa la reabsorción del calcio (1). Estos flujos están sujetos a control estricto por la hormona paratiroidea (PTH) y el calcitriol, el metabolito activo de la vitamina D₃. En términos generales, la PTH es la principal hormona involucrada en la regulación minuto a minuto de los niveles del calcio ionizado en el fluido extracelular mientras que el calcitriol controla el balance del calcio en el organismo día a día (1).

3.1 La vitamina D

La vitamina D fue descubierta hace casi un siglo como un factor nutricional liposoluble que protege del raquitismo (2). Los estudios epidemiológicos demostraron que esta enfermedad ósea se presenta en latitudes geográficas con poca exposición a la luz solar. Posteriormente se descubrió que la piel de los animales tiene la capacidad de sintetizar vitamina D en presencia de radiación solar (3).

El término vitamina D se refiere a dos compuestos relacionados conocidos como vitaminas D₂ y D₃, respectivamente. La vitamina D₂ o ergocalciferol es producida por células vegetales mientras que los animales son capaces de sintetizar vitamina D₃ o colecalciferol (3). En la tabla I se presentan distintos nombres triviales de metabolitos de la vitamina D₃ así como los nombres sistemáticos recomendados por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (4).

Tabla I. Nomenclatura de los metabolitos de la vitamina D₃ (4).

| Nombres triviales | Nombre sistemático |
|--|--|
| colecalfiferol; vitamina D ₃ ; calcicol | (5Z,7E)-(3S)-9,10-seco-5,7,10(19)-colestatrien-3-ol |
| 25-hidroxicolecalciferol; 25-hidroxivitamina D ₃ ; calcidiol | (5Z,7E)-(3S)-9,10-seco-5,7,10(19)-colestatrien-3,25-diol |
| 1 α ,25-dihidroxicolecalciferol; 1,25-dihidroxivitamina D ₃ ; calcitriol | (5Z,7E)-(1S,3R)-9,10-seco-5,7,10(19)-colestatrien-1,3,25-triol |
| 1 α ,24R,25-trihidroxicolecalciferol; 1,24,25-dihidroxivitamina D ₃ ; calcitretol | (5Z,7E)-(1S,3R,24R)-9,10-seco-5,7,10(19)-colestatrien-1,3,24,25-tetrol |

3.2 Biosíntesis del calcitriol

La incidencia de luz solar sobre el 7-dehidrocolesterol presente en la piel provoca la apertura del anillo B y conduce a la formación de colecalfiferol como fotoproducto estable de la reacción (5). La activación del colecalfiferol se consigue por adición secuencial de dos grupos hidroxilo (figura 1). La primera de las hidroxilaciones se efectúa sobre el carbono 25 principalmente en el hígado y se han identificado hasta 6 citocromos P₄₅₀ multifuncionales capaces de producir 25-hidroxicolecalciferol a partir de colecalfiferol (6-10). Entre ellos, las evidencias bioquímicas y genéticas sugieren que CYP2R1 es la principal proteína responsable de la síntesis de 25-hidroxicolecalciferol en la circulación sistémica (11). El metabolito 25-hidroxilado se transporta por todo el organismo unido a la proteína transportadora de la vitamina D₃. En las células que expresan a la 25-hidroxicolecalciferol 1 α -hidroxilasa (1 α -hidroxilasa o CYP27B1), el 25-hidroxicolecalciferol se biotransforma en calcitriol, el metabolito de la vitamina D₃ que presenta la mayor potencia biológica (3).

3.3 Catabolismo del calcitriol

La tercera hidroxilasa importante del sistema endocrino de la vitamina D₃ es la calcitriol 24-hidroxilasa (24-hidroxilasa o CYP24A1), la enzima que inicia la degradación del calcitriol (9). Al igual que la 1 α -hidroxilasa, la 24-hidroxilasa es miembro de la superfamilia de citocromos P₄₅₀ mitocondriales cuya actividad

enzimática es dependiente de NADPH, de ferredoxina reductasa y de ferredoxina (12). La 24-hidroxilasa está ampliamente distribuída por todo el organismo y reconoce como sustratos al calcitriol y a su precursor 25-hidroxicolecalciferol (13).

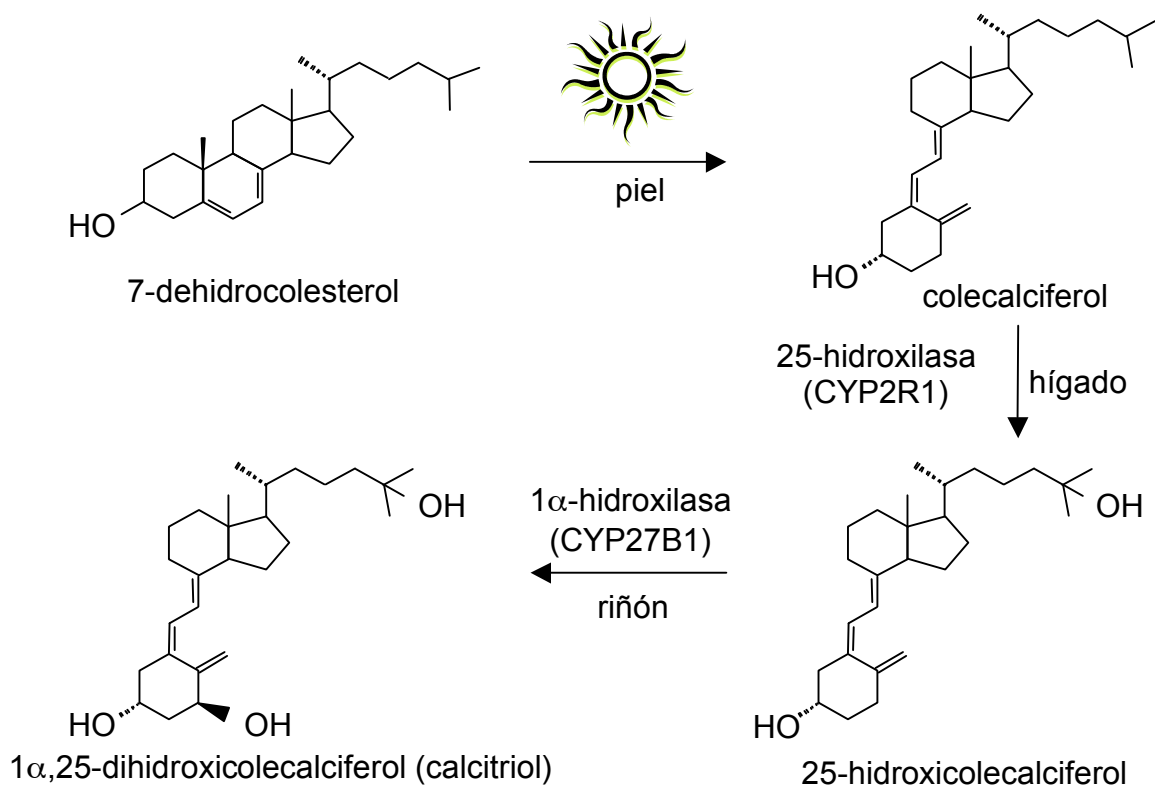


Figura 1. Biosíntesis del calcitriol. Por efecto de la luz solar, el 7-dehidrocolesterol se transforma en colecalciferol, el cual es llevado al hígado por la proteína transportadora de la vitamina D₃. En este órgano, la molécula se hidroxila en el carbono 25 para formar el 25-hidroxicolecalciferol, el metabolito más abundante en la circulación. La activación final ocurre en el riñón, donde se sintetiza el 1 α ,25-dihidroxicolecalciferol o calcitriol, la forma hormonal de la vitamina D₃.

Como se muestra en la figura 2, la oxidación en el carbono 24 marca el inicio de la vía catabólica más importante del calcitriol, la cual culmina con la síntesis del ácido calcitroico, un producto hidrosoluble que se excreta en la bilis. La vía catabólica secundaria del calcitriol se efectúa por hidroxilaciones sucesivas en los carbonos 26 y 23 y posteriormente la formación de una lactona. La 24-hidroxilasa participa en

ambas vías catabólicas y por lo tanto es un regulador importante de la concentración intracelular y de la vida media del calcitriol en el organismo (13).

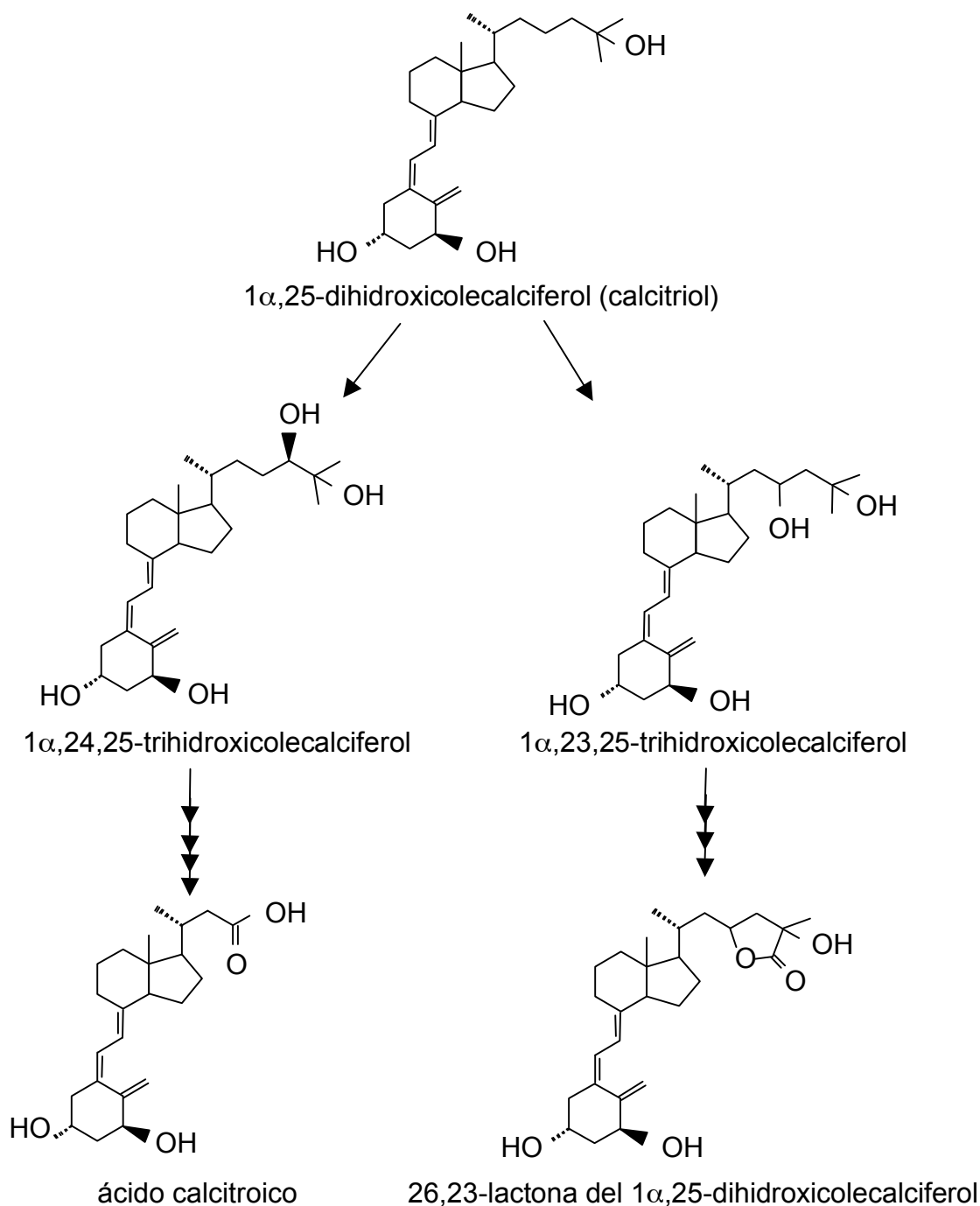


Figura 2. Catabolismo del calcitriol. El 1 α ,25-dihidroxicolecalciferol puede inactivarse a través de dos vías metabólicas catalizadas por la 24-hidroxilasa. En la vía de oxidación del carbono 24 se produce como intermediario el 1 α ,24,25-trihidroxicolecalciferol y como producto final el ácido calcitroico. En la vía C-23, el metabolito final es una lactona del calcitriol.

3.4 Acciones del calcitriol

Como se muestra en la figura 3, la producción renal de calcitriol tiene funciones endocrinas en el intestino, el hueso, el riñón y la glándula paratiroides, participando en la regulación de la homeostasis del calcio y el fósforo (14). Se considera que la 1α -hidroxilasa renal es el blanco principal de la regulación sistémica de la calcemia y la fosfatemia (15). En los últimos años se ha abandonado el concepto de que el calcitriol es únicamente una hormona calciotrópica (16). Actualmente se reconoce al calcitriol como el efector de un sistema hormonal versátil que participa en una gran variedad de funciones biológicas adicionales a la homeostasis mineral, entre las que destacan el control de la proliferación y la diferenciación celular y la modulación de la respuesta inmune (3). Estos efectos autocrinos o paracrinos son ejercidos por el calcitriol de origen extrarrenal (figura 3).

El calcitriol ejerce sus efectos a través de la regulación transcripcional de genes blanco (17). Estos efectos reguladores del calcitriol están mediados a través de la interacción con un receptor nuclear de alta afinidad conocido como receptor de la vitamina D₃ (VDR). El VDR es un factor de transcripción que se activa por la unión del calcitriol. Los promotores de los genes regulados por el calcitriol contienen secuencias de unión para el VDR conocidas como elementos de respuesta a la vitamina D (VDREs) (18). El VDR interactúa con el DNA en asociación con el receptor X para retinoides (RXR), un receptor nuclear para el ácido 9-cis retinoico. El heterodímero VDR-RXR se une principalmente a VDREs del tipo DR3, compuestos de repeticiones directas del hexámero AGGTCA separadas por 3 nucleótidos (19). Sin embargo, el VDR también puede regular la expresión de genes a través de la unión a otros VDREs que no presentan esta configuración, lo cual ocurre principalmente en genes reprimidos por el calcitriol (20). El dominio de unión al DNA del VDR tiene la capacidad de interactuar con VDREs aún en ausencia de ligando (32). La represión génica dependiente del VDR es resultado de la unión del receptor sin ligando a ciertos VDREs. Esta interacción desencadena el reclutamiento de proteínas correpresoras (como N-CoR, SMRT y Alien) y complejos proteínicos con actividad de desacetilasa de histonas que conducen a la condensación de la cromatina (33). La activación de la transcripción dependiente de

ligando, es consecuencia de los cambios conformacionales que presenta el VDR tras la unión del calcitriol. En efecto, estos arreglos moleculares disocian a los correpresores y favorecen la unión de proteínas coactivadoras de la familia p160 (33).

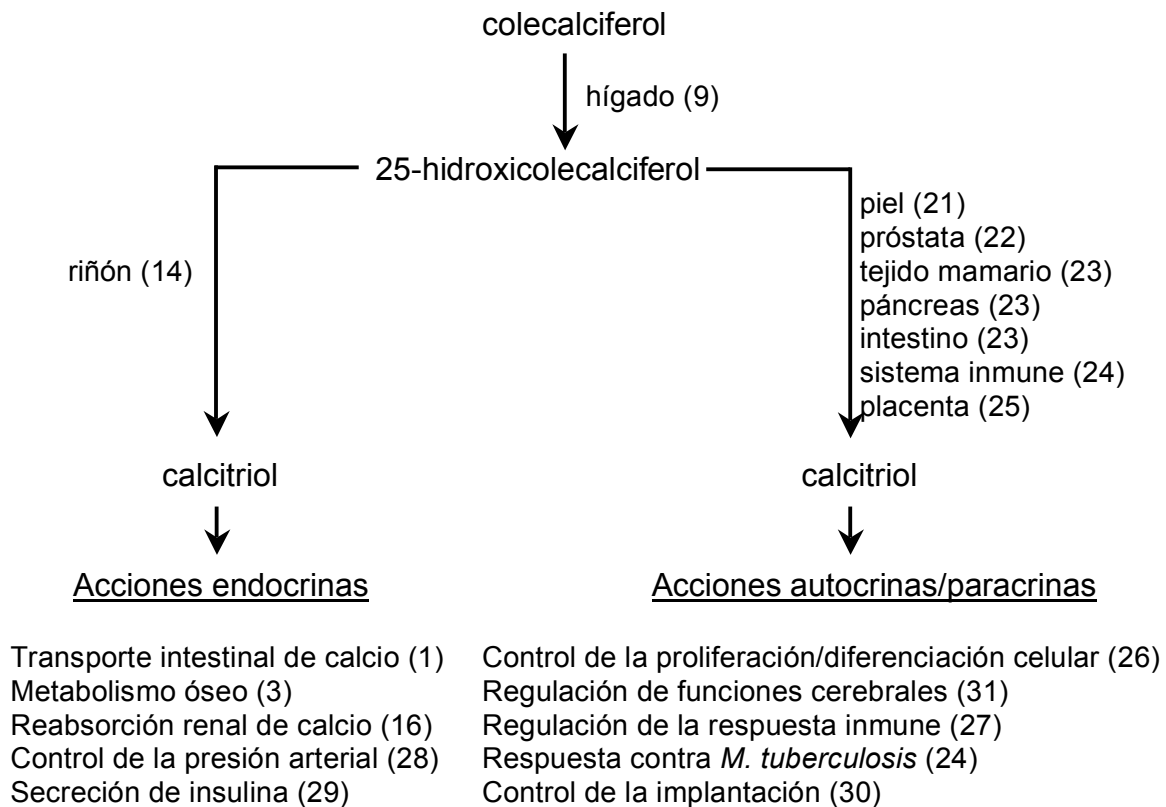


Figura 3. La síntesis renal y extrarrenal de calcitriol tiene funciones endocrinas, autocrinas y paracrinas.

Los coactivadores establecen la conexión funcional entre el VDR activado por el ligando y ciertos complejos enzimáticos con actividad de acetiltransferasas de histonas, lo cual resulta en la relajación de la cromatina y en la reversión del efecto bloqueador del VDR sin ligando. El VDR activado se disocia de los coactivadores de la familia p160 y rápidamente se asocia con otros complejos proteínicos que actúan como mediadores entre la señal del receptor activado y la maquinaria basal de la transcripción (17).

Por otra parte, el calcitriol también es capaz de generar respuestas biológicas rápidas que no requieren de la síntesis de proteínas y de transcripción *de novo* (34). Entre estos efectos rápidos se encuentra el transporte de Ca^{2+} en el intestino (35), la estimulación de la secreción de insulina de las células β -pancreáticas (36), la modulación del crecimiento óseo (37), el crecimiento y la diferenciación de células vasculares (38) y la apertura de canales de calcio y cloro en los osteoblastos (39). Estas respuestas rápidas están mediadas por la unión del calcitriol a diversos receptores de membrana (40, 41), entre los cuales se ha identificado al VDR (42). La interacción del calcitriol con estos receptores promueve la generación de segundos mensajeros como el 1,3,4-trifosfato de inositol, el 1,2-diacilglicerol y el AMPc (34).

3.5 Regulación de la síntesis de los metabolitos del colecalciferol

Se considera que la síntesis cutánea del colecalciferol depende de la exposición a la luz solar (43). En los trópicos se produce suficiente colecalciferol (5), el cual se convierte en su totalidad en 25-hidroxicolecalciferol en el hígado a través de un proceso aún sin caracterizar detalladamente (2). Sin embargo, en las regiones geográficas con poca exposición a la luz solar se presentan grados variables de deficiencia de colecalciferol, lo cual ocurre principalmente en el invierno (43). La concentración de 25-hidroxicolecalciferol en la sangre se considera como el índice del estado nutricional del colecalciferol y existen numerosos estudios que muestran el impacto positivo del calcitriol sobre la salud (3).

La síntesis renal de calcitriol está estrictamente regulada por diversos factores, sobre todo a nivel de la síntesis y la actividad enzimática de la 1α -hidroxilasa (13), cuya expresión basal es muy baja (9). La 1α -hidroxilasa y la 24 -hidroxilasa se expresan principalmente en los túbulos proximales aunque también se localizan en los túbulos distales (44-46). De manera interesante, la regulación de estas enzimas en distintos sitios de la nefrona son diferentes (45). A este respecto, se considera que la síntesis de calcitriol en otros tejidos no está sujeta a los mismos mecanismos de regulación que operan en los túbulos proximales (3) y por ende, el calcitriol

producido extrarrenalmente tiene funciones autocrinas y paracrinas que no están relacionadas con el metabolismo del calcio y el fosfato (23).

Entre los factores más importantes que regulan la síntesis renal de calcitriol se encuentran el calcio, el fosfato, la PTH, la calcitonina y el mismo calcitriol (47).

3.6 Regulación de la 1α -hidroxilasa y la 24 -hidroxilasa del riñón por la calcemia y la fosfatemia

Numerosos estudios se han realizado para investigar el papel del calcio y el fósforo de la dieta sobre la regulación del sistema endocrino de la vitamina D_3 . La gran mayoría de los efectos observados se deben a diferentes hormonas que regulan estrictamente la calcemia y la fosfatemia. Algunos modelos biológicos como los animales paratiroidectomizados y las células en cultivo han permitido determinar que las concentraciones bajas de calcio estimulan directamente la actividad y la expresión de la 1α -hidroxilasa (48). Por otro lado, existen estudios en líneas celulares de túbulos proximales que demuestran la supresión directa de la actividad y de la expresión de la 1α -hidroxilasa por altas concentraciones de calcio (49).

La restricción de fosfato en la dieta se ha utilizado como modelo para incrementar la actividad (50) y la expresión (51) de la 1α -hidroxilasa renal, independientemente de cambios en la concentración de la PTH (52) y del calcio (53). La falta de efectos directos del fosfato sobre la 1α -hidroxilasa en cultivos celulares condujo al descubrimiento de que el fósforo dietario actúa a través de moléculas intermediarias conocidas como fosfatoninas o factores fosfatúricos, de las cuales se han identificado 3 miembros con base en sus efectos sobre la homeostasis del fosfato (54).

La PTH es un estimulador importante de la actividad enzimática y de la expresión de la 1α -hidroxilasa renal a través de un mecanismo dependiente de la generación de AMPc como segundo mensajero (55, 56). El monitoreo de la calcemia se lleva a cabo por el receptor sensor de calcio localizado en la glándula paratiroidea (57). Cuando la concentración de calcio disminuye, la PTH se secreta a la circulación y se une a sus receptores acoplados a proteínas G localizados principalmente en el hueso y en el riñón (58). La interacción de la PTH con su receptor permite la

regulación rápida de la calcemia mediante la estimulación de la resorción ósea (58) y la activación de la 1α -hidroxilasa en los túbulos proximales renales (55). En el mecanismo a largo plazo, la PTH estimula la transcripción del gen de la 1α -hidroxilasa en el riñón (58). El efecto de la PTH sobre el promotor del gen CYP27B1 se lleva a cabo sobre un VDRE atípico (59) y sobre un sitio de unión al factor de transcripción C/EBP β (proteína beta de unión al potenciador CCAAT) (2, 60). Por otra parte, la PTH presenta efectos reguladores negativos a nivel del catabolismo del calcitriol en el riñón, actuando sobre la estabilidad de los transcritos de la 24-hidroxilasa (61). Este sistema de control, así como la baja expresión basal de la 24-hidroxilasa (62) y del VDR (63), son importantes porque aseguran la síntesis de calcitriol bajo condiciones de hipocalcemia. El mecanismo de retroalimentación negativo para la liberación de la PTH a la circulación es mediado por el calcitriol a través de la inhibición de la síntesis y secreción de la PTH. En efecto, el gen de la PTH contiene un VDRE responsable de la represión transcripcional por el calcitriol (64).

La calcitonina, otra hormona calciotrópica, es capaz de aumentar la actividad enzimática y la transcripción de la 1α -hidroxilasa en el riñón bajo condiciones normocalcémicas (65-67). Se ha definido que la calcitonina actúa sobre la región promotora del gen de la 1α -hidroxilasa a través de las vías de señalización de las proteínas cinasas A (PKA) y C (PKC) (68). En primera instancia, los efectos estimuladores de la calcitonina sobre la síntesis de calcitriol podrían interpretarse como acciones contrarias a su papel clásico de hormona hipocalcémica. Sin embargo, la calcitonina también es capaz de activar al promotor de la 24-hidroxilasa en las células renales (69). De esta manera, la secreción de calcitonina durante estados hipercalcémicos normaliza la concentración de calcio directamente por inhibición de la resorción ósea e indirectamente a través del control de la biodisponibilidad del calcitriol.

3.7 Regulación de la 1 α -hidroxilasa y la 24-hidroxilasa por el calcitriol

La síntesis de calcitriol también está sometida a un mecanismo de autorregulación que opera en todos los órganos involucrados en el sistema endocrino de la vitamina D₃ (47). El calcitriol reprime la expresión del gen de la 1 α -hidroxilasa e induce la transcripción del gen de la 24-hidroxilasa (13). La represión del gen de la 1 α -hidroxilasa es ejercida por los correpresores reclutados sobre el VDRE atípico del gen CYP27B1 como resultado de la interacción del VDR con el calcitriol (59). Por otro lado, el calcitriol induce a la 24-hidroxilasa a través de varios VDREs presentes en la región promotora del gen CYP24A1 (70) y mediante otra vía dependiente del factor de transcripción C/EBP β (71).

3.8 El calcitriol y la función reproductiva

Los modelos animales deficientes en vitamina D₃, así como los ratones mutantes nulos para el VDR y la 1 α -hidroxilasa, han proporcionado información valiosa del papel del calcitriol sobre la función reproductiva (15, 72, 73). En particular, se ha mostrado que las ratonas mutantes nulas del VDR y la 1 α -hidroxilasa son infértiles y presentan alteraciones morfológicas del útero (72, 73).

3.9 Síntesis extrarrenal de calcitriol durante el embarazo

El embarazo es una condición fisiológica que cursa con readaptaciones del sistema endocrino de la vitamina D₃ necesarias para la transferencia placentaria de calcio hacia el feto (74). En el embarazo normal, la concentración de calcitriol en la sangre materna aumenta desde el primer trimestre hasta alcanzar valores mayores al doble en la gestación a término (75). Las elevadas concentraciones de calcitriol en la circulación materna son las responsables del aumento en la absorción intestinal de calcio en la madre para cumplir el requerimiento nutricional de 7 mmol/día al final del embarazo. No se ha determinado el mecanismo por el cual aumenta la concentración de calcitriol en la sangre materna; sin embargo, este efecto es independiente de la PTH ya que la concentración de esta hormona no muestra variaciones durante la gestación (75).

Por otra parte, la concentración de calcitriol en la circulación fetal es menor en comparación con la sangre materna, lo cual es debido a que el feto es hipercalcémico con respecto a la madre (75). Esta observación implica que el calcio se transfiere desde la sangre materna hacia la circulación fetal en contra de un gradiente de concentración. Se ha descrito que la placenta expresa proteínas que participan en la transferencia de calcio hacia el feto, entre los que destacan las calbindinas D9k y 28k, la ATPasa de calcio y diversos canales de calcio (1). El calcitriol incrementa la expresión de estas proteínas en la placenta y de esta manera aumenta el paso transplacentario de calcio (18).

3.10 La placenta y el calcitriol

La placenta se forma de las células extraembrionarias del blastocisto y está compuesta por células de origen fetal conocidas como trofoblastos y por células del endometrio materno llamadas células deciduales. La formación de la placenta ocurre posteriormente a la implantación del blastocisto en la cavidad uterina, un proceso que inicia con la penetración del endometrio y de las arterias espirales maternas por el trofoblasto invasivo. En la placenta se encuentran además otros dos tipos de trofoblastos: el trofoblasto de anclaje y el sinciotrofoblasto. El trofoblasto de anclaje se encarga de sujetar la placenta al útero a través de fibras de fibronectina. El sinciotrofoblasto es una estructura multinucleada que se origina por fusión de citotrofoblastos y que tiene capacidad endocrina. De manera simultánea al proceso de invasión, se inicia la formación de una red de vasos sanguíneos que es crucial para el establecimiento anatómico y funcional de la placenta. Las vellosidades coriónicas representan la unidad funcional de la placenta y están compuestas de una matriz laxa que contiene fibroblastos, macrófagos y vasos sanguíneos fetales, rodeados de una capa de citotrofoblastos interna y una de sinciotrofoblastos externa (76).

La placenta es un órgano transitorio mediador del intercambio selectivo de diferentes sustancias entre la madre y el feto. Además de sus funciones nutricionales, la placenta protege de infecciones al feto y tiene la capacidad de producir hormonas esteroides y hormonas peptídicas, las cuales tienen efectos

profundos sobre el metabolismo materno y fetal. La placenta sintetiza gonadotropina coriónica humana (hCG), lactógeno placentario, prolactina, hormona liberadora de gonadotropinas, estradiol y progesterona. La hCG es secretada principalmente por los sinciciotrofoblastos de la placenta. La hCG es indispensable para la progresión exitosa del embarazo, actuando como un factor que mantiene la producción de hormonas esteroideas y otros factores de crecimiento por el cuerpo amarillo. Adicionalmente, la hCG modula la implantación del blastocisto, regula la angiogénesis uterina, mantiene el útero en estado de reposo y participa en la adaptación inmunológica durante el embarazo. La hCG, como otras glicoproteínas gonadotrópicas, está compuesta de dos subunidades: una subunidad α común y la subunidad β específica. Un solo gen localizado en el cromosoma 6q12-q21 codifica a la subunidad α y 6 genes homólogos agrupados en el cromosoma 19 determinan la subunidad β . La síntesis de la hCG inicia después de la fecundación y se ha detectado expresión de la subunidad β en el estadio embrionario de 2 células. Después de la implantación, la hCG se transporta por la sangre materna donde se alcanza las máximas concentraciones a las 9-10 semanas de gestación. Se han correlacionado las bajas concentraciones de hCG en la circulación materna durante el primer trimestre del embarazo con abortos recurrentes, embarazos ectópicos y en eventos fallidos de reproducción asistida. Por otra parte, se han descrito concentraciones elevadas de hCG en la sangre materna en diversas patologías gestacionales (77).

Desde finales de los setentas se describió que el riñón no es el único productor del calcitriol en el organismo. En particular, un estudio realizado en ratas gestantes mostró que existe bioconversión de 25-hidroxicolecalciferol en calcitriol aún en animales con extirpación quirúrgica de ambos riñones (78). También se detectaron concentraciones bajas de calcitriol en la sangre de mujeres embarazadas con insuficiencia renal (79). A raíz de estas observaciones, se inició el estudio de la síntesis de calcitriol por las diferentes células de la placenta (80). Los resultados mostraron que la decidua produce la mayor proporción de calcitriol de origen placentario (81). Datos recientes han mostrado que algunas células del sistema inmunológico residentes en la decidua expresan el gen de la 1α -hidroxilasa y son

las principales productoras del calcitriol (25). Por su parte, el tejido trofoblástico fetal también expresa a la 1α -hidroxilasa (82) y contribuye a la síntesis placentaria de calcitriol (83). Además, la deficiencia de 1α -hidroxilasa ha mostrado que el promotor del gen CYP27B1 se encuentra muy activo únicamente en el riñón y la placenta (84), indicando que en el embarazo la unidad fetoplacentaria contribuye a la síntesis sistémica de calcitriol.

Se ha descrito que el VDR se expresa en diferentes linajes celulares de la placenta (85), indicando que este órgano es blanco de la acción del calcitriol (25). Actualmente se considera que el calcitriol sintetizado en la placenta se utiliza para fines autocrinos y paracrinos, principalmente durante la implantación, por sus efectos inmunomoduladores y reguladores de la expresión de genes asociados con la implantación (25).

4. Justificación

Las placentas de varios mamíferos poseen la capacidad de sintetizar calcitriol (25). Entre los distintos tipos celulares presentes en la placenta humana, el trofoblasto expresa el gen de la 1α -hidroxilasa y tiene la capacidad de biotransformar 25-hidroxicolecalciferol en calcitriol (82). En nuestro laboratorio se han encontrado evidencias de que la síntesis de calcitriol se encuentra alterada en trofoblastos aislados de mujeres con preeclampsia, una enfermedad hipertensiva del embarazo que cursa con anormalidades del metabolismo de la vitamina D_3 (86).

El presente trabajo tiene como meta principal estudiar la regulación de la síntesis de calcitriol en la placenta humana por algunos factores que impactan el metabolismo de la vitamina D_3 en el riñón. Este estudio pretende generar información relevante con respecto a la regulación extrarrenal de la actividad enzimática y de la expresión génica de la 1α -hidroxilasa y la 24 -hidroxilasa. Los resultados de este estudio son de relevancia para comprender la importancia que el sistema endocrino de la vitamina D_3 a nivel placentario tiene sobre el embarazo normal; así como en patologías gestacionales como la preeclampsia.

5. Objetivos

Objetivo general

Estudiar la regulación de las hidroxilasas de la vitamina D por el calcitriol y el AMPc en la placenta humana a término.

Objetivos específicos

Caracterizar funcionalmente el sistema endocrino de la vitamina D₃ en el modelo de los trofoblastos en cultivo.

Determinar el efecto de la diferenciación del trofoblasto *in vitro* sobre la expresión génica y la actividad enzimática de la 1 α -hidroxilasa y la 24-hidroxilasa.

Estudiar el efecto del calcitriol y de factores generadores de AMPc sobre la expresión génica y la actividad enzimática de la 1 α -hidroxilasa y la 24-hidroxilasa.

Comparar los resultados con los obtenidos en una línea celular establecida de placenta humana.

6. Hipótesis

El calcitriol y las hormonas calciotrópicas que actúan a través del AMPc como segundo mensajero son factores reguladores de la actividad y expresión de las hidroxilasas de la vitamina D en la placenta humana.

7. Materiales y Métodos

7.1 Material biológico

El protocolo de este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Las placentas a término (37-42 semanas de gestación) se obtuvieron por operación cesárea de mujeres sanas con edades comprendidas entre 18 y 35 años. Las placentas fueron donadas voluntariamente para este estudio en el Hospital de Gineco Obstetricia Luis Castelazo Ayala del IMSS y en el Hospital General Manuel Gea González (SSa).

Por otra parte, en este trabajo utilizamos la línea celular JEG-3 originada de un coriocarcinoma humano (ATCC, EEUU).

7.2 Reactivos

Los reactivos utilizados en este estudio fueron de la mayor calidad disponible. Los estándares de la vitamina D₃ (25-hidroxicolecalciferol, 24,25-dihidroxicolecalciferol y calcitriol) fueron donados por F. Hoffmann-La Roche Ltd (Basilea, Suiza). El antagonista del VDR ZK 159222 fue donado por Schering AG (Berlín, Alemania).

7.3 Cultivo celular

El aislamiento y el cultivo de los trofoblastos se realizó de acuerdo a modificaciones del método original descrito por Kliman y col. (82, 87). Las placentas se transportaron al laboratorio y se tomaron aproximadamente 50 g de cotiledones placentarios. El tejido placentario se lavó con solución salina isotónica y se trató durante 3 ciclos sucesivos con tripsina y desoxirribonucleasa I de páncreas bovino (Sigma-Aldrich, EEUU) en solución salina balanceada de Hank (HBSS) libre de calcio y magnesio (Invitrogen Corporation, EEUU). Las distintas poblaciones celulares se separaron por centrifugación a 1200 x g durante 20 min en gradientes continuos de Percoll (Amersham Pharmacia, Reino Unido) de 5% a 70% y los citotrofoblastos se recuperaron de la banda cuya densidad se encontraba entre 1.048 y 1.062 g/mL. Los citotrofoblastos se lavaron en medio de Eagle modificado

por Dulbecco (DMEM) con L-alanil-L-glutamina, glucosa y piruvato de sodio (DMEM-HG, Invitrogen Corporation, EEUU) y se sembraron en cajas de cultivo de 6 pozos a razón de 8×10^5 células/mL de medio de cultivo de trofoblastos [DMEM-HG suplementado con penicilina 100 U/mL, estreptomina 0.1 mg/mL, anfotericina B 0.25 μ g/mL y suero fetal bovino inactivado (SFB) 20%]. Las células se incubaron en atmósfera húmeda con aire 95% y CO₂ 5% a 37°C. La diferenciación de los citotrofoblastos a sinciotrofoblastos se examinó por microscopía durante los diferentes días del cultivo. Al segundo día se cambió el medio de cultivo por mezcla nutritiva D-MEM/F-12 (Invitrogen Corporation, EEUU) y en general los tratamientos se realizaron a este tiempo. El medio se reemplazó diariamente durante el resto del cultivo celular. La funcionalidad endocrina de los sinciotrofoblastos se evaluó a los días 1, 2, 3 y 4 del cultivo por su capacidad de sintetizar y secretar a la hCG mediante su cuantificación utilizando un sistema inmunoenzimático (Immunometrix Ltd, Reino Unido) en presencia o ausencia de 8-Bromo AMP cíclico (8-Br AMPc) 1.5 mM. El contenido de proteínas en los cultivos celulares se determinó por el método de Bradford utilizando como estándar a la albúmina del suero bovino (88).

Las células JEG-3 se cultivaron en cajas de 6 pozos en el mismo medio que los trofoblastos, excepto que se utilizó SFB 5%. En general, los experimentos se realizaron en cultivos con células al 75% de confluencia.

7.4 Determinación de las actividades enzimáticas de la 1 α -hidroxilasa y de la 24-hidroxilasa

Los estudios de la actividad enzimática se basaron en la capacidad de estas enzimas para adicionar grupos hidroxilo en las posiciones 1 ó 24 del 25-hidroxicolecalciferol tritiado (83, 89). Para ello, los trofoblastos cultivados durante 2 días o las células JEG-3 se trataron con 25-hidroxi[26,27-metil-³H]coleciferol (actividad específica 30 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido) 5 nM durante 1 h a 37°C en mezcla nutritiva D-MEM/F-12. Los metabolitos de la vitamina D₃ se extrajeron de los medios de cultivo con una mezcla de cloroformo y metanol y posteriormente la fase orgánica fue evaporada con corriente de nitrógeno (90). La separación de los metabolitos de la vitamina D₃ se llevó a cabo en un

sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución equipado con un detector de UV/Vis de arreglo de diodos (Modelo 1100, Agilent Technologies, Alemania). Las separaciones se realizaron a 18°C en columnas de fase normal Zorbax SIL (Agilent Technologies) de 4.6 x 250 mm, 5 µm) bajo 2 condiciones cromatográficas. En la primera de ellas, el extracto lipídico se disolvió en fase móvil I (hexano:isopropano 92:8) y posteriormente se adicionaron 100 ng de los siguientes estándares de vitamina D₃: 25-hidroxicolecalciferol; 24,25-dihidroxicolecalciferol y calcitriol. Esta mezcla se inyectó al cromatógrafo utilizando fase móvil I a un flujo de 1.6 mL/min y se recolectaron 30 fracciones de 1 mL. Posteriormente, se recuperó el área de elución correspondiente al estándar de calcitriol y se dejó evaporar la fase a temperatura ambiente. Los metabolitos de esta fracción fueron disueltos en fase móvil II (diclorometano:isopropanol 95:5) con 100 ng de estándar de calcitriol y fueron separados en 20 fracciones utilizando fase móvil II a un flujo de 1.0 mL/min. Finalmente se determinó la radiactividad de todas las fracciones en un contador de centelleo (Modelo Tri-Carb 1900TR, Packard Instrument Company, EEUU). El porcentaje de conversión del 25-hidroxi[26,27-metil-³H]colecalciferol en [26,27-metil-³H]calcitriol se utilizó para el cálculo de la actividad de la 1α-hidroxilasa. Por otra parte, el porcentaje de conversión a 24,25-dihidroxi[26,27-metil-³H]colecalciferol se tomó para el cálculo de la actividad de la 24-hidroxilasa. Para la normalización de los resultados se utilizó el contenido de proteína total, determinada por el método de Bradford (88). Los resultados se expresaron como femtomoles/mg de proteína.

7.5 “Western blot”

Los trofoblastos cultivados en presencia o ausencia de 8-Br AMPc 1.5 mM se lisaron a 4°C en amortiguador RIPA [Na₂HPO₄ 9.1 mM, NaH₂PO₄ 1.7 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%; pH 7.4] en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche, Alemania). La concentración de proteínas en el homogenado se determinó por el método de Bradford (88). Las proteínas (75 µg/carril) se separaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (10%) y posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore, EEUU) (91). Las membranas se bloquearon con leche descremada (5%) en amortiguador

TBS [Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM; pH 8.0] y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-1 α -hidroxilasa de ratón hecho en oveja (The Binding Site, Reino Unido) o con un anticuerpo anti-citoqueratina 7 humana hecho en oveja (Santa Cruz Biotechnology, EEUU), ambos a una dilución de 1:500. Después de los lavados con amortiguador TBS, las membranas se incubaron con un anticuerpo anti-inmunoglobulinas G de oveja hecho en conejo conjugado a la peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, EEUU) 1:500 durante 1 h a temperatura ambiente. El revelado se realizó después de los lavados con TBS utilizando como sustratos a la 3,3'-diaminobencidina y H₂O₂ (Sigma-Aldrich, EEUU).

7.6 Determinación de AMPc

La cuantificación de AMPc intracelular se llevó a cabo en los trofoblastos en cultivo por radioinmunoanálisis utilizando un anticuerpo anti-AMPc (Calbiochem, EEUU) (92). Para ello, se retiró el medio y las células se lisaron en amortiguador RIPA con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, Sigma, EEUU) 0.1 mM. Los homogenados celulares fueron calentados a 95°C durante 5 min para inactivar a las fosfodiesterasas. Los extractos celulares, así como la sal de sodio del AMPc utilizada como estándar, fueron diluídas en acetato de sodio pH 4.7 y acetiladas con una mezcla 2:1 de trietilamina y anhídrido acético. Las muestras se incubaron durante 18 h a 4°C en presencia del anticuerpo anti-AMPc 1:3000 en solución de acetato de sodio 50 mM pH 6.1 con albúmina de suero bovino 0.1%. El éster tirosilmetílico del AMPc 2'-O-monosuccinilado (Sigma-Aldrich) marcado con ¹²⁵I (Amersham Pharmacia Biotech) por el método de la cloramina T (93), se purificó en una columna de dietilaminoetilcelulosa. El trazador fue utilizado a razón de 10000 cpm por tubo. Después de 18 h a 4°C, se determinó la radiactividad presente en los precipitados en un contador gamma (Crystal Plus multidetector RIA system, Packard Instrument Company, EEUU).

7.7 Estudios de la expresión génica

Los trofoblastos cultivados durante períodos variables e incubados con distintos tratamientos se utilizaron para aislar RNA total por el método de un solo paso (94). Los estudios de expresión génica de este trabajo se realizaron mediante RT-PCR e hibridación DNA/DNA tipo “Southern” (95, 96). Para ello, el RNA total se utilizó para la síntesis de DNA complementario (DNAc) mediante la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina (Invitrogen, EEUU). Las amplificaciones por PCR se realizaron con *Taq* DNA polimerasa (Roche, Alemania) en un termociclador (Modelo 9600, Perkin Elmer EEUU), utilizando las combinaciones de oligonucleótidos mostradas en la tabla II.

Tabla II. Oligonucleótidos utilizados para los estudios de expresión génica por RT-PCR.

| DNAc | Secuencia (5'→3') (s)=sentido, (as)=antisentido | tamaño (pb) | referencia |
|--------------------------|--|----------------|------------|
| β hCG | CGCACCAAGGATGGAGA (s) GCCTTTATTGTGGAGGA (as) | 494 | (97) |
| CYP27B1 | ACCAGATGTTTGCATTTGCTC (s) GGACGAAAAGAATTTGGCTCT (as) | 517 | (98, 99) |
| CYP24A1 | CCTCGTGTTGTATGAGAAGAGATT (s) TTTAAATACGGCATATTCCTCAA (as) | 486 | (100) |
| VDR | TCCTCCTGCTCAGATCACTGT (s) CTCCTCCTCATGCAAGTTCAG (as) | 438 | (101) |
| ferredoxina | TGATTCTCTGCTAGATGTTGTG (s) TATGAAGTCCACTCATCCATGT (as) | 397 | (102) |
| ferredoxina reductasa | GAGTGAAGACAGTGTGGCTAGT (s) CTCCAGTCTAGTGAAGTCTAGG (as) | 347 | (103) |
| ciclofilina | CCCCACCGTGTT CTTGACAT (s) AGGTCCTTACCGTTCTGGTCG (as) | 453 | (104) |

En todos los casos, se amplificó un fragmento del transcrito constitutivo de la ciclofilina para la normalización de los resultados. Los productos de RT-PCR fueron separados en geles de agarosa 1.2%, transferidos por capilaridad a membranas de nylon y fijados covalentemente con luz ultravioleta. Las membranas se incubaron con solución de hibridación [Na_2HPO_4 0.25 M, SDS 7%, polietilenglicol 8000 5%, pH=8.0] durante 30 min a 68°C. Posteriormente, se adicionaron las sondas internas específicas para cada uno de los genes estudiados marcadas radiactivamente con [^{32}P]-dCTP (NEN Du Pont, EEUU) por el método de hexámeros al azar (105). Las membranas se hibridaron durante 18 h y posteriormente fueron tratadas varias veces con solución de lavado [NaCl 0.6 M, citrato de sodio 60 mM, SDS 0.1% pH=8.0]. Los filtros se expusieron a placas de rayos X y los resultados fueron analizados por densitometría.

7.8 Obtención de las sondas moleculares

Las sondas para la hibridación tipo “Southern” fueron obtenidas por RT-PCR a partir de RNA total de tejido placentario. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizadas se muestran en la tabla III.

Los productos de PCR fueron insertados en el vector pCR 2.1-TOPO (Invitrogen, EEUU) mediante la topoisomerasa I del virus *Vaccinia*. Los plásmidos fueron propagados en *Escherichia coli* One Shot TOP10 (Invitrogen, EEUU) y las bacterias portadoras de plásmidos fueron seleccionadas por la expresión funcional de la β -lactamasa. El DNA plasmídico de algunas colonias resistentes a la ampicilina se purificó y se verificó la presencia de los insertos por PCR utilizando los oligonucleótidos mostrados en la tabla III. Además, se verificó la secuencia de nucleótidos de cada inserto por secuenciación automática de DNA (Analizador Genético ABI PRISM 3100, Applied Biosystems, EEUU) (106). Para la obtención de las sondas, las colonias se crecieron en medio LB con ampicilina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 18 h y los plásmidos se obtuvieron por el método de la lisis alcalina (107). Los plásmidos fueron digeridos con la enzima *EcoRI* para liberar los insertos, separados por electroforesis en agarosa 1.2% y purificados del gel.

Tabla III. Oligonucleótidos utilizados para la obtención de las sondas moleculares.

| DNAc | Secuencia (5'→3') (s)=sentido, (as)=antisentido | tamaño (pb) | referencia |
|--------------------------|--|----------------|------------|
| β hCG | TGATTCTCTGCTAGATGTTGTG (s) TATGAAGTCCACTCATCCATGT (as) | 107 | (97) |
| CYP27B1 | GTTGCTATTGGCGGGAGTGGAC (s) GTGACACAGAGTGACCAGCATAT (as) | 298 | (98, 99) |
| CYP24A1 | TCAGCAGCCTAGTGCAGATT(s) TTTGTTGCACTTGGGGATTA (as) | 170 | (108) |
| VDR | ACAGCATCCAAAAGGTCATTG (s) TAGTCTTGTTGCCACAGGTC (as) | 172 | (101) |
| ferredoxina | GCTTGTTCAACCTGTCACCT(s) GTTTCAGGCACTCGAACAGT(as) | 179 | (102) |
| ferredoxina reductasa | TTCACCATTAAGGAGCTTCG (s) GCTTCTCTGTGGCCGTTT (as) | 157 | (103) |
| ciclofilina | CACACGCCATAATGGCACTGGT (s) AAAGACCACATGCTTGCCATCCAGC (as) | 187 | (104) |

7.9 Análisis estadístico

Los datos de actividad enzimática, contenido de hCG y de AMPc se expresaron como la media ± la desviación estándar (DE). La significancia estadística entre los tratamientos se determinó por la prueba t de Student. Un valor de $P \leq 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

8. Resultados

8.1 Caracterización morfológica y funcional del cultivo primario de trofoblastos

Los cultivos de trofoblastos utilizados en este trabajo se caracterizaron morfológicamente mediante inspección microscópica. Los citotrofoblastos purificados por gradiente de densidad mostraron ser mononucleares y esféricos. Estas células se sembraron en cajas de cultivo con medio DMEM suplementado con alta concentración de suero fetal bovino (figura 4A). Al segundo día, se observó que la mayoría de las células se adhirieron a las cajas de cultivo, y presentaban proyecciones hacia células vecinas (figura 4B). Tales proyecciones citoplasmáticas marcaron el inicio de la formación de los sinciciotrofoblastos, estructuras multinucleadas obtenidas por fusión celular. La aparición secuencial de sinciciotrofoblastos *in vitro* se aprecia en las figuras 4C y 4D, obtenidas de cultivos de 3 y 4 días, respectivamente. Es interesante destacar que los cultivos de 4 días presentaban únicamente sinciciotrofoblastos con un promedio de 20 núcleos en su interior.

La caracterización de los cultivos celulares incluyó además la determinación cuantitativa de la hCG, considerada como un marcador de diferenciación del trofoblasto. En la figura 4E se muestra que la concentración basal de hCG en el medio de cultivo aumentó en proporción directa con el tiempo de cultivo celular. Adicionalmente, cada cultivo utilizado fue capaz de responder a análogos del AMPc, un segundo mensajero que estimula la síntesis de la hCG. En efecto, la figura 4E muestra que la incubación de los trofoblastos con el análogo 8-Br AMPc resultó en el incremento significativo dosis dependiente de la secreción de la hCG. Es importante señalar que el tratamiento con 8-Br AMPc no alteró el proceso de diferenciación del citotrofoblasto hacia sinciciotrofoblasto. Los datos de la figura 4 demuestran la integridad morfológica y funcional del modelo biológico utilizado en este estudio.

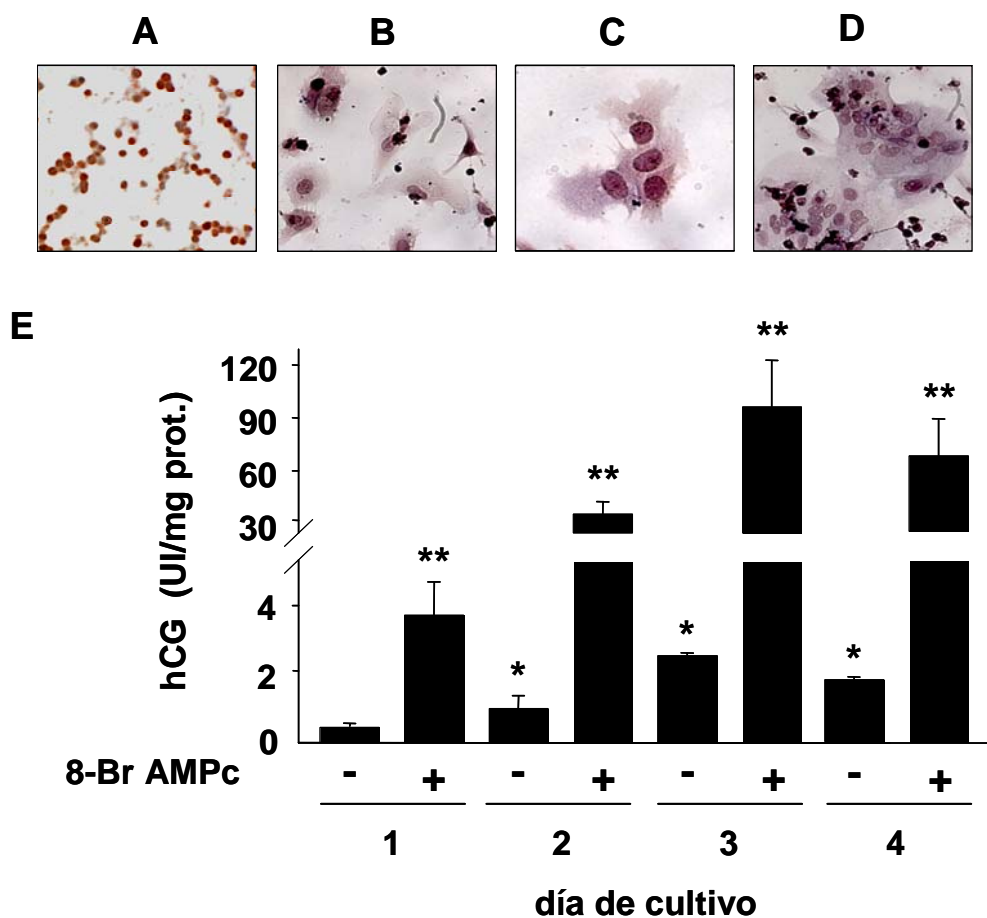


Figura 4. Caracterización morfológica y funcional de los trofoblastos en cultivo. Las células mononucleares (8×10^5 células/mL) se sembraron en cajas de 6 pozos y se cultivaron durante 4 días. En la parte superior se observa la diferenciación del trofoblasto *in vitro* durante los días 1 (A), 2 (B), 3 (C) y 4 (D) del cultivo. Tinción hematoxilina-eosina, 20X. En (E) se muestra el curso temporal de la secreción de la hCG durante el cultivo celular. La hCG se determinó diariamente en los medios de cultivo de las células incubadas en presencia (+) o en ausencia (-) de 8-Br AMPc 1.5 mM. Los resultados se expresan como la media \pm DE de 3 cultivos. * $P < 0.05$ vs. día 1; ** $P < 0.05$ vs. control.

8.2 Efectos del AMPc sobre la expresión génica de proteínas implicadas en el metabolismo de la vitamina D₃ en los trofoblastos en cultivo

Varios estudios han demostrado que el programa de diferenciación del trofoblasto se encuentra bajo el control de factores que actúan mediante el AMPc como segundo mensajero (109). Nuestro primer interés fue investigar la concentración

intracelular de este nucleótido en función del estadio de diferenciación del trofoblasto. Para ello, se incubaron trofoblastos en presencia de IBMX, un inhibidor de fosfodiesterasas (110) y posteriormente se determinó por radioinmunoanálisis la concentración intracelular de AMPc durante los diferentes días del cultivo celular. Como se muestra en la figura 5A, la concentración de AMPc se incrementó paulatina y significativamente en los sinciotrofoblastos cultivados durante 4 días, lo cual correlacionó directamente con el patrón de secreción basal de la hCG (figura 4E). Como control funcional de la generación endógena de AMPc, se llevaron a cabo incubaciones con trofoblastos en presencia de diferentes concentraciones de toxina del cólera, un factor que modifica químicamente a las proteínas $G\alpha_s$ y que resulta en la activación constitutiva de la adenilato ciclasa (111). En la figura 5B se observa que el tratamiento con toxina del cólera incrementó significativamente la acumulación intracelular de AMPc de manera concentración-dependiente.

Con los datos de las figuras 4 y 5, resulta claro que el cultivo de trofoblastos es un modelo adecuado para el estudio de los procesos celulares dependientes de AMPc. El AMPc participa en la regulación de la expresión de las proteínas que transfieren electrones a las hidroxilasas de la vitamina D_3 , así como también controla la síntesis del VDR (12, 17). Como parte de la caracterización de nuestro sistema experimental, investigamos la expresión de los genes que codifican estas proteínas durante la diferenciación del trofoblasto y en respuesta al tratamiento con 8-Br AMPc. El RNA total obtenido de las células incubadas en presencia o en ausencia de 8-Br AMPc se utilizó para la amplificación específica de fragmentos de RNAm mediante RT-PCR y la detección se realizó por hibridación DNA/DNA tipo "Southern". Como control positivo de la acción del 8-Br AMPc, incluimos los transcritos de la subunidad β de la hCG, ya que la expresión de esta subunidad depende de la actividad de la PKA (109). De acuerdo a lo esperado, en la figura 6A se observa que los transcritos de la β hCG se incrementaron gradualmente en función del tiempo de cultivo bajo condiciones basales. El tratamiento con 8-Br AMPc resultó en la mayor respuesta en comparación con las células no tratadas. La abundancia relativa de los transcritos estudiados se obtuvo normalizando las densidades ópticas de cada señal con respecto a las obtenidas con el gen

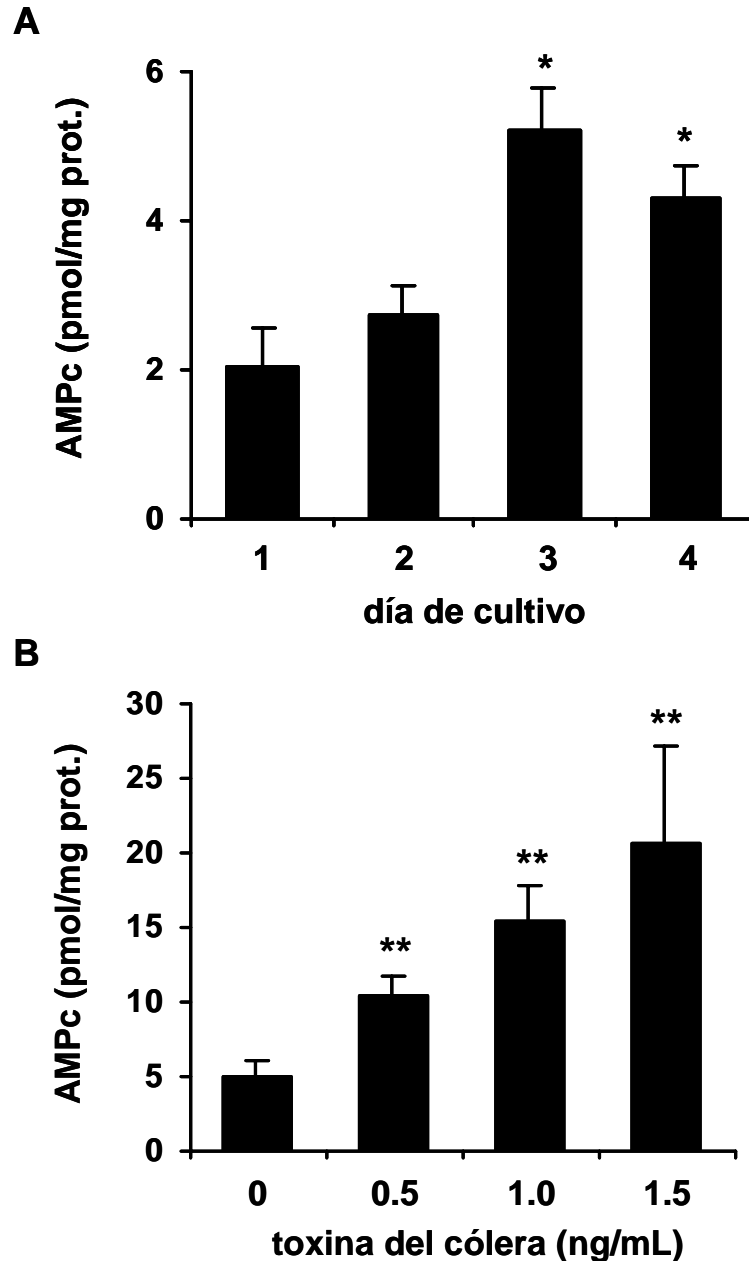


Figura 5. Acumulación de AMPc por los trofoblastos en cultivo. Las células mononucleares (8×10^5 células/mL) se sembraron en cajas de 6 pozos y se cultivaron durante 4 días en medio de cultivo con IBMX 0.1 mM. En (A) se muestra la acumulación intracelular de AMPc durante la diferenciación del trofoblasto *in vitro*. Las células de cada día de cultivo se lisaron en amortiguador RIPA y el AMPc intracelular se determinó por radioinmunoanálisis. En (B) se observa el efecto de la toxina del cólera sobre la síntesis de AMPc. En este caso, los trofoblastos cultivados durante dos días se trataron con diferentes concentraciones de toxina del cólera y la determinación del AMPc se realizó después de 10 min de incubación. Los resultados se expresan como la media \pm DE de 3 cultivos. * $P < 0.05$ vs. día 1; ** $P < 0.05$ vs. control.

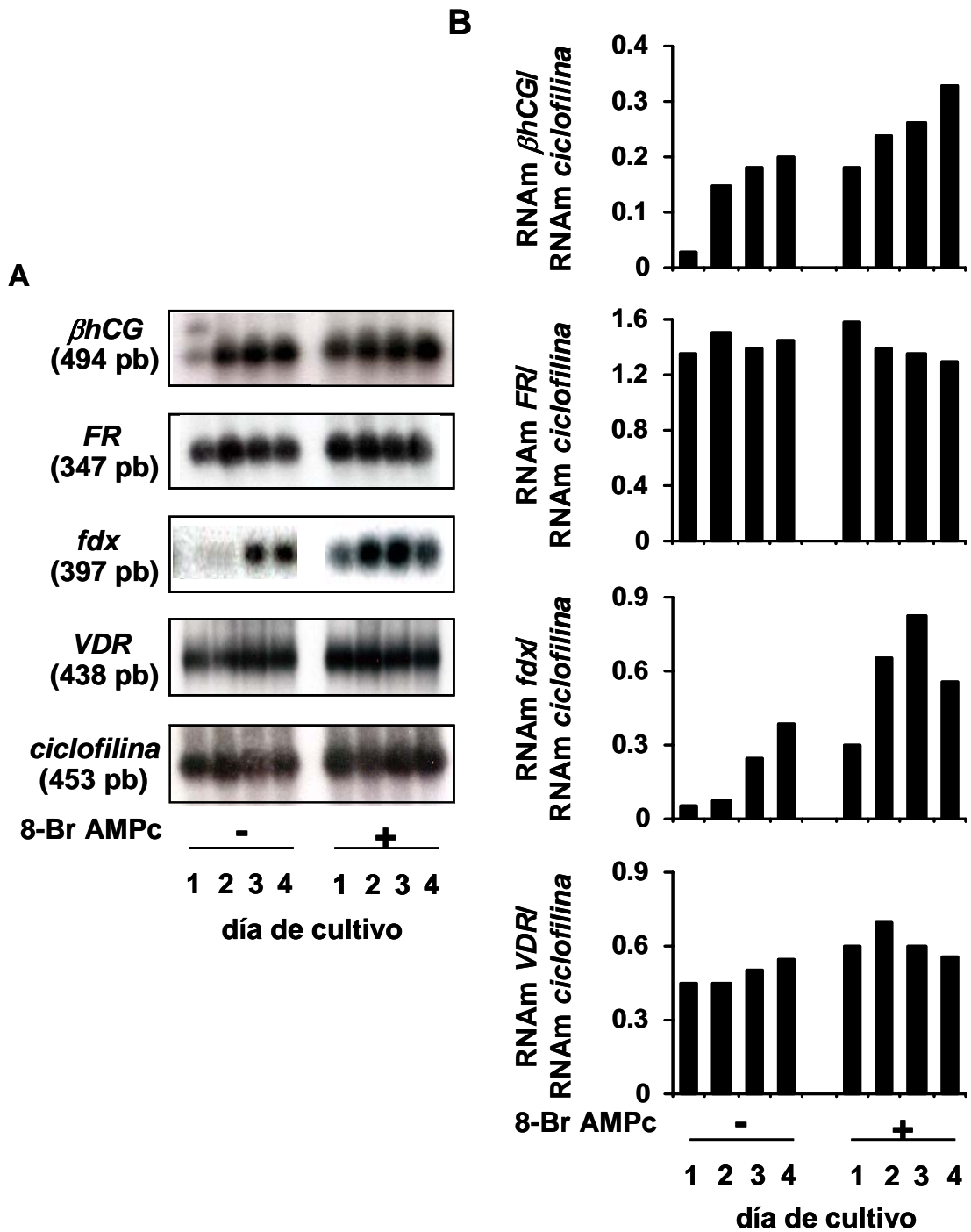


Figura 6. Expresión de los genes de la β hCG y de proteínas implicadas en el metabolismo de la vitamina D₃ durante la diferenciación del trofoblasto en ausencia (-) y en presencia (+) de 8-Br AMPc 1.5 mM. El RNA total se obtuvo durante diferentes días del cultivo celular bajo condiciones basales o bajo el tratamiento con 8-Br AMPc durante 18 h. (A) El RNA total se analizó por RT-PCR e hibridación tipo "Southern" para los genes de la β hCG, el VDR y las proteínas transportadoras de electrones ferredoxina (*fdx*) y ferredoxina reductasa (*FR*). Como control de carga se utilizó la amplificación paralela de los transcritos de la ciclofilina. Se muestran los resultados de un experimento representativo. En (B) se observa la expresión relativa de cada gen con respecto al gen de la ciclofilina.

constitutivo de la ciclofilina (figura 6B). Las figuras 6 A y B muestran la expresión de genes que codifican para proteínas que participan en el metabolismo de la vitamina D₃ como la ferredoxina reductasa (FR), la ferredoxina (fdx) y el VDR. Se observa que en condiciones basales los tres genes se expresan en todos los estadios de diferenciación del trofoblasto, a excepción de la ferredoxina que se expresa preferencialmente en el sinciotrofoblasto (figuras 6 A y B).

De interés para este estudio es que la PTH, utilizando como mediador al AMPc, modifica la síntesis de calcitriol en el riñón al estimular la síntesis *de novo* de la 1 α -hidroxilasa (3). Con base en estas observaciones, propusimos que el AMPc es un segundo mensajero que favorece la síntesis de calcitriol en la placenta humana. Para tal efecto, investigamos si en los trofoblastos en cultivo el AMPc induce al gen CYP27B1 que codifica para la 1 α -hidroxilasa. De manera inesperada, se encontró que el tratamiento con 8-Br AMPc disminuyó la expresión del gen CYP27B1 en función de la concentración del análogo (figuras 7 A y B). El mismo patrón de inhibición sobre la expresión del gen CYP27B1 se observó en las células tratadas con diferentes concentraciones de toxina del cólera (figuras 7 C y D). Estos resultados sobre la 1 α -hidroxilasa nos condujeron a estudiar los efectos del AMPc sobre la expresión de la 24-hidroxilasa, ya que se ha descrito que la expresión de esta enzima disminuye por el AMPc en los túbulos proximales renales (61). Por el contrario, las figuras 7 A, B, C y D muestran que el gen CYP24A1 se indujo en los trofoblastos tratados con 8-Br AMPc y con toxina del cólera. Posteriormente, investigamos el patrón de expresión temporal de estos genes durante la diferenciación del trofoblasto. Las figuras 8 A y B muestran que el gen CYP27B1 disminuyó gradualmente su expresión conforme avanzó el proceso de diferenciación celular. Este efecto se acentuó en presencia de 8-Br AMPc (figuras 8 A y B). De acuerdo a lo esperado, el gen de la 24-hidroxilasa se indujo en las células tratadas con 8-Br AMPc desde el primer día del cultivo y se mantuvo así durante el período estudiado (figuras 8 A y B). Sin embargo, en ausencia de 8-Br AMPc no se observaron señales basales del gen CYP24A1 durante la formación del sinciotrofoblasto (figuras 8 A y B).

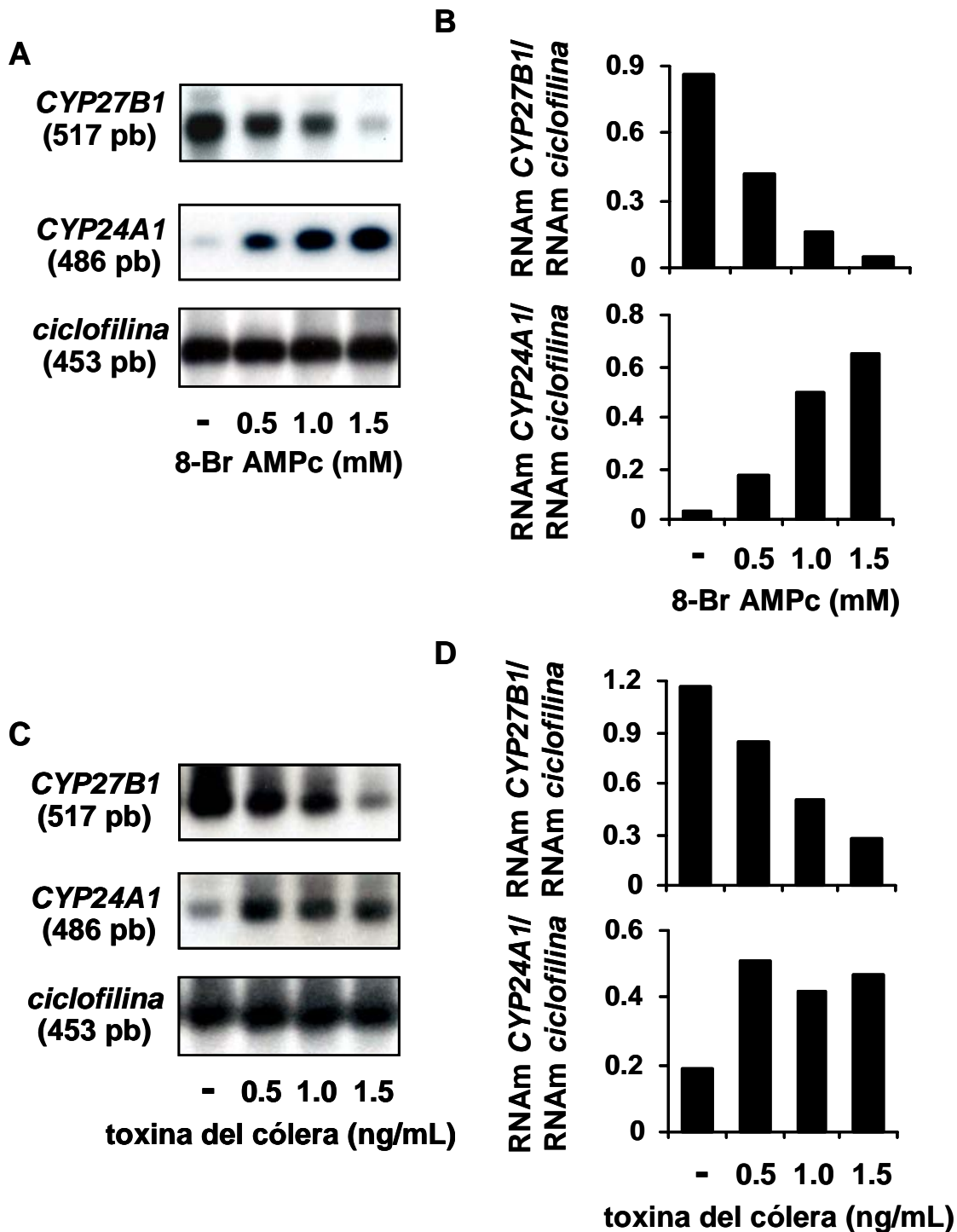


Figura 7. Efecto del 8-Br AMPc (A) y la toxina del cólera (C) sobre la expresión de los genes CYP27B1 y CYP24A1 en los trofoblastos. Las células cultivadas durante dos días, fueron tratadas durante 18 h en presencia o en ausencia de diferentes concentraciones de 8-Br AMPc o de toxina del cólera y la expresión de los genes CYP27B1 y CYP24A1 se evaluó por RT-PCR e hibridación tipo "Southern". Como control de carga se utilizó la amplificación de la ciclofilina. Se muestran los resultados de un experimento representativo. En (B) y (D) se observa la normalización de la expresión con respecto a la ciclofilina para los resultados mostrados en (A) y (C), respectivamente.

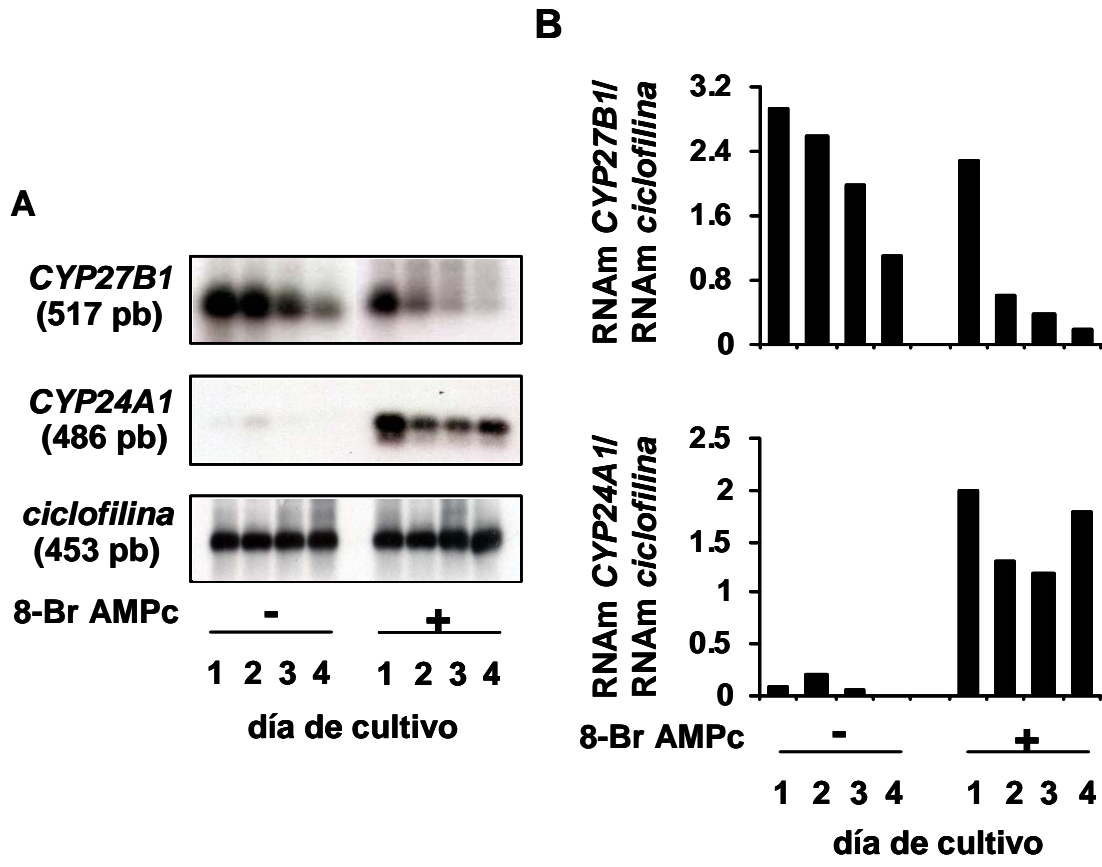


Figura 8. Expresión de los genes CYP27B1 y CYP24A1 durante la diferenciación del trofoblasto en ausencia (-) y en presencia (+) de 8-Br AMPc 1.5 mM. El RNA total se obtuvo durante los diferentes días del cultivo celular bajo condiciones basales o bajo el tratamiento con 8-Br AMPc durante 18 h. (A) El RNA total se analizó por RT-PCR e hibridación tipo “Southern” para los genes CYP27B1 y CYP24A1. Como control de carga se utilizó la amplificación paralela de los transcritos de la ciclofilina. Se muestran los resultados de un experimento representativo. En (B) se observa la expresión relativa de cada gen con respecto al gen de la ciclofilina.

Los efectos del AMPc sobre la 1 α -hidroxilasa también se observaron a nivel de la abundancia de la proteína. En efecto, en las figuras 9 A y B se observa que la 1 α -hidroxilasa inmunorreactiva disminuyó en los trofoblastos en cultivo durante la diferenciación celular y en respuesta al tratamiento con 8-Br AMPc (figuras 9 C y D).

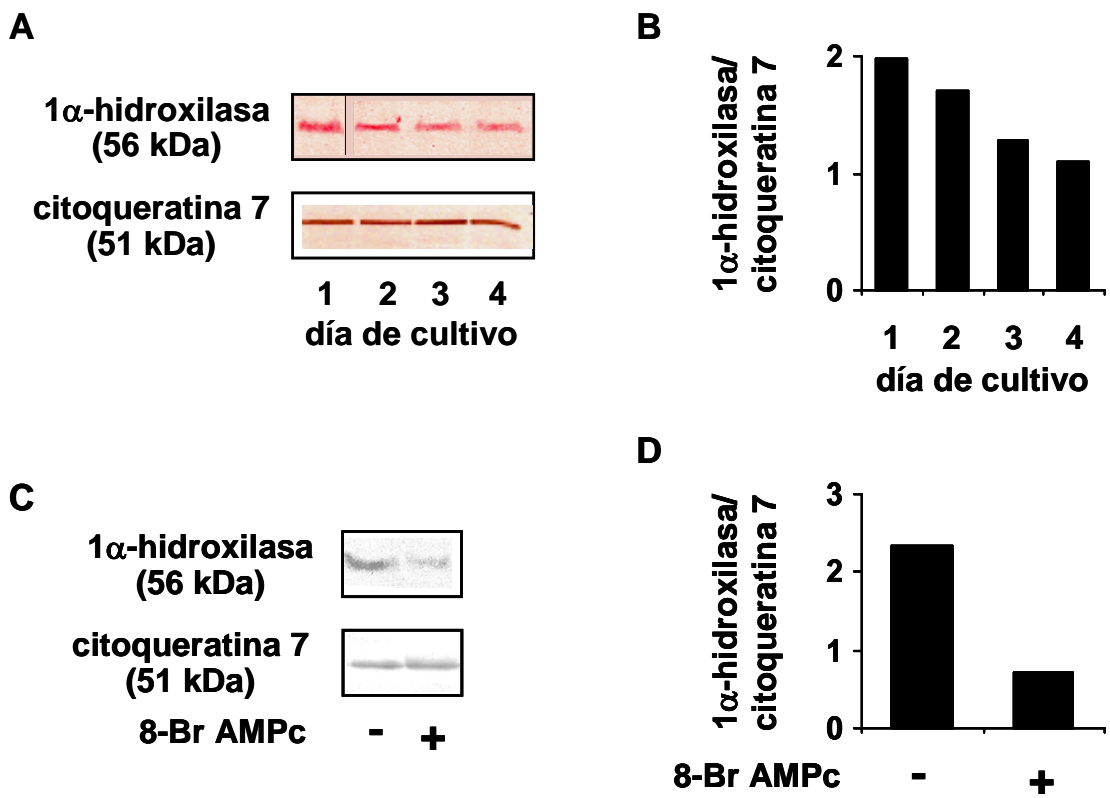


Figura 9. Efecto de la diferenciación del trofoblasto (A y B) y del 8-Br AMPc (C y D) sobre la 1 α -hidroxilasa inmunorreactiva. (A) Las células de cada día de cultivo se lisaron en amortiguador RIPA y la detección de la 1 α -hidroxilasa se efectuó por Western blot. Como control de carga se utilizó la inmunodetección paralela de la citoqueratina 7. En (C) se muestra la expresión de la 1 α -hidroxilasa inmunorreactiva en trofoblastos cultivados por dos días e incubados durante 18 h en ausencia (-) o en presencia (+) de 8-Br AMPc 1.5 mM. En (B) y (D) se observa la abundancia relativa de la 1 α -hidroxilasa con respecto a la citoqueratina 7 para los resultados mostrados en (A) y (C), respectivamente.

Colateralmente, los efectos del AMPc se reflejaron en la actividad enzimática de la 1 α -hidroxilasa, ya que la síntesis de calcitriol se redujo significativamente en los trofoblastos incubados en la presencia de 8-Br AMPc o toxina del cólera (figura 10A). De manera opuesta, el tratamiento de los trofoblastos con 8-Br AMPc o con toxina del cólera estimuló significativamente la actividad enzimática de la 24-hidroxilasa (figura 10B).

En conjunto, los resultados de las figuras 7-10 demuestran que el AMPc es un segundo mensajero que participa en la expresión de los genes CYP27B1 y CYP24A1 en el trofoblasto.

8.3 Efectos del calcitriol sobre la expresión y la actividad enzimática de la 1 α -hidroxilasa y la 24-hidroxilasa de la vitamina D₃ en los trofoblastos en cultivo

La observación de que el gen CYP24A1 se encuentra suprimido durante la diferenciación del trofoblasto es interesante, ya que en otras células el principal activador transcripcional de este gen es el calcitriol (3). Por el contrario, el calcitriol ha sido descrito como un potente supresor de la síntesis de la 1 α -hidroxilasa en el riñón (13). Con el propósito de evaluar el papel del calcitriol en la regulación de los genes CYP27B1 y CYP24A1 en la placenta, los sinciotrofoblastos en cultivo fueron tratados con concentraciones crecientes de calcitriol. Las figuras 11 A y B muestran que el calcitriol inhibió la transcripción del gen CYP27B1 en una manera dependiente de la concentración. Este efecto se reflejó en la disminución significativa de la actividad enzimática de la 1 α -hidroxilasa por el calcitriol (figura 11C). De manera inversa, el gen CYP24A1 se indujo en función directa de la concentración de calcitriol (figuras 11 A y B). Además, la actividad enzimática de la 24-hidroxilasa se incrementó significativamente en las células tratadas con calcitriol (figura 11D). Estos resultados muestran que el efecto del calcitriol sobre los genes CYP27B1 y CYP24A1 es idéntico a lo descrito en el riñón.

8.4 Efectos del AMPc sobre la regulación de la expresión de los genes de la 1 α -hidroxilasa y la 24-hidroxilasa mediada por el calcitriol

En algunos tipos celulares, se ha demostrado que el calcitriol puede generar respuestas rápidas a través de la generación de AMPc (34). En primera instancia, investigamos si el calcitriol afecta la generación de AMPc en los trofoblastos en cultivo durante un período de 10 minutos. La figura 12A muestra que el calcitriol es

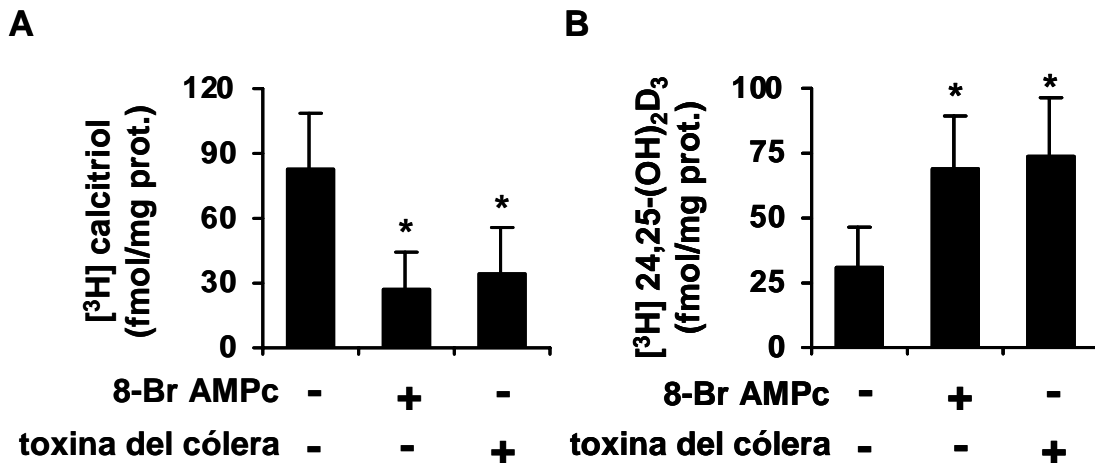


Figura 10. Efecto del 8-Br AMPc y la toxina del cólera sobre las actividades enzimáticas de la 1 α -hidroxilasa (A) y la 24-hidroxilasa (B) en trofoblastos en cultivo. Las células cultivadas durante dos días se incubaron durante 18 h en ausencia (-) o en presencia de 8-Br AMPc 1.5 mM o toxina del cólera 1.5 ng/mL (+). Posteriormente, las células se trataron durante 1 h con 25-hidroxi[26,27-metil-³H]colecalciferol 5 nM y el análisis de los metabolitos de la vitamina D₃ se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución. Las actividades enzimáticas de la 1 α -hidroxilasa y la 24-hidroxilasa se calcularon por el porcentaje de conversión del sustrato en [³H] calcitriol y en [³H] 24,25-dihidroxicolecalciferol {[³H] 24,25-(OH)₂D₃}, respectivamente. Los resultados se normalizaron con las proteínas totales y se presentan como la media \pm DE de 3 cultivos. * $P < 0.05$ vs. control.

capaz de incrementar la acumulación intracelular de AMPc en una manera dependiente de la concentración. Una consecuencia de esta elevación de AMPc intracelular se muestra en la figura 12B, donde se observa que las concentraciones crecientes de calcitriol incrementaron gradualmente la secreción de la hCG. De manera interesante, la figura 12B también muestra que el efecto estimulador del calcitriol sobre la secreción de la hCG no se observó en las células coincubadas en la presencia de H-89, un inhibidor selectivo de la PKA (112).

Nuestros resultados muestran que el AMPc y el calcitriol disminuyen la expresión de la 1 α -hidroxilasa mientras actúan de manera inversa sobre el gen de la 24-hidroxilasa. Estos datos y los que muestran una conexión funcional entre el calcitriol y la adenilato ciclasa (figura 12), nos sugirieron que posiblemente el calcitriol regula la expresión génica de CYP27B1 y CYP24A1 a través de una vía de señalización dependiente de AMPc. Para estudiar esta posibilidad, los trofoblastos se trataron

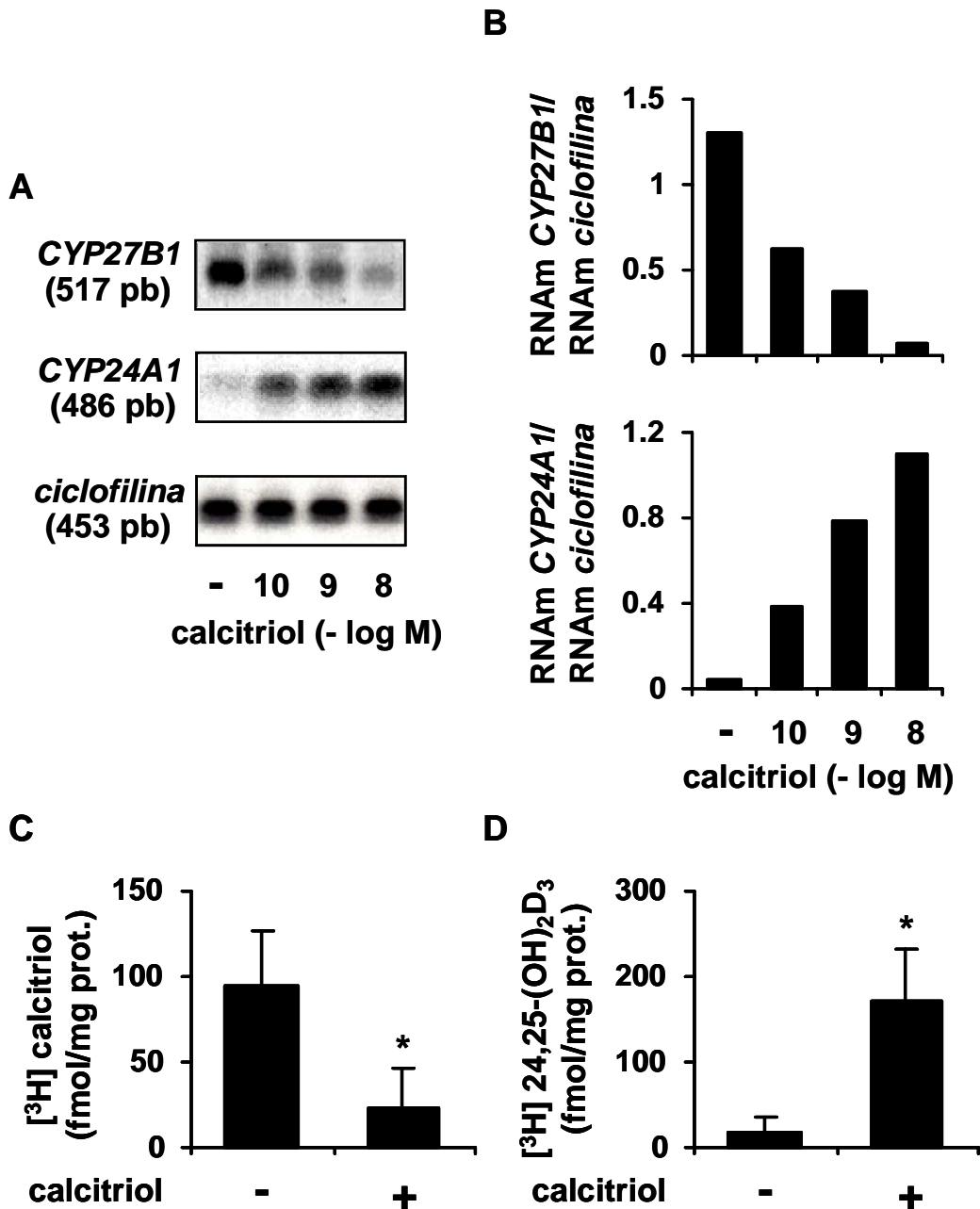


Figura 11. Efecto del calcitriol sobre la expresión y la actividad enzimática de la 1α -hidroxilasa y la 24-hidroxilasa en los trofoblastos en cultivo. (A) Las células cultivadas durante dos días fueron tratadas durante 18 h con etanol como vehículo (-) o con diferentes concentraciones de calcitriol y la expresión de los genes CYP27B1, CYP24A1 y de la ciclofilina se evaluó por RT-PCR e hibridación tipo "Southern". Se muestran los resultados de un experimento representativo. En (B) se observa la normalización de la expresión con respecto a la ciclofilina. En (C) y (D) se muestran las actividades enzimáticas de la 1α -hidroxilasa y la 24-hidroxilasa respectivamente, determinadas de la misma manera que la figura 10. En este caso, las células se trataron durante 18 h con etanol como vehículo (-) o calcitriol 1×10^{-10} M (+). Los resultados se expresan como la media \pm DE de 3 cultivos. * $P < 0.05$ vs. control.

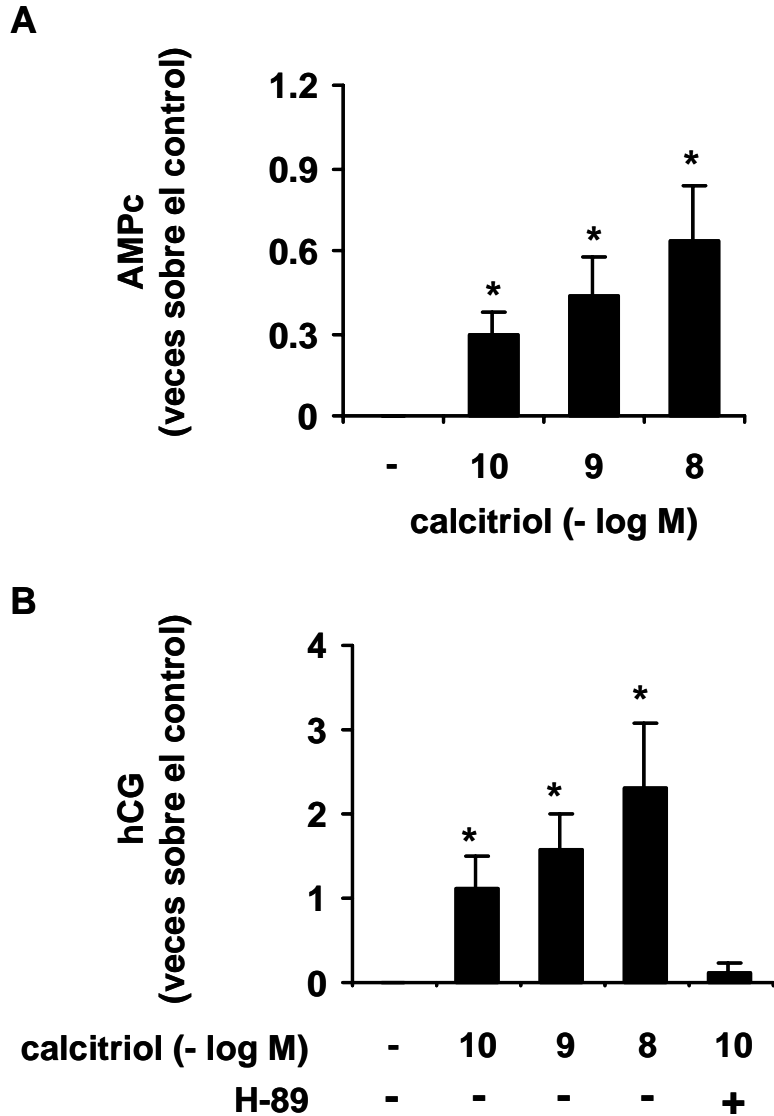


Figura 12. Efecto del calcitriol sobre los niveles intracelulares de AMPc (A) y sobre la secreción de la hCG (B) en los trofoblastos en cultivo. (A) Las células cultivadas durante dos días fueron tratadas con etanol como vehículo o con diferentes concentraciones de calcitriol en medio de cultivo con IBMX 0.1 mM. Las incubaciones se realizaron durante 10 minutos a 37°C y posteriormente el AMPc se determinó por radioinmunoanálisis en los lisados celulares. (B) Las incubaciones se prolongaron hasta 3 h para la determinación de la hCG en el medio de cultivo. Las células tratadas con calcitriol se preincubaron durante dos h en ausencia (-) o en presencia (+) de H-89 5 μ M. Los resultados se expresan como el incremento sobre el control considerado como cero. Cada barra representa la media \pm DE de 3 cultivos. * $P < 0.05$ vs. control.

con calcitriol en presencia o en ausencia de H-89. Las figuras 13 A y B muestran que la inhibición de la expresión del gen CYP27B1 ejercida por el calcitriol no se observó en la presencia del H-89. De manera interesante, el H-89 no tuvo efecto sobre la estimulación mediada por el calcitriol sobre la transcripción del gen CYP24A1 (figuras 13 A y B). Esta última observación es importante, porque sugiere que es el calcitriol y no el AMPc el principal regulador del gen CYP24A1. A este respecto, utilizamos el ZK 159222, un antagonista específico del VDR (113), para investigar la participación de este receptor en la regulación de la expresión de dichas hidroxilasas. Las figuras 13 A y B muestran que la preincubación con ZK 159222 durante 2 h disminuyó la respuesta estimuladora del calcitriol sobre el gen CYP24A1. En contraste, la presencia del antagonista del VDR no afectó el efecto supresivo del calcitriol sobre el gen CYP27B1. También las figuras 13 A y B muestran que el tratamiento de los trofoblastos con ZK 159222 resultó en un ligero incremento en la expresión del gen CYP24A1, mientras disminuyó la señal del gen CYP27B1. Estos resultados pueden ser secundarios a la producción de AMPc por el ZK 159222 de acuerdo a lo observado en la figura 14A. En efecto, las células coincubadas con calcitriol y ZK 159222 produjeron aún mas AMPc (figura 14A). La acumulación de AMPc generada por el ZK 159222 fue suficiente para aumentar la secreción de hCG al medio de cultivo (figura 14B).

Posteriormente tratamos de identificar posibles reguladores naturales de la producción de calcitriol que actuaran a través de receptores acoplados a proteínas G. Para este propósito, los trofoblastos se incubaron en la presencia de hormonas polipeptídicas que regulan la síntesis renal del calcitriol, como son la PTH y la calcitonina (2). Como se observa en las figuras 15 A y B, estas hormonas fueron capaces de disminuir la expresión del gen CYP27B1 y aumentar la expresión de CYP24A1 en una manera similar al 8-Br AMPc y al calcitriol. Los efectos a nivel del RNAm tuvieron un impacto sobre la actividad enzimática, donde se observó que estas hormonas disminuyeron la síntesis de calcitriol (figura 15C) mientras activaron a la 24-hidroxilasa (figura 15D).

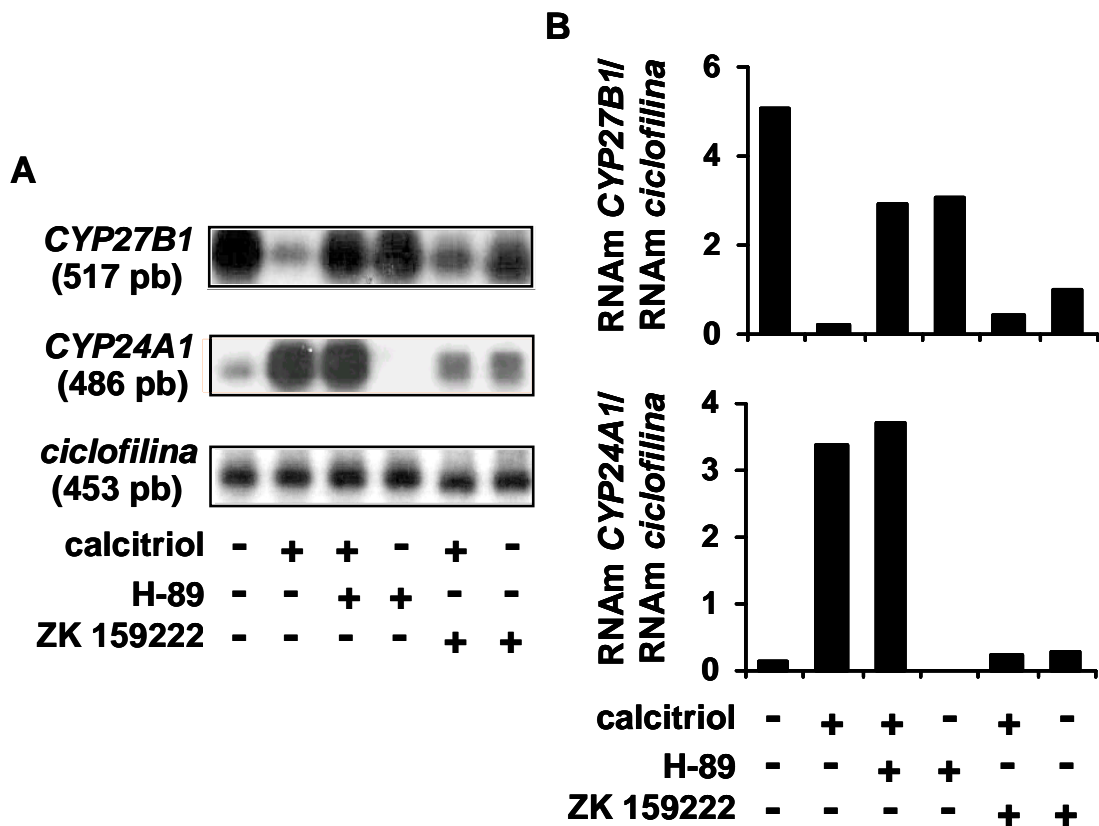


Figura 13. Efecto del H-89 y del ZK 159222 sobre la regulación de los genes *CYP27B1* y *CYP24A1* en los trofoblastos en cultivo. (A) Las células cultivadas durante dos días fueron preincubadas durante 2 h con H-89 5 μ M o con ZK 159222 1×10^{-7} M. Posteriormente, las células fueron tratadas durante 18 h con etanol como vehículo o con calcitriol 1×10^{-10} M y la expresión de los genes *CYP27B1*, *CYP24A1* y de la ciclofilina se evaluó por RT-PCR e hibridación tipo "Southern". Se muestran los resultados de un experimento representativo. En (B) se observa la normalización de la expresión con respecto a la ciclofilina.

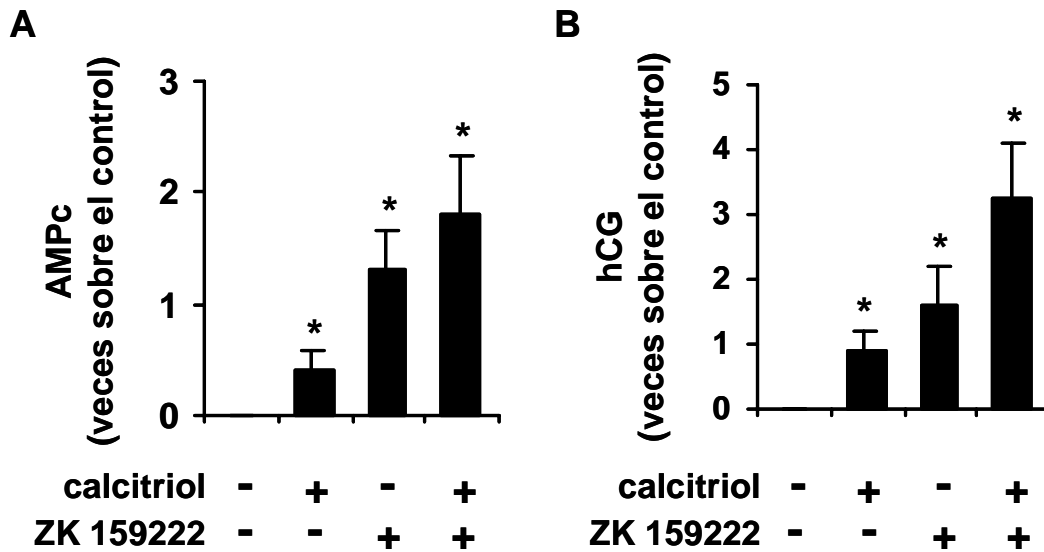


Figura 14. Efecto del ZK 159222 sobre la síntesis de AMPc (A) y la secreción de la hCG (B) en los trofoblastos en cultivo. Las células en medio de cultivo con IBMX 0.1 mM se trataron con etanol como vehículo, calcitriol 1×10^{-10} M o ZK 159222 1×10^{-7} M. Las incubaciones se realizaron a 37°C durante 10 min (A) o 3 h (B) y las determinaciones de AMPc y hCG se realizaron como se describió previamente. Los resultados se expresan como el incremento sobre el control considerado como cero. Cada barra representa la media \pm DE de 3 cultivos. * $P < 0.05$ vs. control.

De acuerdo a lo esperado, la PTH y la calcitonina aumentaron significativamente el contenido intracelular de AMPc en un período de 10 minutos (figura 16A). Estos efectos también se observaron en la secreción de la hCG, utilizada como un marcador funcional del AMPc (figura 16B). La calcitonina fue la hormona que activó con mayor potencia a la adenilato ciclasa y la que estimuló en mayor proporción la secreción de la hCG en este sistema experimental (figuras 16 A y B).

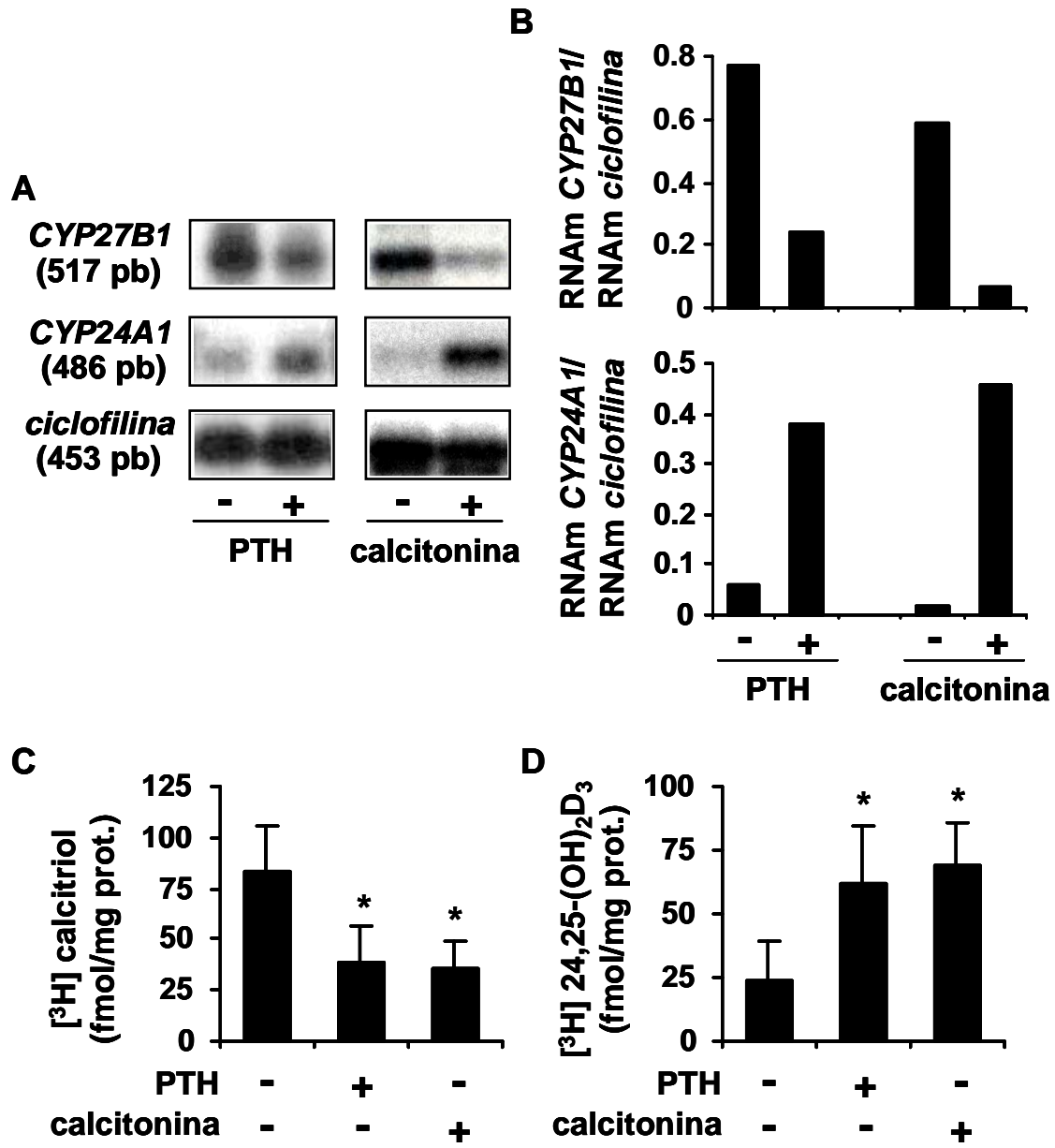


Figura 15. Efecto de la PTH y la calcitonina sobre la expresión (A, B) y las actividades enzimáticas de la 1 α -hidroxilasa (C) y la 24-hidroxilasa (D) en los trofoblastos en cultivo. (A) Las células cultivadas durante dos días fueron tratadas durante 18 h con PTH 1×10^{-7} M y con calcitonina 1×10^{-7} M y la expresión de los genes CYP27B1, CYP24A1 y de la ciclofilina se evaluó por RT-PCR e hibridación tipo "Southern". Se muestran los resultados de un experimento representativo. En (B) se observa la normalización de la expresión con respecto a la ciclofilina. En (C) y (D) se muestra el efecto de ambas hormonas sobre las actividades enzimáticas de la 1 α -hidroxilasa y la 24-hidroxilasa, respectivamente. En este caso, las células se trataron durante 18 h con las hormonas y el análisis se realizó como se describió previamente. Los resultados se expresan como la media \pm DE de 3 cultivos. * $P < 0.05$ vs. control.

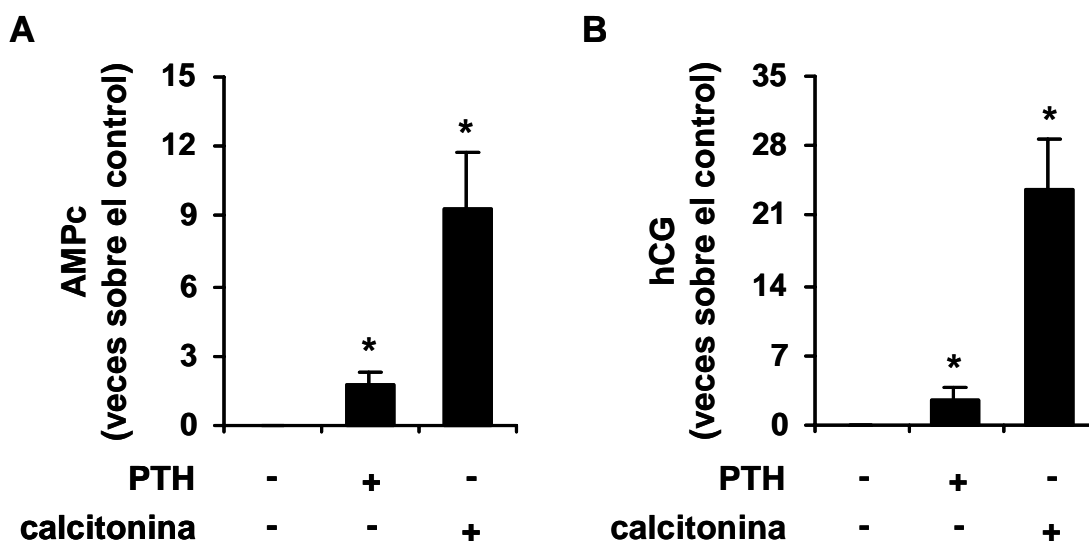


Figura 16. Efecto de la PTH y la calcitonina sobre la síntesis de AMPc (A) y la secreción de la hCG (B) en los trofoblastos en cultivo. Las células en medio de cultivo con IBMX 0.1 mM se trataron con las hormonas durante 10 min (A) o 3 h (B) y las determinaciones de AMPc y hCG se realizaron como se describió previamente. Los resultados se expresan como el incremento sobre el control considerado como cero. Cada barra representa la media \pm DE de 3 cultivos. * $P < 0.05$ vs. control.

8.5 Metabolismo de la vitamina D₃ en la línea celular JEG-3

Con la finalidad de investigar la regulación de las hidroxilasas de la vitamina D₃ en otro modelo biológico de la placenta, utilizamos la línea celular JEG-3 derivada de un coriocarcinoma humano. En las figuras 17 A y B se observa que el gen CYP27B1 se expresa en mayor proporción en las células JEG-3 en comparación con los sinciotrofoblastos en cultivo. Sin embargo, no se observó la 1 α -hidroxilasa inmunorreactiva en esta línea celular (figuras 17 C y D) y estos resultados correlacionaron con la menor producción de calcitriol (figura 17E). De manera interesante, no logramos detectar ni el RNAm ni la actividad enzimática de la 24-hidroxilasa en las células JEG-3 bajo ninguna de las condiciones experimentales utilizadas en este estudio (datos no mostrados). Otra alteración que observamos en las células JEG-3 fue la falta de respuesta del gen CYP27B1 a la acción del 8-Br AMPc. En efecto, las figuras 18 A y B muestran que el transcrito de la 1 α -hidroxilasa

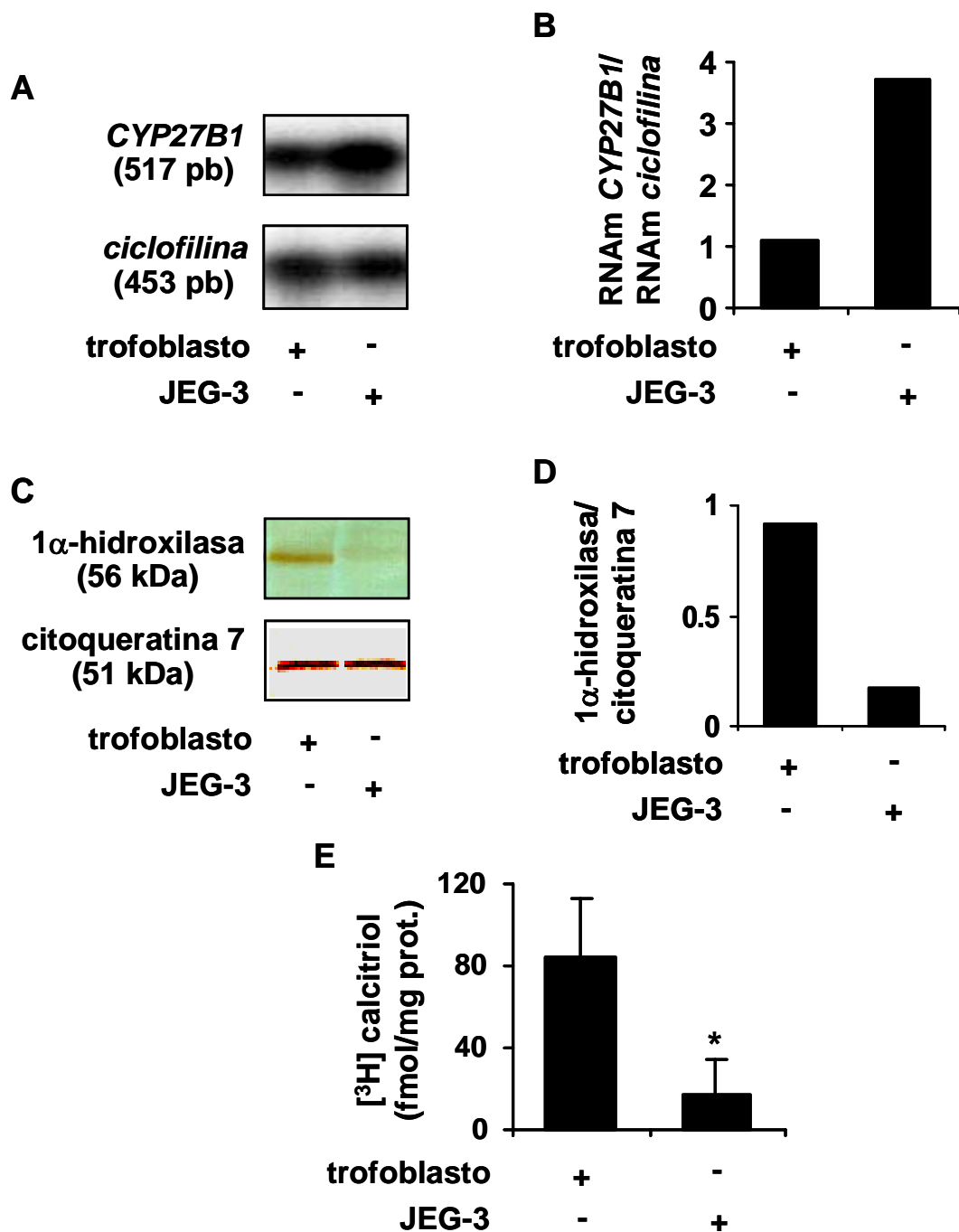


Figura 17. Expresión y actividad enzimática de la 1α -hidroxilasa en las células JEG-3 y en los trofoblastos. (A) El RNA total se obtuvo de cultivos de células JEG-3 y de trofoblastos cultivados durante dos días. La expresión de los genes *CYP27B1* y de la *ciclofilina* se evaluó por RT-PCR e hibridación tipo "Southern" a partir de 1 μ g de RNA total. Se muestran los resultados de un experimento representativo. En (B) se observa la normalización de la expresión con respecto a la *ciclofilina*. En (C) se muestra la inmunodetección de la 1α -hidroxilasa y la citoqueratina 7 a partir de 75 μ g de proteínas totales de cada tipo celular. En (D) se observa la abundancia relativa de la 1α -hidroxilasa con respecto a la citoqueratina 7. En (E) se muestra la actividad enzimática de la 1α -hidroxilasa en ambos tipos celulares. Los resultados se expresan como la media \pm DE de 3 cultivos. * $P < 0.05$ vs. trofoblasto.

se expresó al mismo nivel en función de las diferentes concentraciones de 8-Br AMPc. Con fines comparativos, las figuras 18 A y B muestran que el gen CYP27B1 del sinciotrofoblasto normal fue suprimido de manera dependiente de la concentración de 8-Br AMPc. Como un control del efecto biológico del AMPc, la figura 18C muestra que tanto los trofoblastos en cultivo como las células JEG-3, incrementaron gradualmente la secreción de hCG en respuesta a las diferentes concentraciones de 8-Br AMPc. Finalmente, investigamos el efecto de concentraciones crecientes de calcitriol sobre la expresión del gen CYP27B1 en las células JEG-3. Las figuras 19 A y B muestran que el gen de la 1α -hidroxilasa tampoco responde al efecto supresivo del calcitriol en las células JEG-3. Bajo las mismas condiciones experimentales, los sinciotrofoblastos en cultivo presentaron la inhibición del gen CYP27B1 mediada por el 8-Br AMPc (figuras 19 A y B).

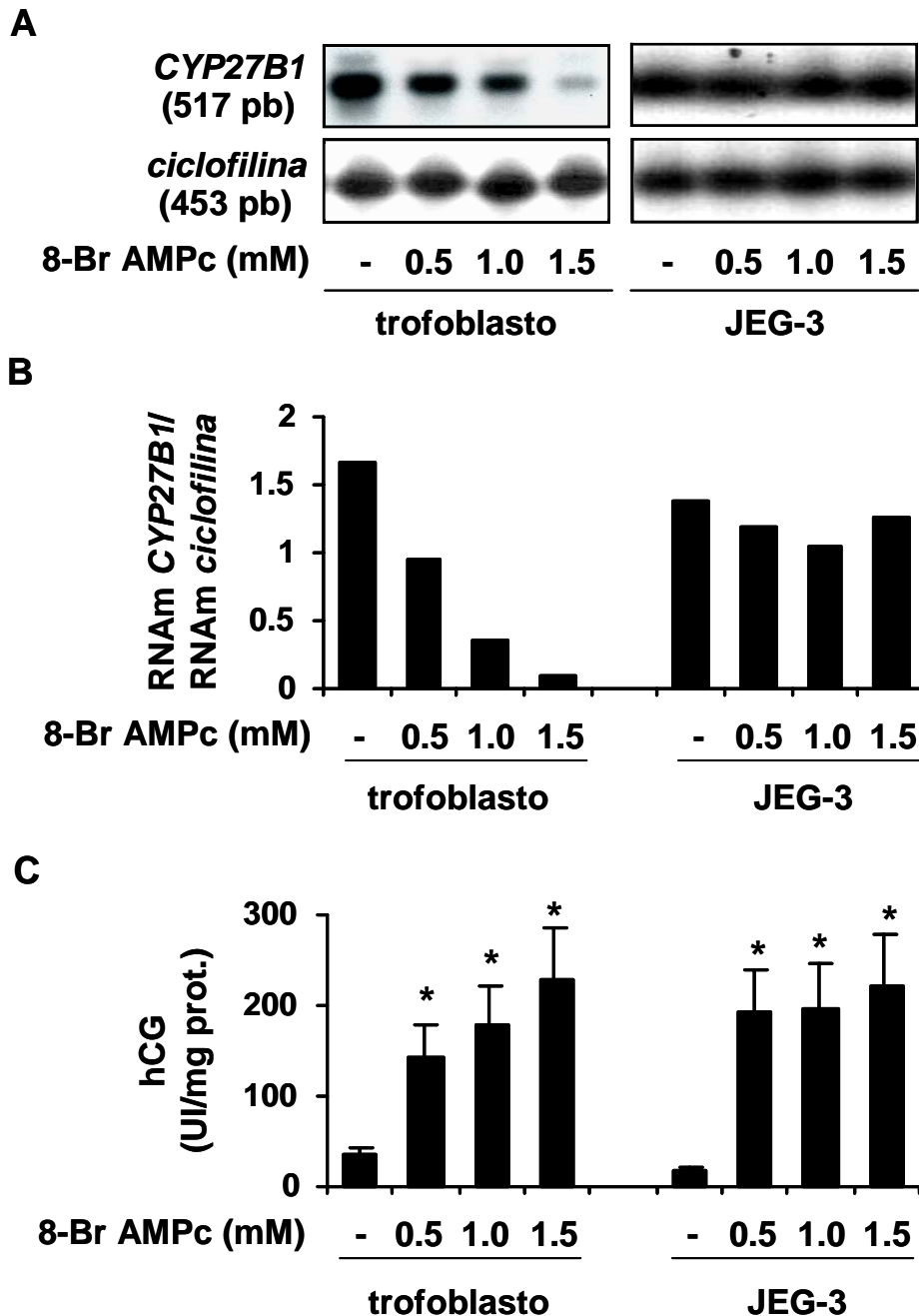


Figura 18. Efecto del 8-Br AMPc sobre la expresión del gen CYP27B1 (A) y sobre la secreción de hCG (C) en las células JEG-3 y en los trofoblastos en cultivo. Las células JEG-3 al 75% de confluencia y los trofoblastos cultivados durante dos días fueron tratados durante 18 h en presencia o en ausencia de diferentes concentraciones de 8-Br AMPc y la expresión de los genes CYP27B1 y de la ciclofilina se evaluó por RT-PCR e hibridación tipo "Southern". Se muestran los resultados de un experimento representativo. En (B) se observa la normalización de la expresión con respecto a la ciclofilina. En (C) se observa el efecto del tratamiento durante 18 h con 8-Br AMPc sobre la secreción de la hCG en ambos tipos celulares. Los resultados se expresan como la media \pm DE de 3 cultivos. * $P < 0.05$ vs. control.

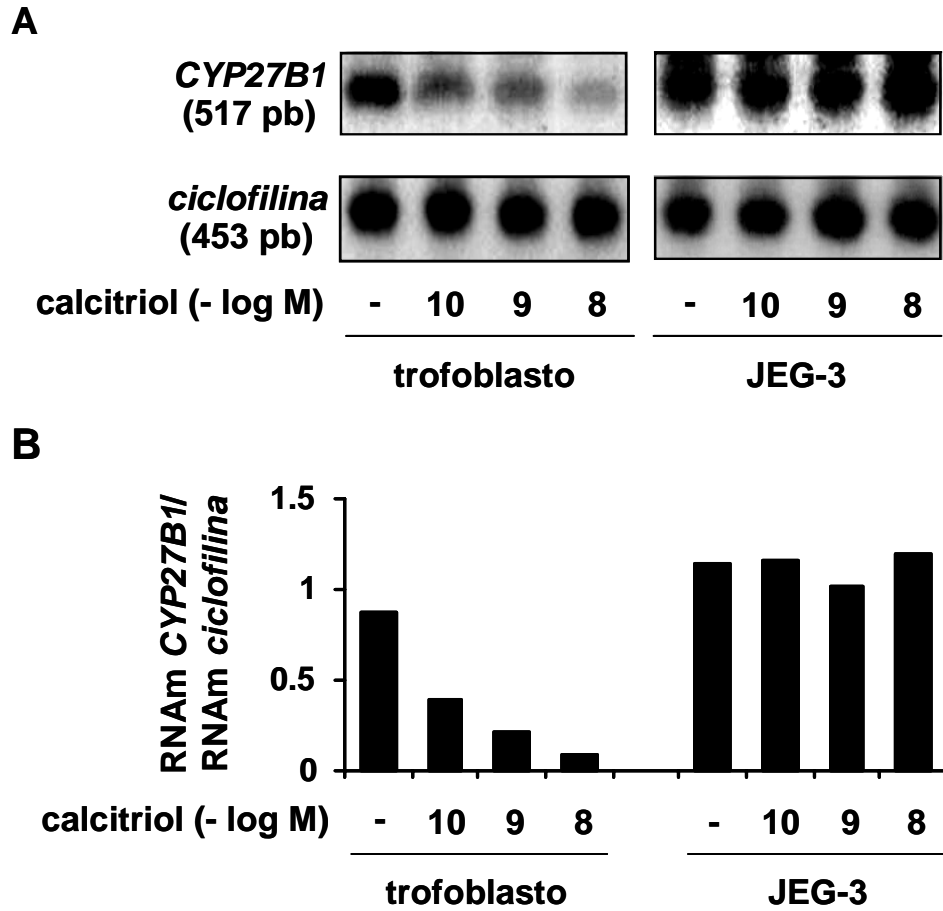


Figura 19. Efecto del calcitriol sobre la expresión del gen CYP27B1 en las células JEG-3 y en los trofoblastos en cultivo. (A) Las células JEG-3 al 75% de confluencia y los trofoblastos cultivados durante dos días fueron tratados durante 18 h en presencia o en ausencia de diferentes concentraciones de calcitriol y la expresión de los genes CYP27B1 y de la ciclofilina se evaluó por RT-PCR e hibridación tipo "Southern". Se muestran los resultados de un experimento representativo. En (B) se observa la normalización de la expresión con respecto a la ciclofilina.

9. Discusión

Los resultados medulares de este estudio corresponden a la descripción de la regulación diferencial de las hidroxilasas de la vitamina D₃ por una vía de señalización dependiente del AMPc. Este trabajo demuestra que el AMPc actúa suprimiendo la síntesis *de novo* de la 1 α -hidroxilasa mientras activa la transcripción del gen de la 24-hidroxilasa, justo de manera opuesta al mecanismo que opera en los túbulos proximales renales (55, 59, 60, 114, 115), el sitio de mayor producción de calcitriol en el organismo (14).

La PTH es la hormona que ejerce el control positivo más importante en la síntesis renal de calcitriol (58). La PTH actúa sobre los túbulos proximales estimulando la expresión del gen CYP27B1 a través del reclutamiento de moduladores transcripcionales sobre la región promotora del gen (59). De manera interesante, el segundo mensajero de la acción de la PTH en el riñón es el AMPc (55). En nuestro modelo de placenta humana, el 8-Br AMPc fue capaz de regular negativamente la síntesis de calcitriol al suprimir la expresión del gen CYP27B1. Resultados similares se obtuvieron al cultivar los trofoblastos en presencia de PTH, calcitonina y toxina del cólera, factores que actúan a través de la síntesis de AMPc como segundo mensajero. Los efectos inhibidores sobre el gen CYP27B1 se reflejaron en la síntesis *de novo* y en la actividad enzimática de la 1 α -hidroxilasa. También se observó la inhibición de la expresión del gen CYP27B1 durante la diferenciación del trofoblasto *in vitro*, un proceso que depende de la acumulación intracelular de AMPc (116). En conjunto, estas observaciones indican que la acción inhibidora del AMPc sobre la 1 α -hidroxilasa ocurre a nivel transcripcional y sugieren que el promotor del gen CYP27B1 posee elementos de respuesta negativos para la acción de este segundo mensajero en el trofoblasto de la placenta a término. A este respecto, se ha descrito que la región promotora del gen CYP27B1 humano contiene 10 sitios de unión para NF κ B, un factor de transcripción que inhibe la expresión basal de la 1 α -hidroxilasa en las células HEK-293 (117). Además, se demostró que el bloqueo farmacológico de este factor de transcripción resulta en el incremento de la expresión del gen CYP27B1 (117). Un mecanismo similar es posible que actúe en la

placenta ya que el trofoblasto expresa este factor de transcripción (118) y se ha descrito que el AMPc estimula la unión del NF κ B al DNA (119). Por otra parte, la inhibición de la transcripción del gen CYP27B1 por el AMPc también puede ser un efecto mediado a través de los elementos de respuesta para el AMPc (CREs) presentes en el promotor (60). En varios tipos celulares tratados por períodos prolongados con activadores de la vía de señalización de la PKA, se ha descrito la presencia de una proteína que bloquea los efectos estimuladores mediados por el AMPc. Esta proteína llamada ICER (represor temprano inducible por AMPc) actúa compitiendo con la proteína de unión a los sitios CRE, pero debido a que no posee el dominio de transactivación, es incapaz de continuar reclutando a los coactivadores y detiene la transcripción estimulada por el AMPc (120). Este mecanismo participa en el incremento del VDR por efecto de la PTH (121) y también en la decidualización del endometrio (122), un proceso en el cual participa el calcitriol (123). De interés es que otros procesos mediados por el AMPc, tales como la síntesis y secreción de la hCG, y la inducción de los genes de la ferredoxina y la 24-hidroxilasa no mostraron un efecto inhibitorio al tratamiento con 8-Br AMPc a largo plazo.

Se considera al calcitriol como el regulador negativo más importante de la expresión de la 1 α -hidroxilasa (9). Este mecanismo de retroalimentación negativo opera en todas las células que expresan a esta enzima y depende de la presencia del VDR (17). Al respecto, la unión del calcitriol al VDR dispara una serie de eventos moleculares en el promotor del gen CYP27B1 que impiden el ensamblaje de la maquinaria general de transcripción (59). Es posible que este mecanismo opere en los trofoblastos, ya que se observó la inhibición gradual de la expresión del gen CYP27B1 por efecto de concentraciones crecientes de calcitriol. Sin embargo, las observaciones de la figura 13, indican que además existe otro sistema de control en la regulación del gen CYP27B1 por el calcitriol. El patrón de inhibición del 8-Br AMPc y el calcitriol sobre la expresión del gen CYP27B1, así como la acumulación rápida de AMPc por efecto del calcitriol, sugieren que el calcitriol puede bloquear la expresión de la 1 α -hidroxilasa a través de un mecanismo dependiente de AMPc. De acuerdo con esto, la presencia del inhibidor de la PKA, H-89, revirtió la supresión

transcripcional del gen CYP27B1 mediada por el calcitriol, pero no se observó reversión en las células coincubadas con calcitriol y ZK 159222, un antagonista del VDR. Esta última observación no descarta la participación del VDR en los efectos inhibidores del calcitriol sobre el gen CYP27B1 en el trofoblasto, ya que se considera que el VDR es esencial para las acciones biológicas del calcitriol (124). El antagonista ZK 159222, el cual interactúa específicamente con el VDR (113), incrementó la acumulación intracelular de AMPc y la secreción de la hCG en nuestro sistema, indicando que su efecto antagónico pudo ser enmascarado ya que el AMPc inhibió la expresión del gen CYP27B1.

Los resultados de este estudio sugieren que el calcitriol es capaz de actuar a nivel de la membrana del trofoblasto, ya que las células tratadas con esta hormona mostraron la elevación dosis-dependiente de la concentración intracelular de AMPc y de la hCG. Además, observamos que el H-89 bloqueó completamente la estimulación de la secreción de la hCG inducida por el calcitriol. Se ha descrito que el músculo cardíaco responde al tratamiento con calcitriol sintetizando AMPc en el lapso de segundos a minutos (125). Estos resultados y los presentados en este estudio sugieren que la síntesis de AMPc es consecuencia de la unión del calcitriol a receptores de membrana. Se han informado varias proteínas de la membrana plasmática que tienen la capacidad de unirse al calcitriol (40, 41). Sin embargo, todo apunta a que las acciones rápidas del calcitriol son mediadas por el VDR, ya que se ha localizado a este receptor en microdominios de la membrana plasmática (42) y se ha demostrado la ausencia de respuestas rápidas del calcitriol en pacientes con mutaciones en el VDR (124).

Este estudio muestra que el gen CYP24A1 placentario se induce dependiendo de la concentración de calcitriol. Se ha establecido que la regulación de la 24-hidroxilasa por el calcitriol se lleva a cabo a nivel transcripcional (19) y obedece al hecho de que la región promotora del gen CYP24A1 posee varios sitios de unión para el heterodímero VDR-RXR (70, 126). En ausencia de calcitriol, el heterodímero VDR-RXR reprime la transcripción a través del reclutamiento de correpresores al promotor (32). El calcitriol, aún en concentraciones muy bajas, promueve un cambio conformacional en el VDR que permite reemplazar los correpresores por

coactivadores e iniciar la transcripción del gen CYP24A1. A mayores concentraciones de calcitriol, los VDREs funcionan de manera cooperativa para asegurar altos niveles de expresión (17). Estos eventos moleculares son los responsables de que se considere al gen CYP24A1 como el más inducible entre los numerosos genes que responden al calcitriol (18). En nuestro sistema experimental, el calcitriol fue el inductor más potente del gen CYP24A1 y el que provocó la máxima respuesta sobre la síntesis de 24,25-dihidroxicolecalciferol, lo cual sugiere que es el principal activador de este gen en el trofoblasto.

Los resultados de este estudio también muestran claramente que el AMPc es capaz de incrementar la expresión del gen CYP24A1 en los trofoblastos en cultivo. En este sentido, las hormonas calciotrópicas PTH y calcitonina, así como la toxina del cólera y el 8-Br AMPc activaron la expresión del gen CYP24A1 e incrementaron la bioconversión de 25-hidroxicolecalciferol en 24,25-dihidroxicolecalciferol. Además, el H-89 disminuyó la expresión basal del gen CYP24A1. Estas observaciones son opuestas a las obtenidas en los túbulos proximales renales, el principal sitio de síntesis de calcitriol (3). En este sitio de la nefrona, la expresión del gen CYP24A1 es suprimida por la PTH, la forskolina y el 8-Br AMPc (115). Diversos estudios en túbulos proximales tratados con PTH mostraron que la transcripción del gen CYP24A1 es normal, pero que los transcritos producidos son rápidamente degradados por efecto de la señalización de esta hormona (61). Esta observación y la baja expresión del VDR (63) tienen un impacto en la producción renal de calcitriol al evitar la depuración inmediata por la 24-hidroxilasa. Ahora es claro que la regulación de la 24-hidroxilasa obedece a factores locales y es distinta en diversas células inclusive dentro del riñón. En los túbulos distales se ha descrito que el AMPc sinergiza los efectos inductores del calcitriol sobre el gen CYP24A1 (45). En este mismo sitio, el AMPc incrementa la síntesis *de novo* del VDR a través de favorecer la producción del factor de transcripción C/EBP β (71). Adicionalmente, se ha demostrado que el calcitriol también estimula la expresión del VDR mediante el aumento en la síntesis de C/EBP β (127). Aunque la placenta expresa C/EBP β (128), es poco probable que un mecanismo similar a este opere en el trofoblasto debido a que no observamos incremento en el RNAm del VDR por efecto del 8-Br

AMPC. De manera interesante, el tratamiento de las células con ZK 159222 incrementó la expresión basal del gen CYP24A1. Esta observación puede ser debida a que este antagonista del VDR aumentó la síntesis rápida de AMPC, lo cual elevó la secreción de la hCG al medio de cultivo. En conjunto nuestra evidencia sugiere que el control de la expresión de la 24-hidroxilasa en el trofoblasto se lleva a cabo por una vía dependiente del VDR y por efecto de la PKA, probablemente a través de los elementos de respuesta al AMPC que se encuentran en el promotor del gen CYP24A1 (108).

Los resultados de la regulación de las hidroxilasas de la vitamina D₃ de este estudio constituyen evidencias a favor de que la síntesis extrarrenal de calcitriol no está sujeta a los mismos sistemas que controlan la síntesis de la mayor fracción del calcitriol en el organismo. Actualmente se considera que el calcitriol producido en el riñón posee efectos endocrinos sobre todo en la homeostasis del calcio y del fósforo (2). Por el contrario, se ha sugerido que la pequeña fracción extrarrenal de calcitriol tiene efectos autocrinos y paracrinos, participando en procesos biológicos locales como la regulación de la respuesta inmune y el control del ciclo celular (3). A este respecto, en este trabajo mostramos que el metabolismo del calcitriol se encuentra alterado en las células JEG-3, utilizadas como un modelo de transformación neoplásica del trofoblasto. Las células JEG-3 produjeron menos calcitriol que los trofoblastos en cultivo, lo cual correlacionó con la aparente falta de 1 α -hidroxilasa inmunorreactiva. Numerosos estudios han mostrado que el calcitriol tiene un efecto protector contra el cáncer a través de la inhibición de la proliferación celular (22). El calcitriol actúa principalmente en la transición de las fases G₁ y G₀ del ciclo celular a través de múltiples mecanismos entre los que destacan el control de la expresión de reguladores del ciclo celular, el bloqueo de la señalización por factores de crecimiento y la inducción de la apoptosis (129). Por tanto es factible suponer que la síntesis deficiente de calcitriol en las células JEG-3 es un factor permisivo para la alta tasa de división celular.

El cáncer de próstata es la patología mejor caracterizada en términos de sensibilidad al calcitriol (22). Diversas líneas celulares y tumores sólidos de esta glándula tienen actividad y expresión reducida de la 1 α -hidroxilasa debido a la

función alterada del promotor del gen CYP27B1 (130). En nuestro estudio con las células JEG-3, observamos que el gen CYP27B1 se expresa inclusive en mayor proporción que en los trofoblastos en cultivo. Estos resultados sugieren alteraciones postranscripcionales en la expresión basal de la 1α -hidroxilasa en estas células de coriocarcinoma humano, de igual manera a lo observado en un modelo animal de hipofosfatemia ligada al cromosoma X (131). Además mostramos que las células JEG-3 no poseen el mecanismo de inhibición del gen CYP27B1 por efecto del AMPc o del calcitriol, lo cual sugiere otras alteraciones funcionales a nivel del promotor.

Es de importancia que el gen CYP24A1 no se expresó en las células JEG-3 bajo condiciones basales ni en respuesta al estímulo del 8-Br AMPc y el calcitriol. Estos resultados se reflejaron en la actividad enzimática de la 24-hidroxilasa, ya que no se detectó 24,25-dihidroxicolecalciferol bajo ninguna de las condiciones utilizadas en este estudio. Estos datos apuntan a que probablemente el gen CYP24A1 es refractario a la acción del calcitriol o el 8-Br AMPc debido a la presencia de alteraciones en la región promotora o porque el aparato general de transcripción no funciona de manera apropiada. En todo caso, los resultados son contradictorios con las descripciones de la literatura, las cuales señalan que la actividad de la 24-hidroxilasa es elevada en células de diversos tumores (132). De hecho, el gen CYP24A1 es considerado como un oncogen debido a que su elevada expresión reduce el calcitriol biodisponible y a través de ello fomenta la proliferación de las células tumorales (133). En la gran mayoría de los casos, la alta tasa de expresión es debida a ciertas anomalías genéticas del brazo largo del cromosoma 20 (133). A semejanza de lo que ocurrió en nuestro estudio, se ha descrito que el gen CYP24A1 no responde a la inducción por el calcitriol en algunos pacientes con xeroderma pigmentoso ocasionado por mutaciones en la subunidad XPD del factor de transcripción/reparación TFIIH (134). En esta patología, se ha determinado que la falta de inducción es debida a alteraciones en el reclutamiento del VDR al promotor del gen (134). Cabe destacar que las células JEG-3 expresan al VDR e inclusive se han utilizado como modelo para el estudio de algunos procesos celulares dependientes del calcitriol (71). En comparación, los resultados obtenidos en los

trofoblastos normales en cultivo sugieren que la regulación de las hidroxilasas de la vitamina D₃ es dependiente de la síntesis local de AMPc y calcitriol, mientras que esto no ocurre en el modelo neoplásico del trofoblasto.

Como parte de la caracterización funcional del cultivo de trofoblastos, investigamos la expresión de los genes de la ferredoxina y la ferredoxina reductasa por efecto del AMPc. Estos genes son importantes porque codifican a las proteínas que transportan los electrones necesarios para las actividades enzimáticas de la 1 α -hidroxilasa y la 24-hidroxilasa (12). Los resultados mostraron que el gen de la ferredoxina se indujo en presencia de AMPc y durante la diferenciación del trofoblasto, mientras no se observaron efectos sobre el gen de la ferredoxina reductasa. El efecto inductivo del AMPc sobre el promotor del gen de la ferredoxina es mediado por la interacción de un factor de transcripción de la familia Sp1 y ocurre en tejidos esteroideogénicos como la placenta (135). Para la ferredoxina reductasa se ha descrito que en las células JEG-3 el AMPc modifica la estabilidad del transcrito (136), lo cual no se observó en el trofoblasto normal. Interesantemente, se ha descrito que esta proteína se expresa a bajos niveles en la placenta y debido a esto se considera el factor limitante de la síntesis placentaria de progesterona (137).

En este estudio observamos que la secreción de la hCG se incrementó durante el proceso de diferenciación del trofoblasto y que el AMPc acentuó tal respuesta. Otros grupos también han mostrado estos efectos, los cuales son debidos a la síntesis *de novo* de las dos subunidades de la hCG (138). La subunidad α de la hCG es común para otras hormonas polipeptídicas como la hormona estimulante del folículo y la hormona luteinizante. La síntesis de la subunidad α es regulada por las proteínas AP-2, por miembros de la familia GATA de reguladores transcripcionales y por CREBP (139). Por otra parte, la subunidad β de la hCG es codificada por 6 genes, entre los cuales el hCG- β 5 es el que presenta la mayor respuesta al AMPc mediante la acción del factor de transcripción Ets-2 (140). Nuestros resultados mostraron que el calcitriol, actuando a través de la generación rápida de AMPc, puede modular la síntesis y secreción de la hCG. Esta observación es de sumo interés porque establece una conexión funcional entre el sistema

endocrino de la vitamina D₃ y la hCG, lo cual sugiere efectos del calcitriol sobre eventos tempranos del embarazo. De hecho, la placenta es el único órgano extrarrenal que muestra alta actividad del promotor de la 1 α -hidroxilasa a inicios del embarazo (84). Estudios por inmunohistoquímica en secciones de placenta humana han mostrado que la 1 α -hidroxilasa y el VDR se expresan a niveles muy elevados durante los dos primeros trimestres de la gestación y luego declinan al final del embarazo (25, 141). Este patrón es similar al de las concentraciones de la hCG a lo largo del embarazo, lo cual es congruente con la regulación de esta hormona por el calcitriol (139). Colateralmente se ha descrito que el calcitriol es un regulador fisiológico de la diferenciación de las células endometriales hacia células deciduales (123, 142). También se ha demostrado que el calcitriol promueve la receptividad uterina y la implantación del blastocisto (143) a través de la inducción del gen homeótico HOXA10 (30) y mediante la supresión local del sistema inmunológico materno (25).

Por otro lado, la síntesis de pequeñas cantidades de calcitriol y los bajos niveles de VDR en la placenta a término (25), sugieren que esta hormona probablemente tiene otras funciones al final del embarazo. Nuestro grupo ha descrito que la expresión y actividad de la 1 α -hidroxilasa se encuentra disminuída en trofoblastos de embarazos con preeclampsia, una enfermedad hipertensiva del embarazo (86). Datos recientes de nuestro laboratorio indican que el calcitriol incrementa la secreción de estradiol y progesterona en los trofoblastos en cultivo de embarazos a término (datos no publicados). La relevancia fisiológica de estas observaciones no es clara, pero enfatizan un papel alternativo del calcitriol en la placenta a término. Además, es probable que la regulación de la expresión de los genes CYP27A1 y CYP24A1 cambie durante la gestación en la placenta, probablemente debido a la síntesis diferencial de moduladores transcripcionales.

En resumen, los resultados presentados en este trabajo demuestran que el calcitriol y el AMPc suprimen la síntesis del calcitriol en los trofoblastos cultivados de placentas a término. Tal supresión obedece a la menor biodisponibilidad de la 1 α -hidroxilasa y al mayor catabolismo debido a la 24-hidroxilasa. Además presentamos

evidencia de que las células JEG-3 presentan alteraciones en la expresión de ambas hidroxilasas que resultan en la baja capacidad de síntesis de calcitriol.

10. Conclusiones

Las hidroxilasas de la vitamina D₃ se expresan diferencialmente en los distintos estadios de diferenciación del trofoblasto.

La síntesis de calcitriol en el trofoblasto se regula negativamente por el mismo calcitriol y por factores que actúan a través de AMPc como segundo mensajero a nivel de la expresión de la 1 α -hidroxilasa.

La regulación de la 1 α -hidroxilasa por el calcitriol es un proceso mediado por el VDR y el AMPc.

La 24-hidroxilasa placentaria es una enzima que se induce en respuesta al AMPc y al calcitriol a nivel transcripcional.

El calcitriol regula la secreción de la hCG a través de la generación rápida de AMPc.

El trofoblasto en cultivo produce AMPc en respuesta al tratamiento con calcitriol.

Las células JEG-3 producen menos calcitriol en comparación con los cultivos primarios de trofoblastos.

11. Perspectivas

La continuidad del presente estudio es importante para comprender el impacto del sistema endocrino de la vitamina D₃ en la fisiología placentaria. Resulta de interés la investigación de la vía de señalización utilizada por la PTH y la calcitonina para regular diferencialmente a las hidroxilasas de la vitamina D₃. Estos estudios pueden realizarse en el mismo sistema experimental a través del uso de inhibidores y activadores específicos de la vía de la PKA. Adicionalmente, es interesante el estudio de la región promotora de los genes CYP27B1 y CYP24A1 para definir las secuencias importantes en la regulación de la síntesis placentaria del calcitriol. Se ha iniciado ya la construcción de vectores plasmídicos que contienen al gen reportero de la luciferasa bajo el control de diferentes secuencias de los promotores de los genes CYP27B1 y CYP24A1. En un futuro cercano, estos vectores serán transfectados en trofoblastos en cultivo para identificar los elementos de respuesta al AMPc y al calcitriol.

12. Referencias

1. **Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ** 2005 Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 85:373-422
2. **Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E** 2005 Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F8-28
3. **Lips P** 2006 Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 92:4-8
4. **IUB** 1982 IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN): Nomenclature of vitamin D. Recommendations 1981. *Eur J Biochem* 124:223-7
5. **Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, et al.** 1980 Photosynthesis of previtamin D₃ in human skin and the physiologic consequences. *Science* 210:203-5
6. **Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW** 2004 Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7711-5
7. **Shinkyo R, Sakaki T, Kamakura M, Ohta M, Inouye K** 2004 Metabolism of vitamin D by human microsomal CYP2R1. *Biochem Biophys Res Commun* 324:451-7
8. **Rahmaniyan M, Patrick K, Bell NH** 2005 Characterization of recombinant CYP2C11: a vitamin D 25-hydroxylase and 24-hydroxylase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E753-60
9. **Sakaki T, Kagawa N, Yamamoto K, Inouye K** 2005 Metabolism of vitamin D₃ by cytochromes P450. *Front Biosci* 10:119-34
10. **Gupta RP, He YA, Patrick KS, Halpert JR, Bell NH** 2005 CYP3A4 is a vitamin D-24- and 25-hydroxylase: analysis of structure function by site-directed mutagenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1210-9
11. **Cheng JB, Motola DL, Mangelsdorf DJ, Russell DW** 2003 De-orphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase. *J Biol Chem* 278:38084-93

12. **Miller WL** 2005 Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology* 146:2544-50
13. **Prosser DE, Jones G** 2004 Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci* 29:664-73
14. **Fraser DR, Kodicek E** 1970 Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature* 228:764-6
15. **Dardenne O, Prud'homme J, Arabian A, Glorieux FH, St-Arnaud R** 2001 Targeted inactivation of the 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase gene (CYP27B1) creates an animal model of pseudovitamin D-deficiency rickets. *Endocrinology* 142:3135-41
16. **Fleet JC** 2004 Genomic and proteomic approaches for probing the role of vitamin D in health. *Am J Clin Nutr* 80:1730S-4S
17. **Demay MB** 2006 Mechanism of vitamin D receptor action. *Ann N Y Acad Sci* 1068:204-13
18. **Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, et al.** 2005 Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D₃ target genes. *Mol Endocrinol* 19:2685-95
19. **Rachez C, Freedman LP** 2000 Mechanisms of gene regulation by vitamin D₃ receptor: a network of coactivator interactions. *Gene* 246:9-21
20. **Belandia B, Parker MG** 2003 Nuclear receptors: a rendezvous for chromatin remodeling factors. *Cell* 114:277-80
21. **Lehmann B** 2005 The vitamin D₃ pathway in human skin and its role for regulation of biological processes. *Photochem Photobiol* 81:1246-51
22. **Schwartz GG, Blot WJ** 2006 Vitamin D status and cancer incidence and mortality: something new under the sun. *J Natl Cancer Inst* 98:428-30
23. **Zehnder D, Bland R, Williams MC, et al.** 2001 Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab* 86:888-94
24. **Liu PT, Stenger S, Li H, et al.** 2006 Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 311:1770-3
25. **Evans KN, Bulmer JN, Kilby MD, Hewison M** 2004 Vitamin D and placental-decidual function. *J Soc Gynecol Investig* 11:263-71

26. **Bohnsack BL, Hirschi KK** 2004 Nutrient regulation of cell cycle progression. *Annu Rev Nutr* 24:433-53
27. **Boland R, Buitrago C, De Boland AR** 2005 Modulation of tyrosine phosphorylation signalling pathways by $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 . *Trends Endocrinol Metab* 16:280-7
28. **Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP** 2002 $1,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 110:229-38
29. **Lee S, Clark SA, Gill RK, Christakos S** 1994 $1,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 and pancreatic β -cell function: vitamin D receptors, gene expression, and insulin secretion. *Endocrinology* 134:1602-10
30. **Du H, Daftary GS, Lalwani SI, Taylor HS** 2005 Direct regulation of HOXA10 by $1,25$ - $(\text{OH})_2\text{D}_3$ in human myelomonocytic cells and human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol* 19:2222-33
31. **Kiraly SJ, Kiraly MA, Hawe RD, Makhani N** 2006 Vitamin D as a neuroactive substance: review. *ScientificWorldJournal* 6:125-39
32. **Dwivedi PP, Muscat GE, Bailey PJ, Omdahl JL, May BK** 1998 Repression of basal transcription by vitamin D receptor: evidence for interaction of unliganded vitamin D receptor with two receptor interaction domains in RIP13 Δ 1. *J Mol Endocrinol* 20:327-35
33. **Tagami T, Lutz WH, Kumar R, Jameson JL** 1998 The interaction of the vitamin D receptor with nuclear receptor corepressors and coactivators. *Biochem Biophys Res Commun* 253:358-63
34. **Fleet JC** 2004 Rapid, membrane-initiated actions of $1,25$ dihydroxyvitamin D: what are they and what do they mean? *J Nutr* 134:3215-8
35. **Nemere I, Yoshimoto Y, Norman AW** 1984 Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 . *Endocrinology* 115:1476-83
36. **Kajikawa M, Ishida H, Fujimoto S, et al.** 1999 An insulinotropic effect of vitamin D analog with increasing intracellular Ca^{2+} concentration in

- pancreatic β -cells through nongenomic signal transduction. *Endocrinology* 140:4706-12
37. **Schwartz Z, Sylvia VL, Larsson D, et al.** 2002 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regulates chondrocyte matrix vesicle protein kinase C (PKC) directly via G-protein-dependent mechanisms and indirectly via incorporation of PKC during matrix vesicle biogenesis. *J Biol Chem* 277:11828-37
 38. **Rebsamen MC, Sun J, Norman AW, Liao JK** 2002 $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circ Res* 91:17-24
 39. **Zanello LP, Norman AW** 2003 Multiple molecular mechanisms of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 rapid modulation of three ion channel activities in osteoblasts. *Bone* 33:71-9
 40. **Berry DM, Antochi R, Bhatia M, Meckling-Gill KA** 1996 $1,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 stimulates expression and translocation of protein kinase $\text{C}\alpha$ and $\text{C}\delta$ via a nongenomic mechanism and rapidly induces phosphorylation of a 33-kDa protein in acute promyelocytic NB4 cells. *J Biol Chem* 271:16090-6
 41. **Nemere I, Safford SE, Rohe B, DeSouza MM, Farach-Carson MC** 2004 Identification and characterization of $1,25\text{D}_3$ -membrane-associated rapid response, steroid ($1,25\text{D}_3$ -MARRS) binding protein. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90:281-5
 42. **Huhtakangas JA, Olivera CJ, Bishop JE, Zanello LP, Norman AW** 2004 The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 *in vivo* and *in vitro*. *Mol Endocrinol* 18:2660-71
 43. **Holick MF** 2004 Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 79:362-71
 44. **Iwata K, Yamamoto A, Satoh S, Ohyama Y, Tashiro Y, Setoguchi T** 1995 Quantitative immunoelectron microscopic analysis of the localization and induction of 25-hydroxyvitamin D_3 24-hydroxylase in rat kidney. *J Histochem Cytochem* 43:255-62

45. **Yang W, Friedman PA, Kumar R, et al.** 1999 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:E793-805
46. **Kumar R, Schaefer J, Grande JP, Roche PC** 1994 Immunolocalization of calcitriol receptor, 24-hydroxylase cytochrome P-450, and calbindin D28k in human kidney. *Am J Physiol* 266:F477-85
47. **Omdahl JL, Morris HA, May BK** 2002 Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. *Annu Rev Nutr* 22:139-66
48. **Omdahl JL, Gray RW, Boyle IT, Knutson J, DeLuca HF** 1972 Regulation of metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by kidney tissue *in vitro* by dietary calcium. *Nat New Biol* 237:63-4
49. **Bland R, Walker EA, Hughes SV, Stewart PM, Hewison M** 1999 Constitutive expression of 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase in a transformed human proximal tubule cell line: evidence for direct regulation of vitamin D metabolism by calcium. *Endocrinology* 140:2027-34
50. **Tanaka Y, Deluca HF** 1973 The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism by inorganic phosphorus. *Arch Biochem Biophys* 154:566-74
51. **Shinki T, Shimada H, Wakino S, et al.** 1997 Cloning and expression of rat 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12920-5
52. **Hughes MR, Brumbaugh PF, Hussler MR, Wergedal JE, Baylink DJ** 1975 Regulation of serum 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ by calcium and phosphate in the rat. *Science* 190:578-80
53. **Bushinsky DA, Nalbantian-Brandt C, Favus MJ** 1989 Elevated Ca²⁺ does not inhibit the 1,25(OH)₂D₃ response to phosphorus restriction. *Am J Physiol* 256:F285-9
54. **White KE, Larsson TE, Econs MJ** 2006 The roles of specific genes implicated as circulating factors involved in normal and disordered phosphate homeostasis: frizzled related protein-4, matrix extracellular phosphoglycoprotein, and fibroblast growth factor 23. *Endocr Rev* 27:221-41

55. **Horiuchi N, Suda T, Takahashi H, Shimazawa E, Ogata E** 1977 *In vivo* evidence for the intermediary role of 3',5'-cyclic AMP in parathyroid hormone-induced stimulation of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ synthesis in rats. *Endocrinology* 101:969-74
56. **Brenza HL, Kimmel-Jehan C, Jehan F, et al.** 1998 Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D₃- 1α -hydroxylase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1387-91
57. **Breitwieser GE** 2006 Calcium sensing receptors and calcium oscillations: calcium as a first messenger. *Curr Top Dev Biol* 73:85-114
58. **Potts JT** 2005 Parathyroid hormone: past and present. *J Endocrinol* 187:311-25
59. **Murayama A, Kim MS, Yanagisawa J, Takeyama K, Kato S** 2004 Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *Embo J* 23:1598-608
60. **Kong XF, Zhu XH, Pei YL, Jackson DM, Holick MF** 1999 Molecular cloning, characterization, and promoter analysis of the human 25-hydroxyvitamin D₃- 1α -hydroxylase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6988-93
61. **Zierold C, Mings JA, DeLuca HF** 2001 Parathyroid hormone regulates 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase mRNA by altering its stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13572-6
62. **Akeno N, Saikatsu S, Kawane T, Horiuchi N** 1997 Mouse vitamin D-24-hydroxylase: molecular cloning, tissue distribution, and transcriptional regulation by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* 138:2233-40
63. **Iida K, Shinki T, Yamaguchi A, DeLuca HF, Kurokawa K, Suda T** 1995 A possible role of vitamin D receptors in regulating vitamin D activation in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6112-6
64. **Russell J, Lettieri D, Sherwood LM** 1986 Suppression by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ of transcription of the pre-parathyroid hormone gene. *Endocrinology* 119:2864-6

65. **Horiuchi N, Takahashi H, Matsumoto T, et al.** 1979 Salmon calcitonin-induced stimulation of $1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferol synthesis in rats involving a mechanism independent of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Biochem J* 184:269-75
66. **Shinki T, Ueno Y, DeLuca HF, Suda T** 1999 Calcitonin is a major regulator for the expression of renal 25-hydroxyvitamin D_3 - 1α -hydroxylase gene in normocalcemic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8253-8
67. **Yoshida N, Yoshida T, Nakamura A, Monkawa T, Hayashi M, Saruta T** 1999 Calcitonin induces 25-hydroxyvitamin D_3 1α -hydroxylase mRNA expression via protein kinase C pathway in LLC-PK1 cells. *J Am Soc Nephrol* 10:2474-9
68. **Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, Kodera Y, Hosoya T, Kato S** 1998 The promoter of the human 25-hydroxyvitamin D_3 1α -hydroxylase gene confers positive and negative responsiveness to PTH, calcitonin, and $1\alpha,25(OH)_2D_3$. *Biochem Biophys Res Commun* 249:11-6
69. **Gao XH, Dwivedi PP, Omdahl JL, Morris HA, May BK** 2004 Calcitonin stimulates expression of the rat 25-hydroxyvitamin D_3 -24-hydroxylase (CYP24) promoter in HEK-293 cells expressing calcitonin receptor: identification of signaling pathways. *J Mol Endocrinol* 32:87-98
70. **Zierold C, Darwish HM, DeLuca HF** 1995 Two vitamin D response elements function in the rat $1,25$ -dihydroxyvitamin D 24-hydroxylase promoter. *J Biol Chem* 270:1675-8
71. **Dhawan P, Peng X, Sutton AL, et al.** 2005 Functional cooperation between CCAAT/enhancer-binding proteins and the vitamin D receptor in regulation of 25-hydroxyvitamin D_3 24-hydroxylase. *Mol Cell Biol* 25:472-87
72. **Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, et al.** 1997 Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet* 16:391-6
73. **Panda DK, Miao D, Tremblay ML, et al.** 2001 Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1α -hydroxylase enzyme: evidence for skeletal,

- reproductive, and immune dysfunction. Proc Natl Acad Sci U S A 98:7498-503
74. **Diaz L, Carino C, Mendez I** 2001 [Vitamin D: implications for health and pregnancy]. Rev Invest Clin 53:77-85
 75. **Kovacs CS, Kronenberg HM** 1997 Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. Endocr Rev 18:832-72
 76. **Huppertz B, Burton G, Cross JC, Kingdom JC** 2006 Placental morphology: from molecule to mother -- a dedication to Peter Kaufmann -- a review. Placenta 27 Suppl A:S3-8
 77. **Malassine A, Cronier L** 2002 Hormones and human trophoblast differentiation: a review. Endocrine 19:3-11
 78. **Weisman Y, Vargas A, Duckett G, Reiter E, Root AW** 1978 Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D in the nephrectomized pregnant rat. Endocrinology 103:1992-6
 79. **Gray TK, Lester GE, Lorenc RS** 1979 Evidence for extra-renal 1α -hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃ in pregnancy. Science 204:1311-3
 80. **Zerwekh JE, Breslau NA** 1986 Human placental production of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃: biochemical characterization and production in normal subjects and patients with pseudohypoparathyroidism. J Clin Endocrinol Metab 62:192-6
 81. **Glorieux FH, Arabian A, Delvin EE** 1995 Pseudo-vitamin D deficiency: absence of 25-hydroxyvitamin D 1α -hydroxylase activity in human placenta decidual cells. J Clin Endocrinol Metab 80:2255-8
 82. **Diaz L, Sanchez I, Avila E, Halhali A, Vilchis F, Larrea F** 2000 Identification of a 25-hydroxyvitamin D₃ 1α -hydroxylase gene transcription product in cultures of human syncytiotrophoblast cells. J Clin Endocrinol Metab 85:2543-9
 83. **Halhali A, Diaz L, Sanchez I, Garabedian M, Bourges H, Larrea F** 1999 Effects of IGF-I on 1,25-dihydroxyvitamin D₃ synthesis by human placenta in culture. Mol Hum Reprod 5:771-6

84. **Vanhooke JL, Prah J, Kimmel-Jehan C, et al.** 2006 CYP27B1 null mice with LacZreporter gene display no 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase promoter activity in the skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:75-80
85. **Tanamura A, Nomura S, Kurauchi O, Furui T, Mizutani S, Tomoda Y** 1995 Purification and characterization of 1,25(OH)₂D₃ receptor from human placenta. *J Obstet Gynaecol* 21:631-9
86. **Diaz L, Arranz C, Avila E, Halhali A, Vilchis F, Larrea F** 2002 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* 87:3876-82
87. **Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF, 3rd** 1986 Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 118:1567-82
88. **Bradford MM** 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54
89. **Ohyama Y, Masumoto O, Usui E, Okuda K** 1991 Multi-functional property of rat liver mitochondrial cytochrome P-450. *J Biochem (Tokyo)* 109:389-93
90. **Bligh EG, Dyer WJ** 1959 A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Med Sci* 37:911-7
91. **Burnette WN** 1981 "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195-203
92. **Villanueva LA, Mendez I, Ampuero S, Larrea F** 1996 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* 2:725-31
93. **Bocci V** 1964 Efficient labelling of tissue-soluble proteins with iodine-131 using chloramine T. *Nature* 203:985-6

94. **Chomczynski P, Sacchi N** 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9
95. **Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al.** 1985 Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-4
96. **Southern EM** 1975 Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-17
97. **Fiddes JC, Goodman HM** 1980 The cDNA for the β -subunit of human chorionic gonadotropin suggests evolution of a gene by readthrough into the 3'-untranslated region. *Nature* 286:684-7
98. **Fu GK, Lin D, Zhang MY, et al.** 1997 Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets type 1. *Mol Endocrinol* 11:1961-70
99. **Monkawa T, Yoshida T, Wakino S, et al.** 1997 Molecular cloning of cDNA and genomic DNA for human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun* 239:527-33
100. **Chen KS, Prah J, DeLuca HF** 1993 Isolation and expression of human 1,25-dihydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4543-7
101. **Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, et al.** 1988 Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3294-8
102. **Mittal S, Zhu YZ, Vickery LE** 1988 Molecular cloning and sequence analysis of human placental ferredoxin. *Arch Biochem Biophys* 264:383-91
103. **Solish SB, Picado-Leonard J, Morel Y, et al.** 1988 Human adrenodoxin reductase: two mRNAs encoded by a single gene on chromosome 17cen----q25 are expressed in steroidogenic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7104-8
104. **Liu J, Albers MW, Chen CM, Schreiber SL, Walsh CT** 1990 Cloning, expression, and purification of human cyclophilin in *Escherichia coli* and

- assessment of the catalytic role of cysteines by site-directed mutagenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 87:2304-8
105. **Feinberg AP, Vogelstein B** 1983 A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem 132:6-13
 106. **Maxam AM, Gilbert W** 1977 A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 74:560-4
 107. **Birnboim HC, Doly J** 1979 A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 7:1513-23
 108. **Chen KS, DeLuca HF** 1995 Cloning of the human $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. Biochim Biophys Acta 1263:1-9
 109. **Knofler M, Saleh L, Bauer S, et al.** 2000 Promoter elements and transcription factors involved in differentiation-dependent human chorionic gonadotrophin- α messenger ribonucleic acid expression of term villous trophoblasts. Endocrinology 141:3737-48
 110. **Lindsey AM, Channing CP** 1978 Effect of a phosphodiesterase inhibitor, 3-isobutyl 1-methylxanthine, upon the stimulatory effect of human follicle-stimulating hormone and human luteinizing hormone upon cyclic adenosine 3':5'-monophosphate accumulation by porcine granulosa cells. Proc Soc Exp Biol Med 159:230-6
 111. **Sharp GW, Hynie S** 1971 Stimulation of intestinal adenyl cyclase by cholera toxin. Nature 229:266-9
 112. **Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, et al.** 1990 Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. J Biol Chem 265:5267-72
 113. **Herdick M, Steinmeyer A, Carlberg C** 2000 Antagonistic action of a 25-carboxylic ester analogue of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ is mediated by a

- lack of ligand-induced vitamin D receptor interaction with coactivators. *J Biol Chem* 275:16506-12
114. **Brenza HL, DeLuca HF** 2000 Regulation of 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene expression by parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Arch Biochem Biophys* 381:143-52
 115. **Zierold C, Reinholz GG, Mings JA, Prah JM, DeLuca HF** 2000 Regulation of the porcine 1,25-dihydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase (CYP24) by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and parathyroid hormone in AOK-B50 cells. *Arch Biochem Biophys* 381:323-7
 116. **Keryer G, Alsat E, Tasken K, Evain-Brion D** 1998 Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation *in vitro*. *J Cell Sci* 111 (Pt 7):995-1004
 117. **Ebert R, Jovanovic M, Ulmer M, et al.** 2004 Down-regulation by nuclear factor κ B of human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase promoter. *Mol Endocrinol* 18:2440-50
 118. **Vasarhelyi B, Cseh A, Kocsis I, Treszl A, Gyorffy B, Rigo J, Jr.** 2006 Three mechanisms in the pathogenesis of pre-eclampsia suggested by over-represented transcription factor-binding sites detected with comparative promoter analysis. *Mol Hum Reprod* 12:31-4
 119. **Serkkola E, Hurme M** 1993 Activation of NF- κ B by cAMP in human myeloid cells. *FEBS Lett* 334:327-30
 120. **Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P** 1993 Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* 75:875-86
 121. **Huening M, Yehia G, Molina CA, Christakos S** 2002 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* 16:2052-64
 122. **Gellersen B, Kempf R, Telgmann R** 1997 Human endometrial stromal cells express novel isoforms of the transcriptional modulator CREM and up-regulate ICER in the course of decidualization. *Mol Endocrinol* 11:97-113

123. **Halhali A, Acker GM, Garabedian M** 1991 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces *in vivo* the decidualization of rat endometrial cells. *J Reprod Fertil* 91:59-64
124. **Nguyen TM, Lieberherr M, Fritsch J, et al.** 2004 The rapid effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ require the vitamin D receptor and influence 24-hydroxylase activity: studies in human skin fibroblasts bearing vitamin D receptor mutations. *J Biol Chem* 279:7591-7
125. **Selles J, Boland R** 1991 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* 82:229-35
126. **Vaisanen S, Dunlop TW, Sinkkonen L, Frank C, Carlberg C** 2005 Spatio-temporal activation of chromatin on the human CYP24 gene promoter in the presence of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Mol Biol* 350:65-77
127. **Gutierrez S, Javed A, Tennant DK, et al.** 2002 CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) β and δ activate osteocalcin gene transcription and synergize with Runx2 at the C/EBP element to regulate bone-specific expression. *J Biol Chem* 277:1316-23
128. **Bamberger AM, Makrigiannakis A, Schroder M, et al.** 2004 Expression pattern of the CCAAT/enhancer-binding proteins C/EBP- α , C/EBP- β and C/EBP- δ in the human placenta. *Virchows Arch* 444:149-52
129. **Yang ES, Burnstein KL** 2003 Vitamin D inhibits G₁ to S progression in LNCaP prostate cancer cells through p27Kip1 stabilization and Cdk2 mislocalization to the cytoplasm. *J Biol Chem* 278:46862-8
130. **Chen TC, Wang L, Whitlatch LW, Flanagan JN, Holick MF** 2003 Prostatic 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase and its implication in prostate cancer. *J Cell Biochem* 88:315-22
131. **Yuan B, Xing Y, Horst RL, Drezner MK** 2004 Evidence for abnormal translational regulation of renal 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase activity in the *hyp*-mouse. *Endocrinology* 145:3804-12
132. **Peehl DM, Krishnan AV, Feldman D** 2003 Pathways mediating the growth-inhibitory actions of vitamin D in prostate cancer. *J Nutr* 133:2461S-2469S

133. **Albertson DG, Ylstra B, Se Graves R, et al.** 2000 Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet* 25:144-6
134. **Drane P, Compe E, Catez P, Chymkowitz P, Egly JM** 2004 Selective regulation of vitamin D receptor-responsive genes by TFIIH. *Mol Cell* 16:187-97
135. **Chang CY, Huang C, Guo IC, Tsai HM, Wu DA, Chung BC** 1992 Transcription of the human ferredoxin gene through a single promoter which contains the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-responsive sequence and Sp1-binding site. *Mol Endocrinol* 6:1362-70
136. **Brentano ST, Black SM, Lin D, Miller WL** 1992 cAMP post-transcriptionally diminishes the abundance of adrenodoxin reductase mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4099-103
137. **Tuckey RC, Sadleir J** 1999 The concentration of adrenodoxin reductase limits cytochrome p450scc activity in the human placenta. *Eur J Biochem* 263:319-25
138. **Feinman MA, Kliman HJ, Caltabiano S, Strauss JF, 3rd** 1986 8-Bromo-3',5'-adenosine monophosphate stimulates the endocrine activity of human cytotrophoblasts in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 63:1211-7
139. **LiCalsi C, Christophe S, Steger DJ, Buescher M, Fischer W, Mellon PL** 2000 AP-2 family members regulate basal and cAMP-induced expression of human chorionic gonadotropin. *Nucleic Acids Res* 28:1036-43
140. **Ghosh D, Ezashi T, Ostrowski MC, Roberts RM** 2003 A central role for Ets-2 in the transcriptional regulation and cyclic adenosine 5'-monophosphate responsiveness of the human chorionic gonadotropin- β subunit gene. *Mol Endocrinol* 17:11-26
141. **Zehnder D, Evans KN, Kilby MD, et al.** 2002 The ontogeny of 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase expression in human placenta and decidua. *Am J Pathol* 161:105-14
142. **Halloran BP, DeLuca HF** 1980 Effect of vitamin D deficiency on fertility and reproductive capacity in the female rat. *J Nutr* 110:1573-80

143. **Kwecinski GG, Petrie GI, DeLuca HF** 1989 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ restores fertility of vitamin D-deficient female rats. *Am J Physiol* 256:E483-7

13. Anexos. Producción científica generada durante la realización de esta tesis

- **Avila E, Díaz L, Barrera D, Halhali A, Méndez I, González L, Zuegel U, Steinmeyer A, Larrea F** 2007 Regulation of vitamin D hydroxylases gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblasts. J Steroid Biochem Molec Biol 103. En prensa
- **Avila E, Barrera D, Díaz L** Acciones calciotrópicas del sistema endocrino de la vitamina D₃. Enviado a Rev Invest Clin
- **Avila E, Díaz L, Barrera D, Arranz C, Halhali A, Larrea F** 2006 Metabolism of vitamin D in the human choriocarcinoma cell line JEG-3. J Steroid Biochem Molec Biol 97. En prensa
- **Avila E, Díaz L, Halhali A, Larrea F** 2004 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 Molec Biol 89-90:115-9

REGULATION OF VITAMIN D HYDROXYLASES GENE EXPRESSION BY 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D₃ AND CYCLIC AMP IN CULTURED HUMAN SYNCYTIOTROPHOBLASTS

Euclides Avila,¹ Lorenza Díaz,¹ David Barrera,¹ Ali Halhali,¹ Isabel Méndez,¹
Leticia González,¹ Ulrich Zuegel,² Andreas Steinmeyer,² Fernando Larrea*¹

¹Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F., 14000, México. ²Schering AG, Berlin, 13342, Germany.

*Corresponding author: Dr. Fernando Larrea, Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14000, México D.F. Tel: (5255)55.73.11.60; Fax: (5255)56.55.98.59; E-Mail: larrea@innsz.mx

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.

Keywords: CYP27B1, CYP24A1, VDR, calcitonin, trophoblast, gene expression

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 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(OH)₂D₃.

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(OH)₂D₃ 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(OH)₂D₃ 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.

Materials and Methods

Materials

Culture media, fetal bovine serum, Trizol, and RT-PCR reagents were from Invitrogen (Carlsbad, CA). (¹²⁵I)NaI and (³²P)-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).

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% CO₂-95% 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.

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'-ACCAGATGTTTGCATTTGCTC-3' and 5'-GGACGAAAAGAATTTGGCTCT-3'; and CYP24A1: 5'-CCTCGTGTGTATGAGAAGAGATT-3' and 5'-TTTAAATACGGCATATTCCTCAAA-3', yielding a 517-bp and 486-bp RT-PCR products, respectively. These products were separated in agarose gels, blotted onto nylon membranes and hybridized with (³²P)-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.

Statistical analysis

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

Results

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 three days from plating, syncytiotrophoblasts appeared as network structures of multinucleated cells. As shown in figure 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.

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 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 figure 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 figure 2B, three hours 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 vs 2.0 ± 1.6 IU/mg protein; $P < 0.05$, in the absence or presence of the PKA inhibitor).

Effects of 8-Br-cAMP and 1,25(OH)₂D₃ 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(OH)₂D₃ and subjected to RT-PCR using primers based on human 1 α -hydroxylase and 24-hydroxylase genes. Figure 3A shows a representative Southern blot analysis of RT-PCR products of CYP27B1 (517-bp) and CYP24A1 (486-bp) genes obtained 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(OH)₂D₃ on placental CYP27B1 and CYP24A1 expression was studied. As shown in figure 3B, 1,25(OH)₂D₃ suppressed expression of CYP27B1 gene in a dose dependent manner. At the same time, 1,25(OH)₂D₃ strongly increased CYP24A1 transcription even at the lowest dose used (Fig. 3B). Parallel amplifications of the housekeeping 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 figure 4, inhibition of CYP27B1 expression by 1,25(OH)₂D₃ 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 effects of ZK 159222, a specific antagonist of VDR, were studied. Figure 4 shows that preincubation with ZK 159222 during 2 h decreased 1,25(OH)₂D₃ 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 presence of human PTH and calcitonin, two hormones known to regulate calcitriol synthesis and metabolism in the kidney. As depicted in figure 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 figure 5C, decreased and increased CYP27B1 and CYP24A1 gene expression, respectively, in a similar manner than $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

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 25OHD_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-G α 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 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 CRE's 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 placental 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 can not 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) F8-28.
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 D3 1alpha-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 alpha-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) 1alpha-hydroxylase expression in human placenta and decidua, *Am J Pathol.* 161 (1) (2002) 105-114.
7. H.L. Henry, The 25(OH)D(3)/1alpha,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)2D3 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 D3-24-hydroxylase mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and parathyroid hormone, *J Cell Biochem.* 88 (2) (2003) 234-237.
11. 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.
12. A. Stephanou, R. Ross, S. Handwerger, Regulation of human placental lactogen expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3, *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 Investig.* 11 (5) (2004) 263-271.
14. H.J. Kliman, J.E. Nestler, E. Sermasi, J.M. Sanger, J.F. Strauss, 3rd, 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 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.
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 preeclamptic 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, *Pharmacol 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 D $_3$ 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 D $_3$ 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 D $_3$ 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 D $_3$) 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 D-3 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)D $_3$ 24-hydroxylase in distal nephron: coordinate regulation by 1,25(OH) $_2$ D $_3$ and cAMP or PTH, *Am J Physiol.* 276 (4 Pt 1) (1999) E793-805.
32. A.V. Krishnan, D. Feldman, Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate up-regulates 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$ 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. Makriganakis, 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.

Figure Captions

Figure 1. Temporal pattern of hCG secretion by cultured human trophoblasts. Mononuclear cells (8×10^5 cells/ml) were incubated for three 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 SD of 3 cultures. * $P < 0.05$ vs. day 1; ** $P < 0.05$ vs. control.

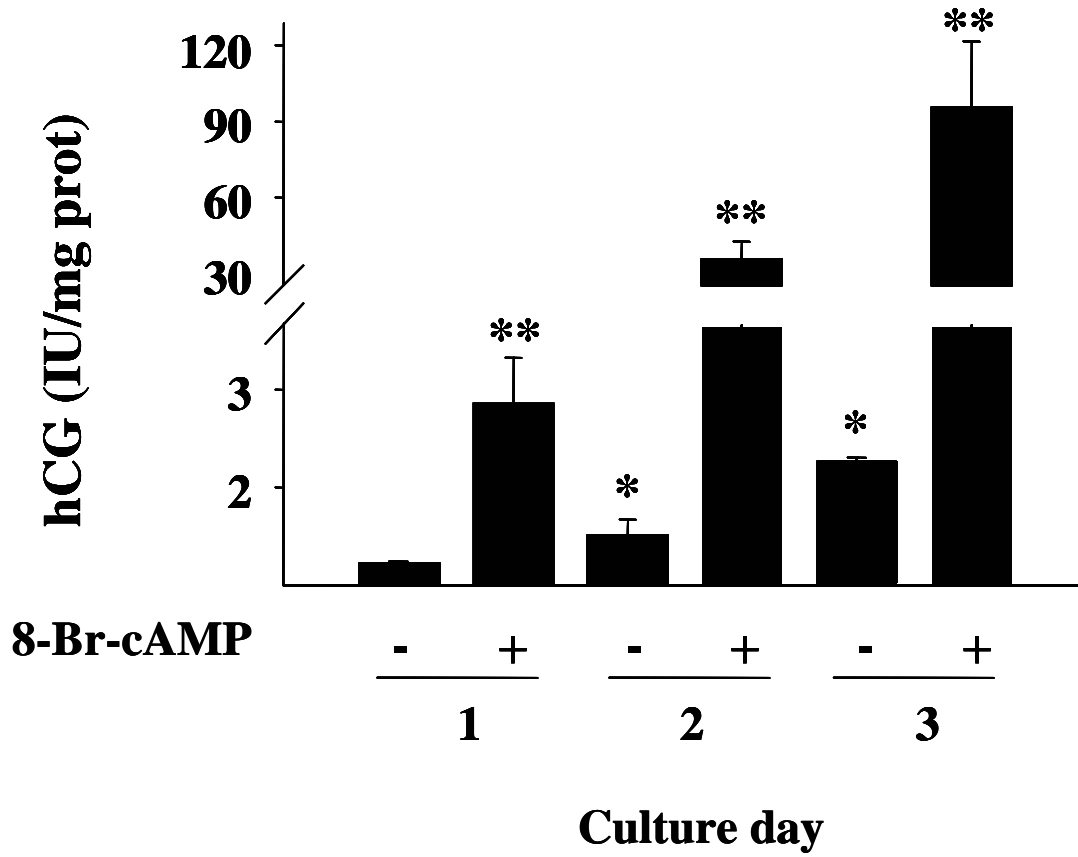
Figure 2. Dose-dependent effects of calcitriol on intracellular cAMP levels (A) and hCG secretion (B) by cultured trophoblasts. Intracellular cAMP was measured by specific RIA after 10 min incubation in the presence or absence of increasing concentrations of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Immunoassayable 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 SD of 3 cell cultures. * $P < 0.05$ vs. control.

Figure 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 Material and Methods. 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 3 experiments.

Figure 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 μM) 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 3 experiments.

Figure 5. Effects of calciotropic 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 SD of 3 cell cultures. * $P < 0.05$ vs. vehicle, ** $P < 0.05$ vs. calcitriol.

Figure 1



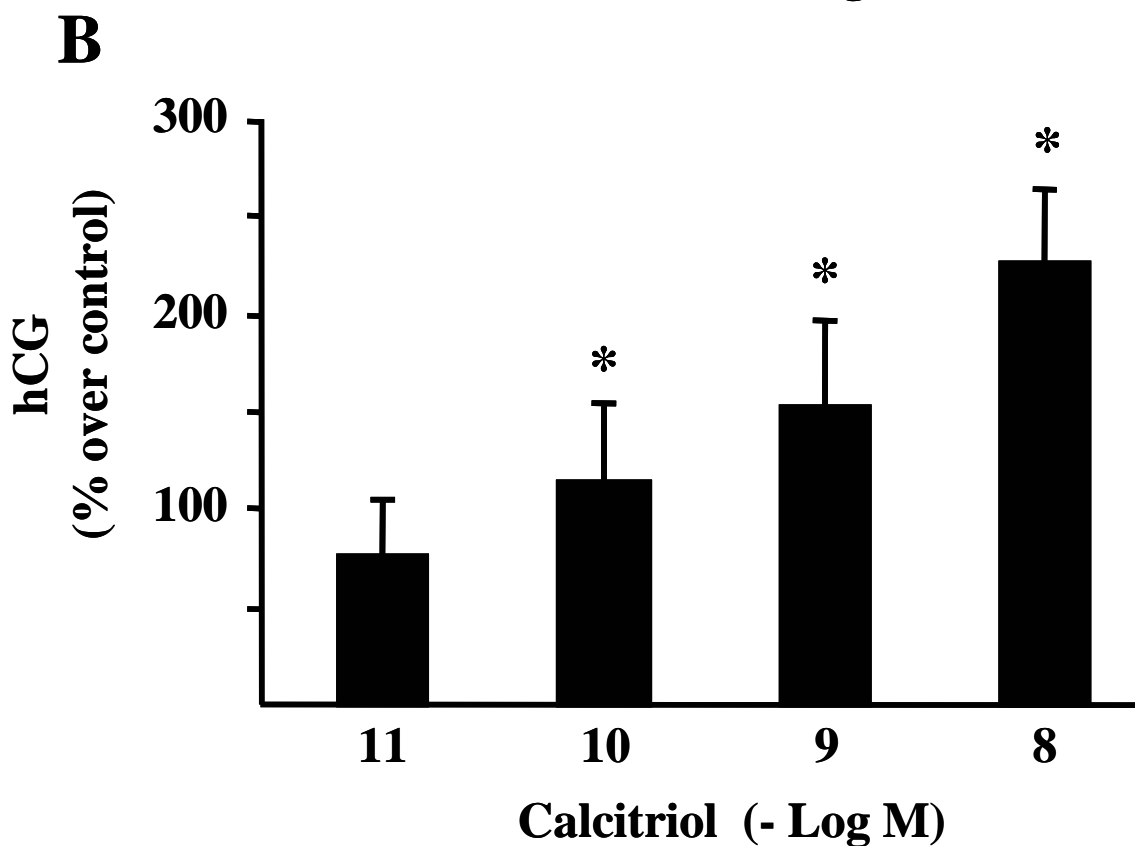
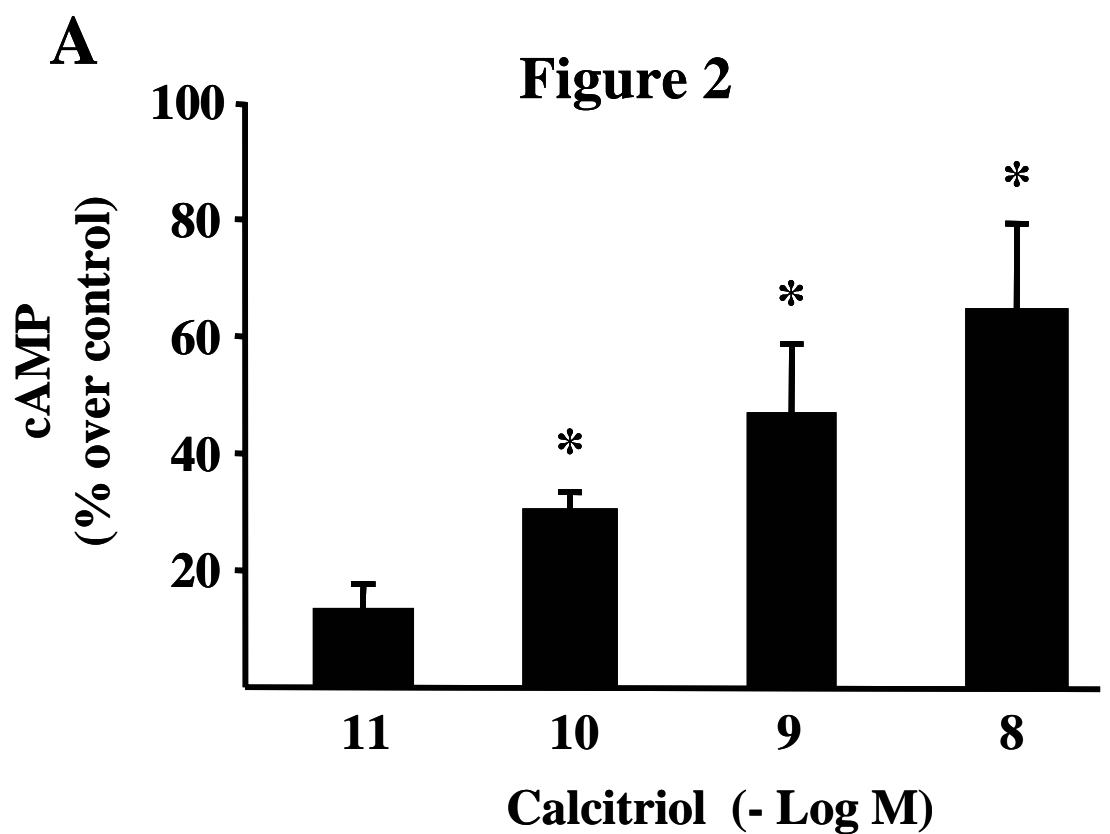
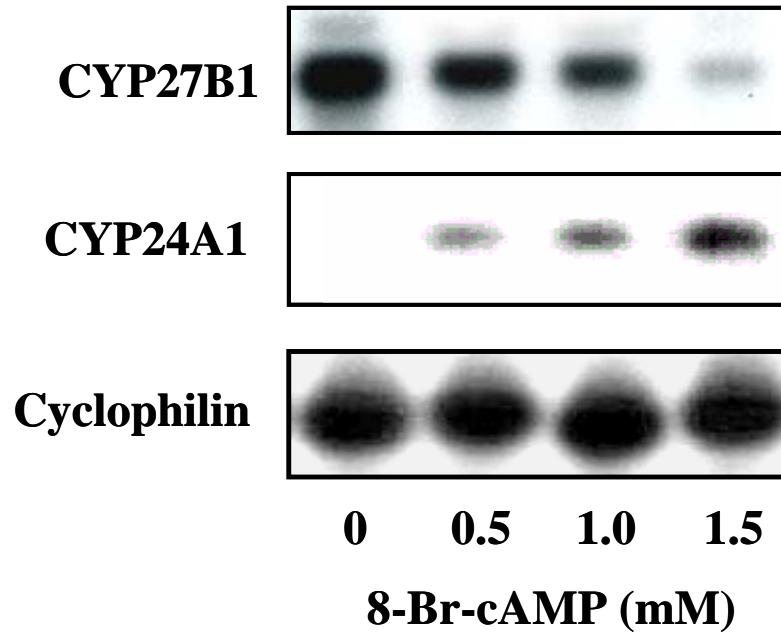


Figure 3

A



B

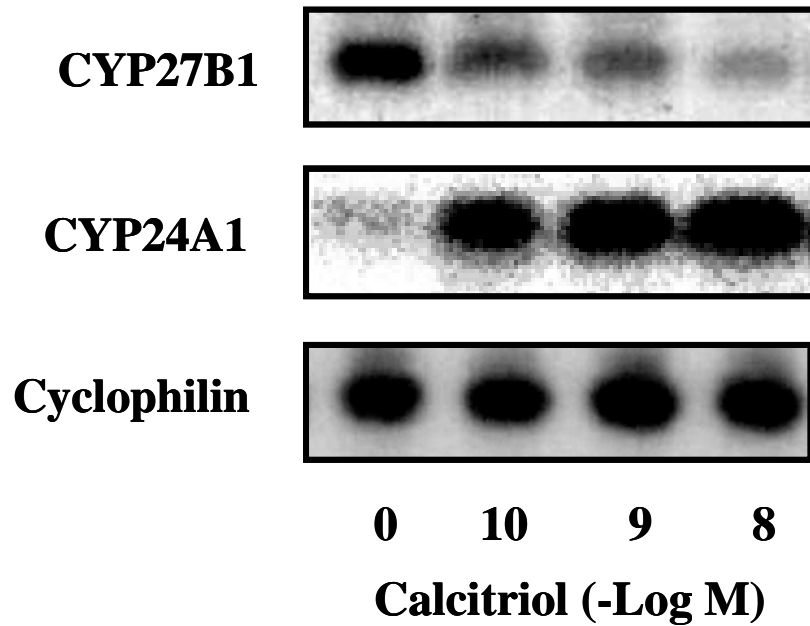


Figure 4

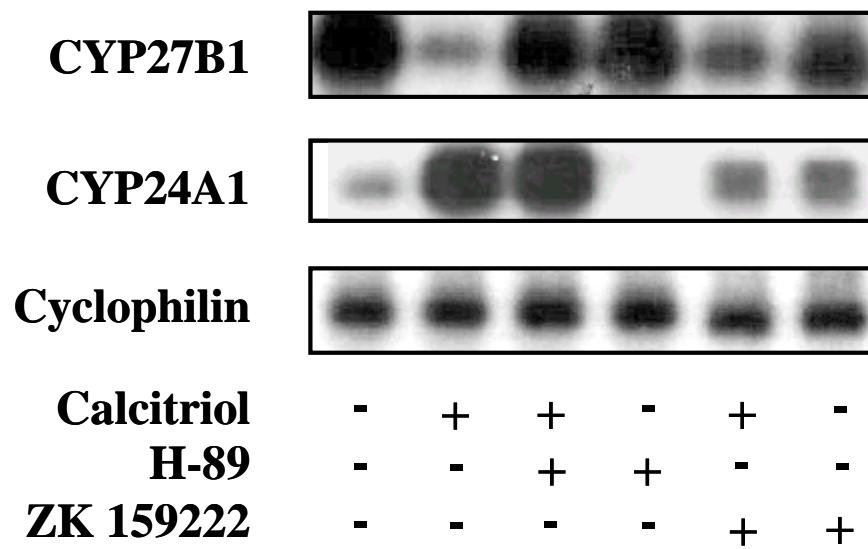
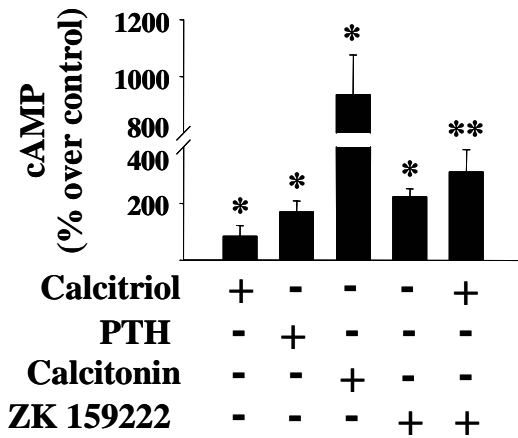
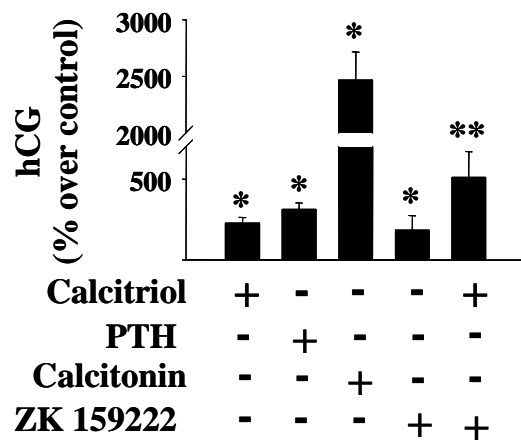


Figure 5

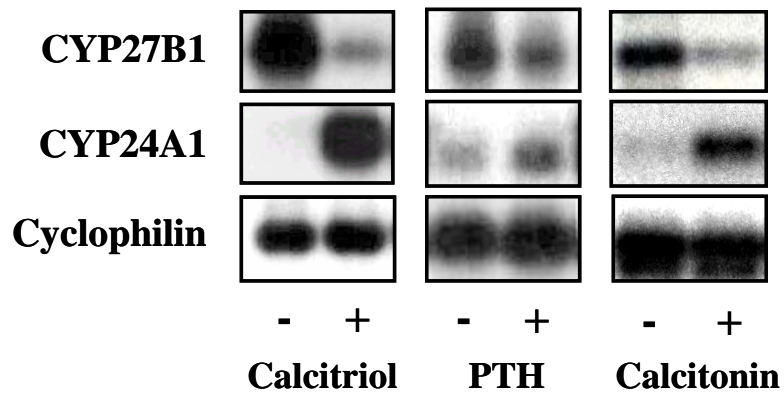
A



B



C



**ACCIONES CALCOTRÓPICAS DEL SISTEMA ENDOCRINO
DE LA VITAMINA D₃**

Euclides Avila*, David Barrera, Lorenza Díaz

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

***Dirigir correspondencia a: 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: 55 73 11
60, Fax: 56 55 98 59, correo electrónico: euclides@quetzal.innsz.mx.**

ABSTRACT

Calcitriol, the most active metabolite of vitamin D₃, is the key hormone of the vitamin D₃ endocrine system. Calcitriol is a regulator of calcium and phosphate homeostasis through endocrine actions on intestine, bone, kidney and parathyroid glands. Calcitriol acts mainly through vitamin D₃ receptor to modify gene expression of vitamin D₃ target genes. This overview provides a brief description of the impact of vitamin D₃ endocrine system on calcium and phosphorus homeostasis in classic calciotropic organs. It also provides information on physiologic adaptations on calcium metabolism during pregnancy.

RESUMEN

El calcitriol es el modulador central del sistema endocrino de la vitamina D₃, el cual regula la concentración de calcio y fosfato en la sangre a través de acciones endocrinas sobre el intestino, el hueso y la glándula paratiroides. El calcitriol es el ligando del receptor de la vitamina D₃, un factor de transcripción que activa o reprime genes regulados por el calcitriol. Esta revisión muestra un panorama breve del impacto del sistema endocrino de la vitamina D₃ sobre procesos relacionados con la homeostasis del calcio y el fósforo en los órganos calciotrópicos clásicos. Además, se presenta información acerca de las adaptaciones fisiológicas en la homeostasis de calcio durante el embarazo.

Palabras clave: *intestino, hueso, riñón, glándula paratiroides, VDR, homeostasis del calcio, calcitriol*

Key words: *intestine, bone, kidney, parathyroid gland, VDR, calcium homeostasis, calcitriol*

INTRODUCCIÓN

El calcio es un elemento de gran importancia en la fisiología humana. Este elemento se localiza principalmente en el hueso, en reservas intracelulares y en el fluido extracelular. El calcio circula en la sangre unido a proteínas, en forma de complejos con aniones y en forma libre. El mantenimiento de la concentración normal de calcio en la sangre es crucial para el organismo, ya que sus variaciones 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 intestino delgado, donde el calcio dietario se absorbe; el hueso, que funciona como un gran reservorio de calcio; y el riñón, donde se efectúa la reabsorción del calcio (figura 1).¹ Estos flujos están sujetos a control estricto por la hormona paratiroidea (PTH) y el calcitriol, el metabolito activo de la vitamina D₃. En otras especies, la calcitonina tiene efectos hipocalcémicos significativos, sin embargo, se considera que en el ser humano esta hormona ejerce efectos reguladores mínimos sobre el metabolismo del calcio.² En términos generales, la PTH es la principal hormona involucrada en la regulación minuto a minuto de los niveles del calcio ionizado en el fluido extracelular mientras que el calcitriol controla el balance del calcio en el organismo día a día.³ Los efectos biológicos del calcitriol son el resultado de la integración de acciones de hidroxilasas mitocondriales, receptores nucleares y proteínas efectoras en distintos órganos que conforman lo que se conoce como el sistema endocrino de la vitamina D₃.⁴ Esta revisión se enfoca en las acciones de este sistema hormonal sobre los efectos calciotrópicos en los órganos endocrinos clásicos que son el hueso, el riñón, el intestino y la glándula paratiroides.

LA PTH Y EL SISTEMA ENDOCRINO DE LA VITAMINA D₃

En los mamíferos, la PTH es el regulador más importante de la homeostasis del calcio.⁵ Esta hormona peptídica se sintetiza casi exclusivamente en la glándula paratiroides, aunque se ha detectado su transcrito en el hipotálamo.⁶ La PTH es un polipéptido de 84 aminoácidos que posee homología significativa con el péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP), un péptido esencial en el desarrollo del esqueleto durante la embriogénesis.⁵ La región amino terminal de ambas moléculas comparten similitud en la secuencia y son capaces de interactuar con el mismo receptor conocido como receptor tipo 1 para la PTH y el PTHrP (PTHR1).⁷ La región 1-34 de ambas moléculas es la secuencia mínima necesaria para la regulación de la homeostasis mineral.⁸ El receptor PTHR1 pertenece a la familia de receptores clase II para hormonas peptídicas, los cuales poseen un gran dominio amino terminal en el exterior de la célula que funciona como el sitio inicial de contacto con el ligando. Este receptor posee 7 dominios transmembranales y se encuentra acoplado a proteínas G, las cuales se activan por los movimientos moleculares del receptor activado.⁸ El PTHR1 utiliza distintas vías de señalización, siendo la más importante la de la proteína cinasa A (PKA).⁵ La activación del receptor PTHR1 por la PTH o por el PTHrP estimula el reclutamiento de β -arrestinas, permitiendo la desensibilización del receptor y la endocitosis a través de la vía dependiente de la dinamina y la clatrina.⁹ El PTHR1 se considera un blanco importante en intervenciones farmacológicas para el tratamiento del hiperparatiroidismo, la hipercalcemia humoral maligna y la

osteoporosis.⁸ Se ha identificado un segundo receptor para la región amino terminal de la PTH (PTHr2), el cual no reconoce al PTHrP y tiene una distribución restringida al sistema nervioso central y órganos endocrinos como el páncreas, las gónadas y la placenta.¹⁰ Adicionalmente, se han descrito otros receptores para la PTH y el PTHrP, los cuales reconocen secuencias distintas al extremo amino terminal y por lo tanto no impactan sobre la homeostasis del calcio y del fósforo.⁸

La síntesis y secreción de la PTH está gobernada por la concentración extracelular de calcio, la cual es monitoreada por el receptor sensor de calcio localizado en la glándula paratiroides.¹¹ En respuesta a la hipocalcemia, la PTH es secretada a la circulación e incrementa la concentración de calcio en la sangre estimulando la movilización de este elemento en el hueso y favoreciendo la reabsorción renal de calcio. En el efecto a largo plazo, la PTH incrementa la síntesis de calcitriol en el riñón.¹²

El calcitriol o 1,25-dihidroxitamina D₃ es la forma hormonal activa de la vitamina D₃.¹³ La síntesis de esta hormona depende de la cooperación entre la piel, el hígado y el riñón (figura 2). El precursor 7-deshidrocolesterol presente en las reservas cutáneas se transforma en vitamina D₃ por efecto de la radiación ultravioleta del sol. En el hígado, la vitamina D₃ se hidroxila en la posición 25 y forma 25-hidroxitamina D₃, el metabolito de la vitamina D₃ mas abundante en la circulación. La actividad hormonal se adquiere con la 1 α -hidroxilación de la 25-hidroxitamina D₃, lo cual ocurre en el riñón por efecto de la 25-hidroxitamina D₃ 1 α -hidroxilasa (1 α -hidroxilasa).¹² El calcitriol ejerce sus efectos biológicos principales a través de la interacción con un receptor nuclear perteneciente a la

superfamilia de receptores para hormonas esteroideas.¹³ El receptor del calcitriol (VDR) es un regulador transcripcional que funciona como una molécula adaptadora que facilita o impide el ensamblaje de la maquinaria general de la transcripción por la RNA polimerasa II.¹⁴ En general, el VDR actúa sobre los genes regulados por el calcitriol como un heterodímero con el receptor X para retinoides (RXR). Los genes blanco del calcitriol contienen secuencias pequeñas conocidas como elementos de respuesta al calcitriol (VDREs), los cuales son el sitio de interacción del heterodímero VDR-RXR.¹⁵ El calcitriol 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

EFFECTOS DE LA PTH Y EL CALCITRIOL EN EL HUESO

El incremento continuo de la PTH favorece la movilización de calcio y fosfato del hueso a través de la estimulación de la diferenciación de los osteoclastos.⁵ Este proceso es indirecto y depende de la unión de la PTH al receptor PTHR1 presente en los osteoblastos. Tanto la PTH como el calcitriol aumentan la expresión del ligando activador del receptor NF- κ B (RANKL) en los osteoblastos.^{16,17} La unión de RANKL a su receptor RANK presente en los preosteoclastos induce una cascada de señalización en estas células inmaduras que culmina con la diferenciación a osteoclastos activos. Por otro lado, el calcitriol incrementa la osteoclastogénesis a través de la inhibición de la expresión de la osteoprotegerina, un receptor soluble del osteoblasto que compite con RANK por la unión de

RANKL.¹⁸ Estas observaciones señalan que la PTH y el calcitriol aumentan la calcemia al incrementar los osteoclastos activos en el hueso.

Por otra parte, se ha descrito que la PTH también tiene un papel anabólico en el hueso al fomentar la actividad y la vida del osteoblasto.¹⁹ Los efectos anabólicos de la PTH se observan en regímenes de dosificación intermitentes que incluyen el incremento de la masa ósea en modelos animales y en pacientes con osteoporosis y la reducción de la frecuencia de fracturas.²⁰⁻²²

Por su parte, el calcitriol es esencial para el desarrollo y el mantenimiento del esqueleto, ya que su deficiencia provoca raquitismo en los animales jóvenes y osteomalacia en los adultos.²³ A este respecto, se ha demostrado que las mutaciones en los genes de la 1α -hidroxilasa y del VDR son los responsables del raquitismo tipo I y II, respectivamente.^{24,25} El calcitriol se ha usado en el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica debido a que esta hormona corrige la absorción intestinal de calcio.²⁶ Además, el calcitriol incrementa la densidad mineral del hueso y también disminuye la incidencia de fracturas.²⁶

En los últimos años se han realizado avances significativos en la comprensión de los mecanismos de control de la PTH y el calcitriol sobre los órganos clásicos que regulan la homeostasis mineral. Estos avances se han obtenido del estudio de pacientes con raquitismo tipo I y II, así como de la caracterización del fenotipo de ratones mutantes nulos para la 1α -hidroxilasa, el VDR y la PTH. Los ratones carentes de 1α -hidroxilasa y del VDR presentan hipocalcemia e hiperparatiroidismo secundario de manera similar a lo observado en el raquitismo tipo I y II, respectivamente.²⁷⁻²⁹ En estos animales se presentan anomalías

óseas entre las que destacan la elevación del volumen óseo y del número de osteoblastos. La alimentación de estos ratones con una dieta de rescate alta en calcio y fósforo, normaliza las concentraciones de estos elementos y de la PTH, pero reduce el número de osteoblastos y el volumen óseo.^{30,31} De manera interesante, el fenotipo óseo se normalizó en los ratones carentes de 1α -hidroxilasa tratados con calcitriol, lo que indica que el calcitriol tiene un papel anabólico en el hueso *in vivo* en presencia de concentraciones normales de PTH.³² En particular, la placa de crecimiento ósea requiere la acción coordinada del calcio y el calcitriol para su adecuado desarrollo.²⁶ Un trabajo reciente mostró que los ratones dobles mutantes nulos para la 1α -hidroxilasa y la PTH tratados con calcitriol fueron capaces de incrementar los niveles de calcio en la sangre a través del aumento en la absorción intestinal del calcio y mediante el estímulo de la expresión de transportadores de calcio en el riñón, lo cual resulta en la mayor reabsorción de calcio.³³ De manera interesante, este estudio mostró claramente que el calcitriol no moviliza el calcio depositado en el hueso en ausencia de la PTH, sino que al contrario tiene efectos anabólicos en este tejido.³³

EFFECTOS DE LA PTH Y EL CALCITRIOL EN EL RIÑÓN

La producción de calcitriol en el riñón depende del balance de calcio en el organismo. La PTH estimula la producción de calcitriol en los túbulos proximales del riñón a través del incremento en la síntesis *de novo* de la 1α -hidroxilasa por un mecanismo dependiente de AMP cíclico y del VDR.^{34,35} En ausencia de PTH, el

promotor del gen de la 1α -hidroxilasa se mantiene reprimido por la presencia del VDR y un complejo de corepresores reclutados sobre un VDRE.³⁶ La presencia de la PTH promueve la fosforilación de proteínas asociadas en el VDRE, la disociación de los corepresores y el ensamblaje de la maquinaria general de transcripción dependiente del VDR.³⁶ Este proceso que toma algunas horas le proporciona al riñón la capacidad de responder a la demanda de calcio a través del calcitriol. Es interesante destacar que elevadas concentraciones de calcitriol inhiben la expresión del gen de la 1α -hidroxilasa a través de efectos en el promotor que son mediados por el VDR.³⁷ Por el contrario, el calcitriol es un inductor muy potente de la calcitriol 24-hidroxilasa (24-hidroxilasa), la enzima mitocondrial que se encarga del catabolismo del calcitriol.²³ La inducción de la 24-hidroxilasa por el calcitriol es debida a la acción cooperativa de los VDREs presentes en la región promotora de su gen.³⁸ Los túbulos proximales ofrecen un microambiente permisivo para la síntesis de calcitriol debido a la baja expresión de la 24-hidroxilasa y del VDR. Asimismo, la PTH mantiene la baja expresión de la 24-hidroxilasa aún en presencia de elevadas concentraciones de calcitriol, a través de reducir la estabilidad de los transcritos de esta enzima.³⁹

Por otra parte, se ha descrito la presencia de la 1α -hidroxilasa, la 24-hidroxilasa y el VDR en otros sitios del riñón, como los túbulos distales.^{23,40} De manera interesante, los túbulos distales son capaces de producir pequeñas cantidades de calcitriol a través de mecanismos regulados diferencialmente en comparación con los túbulos proximales.⁴⁰ Estas observaciones probablemente están relacionadas con el control local de la reabsorción de calcio a nivel de los túbulos distales.¹ En

efecto, uno de los efectos endocrinos de la PTH es la estimulación de la recuperación de calcio en los túbulos distales, en parte a través de la acción del canal de calcio TRPV5.³ Estas evidencias junto con la regulación positiva de TRPV5 por el calcitriol,⁴¹ sugieren que parte del efecto de la PTH sobre la reabsorción tubular de calcio puede ser mediado por el calcitriol producido localmente.

La PTH inhibe la reabsorción del fosfato en los túbulos proximales y distales del riñón y de esta manera contribuye a la homeostasis del fosfato.⁵ Estos efectos se consiguen por la disminución de la expresión del cotransportador dependiente de sodio Npt2 en las membranas vellosas de los túbulos proximales, lo cual resulta en la pérdida de fosfato en la orina.⁴²

EFFECTOS DE LA PTH Y EL CALCITRIOL EN EL INTESTINO

La PTH participa indirectamente en la absorción intestinal de calcio a través del efecto del calcitriol. Distintos modelos biológicos han mostrado que la principal función endocrina del calcitriol es la regulación de la síntesis del conjunto de proteínas que participan en la absorción de calcio en el intestino.⁴³ El primer paso de la absorción intestinal de calcio consiste en la transferencia de este elemento desde el lumen hacia las células epiteliales mediante los canales TRPV6 y TRPV5. El calcio absorbido es desplazado a través de las células por proteínas llamadas calbindinas. Finalmente, el calcio es liberado a la corriente sanguínea por efecto de la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA1b) y el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.¹ El primer paso limita la absorción intestinal de calcio y es dependiente de la biodisponibilidad local de los canales de calcio.⁴⁴ El

calcitriol incrementa la síntesis de los canales TRPV5 y TRPV6 en animales tratados con calcitriol⁴⁵ y se ha observado que la expresión de ambos canales se encuentra abatida en los ratones mutantes nulos para el VDR.⁴¹ Adicionalmente, se ha demostrado que algunos análogos del calcitriol con reducida acción calcémica son pobres activadores de la expresión de estos canales.¹³ El calcitriol además controla la síntesis de otras proteínas duodenales que participan en la absorción de calcio, como la calbindina D9k, el intercambiador de Na⁺/Ca²⁺ y la ATPasa PMCA1b.⁴⁵

También se ha descrito que los efectos rápidos no genómicos del calcitriol son mediadores del incremento del transporte vesicular y paracelular de calcio que ocurre durante la absorción de calcio.⁴⁶ Sin embargo, existe controversia acerca de la contribución real de esas vías no genómicas para la absorción intestinal de calcio *in vivo*.

EFFECTOS DE LA PTH Y EL CALCITRIOL EN LA GLÁNDULA PARATIROIDES

El calcitriol suprime la síntesis y secreción de la PTH en las células de la glándula paratiroides mediante represión transcripcional como lo hace con la 1 α -hidroxilasa.⁸ Las ratas deficientes en calcitriol y los ratones mutantes nulos para la 1 α -hidroxilasa y el VDR alimentados con dietas altas en calcio corrigen los elevados niveles de la PTH en el suero.^{30,31} Esto sugiere que el control de la síntesis y liberación de la PTH depende de la cooperación funcional entre el calcio, el calcitriol y el VDR. En este sentido, el VDR incrementa su expresión por un

efecto del calcio⁴⁷ y se ha descrito que el calcitriol favorece este efecto a través de la reducción del recambio del receptor por el proteosoma⁴⁸. El VDR actúa como la molécula sensora de la concentración de calcitriol en la glándula paratiroides.²³ El calcitriol también incrementa la expresión del receptor sensor de calcio a través de 2 VDREs presentes en la región promotora del gen.⁴⁹ Estas observaciones señalan la importancia que tiene el calcitriol en la respuesta de la glándula paratiroides al calcio.

Adicionalmente se ha demostrado que la deficiencia de calcitriol causa hiperplasia de la glándula paratiroides e hiperparatiroidismo secundario.⁴ En este sentido, la normalización de la calcemia en los ratones mutantes nulos para la 1 α -hidroxilasa no suprime la hiperplasia de la glándula paratiroides.³² Además, la administración sistémica de calcitriol inhibe la síntesis y la liberación de la PTH y evita la hiperplasia de la glándula paratiroides que se observa en ciertas patologías renales.¹³ Los mecanismos por los cuales el calcitriol detiene el crecimiento de la glándula paratiroides incluyen: a) la 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^{50,51} y b) la mayor biodisponibilidad de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas, los cuales son potentes supresores de la proliferación celular.⁵² De manera interesante, la alimentación de los ratones mutantes nulos para el VDR con elevada concentración de calcio detiene el crecimiento de la glándula paratiroides.³⁰ Debido a que este modelo produce una concentración muy elevada de calcitriol en ausencia del VDR, es probable que los efectos sobre el crecimiento

de la glándula paratiroides sean debidos a acciones directas del calcio o a efectos del calcitriol independientes del VDR.¹⁴

CONSIDERACIONES FINALES

El mantenimiento de la concentración extracelular de calcio es el resultado del balance estricto de la entrada y la salida de calcio en el organismo. Durante eventos reproductivos, la homeostasis de calcio muestra ajustes radicales, ya que la placenta y la glándula mamaria son órganos que transportan cantidades considerables de calcio fuera del organismo materno. En el embarazo se ha descrito que la madre es hipocalcémica con respecto al feto.⁵³ Sin embargo, la PTH no muestra cambios durante la gestación⁵⁴ y el calcitriol se encuentra elevado en la circulación materna debido a una mayor tasa de síntesis en el riñón y en la placenta.^{53,55} A la fecha no se ha caracterizado el mecanismo que controla la síntesis de calcitriol en el embarazo. La concentración elevada de calcitriol tiene efectos endocrinos en el intestino para aumentar la capacidad de absorción del calcio de la dieta, lo cual es esencial para cubrir los requerimientos de este elemento durante la formación del esqueleto fetal.⁵⁴ Por otro lado, aún cuando la producción placentaria de calcitriol es considerable,⁵⁶⁻⁵⁸ se piensa que esta hormona producida localmente regula preferencialmente procesos tempranos del embarazo como la implantación y aceptación del aloinjerto fetal mediante efectos autocrinos y paracrinos independientes del calcio.⁵⁹

CONCLUSIONES

El sistema endocrino de la vitamina D₃ es esencial en la interacción entre el riñón, el hueso, la glándula paratiroides y el intestino, 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 entre los que se destaca el control de la síntesis del calcitriol. Este secosteroide es la tercera hormona reguladora de la calcemia cuyos efectos calciotrópicos se llevan a cabo por varios mecanismos. El calcitriol es la única hormona que induce la síntesis de las proteínas que participan en el transporte activo de calcio y fosfato en el intestino. El calcitriol y la PTH 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 el calcitriol y la PTH. Otro efecto importante del calcitriol es la retroalimentación negativa de la síntesis y la secreción de la PTH en la glándula paratiroides. La gran mayoría de los efectos calciotrópicos del calcitriol son ejercidos a través del control de la expresión de genes blanco dependientes del VDR. Sin embargo, se han documentado efectos calciotrópicos del calcitriol en el intestino debidos a acciones no genómicas. Finalmente, el calcitriol es capaz de regular la proliferación celular en la glándula paratiroides a través de efectos sobre el ciclo celular que son independientes de

los efectos calciotrópicos. Todas estas observaciones demuestran la versatilidad funcional del calcitriol en el organismo y destacan la importancia que el sistema endocrino de la vitamina D₃ tiene sobre la salud.

REFERENCIAS

1. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 2005; 85: 373-422.
2. Ramasamy I. Recent advances in physiological calcium homeostasis. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 237-73.
3. Lambers TT, Bindels RJ, Hoenderop JG. Coordinated control of renal Ca²⁺ handling. *Kidney Int* 2006; 69: 650-4.
4. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1689S-96S.
5. Potts JT. Parathyroid hormone: past and present. *J Endocrinol* 2005; 187: 311-25.
6. Nutley MT, Parimi SA, Harvey S. Sequence analysis of hypothalamic parathyroid hormone messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 1995; 136: 5600-7.
7. Pausova Z, Bourdon J, Clayton D, Mattei MG, Seldin MF, Janicic N, Riviere M, Szpirer J, Levan G, Szpirer C, et al. Cloning of a parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor (PTHrP) cDNA from a rat osteosarcoma (UMR 106) cell line: chromosomal assignment of the gene in the human, mouse, and rat genomes. *Genomics* 1994; 20: 20-6.
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. Castro M, Dicker F, Vilardaga JP, Krasel C, Bernhardt M, Lohse MJ. Dual regulation of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor signaling by protein kinase C and beta-arrestins. *Endocrinology* 2002; 143: 3854-65.
10. Usdin TB, Gruber C, Bonner TI. Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J Biol Chem* 1995; 270: 15455-8.
11. Breitwieser GE. Calcium sensing receptors and calcium oscillations: calcium as a first messenger. *Curr Top Dev Biol* 2006; 73: 85-114.
12. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92: 4-8.
13. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F8-28.
14. Demay MB. Mechanism of vitamin D receptor action. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068: 204-13.
15. Rachez C, Freedman LP. Mechanisms of gene regulation by vitamin D(3) receptor: a network of coactivator interactions. *Gene* 2000; 246: 9-21.
16. Kitazawa R, Kitazawa S. Vitamin D(3) augments osteoclastogenesis via vitamin D-responsive element of mouse RANKL gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 650-5.
17. Ma YL, Cain RL, Halladay DL, Yang X, Zeng Q, Miles RR, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia JE. 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.

18. Kondo T, Kitazawa R, Maeda S, Kitazawa S. 1 alpha,25 dihydroxyvitamin D3 rapidly regulates the mouse osteoprotegerin gene through dual pathways. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 1411-9.
19. Reeve J, Meunier PJ, Parsons JA, Bernat M, Bijvoet OL, Courpron P, Edouard C, Klenerman L, Neer RM, Renier JC, Slovik D, Vismans FJ, Potts JT, Jr. Anabolic effect of human parathyroid hormone fragment on trabecular bone in involutional osteoporosis: a multicentre trial. *Br Med J* 1980; 280: 1340-4.
20. Lane NE, Sanchez S, Modin GW, Genant HK, Pierini E, Arnaud CD. Parathyroid hormone treatment can reverse corticosteroid-induced osteoporosis. Results of a randomized controlled clinical trial. *J Clin Invest* 1998; 102: 1627-33.
21. Dempster DW, Cosman F, Kurland ES, Zhou H, Nieves J, Woelfert L, Shane E, Plavetic K, Muller R, Bilezikian J, Lindsay R. 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.
22. Cosman F. Anabolic therapy for osteoporosis: parathyroid hormone. *Curr Rheumatol Rep* 2006; 8: 63-9.
23. Christakos S, Dhawan P, Shen Q, Peng X, Benn B, Zhong Y. New insights into the mechanisms involved in the pleiotropic actions of 1,25dihydroxyvitamin D3. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068: 194-203.
24. Fu GK, Lin D, Zhang MY, Bikle DD, Shackleton CH, Miller WL, Portale AA. Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets type 1. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 1961-70.

25. Hughes MR, Malloy PJ, Kieback DG, Kesterson RA, Pike JW, Feldman D, O'Malley BW. Point mutations in the human vitamin D receptor gene associated with hypocalcemic rickets. *Science* 1988; 242: 1702-5.
26. Riggs BL. Role of the vitamin D-endocrine system in the pathophysiology of postmenopausal osteoporosis. *J Cell Biochem* 2003; 88: 209-15.
27. Dardenne O, Prud'homme J, Arabian A, Glorieux FH, St-Arnaud R. Targeted inactivation of the 25-hydroxyvitamin D(3)-1(alpha)-hydroxylase gene (CYP27B1) creates an animal model of pseudovitamin D-deficiency rickets. *Endocrinology* 2001; 142: 3135-41.
28. Panda DK, Miao D, Tremblay ML, Sirois J, Farookhi R, Hendy GN, Goltzman D. Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1alpha -hydroxylase enzyme: evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 7498-503.
29. Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K, Yoshihara Y, Kawakami T, Arioka K, Sato H, Uchiyama Y, Masushige S, Fukamizu A, Matsumoto T, Kato S. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet* 1997; 16: 391-6.
30. Li YC, Amling M, Pirro AE, Priemel M, Meuse J, Baron R, Delling G, Demay MB. 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.

31. 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.
32. 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.
33. 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 Which Are Homozygous for Both the 1 α Hydroxylase and Parathyroid Hormone Null Alleles. *Endocrinology* 2006;
34. Horiuchi N, Suda T, Takahashi H, Shimazawa E, Ogata E. In vivo evidence for the intermediary role of 3',5'-cyclic AMP in parathyroid hormone-induced stimulation of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ synthesis in rats. *Endocrinology* 1977; 101: 969-74.
35. Brenza HL, Kimmel-Jehan C, Jehan F, Shinki T, Wakino S, Anazawa H, Suda T, DeLuca HF. Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 1387-91.
36. 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.
37. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 664-73.

38. Zierold C, Darwish HM, DeLuca HF. Two vitamin D response elements function in the rat 1,25-dihydroxyvitamin D 24-hydroxylase promoter. *J Biol Chem* 1995; 270: 1675-8.
39. Zierold C, Mings JA, DeLuca HF. Parathyroid hormone regulates 25-hydroxyvitamin D(3)-24-hydroxylase mRNA by altering its stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 13572-6.
40. Yang W, Friedman PA, Kumar R, Omdahl JL, May BK, Siu-Caldera ML, Reddy GS, Christakos S. Expression of 25(OH)D₃ 24-hydroxylase in distal nephron: coordinate regulation by 1,25(OH)₂D₃ and cAMP or PTH. *Am J Physiol* 1999; 276: E793-805.
41. Okano T, Tsugawa N, Morishita A, Kato S. Regulation of gene expression of epithelial calcium channels in intestine and kidney of mice by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90: 335-8.
42. Zhao N, Tenenhouse HS. Npt2 gene disruption confers resistance to the inhibitory action of parathyroid hormone on renal sodium-phosphate cotransport. *Endocrinology* 2000; 141: 2159-65.
43. Van Cromphaut SJ, Dewerchin M, Hoenderop JG, Stockmans I, Van Herck E, Kato S, Bindels RJ, Collen D, Carmeliet P, Bouillon R, Carmeliet G. Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 13324-9.
44. Bouillon R, Van Cromphaut S, Carmeliet G. Intestinal calcium absorption: Molecular vitamin D mediated mechanisms. *J Cell Biochem* 2003; 88: 332-9.
45. van Abel M, Hoenderop JG, van der Kemp AW, van Leeuwen JP, Bindels RJ. Regulation of the epithelial Ca²⁺ channels in small intestine as studied by

quantitative mRNA detection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G78-85.

46. Norman AW, Okamura WH, Bishop JE, Henry HL. Update on biological actions of 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ (rapid effects) and 24R,25(OH)₂-vitamin D₃. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 197: 1-13.

47. Brown AJ, Zhong M, Finch J, Ritter C, Slatopolsky E. The roles of calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the regulation of vitamin D receptor expression by rat parathyroid glands. *Endocrinology* 1995; 136: 1419-25.

48. Wiese RJ, Uhland-Smith A, Ross TK, Prah J, DeLuca HF. Up-regulation of the vitamin D receptor in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ results from ligand-induced stabilization. *J Biol Chem* 1992; 267: 20082-6.

49. Canaff L, Hendy GN. Human calcium-sensing receptor gene. Vitamin D response elements in promoters P1 and P2 confer transcriptional responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Biol Chem* 2002; 277: 30337-50.

50. Cozzolino M, Lu Y, Finch J, Slatopolsky E, Dusso AS. p21WAF1 and TGF- α mediate parathyroid growth arrest by vitamin D and high calcium. *Kidney Int* 2001; 60: 2109-17.

51. Cordero JB, Cozzolino M, Lu Y, Vidal M, Slatopolsky E, Stahl PD, Barbieri MA, Dusso A. 1,25-Dihydroxyvitamin D down-regulates cell membrane growth- and nuclear growth-promoting signals by the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 2002; 277: 38965-71.

52. Tokumoto M, Tsuruya K, Fukuda K, Kanai H, Kuroki S, Hirakata H. Reduced p21, p27 and vitamin D receptor in the nodular hyperplasia in patients with advanced secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 2002; 62: 1196-207.

53. Weisman Y. Maternal, fetal and neonatal vitamin D and calcium metabolism during pregnancy and lactation. *Endocr Dev* 2003; 6: 34-49.
54. Kovacs CS, Kronenberg HM. Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. *Endocr Rev* 1997; 18: 832-72.
55. Vanhooke JL, Prah J, Kimmel-Jehan C, Mendelsohn M, Danielson EW, Healy KD, DeLuca HF. CYP27B1 null mice with LacZreporter gene display no 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase promoter activity in the skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 75-80.
56. 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.
57. 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.
58. Zehnder D, Evans KN, Kilby MD, Bulmer JN, Innes BA, Stewart PM, Hewison M. The ontogeny of 25-hydroxyvitamin D(3) 1 α -hydroxylase expression in human placenta and decidua. *Am J Pathol* 2002; 161: 105-14.
59. Evans KN, Bulmer JN, Kilby MD, Hewison M. Vitamin D and placental-decidual function. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11: 263-71.

Figura 1

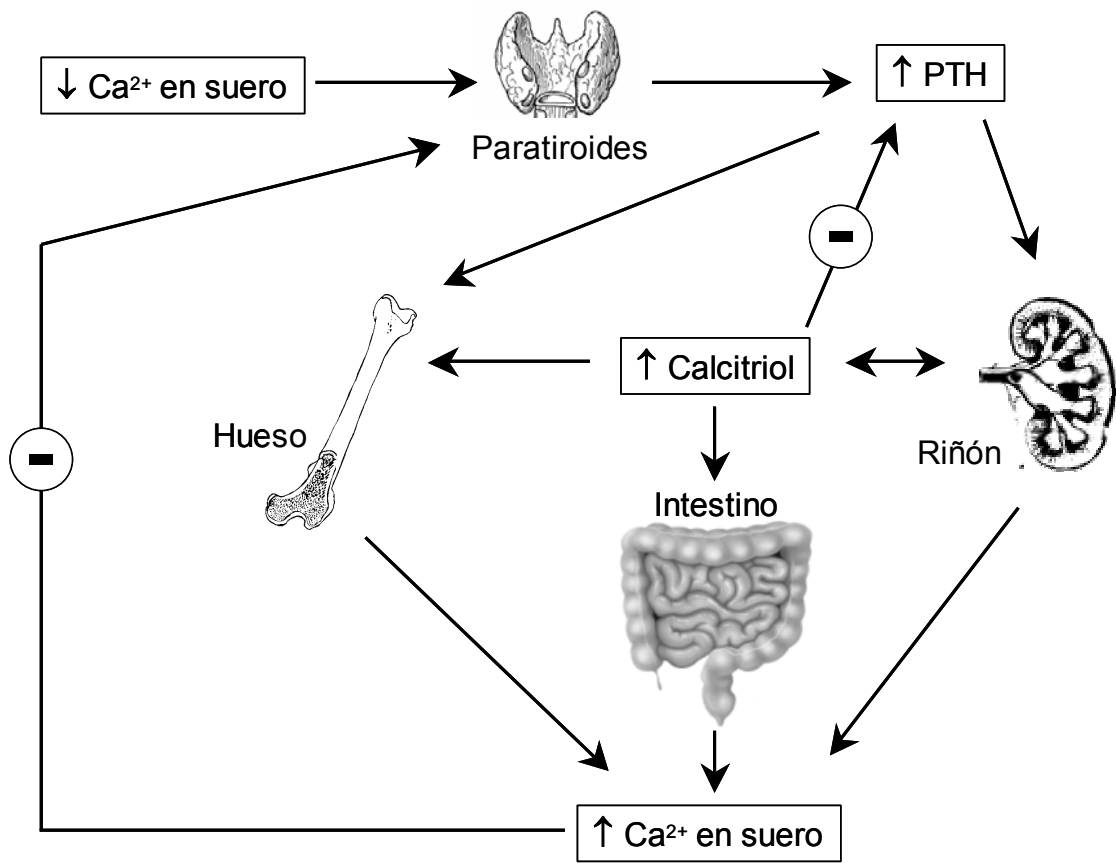
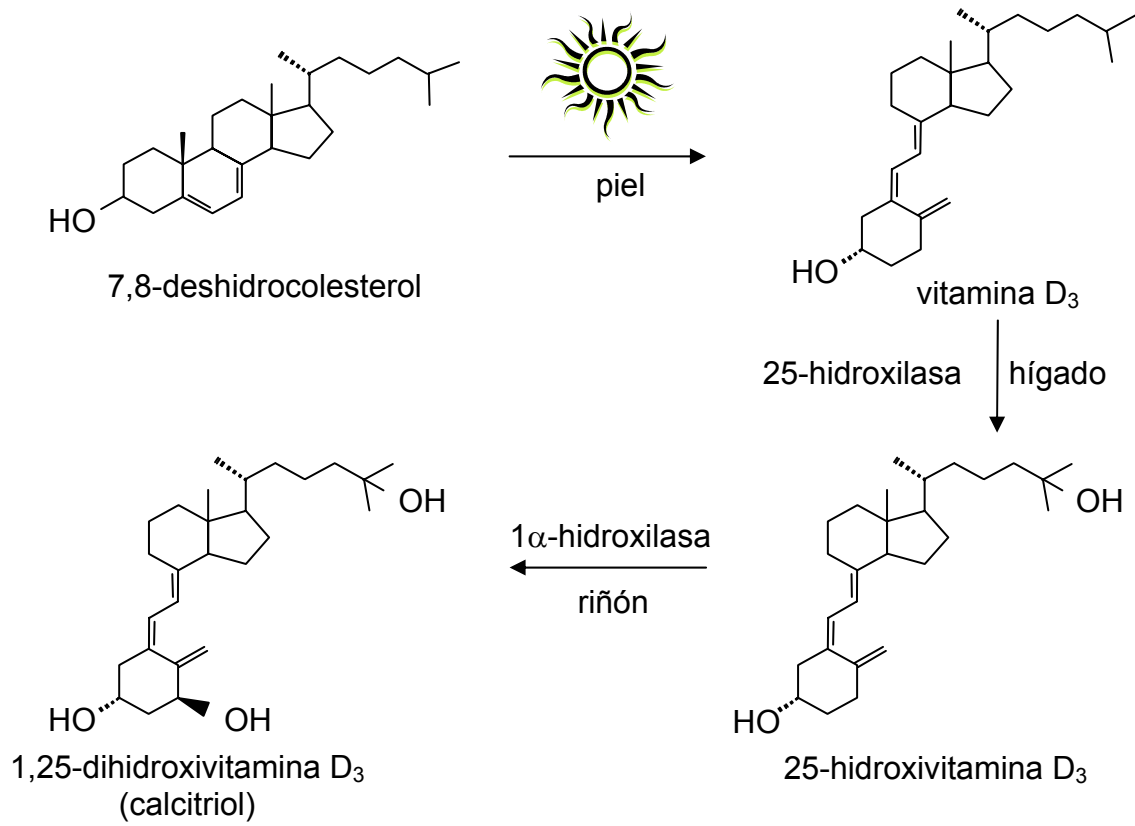


Figura 2



Pies de Figura

Figura 1. El sistema endocrino de la vitamina D₃. Las glándulas paratiroides responden a la baja concentración de calcio en la sangre secretando PTH. Esta hormona estimula la actividad y la síntesis de la 1 α -hidroxilasa en el riñón, el cual secreta calcitriol. El incremento de calcitriol restaura las concentraciones de Ca²⁺ en la sangre mediante 3 mecanismos: 1) activando la absorción intestinal de Ca²⁺, 2) incrementando la movilización de Ca²⁺ y fosfato del hueso, y 3) estimulando la reabsorción de Ca²⁺ en el riñón.

Figura 2. Síntesis del calcitriol. Por efecto de la luz solar, el 7,8-deshidrocolesterol presente en la piel se transforma en vitamina D₃, la cual es llevada al hígado por la proteína transportadora de la vitamina D₃. En este órgano, la 25-hidroxilasa convierte a la vitamina D₃ en 25-hidroxivitamina D₃, el metabolito más abundante en la circulación. La activación final ocurre en el riñón, donde se sintetiza la 1,25-dihidroxivitamina D₃ o calcitriol, el metabolito con actividad hormonal.

Figure 1

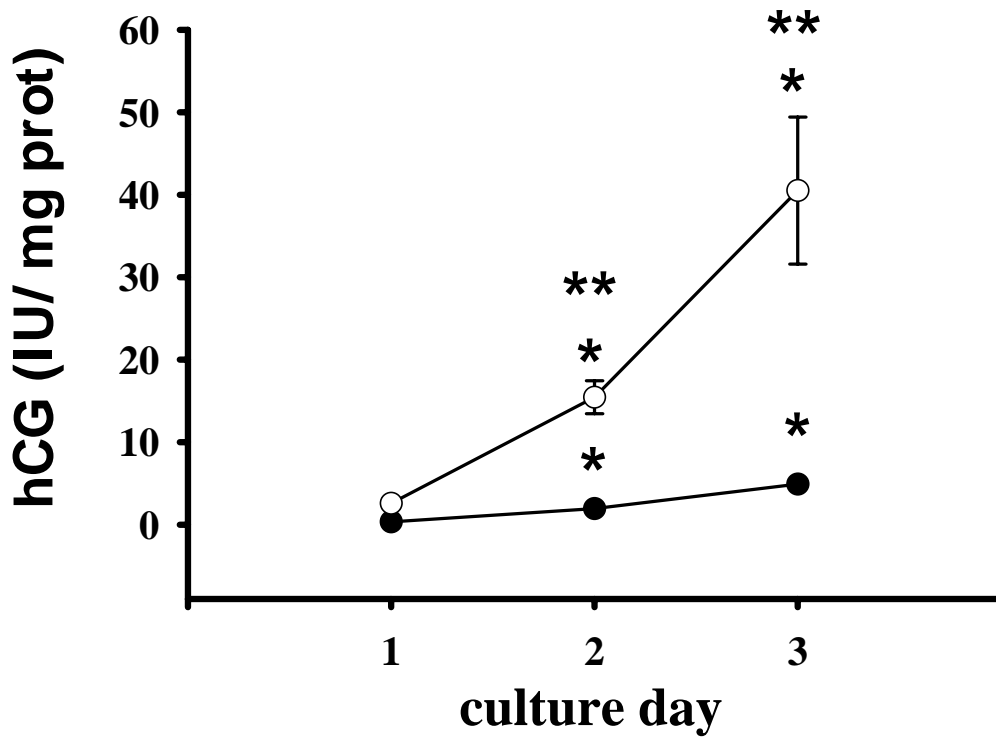


Figure 2

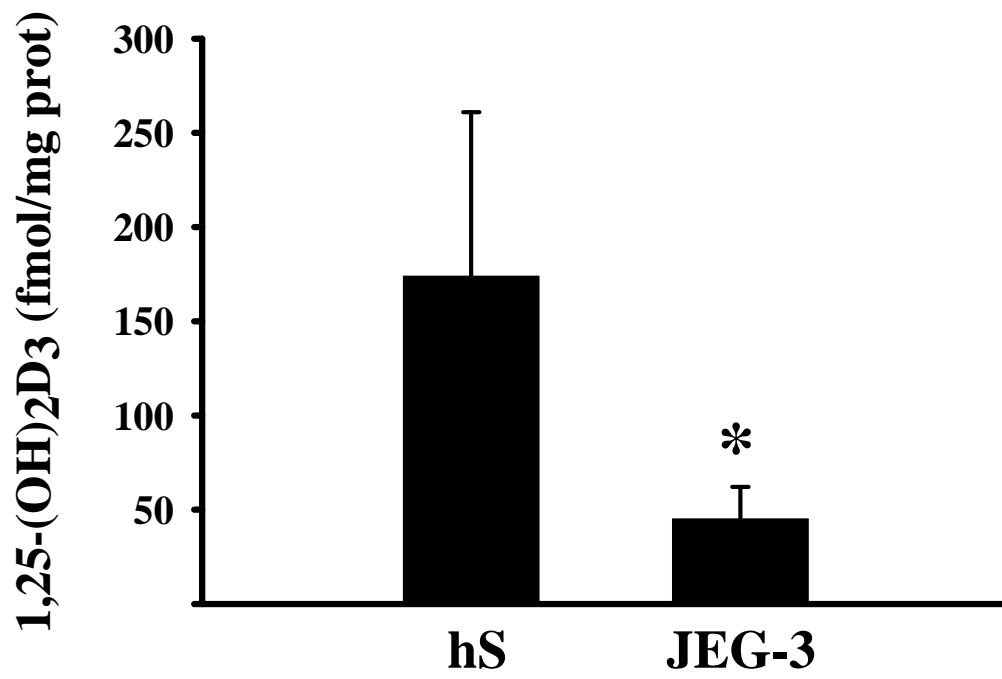
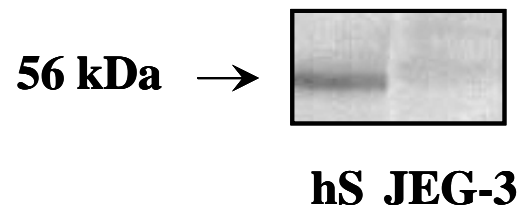


Figure 3

A



B

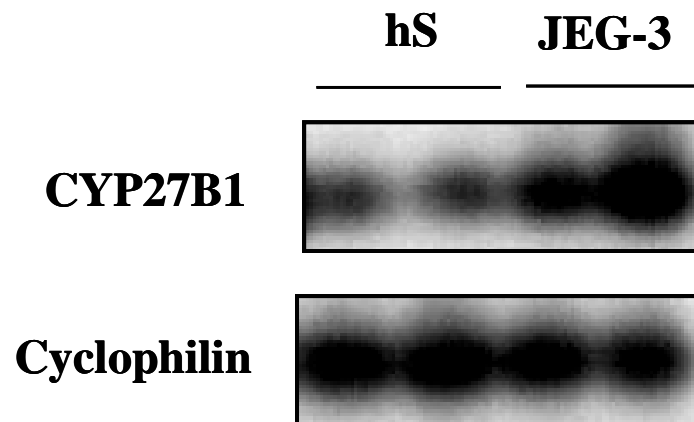
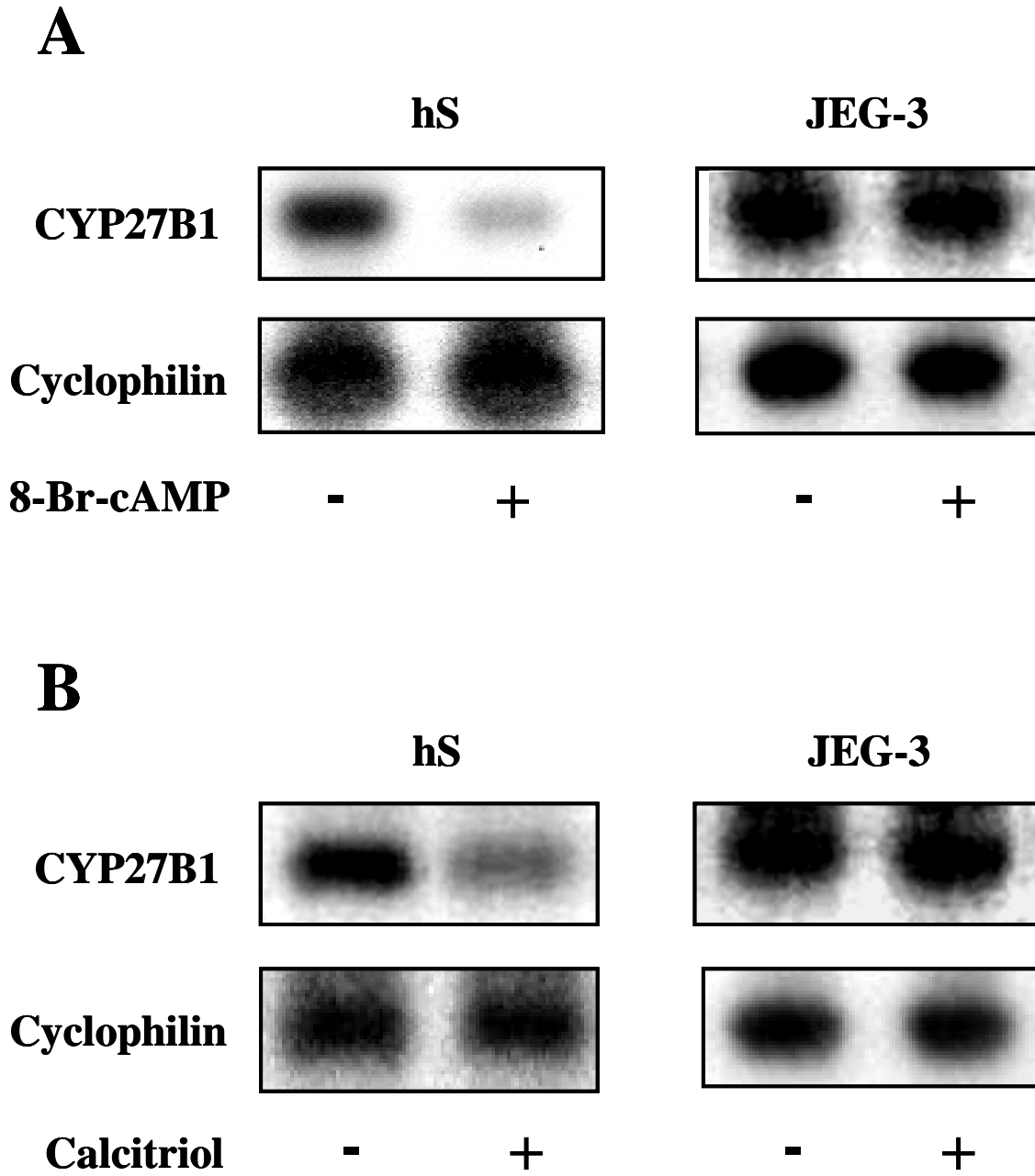


Figure 4



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

Euclides Avila*, Lorenza Díaz, Ali Halhali, Fernando Larrea.

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.

*Corresponding author: 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; México. Tel. (52) 55 55 73 11 60; Fax: (52) 55 56 55 98 59; E-mail: euclides_@excite.com

Abstract

In vitro differentiation of human trophoblast cells is a dynamic process accompanied by increasing intracellular levels of cyclic AMP (cAMP). Signaling through cAMP in this tissue is central to hormone expression and cytodifferentiation. In the present study, we analyzed transcriptional regulation of key enzymes involved in vitamin D endocrine system during *in vitro* syncytiotrophoblast formation. Total RNA was isolated from human trophoblast cells and subjected to reverse transcription, polymerase chain reaction and southern blot analysis using specific primers and radiolabeled probes. During syncytium formation 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase (CYP27B1) was decreased while vitamin D receptor (VDR) gene remained unaffected. No 1,25-dihydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase (CYP24) transcription signal was detected. Nevertheless, incubations in the presence of 8-Bromo cAMP (1.5 mM) resulted in CYP24 induction and CYP27B1 inhibition, respectively. The overall data showed that cultured human syncytiotrophoblasts express key enzymes involved in vitamin D metabolism, as well as VDR. The results support previous findings that human placenta is a source of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, which synthesis is regulated by common growth and developmental factors. The data also suggest a tissue-dependant differential regulation of CYP27B1 gene expression by cAMP.

Keywords: vitamin D, placenta, gene expression, cell differentiation, trophoblast

1. Introduction

During human placental development, cytotrophoblast cells differentiate into multinucleated syncytiotrophoblasts via cell fusion [1]. This pathway of differentiation is a key process in human pregnancy since most of the metabolic activities of the placenta, which are required for fetal growth and development, are associated with the acquisition of a syncytial phenotype [1]. Studies in trophoblast primary cultures have demonstrated that syncytial formation is cyclic AMP (cAMP) dependent [2]. In fact, intracellular levels of cAMP rise during *in vitro* citodifferentiation [3].

In addition, human syncytiotrophoblast cultures are able to synthesize the secosteroid 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25-(OH)₂D₃) [4-6]. This process is catalyzed by the placental 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase (1 α -OHase or CYP27B1) [5], an enzyme that belongs to the mitochondrial cytochrome P450 family [7]. Furthermore, 1,25-dihydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase (24-OHase or CYP24), a cytochrome involved in the main catabolic pathway of 1,25-(OH)₂D₃, and the vitamin D receptor (VDR) are also expressed in the human placenta [8, 9]. Thus, the aim of this work was to study transcriptional regulation of three key components of the vitamin D endocrine system: 1 α -OHase, 24-OHase and VDR, during *in vitro* differentiation of human trophoblasts cells. In addition, the effect of 8-Bromo-cAMP (8-Br-cAMP), on CYP27B1, CYP24 and VDR gene regulation was also studied.

2. Materials and methods

Trophoblast cell culture

The study protocol was approved by the Human Ethical Committee of the Institute. Term placentae (38-42 weeks of gestation) were obtained from normal pregnant women. The isolation and culture of trophoblasts was performed as described previously [5, 10]. Briefly: villous tissue was digested with trypsin and DNase I, and cytotrophoblasts were separated on a Percoll gradient. Cells (2×10^6 cells/ml) were plated in Dulbecco's Modified Eagle Medium in humidified 5% CO₂-95% air at 37°C. At different days of plating, cells were incubated in the presence or absence of 1.5 mM 8-Br-cAMP (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) during 24 h. Cell cultures were examined daily and both basal and 8-Br-cAMP stimulated human chorionic gonadotropin (hCG) secretion in culture media was measured by radioimmunoanalysis as previously described [4-6]. The area under the curve (AUC) of hCG secretion was calculated by the trapezoid method (SigmaStat; Jandel Scientific Software, Chicago, IL). Total protein content of cell cultures was determined by the method of Bradford using BSA as standard [11]. Statistical significance between comparisons was established using Student's *t* test. A *P* value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

PCR amplifications and Southern blot analysis

Total RNA was isolated from cultured trophoblast cells with Trizol® reagent (Invitrogen, USA) [12]. cDNA synthesis from 1 µg of total RNA was performed using reverse transcriptase (Invitrogen, USA), and then PCR amplifications were

done with *Taq* DNA polymerase (Roche, Germany) and the following sense and antisense primers: β hCG, (5'-CGCACCAAGGATGGAGA-3' and 5'-GCCTTTATTGTGGAGGA-3'); CYP27B1, (5'-GTTGCTATTGGCGGGAGTGGAC-3' and 5'-GTGACACAGAGTGACCAGCGTAT-3'); CYP24, (5'-CCTCGTGTTGTATGAGAAGAGATT-3' and 5'-TTTAAATACGGCATATTCCTCAA-3'); and VDR, (5'-TCCTCCTGCTCAGATCACTGT-3' and 5'-CTCCTCCTCATGCAAGTTCAG-3'); which yielded a 494-bp, 298-bp, 489-bp and 438-bp RT-PCR products, respectively. Normalization was performed by the amplification of cyclophilin mRNA with the following sense and antisense primers: 5'-CCCCACCGTGTTCTTCGACAT-3' and 5'-AGGTCCTTACCGTTCTGGTTCG-3', which yielded a 453-bp RT-PCR product. The RT-PCR products were separated in agarose gels, blotted onto nylon membranes and hybridized with probes radiolabeled with [³²P]-dCTP. Specific probes were obtained by RT-PCR from human placental tissue using the following upper and lower primers: for the 494-bp β hCG probe (5'-CGCACCAAGGATGGAGA-3' and 5'-GCCTTTATTGTGGAGGA-3'); for the 183-bp CYP27B1 probe (5'-TTGGGGATAATATAGTCACCCAC-3' and 5'-CCACTCAGAGATCACAGCTGC-3'); for the 170-bp CYP24 probe (5'-TCAGCAGCCTAGTGCAAGATT-3' and 5'-TTTGTTCGCACTTGGGGATTA-3'); for the 172-bp VDR probe (5'-ACAGCATCCAAAAGGTCATTG-3' and 5'-TAGTCTTGGTTGCCACAGGTC-3'); and for the 187-bp cyclophilin probe (5'-CACACGCCATAATGGCACTGGTGG-3' and 5'-AAAGACCACATGCTTGCCATCCAGC-3'), respectively. In all cases, after 18 h hybridization, filters were washed and exposed to X-ray films.

3. Results

Microscopic examination of cell cultures showed that within 3 days after plating the cultured cytotrophoblasts formed cell aggregates conformed mostly of larger areas containing multiple nuclei with very little, if any, single mononuclear cells. By day 3, multinucleated cells seemed to form a network that corresponded to functional syncytiotrophoblasts, as determined by their ability to secrete hCG. Figure 1 shows the area under the curve of hCG released during 96 h of culture. As depicted, cell cultures were able to synthesize basal amounts of hCG and the addition of 8-Br-cAMP significantly increased the content of hCG in the culture media. Figure 2 shows the temporal pattern of transcription of the β subunit of hCG (β hCG) during trophoblast differentiation in the presence or absence of 8-Br-cAMP. A specific 494-bp β hCG cDNA fragment was obtained in basal conditions with a pattern according with the released hormone (Figure 2A). The relative abundance of β hCG mRNA (Fig. 2C) was obtained by normalizing the specific β hCG band intensity with the 453-bp signal generated for the housekeeping gene cyclophilin (Fig 2B). As shown, 8-Br-cAMP increased β hCG mRNA, compared with cultures in the absence of the cyclic nucleotide analogue (Fig. 2C).

In order to study the regulation of key elements of the vitamin D endocrine system during trophoblast differentiation, total RNA was extracted from cultured cells at different days from plating and subjected to RT-PCR and southern blot analysis. Figure 3 shows the temporal pattern of expression of 1α -OHase and 24-OHase genes. As depicted, the 298-bp product of CYP27B1 gene was decreased during the process of trophoblasts differentiation under basal conditions (Fig. 3A), and

the addition of 8-Br-cAMP further inhibited transcription of this gene (Fig. 3D). In contrast, CYP24 gene was up regulated by 8-Br-cAMP addition (Fig. 3B and 3E). As can be seen in Figure 3B, the 489-bp cDNA fragment of 24-OHase mRNA was barely detectable under basal conditions but clearly visible under 8-Br-cAMP stimuli. On the other hand, VDR mRNA remained without changes throughout the differentiation process, and the addition of 8-Br-cAMP slightly increased VDR mRNA levels at 24 h of culture (Figure 4A). Normalization was carried out with cyclophilin (Fig. 4B and 4C).

4. Discussion

Although calcium homeostasis is a main issue for the maternal organism during pregnancy, very few studies have been aimed at investigating placental vitamin D metabolism. The placenta is active in calcium transport, and expresses VDR, CYP24 and CYP27B1 [5, 9, 13]. In the present study, we provide evidence for the role of cAMP on transcriptional regulation of three key enzymes involved in vitamin D metabolism in human placenta.

Under the experimental conditions used in this study, β hCG expression and hCG secretion were studied in all culture days. We observed that hCG concentrations progressively increased with the acquisition of a syncytial phenotype, a process that was further enhanced in the presence of 8-Br-cAMP (Fig. 2).

The presence of cAMP responsive elements (CREs) have been described in the promoter regions of CYP24 and CYP27B1 genes [14, 15], which implies that cAMP-dependant regulation is feasible. In fact, in the kidney, cAMP and forskolin stimulate CYP27B1 and inhibit CYP24 gene expression [16, 17]. On the contrary, in the experimental model used herein, incubation of syncytiotrophoblasts in the presence of 8-Br-cAMP resulted in CYP27B1 inhibition and CYP24 stimulation, which suggest a tissue-specific regulation of these genes. In addition, a progressive and spontaneous decline of CYP27B1 expression was observed during trophoblast differentiation under basal conditions. This finding is in line with previous studies showing that intracellular content of cAMP rises throughout *in vitro* syncytial formation [18]. Indeed, activation of cAMP dependant kinases is known to be crucial for the trophoblast differentiation [2].

Interestingly, the observation that CYP24 transcriptional activity couldn't be detected under basal conditions in none of the different days of culture (Fig. 3B), suggests that generation of endogen cAMP during cytotrophoblasts differentiation was not sufficiently enough to induce CYP24 expression. Nevertheless, the fact that 8-Br-cAMP significantly switched on CYP24 gene expression, also suggests that this gene is regulated via the PKA signaling pathway, independently of 1,25-(OH)₂D₃. Indeed, It is known that the major route of 24-hydroxylase induction involves the combined action of 1,25-(OH)₂D₃ and VDR [19, 20]. Consequently, cellular expression of CYP24 is tightly linked to the coexpression of VDR. Most cells that contain VDR express basal levels of CYP24; however, in this study CYP24 transcription was not detected in the absence of 8-Br-cAMP, even when VDR gene expression was observed (Figs. 3B and 4 respectively). This finding may indicate the role of cAMP on VDR actions upon CYP24 gene expression. In addition, the presence of 8-Br-cAMP in the first day of culture induced a slight increase on VDR gene transcription, which was in agreement with the presence of CREs in the promoter region of this gene [21, 22].

Finally, it has been established that 1,25-(OH)₂D₃ is involved in the regulation of placental lactogen expression, decidualization of the endometrium, and calcium transport in the placenta [23-25]. Furthermore, since 1,25-(OH)₂D₃ is considered as an immunosuppressor agent and acts as a regulator of the synthesis of several cytokines [26], it may contribute to the establishment and maintenance of the fetoplacental unit. The overall data point out the importance of future studies on the physiological meaning of vitamin D metabolism during the process of placental citodifferentiation.

In summary, the present study demonstrates a tissue-specific regulation of key cytochromes involved in the vitamin D endocrine system and highlights the role of cAMP on CYP27B1 and CYP24 gene regulation in the placenta.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the National Council of Science and Technology CONACyT (México). The authors acknowledge with special thanks to Hospital de Gineco-Obstetricia Luis Castelazo Ayala (IMSS) México, D.F., for placentae donation.

EN.REFLIST

Figure legends

Figure 1. hCG secretion by trophoblast cells in culture. Area under the curve of hCG released during 96 h in the absence (-) or presence (+) of 8-Br-cAMP. * $P < 0.05$ vs. control.

Figure 2. Time course of expression of β hCG mRNA in cultured trophoblast cells. Total RNA was obtained daily from cultured cells during different days in the absence (-) or presence (+) of 8-Br-cAMP and then subjected to RT-PCR as described in Materials and Methods. (A). Southern blot analysis of 494-bp β hCG RT-PCR products. (B). RT-PCR amplifications of cyclophilin. (C). Normalization of relative optical densities of RT-PCR products of β hCG and cyclophilin.

Figure 3. Expression of CYP27B1 and CYP24 genes in the presence (+) or absence (-) of 8-Br-cAMP in cultured trophoblast cells. Total RNA was obtained at different days of culture and subjected to RT-PCR analysis using specific cDNA probes for CYP27B1 (A), CYP24 (B) and cyclophilin (C), respectively. Normalization of the relative optical densities of the 298-bp CYP27B1 RT-PCR product with the 453-bp cyclophilin fragment is shown in D. Normalization of 489-bp CYP24 RT-PCR product with cyclophilin signal is shown in E.

Figure 4. Expression of VDR mRNA in cultured trophoblast cells. Daily total RNA was obtained from cultured cells in the absence (-) or the presence (+) of 8-Br-cAMP and then subjected to RT-PCR as described in Materials and Methods. This yielded VDR-products of 438-bp (A) and cyclophilin 453-bp products (B), respectively. The Southern blot was then probed with specific nested cDNA fragments. Normalization of relative optical densities of RT-PCR products is shown in panel C.

Figure 1

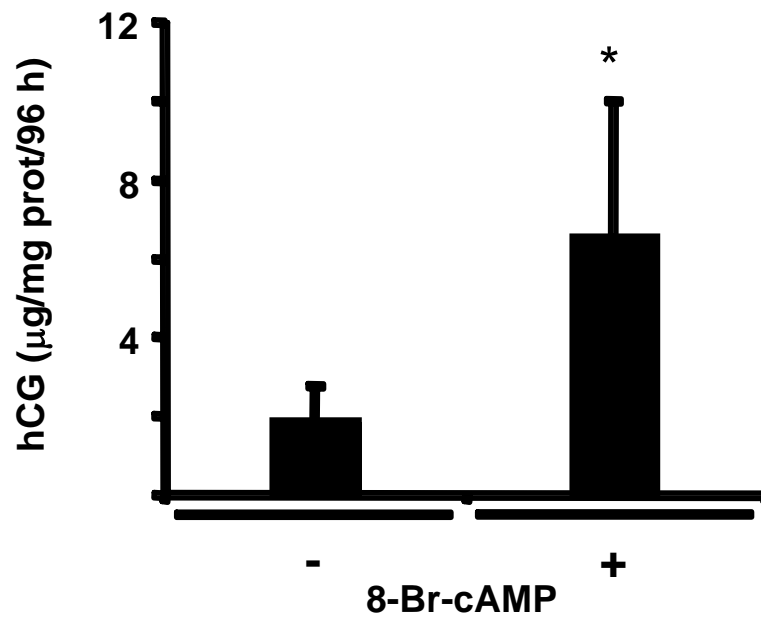


Figure 2

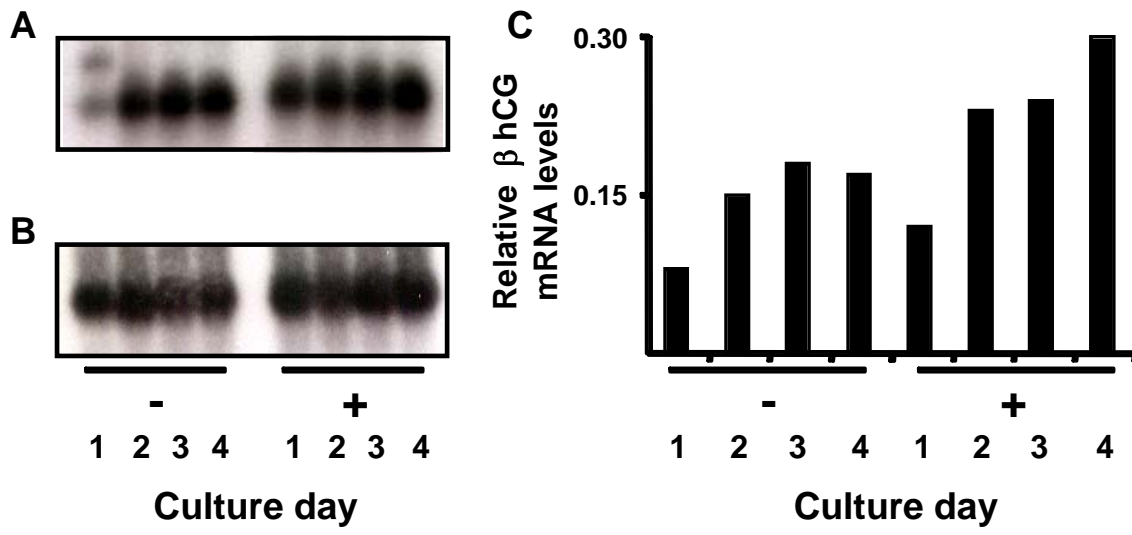


Figure 3

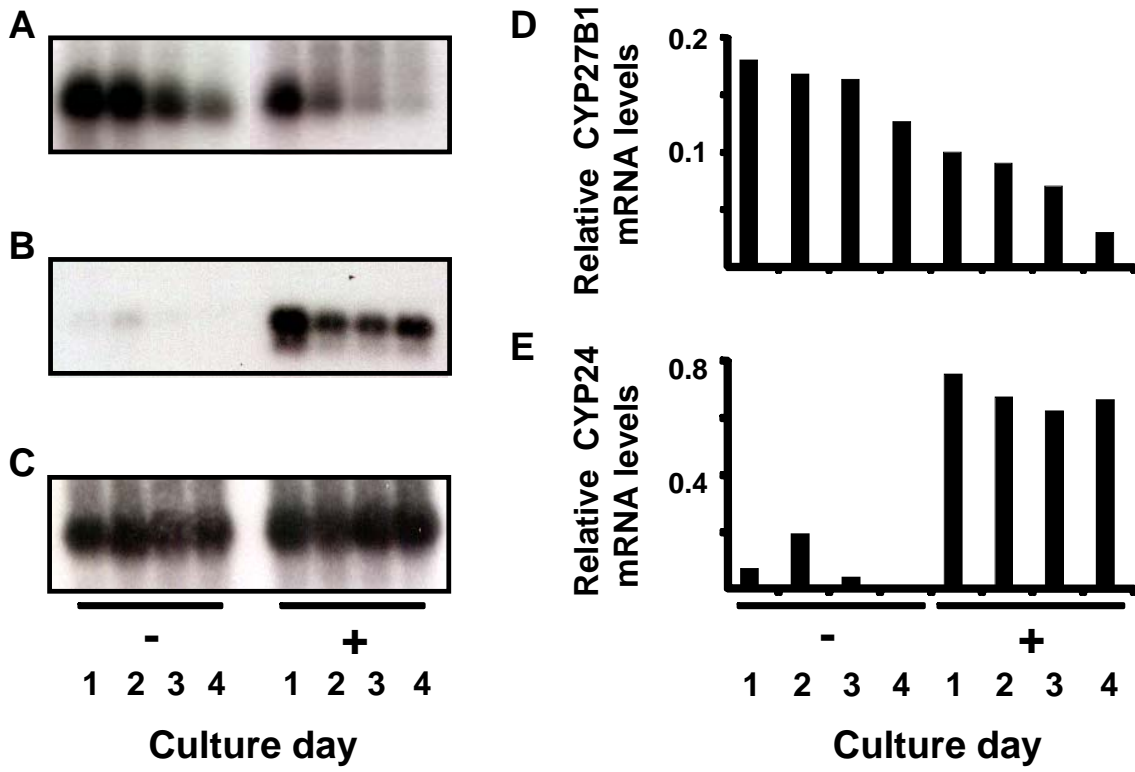


Figure 4

