



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**ACCIONES INMUNOMODULADORAS
DEL CALCITRIOL
EN LA PLACENTA HUMANA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

PRESENTA:
NANCY NOYOLA MARTÍNEZ

Director: Dr. David Barrera Hernández



MÉXICO, D.F.

MAYO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

ACCIONES INMUNOMODULADORAS DEL CALCITRIOL EN LA PLACENTA
HUMANA

Tesis que para obtener el título de biólogo presenta: Nancy Noyola Martínez

Director de tesis: Dr. David Barrera Hernández

Realizada en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencia Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Durante la realización de esta tesis se contó con el financiamiento No. 45937/A1 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

RECONOCIMIENTO

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por ser la casa de estudios donde realice mi bachillerato y licenciatura.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Z), por la formación académica que de allí obtuve.

Al Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), por las facilidades otorgadas para realizar este proyecto.

Al hospital de Gineco-Obstetricia Luis Castelazo Ayala (IMSS), por la donación de las placentas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento No. 45937/A1 otorgado para el desarrollo del proyecto.

Al comité tutorial: Dr. David Barrera Hernández, Dra. María Elena Ayala Escobar, Dra. Patricia Rosas Saucedo, Dra. Leticia Morales Ledesma y Biol. Cristina Alvarado Domínguez por las valiosas aportaciones que enriquecieron este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. David Barrera Hernández porque además de ser mi tutor fuiste mi amigo. Mil gracias por la paciencia, la preocupación, la enseñanza, el apoyo, los consejos y todas las cosas que me diste sin condición durante esta etapa. Gracias por darme la oportunidad de ser tu alumna y compartir tantos conocimientos y experiencias juntos. Mi respeto y admiración para ti TUTOR porque eres un excelente académico y aún una mejor persona.

Al grupo de la VD₃

Dra. Lorenza Díaz Nieto, Dr. Euclides Ávila Chávez y Dr. Ali Halhali Bagdad a los tres gracias por compartir sus conocimiento y experiencias conmigo. Lore en particular gracias a ti por haberme aceptado en tu grupo sin conocerme y por el cariño y apoyo que me brindaste sin el cual no lo habría logrado y Eu gracias por hacernos tan grata la vida con ese animo y dedicación que siempre te caracterizan.

En especial muchas gracias a mis grandes amigos del laboratorio Guillermo Arturo Hernández, J. Adrián Rodríguez, Gaby Sosa y Jazmín Suárez por su cariño, por hacerme reír, por prestarme su hombro en los momentos difíciles, por ayudarme cuando estuve en aprietos y por sus consejos para concluir este trabajo.

A mis amigos y compañeros de trabajo que hicieron muy grata mi estancia en el laboratorio Efrén Méndez, Isela Martínez, Leticia Ibarra, David Ordaz, Ma. Elena Gonzáles, Ingrid de la Peña, Andrea Olmos, Ana Lilia Saldivar, Dra. Angélica Morales, Dra. Rocío García, Dra. Mayel Chirinos y Sr. Luis Pérez gracias por darme la oportunidad y el gusto de compartir su tiempo conmigo.

DEDICATORIAS

Gracias Diosito porque me haz acompañado hasta donde ahora estoy.

Papi, Mami gracias por su amor, su apoyo y su confianza. Los amo con todo mi corazón gracias por mi vida y mi educación, espero que se sientan orgullosos de mí porque yo lo estoy mucho de ustedes.

A mis 3 hermosas hermanas Blan, Lili y Fabis porque a pesar de todo nunca me dejan sola. Gracias por su ejemplo de lucha, por su comprensión y su amor incondicional.

A mis sobrinos Lalo, Vane y Dani chiquitos hermosos, gracias por su cariño y por formar parte de esta familia. La escuela es fundamental prepárense para la vida.

COPO, MOF fuiste, eres y serás súper importante en mí vida. Gracias por tu amor, por todo lo que me haz dado y por haber compartido una parte de tu hermosa vida y la de tu familia conmigo, te debo mucho y por eso siempre te voy a querer de una u otra manera.

A Omar Sánchez gracias por esa amistad de 13 años, por tu apoyo, por ayudarnos y estar al pendiente de nosotros siempre.

A mi tío Herminio Herrera por su preocupación y ayuda a lo largo de toda la carrera muchas gracias.

Espero no haber omitido a nadie y a todos ustedes GRACIAS por estar conmigo en un momento que me ha costado mucho, por el que deje ir cosas muy importantes en mi vida pero también del cual aprendí tantas cosas no solo académicas sino de vida que me han hecho ser una persona distinta.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	vii
2. INTRODUCCIÓN.....	1
2.1 Generalidades.....	1
2.2 Funciones del calcitriol.....	3
2.3 Calcitriol y embarazo.....	5
2.4 Biosíntesis del calcitriol.....	7
2.5 Mecanismos de acción del calcitriol.....	9
2.6 Citocinas.....	10
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. HIPÓTESIS.....	15
5. OBJETIVOS.....	16
5.1 Objetivo General.....	16
5.2 Objetivos Particulares.....	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
6.1 Cultivo de trofoblasto humano.....	17
6.2 Cuantificación de citocinas.....	20
6.3 Estudios de expresión génica.....	23
6.3.1 Extracción de RNA total.....	23
6.3.2 Transcripción Reversa.....	25
6.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	26
7. ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	28
8. RESULTADOS.....	29
8.1 Viabilidad y funcionalidad del cultivo celular.....	29
8.1.1 Cambios Morfológicos.....	29
8.2 Determinación de la secreción de citocinas producidas por el trofoblasto.....	30
8.3 Efecto del calcitriol sobre la expresión y secreción de las citocinas en ausencia o presencia de TNF- α	31
8.3.1 Efecto del calcitriol sobre TNF- α	32
8.3.2 Efecto del calcitriol sobre IL-6.....	33
8.3.3 Efecto del calcitriol sobre INF- γ	34
8.3.4 Efecto del calcitriol sobre TNF- α , IL-6 e INF- γ en presencia de TEI-9647.....	35
8.3.5 Efecto del calcitriol sobre IL-10.....	36
9. DISCUSIÓN.....	37
9.1 General.....	37
9.2 Secreción de citocinas proinflamatorias por el trofoblasto en cultivo.....	37
9.3 Efecto del TNF- α sobre la síntesis de citocinas.....	38
9.4 Efecto del calcitriol sobre La expresión y secreción de las citocinas en presencia de TNF- α	39

9.5 Estudios sobre el modo de acción del calcitriol.....	41
9.6 Diferenciación celular, IL-10 y calcitriol.....	41
10. CONCLUSIONES.....	43
11. PERSPECTIVAS.....	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
ANEXO I.....	52
ANEXO II.....	52

1. RESUMEN

El calcitriol (1α -25 dihidroxivitamina D) es el metabolito activo de la vitamina D producido principalmente por el riñón, sin embargo, durante el embarazo la placenta también produce calcitriol y contribuye para incrementar la concentración de esta hormona en el suero materno (≥ 70 pg/mL) asegurando el paso transplacentario de Ca^{2+} al feto y regulando la producción hormonal producida en la placenta. Por otra parte, el calcitriol inhibe la secreción de citocinas proinflamatorias en células inmunológicas como los linfocitos T y los macrófagos, además ejerce una acción inmunosupresora para la aceptación de trasplantes. Sin embargo, poco se sabe del papel que tiene el calcitriol sobre la síntesis de citocinas producidas en la placenta. Considerando las funciones inmunológicas del calcitriol, y que existen patologías del embarazo como la preeclampsia (PE) que presenta altas concentraciones de citocinas proinflamatorias, además de hipertensión y bajas concentraciones circulantes de calcitriol, el propósito de este trabajo fue determinar el efecto del calcitriol sobre la expresión y secreción de factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), interferon gama ($\text{INF-}\gamma$), interleucina (IL)-6 e IL-10, producidas por el trofoblasto humano en cultivo. Para el estudio se colectaron placentas humanas normales con edad gestacional \geq a 37 semanas. El cultivo de trofoblasto se llevó a cabo mediante el método de Kliman bajo algunas modificaciones. Posteriormente se realizó el tratamiento con calcitriol en ausencia o presencia del $\text{TNF-}\alpha$ para simular el estado de inflamación predominante en la PE. La secreción de las citocinas fue evaluada usando el ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISA) y para la expresión de los genes se realizó la extracción de ácido ribonucleico (RNA) por el método de Trizol, finalmente se realizó la retro transcripción y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Los resultados mostraron que la síntesis de $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 e IL-10 fue mayor al inicio de la diferenciación celular. Por otra parte, se mostró que tanto la expresión como la secreción de las citocinas placentarias fue inducida por el $\text{TNF-}\alpha$. En presencia del calcitriol se inhibió la expresión y síntesis de las citocinas. Adicionalmente, se utilizó un antagonista específico del receptor de la vitamina D (VDR) TEI-9646 para indagar si el mecanismo de acción genómico del calcitriol está involucrado. Se mostró que el efecto inhibitor del calcitriol fue bloqueado por el antagonista TEI-9647, lo cual sugiere que el calcitriol utiliza el mecanismo genómico para llevar a cabo su efecto. En conjunto los resultados sugieren que el calcitriol actúa como un potente supresor de la producción de citocinas trofoblásticas interviniendo de manera importante para la aceptación materna del aloinjerto fetal.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades

La formación de una nueva vida depende de la unión entre un espermatozoide y un óvulo dando lugar a la fertilización y subsecuentemente a la formación del blastocisto, el cual entra en contacto tanto físico como fisiológico con el endometrio materno durante la implantación iniciando el desarrollo de la placenta [1, 2]. La placenta es un órgano transitorio que se encarga del aporte de los nutrimentos, el transporte de oxígeno, y de excretar los desechos entre la madre y el feto durante el embarazo [3, 4]. La placenta se origina a partir de las células que conforman al blastocisto, las cuales se comprimen dando lugar a una capa celular denominada trofoblasto, que es el tejido embrionario implicado en la implantación y la placentación [5]. El trofoblasto se diferencia en células de citotrofoblasto mononuclear veloso y citotrofoblasto extraveloso invasor, ambos con capacidad de producir hormonas peptídicas, citocinas, factores de crecimiento, mediadores lipídicos, agentes vasoactivos, factores de adhesión celular y enzimas involucradas en la bioconversión de esteroides y secoesteroides [2-4]. Adicionalmente, el citotrofoblasto veloso prolifera y se fusiona para crear un tipo celular denominado sinciotrofoblásto que tiene mayor capacidad para producir tanto hormonas glicoproteicas como esteroides [6]. Paralelamente, comienza la vascularización del trofoblasto y el remodelado vascular materno para generar la circulación madre-placenta-feto (Figura 1), que en conjunto permiten el desarrollo de un organismo con diferente perfil antigénico al de la madre [2, 7, 8].

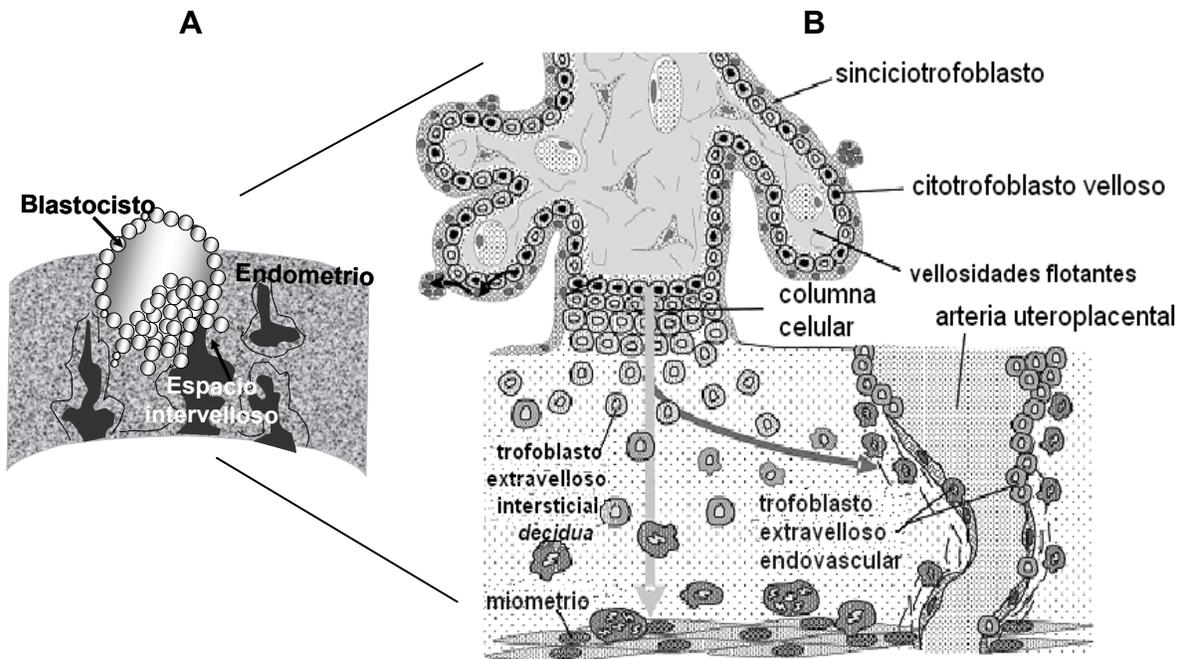


Figura 1. A) Implantación del blastocisto en el endometrio materno. B) Aumento de la imagen donde se aprecia la penetración del trofoblasto invasor [9].

En general, se le ha atribuido a la gonadotropina coriónica humana (hCG) y a la progesterona (P_4) un papel preponderante en la aceptación del feto al inducir la quiescencia miometrial necesaria para permitir la implantación del blastocisto, y por suprimir al sistema inmunológico evitando el rechazo materno [10, 11]. Sin embargo, poco se sabe de la participación de otras moléculas que se producen en la placenta como es el caso del calcitriol, el metabolito biológicamente activo de la vitamina D, que se ha involucrado recientemente en eventos reproductivos como la gestación [12-14].

2.2 Funciones del calcitriol

El calcitriol fue descubierto como una hormona esencial en contra del raquitismo [15, 16]. Por tal motivo, sus funciones fueron relacionadas por mucho tiempo con el mantenimiento de la homeostasis del calcio (Ca^{2+}) y del fósforo en el organismo, promoviendo la absorción de Ca^{2+} en el hueso, riñón e intestino. Adicionalmente se le atribuyen acciones antiproliferativas, prodiferenciantes, apoptóticas [17] y se le ha asociado con la regulación del sistema endocrino e inmunológico [18, 19].

Con relación al efecto del calcitriol sobre aspectos endocrinos, se sabe que esta hormona estimula la secreción de la insulina en el páncreas e inhibe la secreción de la hormona paratiroidea (PTH) en la paratiroides [20]. Además el calcitriol incrementa la actividad de la P450-aromatasa en células de coriocarcinoma humano e induce la síntesis de estrógenos en células gonadales [21, 22]. En el trofoblasto humano en cultivo el calcitriol estimula la secreción del lactógeno placentario humano, la P_4 y el estradiol e inhibe la secreción de la hCG [23, 24].

Con respecto al sistema inmunológico, se ha demostrado que el calcitriol inhibe la proliferación de los linfocitos T y suprime la síntesis de citocinas proinflamatorias como las interleucinas (IL's) 2, 12, el factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) y el interferon gama ($\text{INF-}\gamma$) [25, 26], lo cual se correlaciona con estudios experimentales donde se ha demostrado que el calcitriol disminuye el desarrollo de varias enfermedades autoinmunes dependientes de citocinas proinflamatorias como la encefalomiелitis alérgica experimental, la artritis reumatoide, la esclerosis

múltiple, la diabetes tipo I y la enfermedad inflamatoria intestinal [18, 27]. Padecimientos cuya causa se desconoce pero que experimentalmente se hacen más severas por la deficiencia de vitamina D [28]. Asimismo el calcitriol favorece la tolerancia de transplantes como el riñón, el hígado y el corazón. En este último órgano se ha observado que en ratones neonatos al adicionar calcitriol se prolonga la supervivencia del injerto de un donador incompatible de 13 a 51 días comparado con ratones que recibieron tratamientos con placebos [18]. Por otro lado en humanos el tratamiento con calcitriol favorece el transplante renal al suprimir el sistema inmune del individuo receptor del órgano [29, 30].

Por otra parte, estudios realizados con ratones mutantes nulos para el receptor nuclear de la vitamina D (VDR) han demostrado que el calcitriol es fundamental para que se lleven a cabo las funciones reproductivas de manera normal, ya que existe una disminución en la tasa de fertilidad de los ratones mutantes comparados con los ratones silvestres [31]. Froicu y col. en 2006 demostraron que las células T de ratones mutantes al VDR tienen un fenotipo inflamatorio y secretan más INF- γ que los de tipo silvestre por lo que se sugiere que el balance de las citocinas circulantes es mediado de manera importante por el calcitriol, mientras que en ratones con doble mutación (IL-10/VDR) demostraron que la deficiencia de vitamina D acelera el desarrollo espontáneo de enfermedades inflamatorias y eventualmente induce muerte prematura [32].

Tomando en cuenta lo anterior, se considera al calcitriol como una hormona reguladora de algunas acciones del sistema endocrino e inmunológico, y podría participar en la modulación de citocinas producidas en la interfase materno fetal para contribuir en la receptividad materna.

2.3 Calcitriol y el embarazo

La concentración del calcitriol en un individuo adulto sano oscila entre 15 y 60 pg/mL la cual se duplica en el embarazo durante el primer trimestre y se mantiene así hasta el parto [33, 34]. El incremento de calcitriol se atribuye además del aporte renal de la madre y del feto, a la contribución placentaria [35]. El ajuste en la síntesis del calcitriol promueve la absorción intestinal de Ca^{2+} , conserva el Ca^{2+} renal e incrementa la expresión de las calbindinas que son proteínas transportadoras de este mineral [36], lo cual favorece el crecimiento y la mineralización del esqueleto fetal así como la producción de la leche materna [37].

Aunque existen estudios que muestran el desarrollo sin complicaciones de embarazos que han cursado con bajas concentraciones de calcitriol [38], hay otros que demuestran crecimiento intrauterino reducido y alteraciones en el desarrollo fetal, así como nacimientos de niños con hipocalcemia, raquitismo neonatal o que lo desarrollaron más tarde [39-41]. Asimismo, la deficiencia del calcitriol se ha relacionado con algunas patologías del embarazo como los abortos recurrentes o la preeclampsia (PE), la cual clínicamente se caracteriza por hipertensión, edema y proteinuria, con desorden hormonal e inmunológico que repercute en el

desarrollo de la placenta y en la vasculatura útero placentaria, afectando el proceso invasor del trofoblasto que presenta hipoxia, inflamación, estrés oxidativo y aponecrosis [9, 42]. Lo anterior resulta importante ya que la PE es exclusiva del embarazo humano y representa una de las principales causas de morbilidad materno-fetal en el mundo [43].

Si bien, algunos autores proponen que la PE es debida al daño celular endotelial materno, este fenómeno es probablemente secundario a factores citotóxicos liberados por la placenta en respuesta a la hipoxia e isquemia a las que se encuentra sometida [44]. En apoyo a lo anterior se ha descrito que en mujeres preeclámpticas puede llegar a producirse TNF- α y otras citocinas inflamatorias que son capaces de producir activación de las células endoteliales y disfunción de las mismas [45]. Destacando que el exceso en la producción de citocinas inflamatorias es dañino para el embarazo [46, 47]. Aunque se ha demostrado que el calcitriol inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e INF- γ , en células asesinas naturales (NK) deciduales [13] a la fecha se desconoce el papel del calcitriol sobre la producción de citocinas de origen placentario. En particular, de las células del trofoblasto que expresan diferentes citocinas tales como IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-17, el INF- γ , el TNF- α y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) entre otras [31, 32, 48].

2.4 Biosíntesis del calcitriol

El calcitriol se obtiene a partir del 7-dehidrocolesterol que es el precursor de la pre vitamina D y sus derivados, el cual se localiza abundantemente en la piel y esta constituido por los cuatro anillos característicos de las hormonas esteroides que son denominados por las letras A, B, C y D. El término genérico de “vitamina D” se refiere a un grupo de secoesteroides que como consecuencia de la acción de los rayos ultravioleta provenientes de la luz solar presentan abierto el anillo B del núcleo esteroidal, formando a un intermediario inestable (pre vitamina D), que a través de un proceso fototérmico cambia su conformación espacial para dar lugar al colecalciferol, este cambio facilita su interacción con la proteína de unión a la vitamina D (DBP) que se encarga de su transporte hasta el hígado, donde se hidroxila el carbono 25 de la hormona por la enzima 25 hidroxilasa, produciendo de esta manera al calcidiol. Posteriormente, el calcidiol unido a la DBP es acarreado hasta el riñón, donde por acción de la 1α -hidroxilasa se biotransforma en calcitriol (Figura 2). El calcitriol se puede obtener también de la dieta diaria en forma de ergocalciferol (vitamina D₂), el cual se hidroxila por el mismo sistema de la 1α -hidroxilasa para formar calcitriol [49].

Cabe señalar que la 1α -hidroxilasa ubicada en las mitocondrias de los túbulos proximales del riñón es la principal productora del calcitriol, sin embargo, esta enzima ha sido detectada en otros tejidos como el colon, el cerebro, el páncreas, la piel, células del sistema inmune como los macrófagos y las células dendríticas [17, 35, 50] y en particular en la placenta [51].

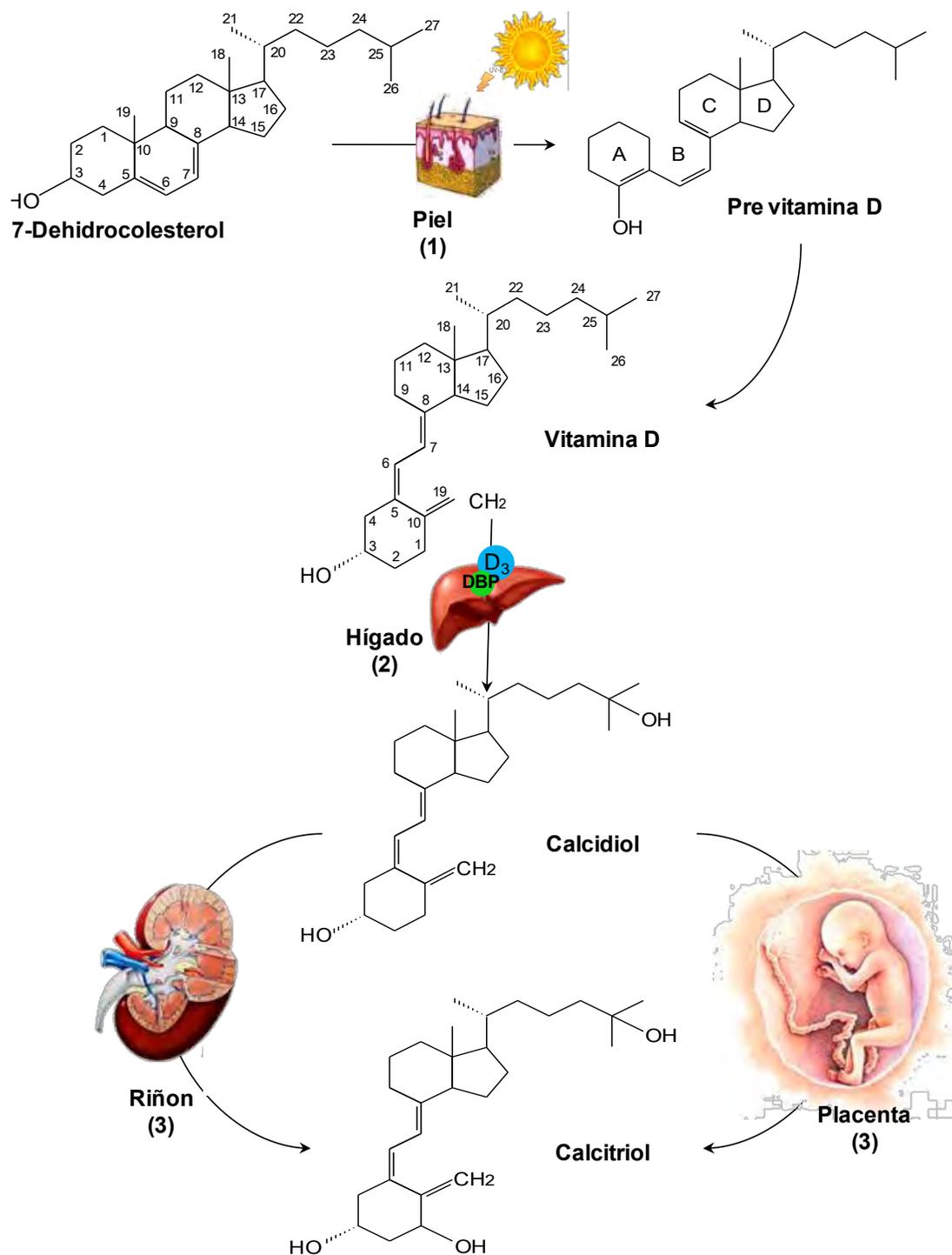


Figura 2. Ruta de síntesis de calcitriol. En la piel (1) la luz solar rompe el anillo B del 7-dehidrocolesterol para formar la vitamina D, la cual se transporta al hígado (2) donde se hidroxila en el carbono 25 para formar al calcidiol. Finalmente, el calcidiol se transporta a tejidos blanco (3) para producir al calcitriol [15, 35].

2.5 Mecanismo de acción del calcitriol

El calcitriol es una hormona capaz de generar sus efectos biológicos por la vía genómica a través del VDR, o por la vía no genómica utilizando receptores de membrana [14, 15, 52]. En el primer caso, una vez que el calcitriol se une con el VDR el complejo hormona/receptor se acopla con otro receptor nuclear conocido como el receptor retinoide X (RXR) formando un heterodímero funcional que activa a elementos de respuesta para la vitamina D (VDRE) en la región promotora de los genes blanco. El heterodímero recluta coactivadores y componentes del complejo de inicio de la transcripción con la finalidad de modular la transcripción génica y provocar respuestas biológicas [53]. Estos efectos se alcanzan después de tiempos relativamente largos (horas, días). Por ejemplo, estudios realizados en linfocitos T demostraron que el calcitriol regula negativamente la activación del factor nuclear kappa beta (NF- κ B) al inducir la producción del factor inhibidor de NF- κ B (I κ B) [54], bloqueando así la síntesis de citocinas inflamatorias.

Por otra parte, los efectos no genómicos del calcitriol involucran proteínas de membrana que activan vías de señalización de acción rápida (segundos o minutos) que inducen cambios en las concentraciones de segundos mensajeros como el adenosín monofosfato 3',5'cíclico (AMPc) o que modifican las corrientes de Ca²⁺ y/o Cl⁻ para generar respuestas que no dependen del proceso transcripcional regulado por el VDR nuclear [55, 56]. Por ejemplo, se ha demostrado que el calcitriol en linfocitos T bloquea la formación del complejo; factor de transcripción de células T/proteína activadora 1 (NFATp/AP1) el cual es

un complejo dependiente de Ca^{2+} y que también involucra la producción de diferentes citocinas [25, 26].

Tomando en cuenta que la gestación se controla por la integración de los diferentes tipos celulares presentes en la interfase materno-fetal que incluyen: células del trofoblasto, células endometriales y las células inmunológicas que en conjunto tienen la capacidad de producir citocinas, es factible que el calcitriol producido por el trofoblasto [35] induzca efectos de tipo autócrino o parácrino sobre la síntesis de citocinas específicas para mediar la estabilidad gestacional evitando el rechazo del feto considerado como un aloinjerto. Por tal motivo resulta de interés revisar las características particulares de algunas citocinas que potencialmente podrían ser blanco de la acción del calcitriol en células de trofoblasto humano en cultivo.

2.6 Citocinas

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular que al actuar sobre células blanco tienen efectos biológicos a concentraciones pico o nano molares [57, 58]. No se almacenan como moléculas preformadas; su síntesis se inicia mediante una nueva transcripción génica como resultado de un proceso de activación celular donde la síntesis y transcripción son transitorias. Como características particulares para inducir sus efectos biológicos, las citocinas presentan acciones pleiotrópicas (una citocina puede actuar sobre distintos tipos celulares) y redundantes (algunas citocinas tienen los mismos efectos funcionales). Frecuentemente algunas

citocinas influyen sobre la síntesis de otra citocina o interaccionan entre ellas para antagonizar mutuamente sus acciones o producir efectos sinérgicos, Figura 3.

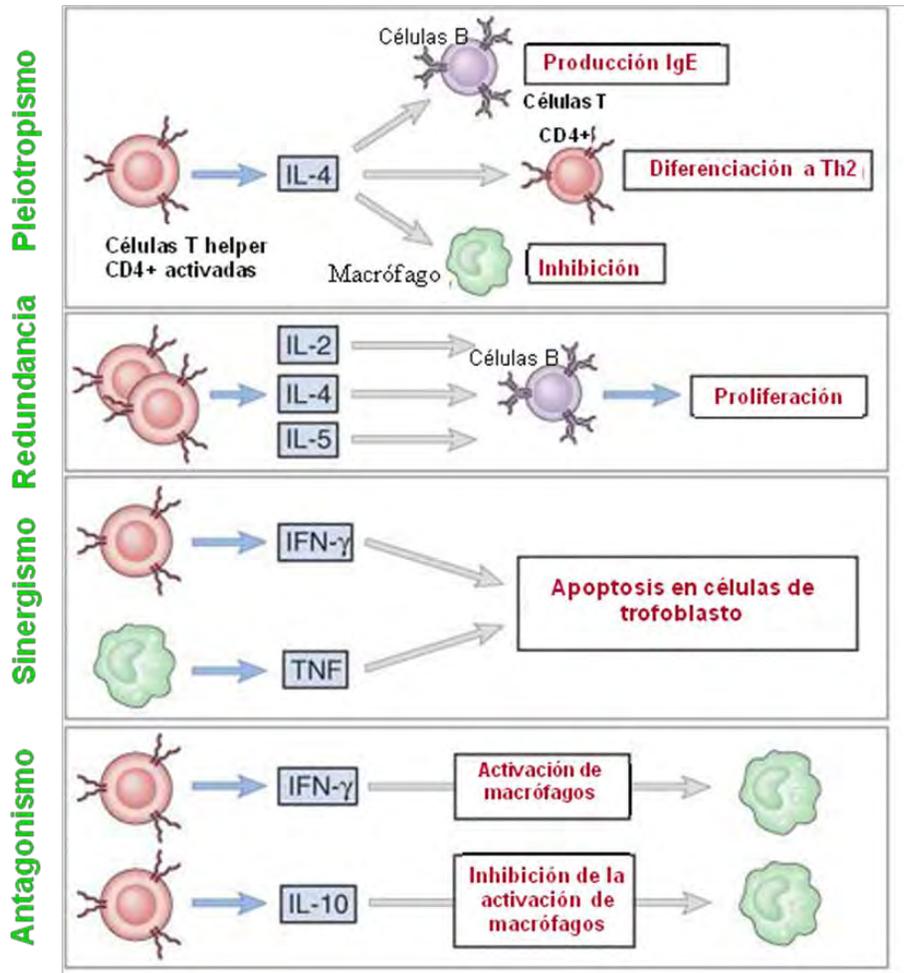


Figura 3. Acciones que ejercen las citocinas sobre distintos tipos celulares, esquema modificado de Abbas A. y Lichtman A., 2005 [59].

Existe una gran cantidad de citocinas y se producen en respuesta a varios factores que incluyen la presencia de un patógeno en el organismo, una herida, infecciones, factores ambientales, hormonales, etc. Por tal motivo sus funciones son amplias e incluyen la regulación de las respuestas inflamatorias locales y sistémicas. Asimismo están involucradas en eventos reproductivos como el desarrollo del folículo ovárico y la implantación, remodelan el tejido endometrial,

modulan el crecimiento, el desarrollo y la producción hormonal placentaria e intervienen en el trabajo de parto [57, 60, 61]. Son producidas por diferentes tipos celulares como los macrófagos, las células NK, las células dendríticas, los linfocitos T así como otros tipos celulares que no son considerados de tipo inmunológico como las células del trofoblasto de la placenta [48].

Entre las citocinas benéficas en el embarazo se menciona a la IL-10 que se encarga de regular negativamente la producción de citocinas proinflamatorias en linfocitos T y macrófagos e inhibe la actividad citotóxica de las células NK. Promueve la proliferación del trofoblasto para invadir los tejidos maternos e incrementa la resistencia del trofoblasto a la apoptosis mediada por la vía Fas [57], lo cual contribuye en la tolerancia materna al inducir la expresión de Antígeno-G de leucocitos humanos (HLA-G).

Por el contrario algunas citocinas como la IL-6, el TNF- α y el INF- γ comprometen el bienestar del embarazo ya que el TNF- α se ha relacionado con la deficiente invasión del trofoblasto en la PE como posible consecuencia de su producción aumentada por leucocitos deciduales activados [62]. Además, el TNF- α es considerado como un mediador de la disfunción endotelial [63]. Aunque el INF- γ en concentraciones adecuadas elimina las células trofoblásticas anormales, provee protección al feto contra la transmisión de microorganismos maternos durante el embarazo [60, 64] y junto con otras citocinas regula el crecimiento de las células trofoblásticas de la placenta, así como su invasión [57], en altas concentraciones

es dañino para el embarazo ya que junto con TNF- α estimulan la apoptosis del trofoblasto.

Tabla 1. Algunas citocinas producidas por el trofoblasto placentario [44, 64, 65].

	Citocina / Peso Molecular en kDa	
	PLACENTA	Antiinflamatorias
	Proinflamatorias	IL-1 / 17.5 IL-2 / 15.4 IL-6 / 26 INF-γ / 15-17 TNF-α / 17

Con respecto a la IL-6 se sabe que esta citocina provoca el aumento de la actividad citotóxica de las células NK al inducir la actividad de IL-2 e incrementa la síntesis de hCG en el trofoblasto [66]. Su concentración se encuentra incrementada en el líquido amniótico, miometrio, decidua y membranas fetales de embarazos que presentan infecciones y de mujeres con PE [67, 68], así como en ratones con abortos recurrentes [69]. Estudios recientes han demostrado que tanto el TNF- α como la IL-6 inhiben la actividad de la 11 β -HSD tipo 2 placentaria, lo cual podría resultar en una excesiva exposición fetal al cortisol materno [70]. Por lo tanto resulta interesante estudiar el impacto que tiene el calcitriol sobre estas citocinas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los efectos biológicos de la vitamina D en cultivos de trofoblasto humano constituye una línea de investigación activa en el laboratorio [35, 51, 71-73], en donde se ha demostrado el efecto del calcitriol sobre la secreción de hormonas tales como la hCG, la P₄ y el E₂ en este tejido. Sin embargo, a la fecha no existen estudios del efecto del calcitriol sobre la producción de las citocinas derivadas del trofoblasto, por lo tanto, el presente trabajo estudia la participación del calcitriol en el perfil inmunológico de la unidad fetoplacentaria, con lo cual se pretende que el resultado de esta investigación contribuya en el entendimiento de la compleja red inmunológica en la que se encuentra inmersa la placenta y de algunas patologías en la cual se encuentra incrementada la producción de citocinas.

4. HIPÓTESIS

Tomando en cuenta que el calcitriol modula la regulación hormonal en el trofoblasto y de citocinas producidas por linfocitos T, es factible que regule la síntesis de citocinas producidas por el trofoblasto humano en cultivo participando en la aceptación del aloinjerto fetal.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Estudiar el efecto del calcitriol sobre la síntesis de citocinas producidas por trofoblastos humanos en cultivo.

5.2 Objetivos Particulares

1. Evaluar la secreción de TNF- α , IL-6, INF- γ y IL-10 durante la diferenciación del trofoblasto en cultivo.
2. Determinar el efecto del calcitriol sobre la expresión y la secreción de TNF- α , IL-6, INF- γ e IL-10 en los trofoblastos cultivados en ausencia o presencia de TNF- α .
3. Estudiar el efecto del antagonista del VDR TEI-9647, como posible vía de acción del calcitriol.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se utilizaron placentas humanas a término bajo el consentimiento informado de mujeres de entre 18 y 40 años que cursaron embarazos normales igual o mayores a 37 semanas de gestación, con operación cesárea programada. Las muestras fueron colectadas bajo la aprobación del comité de ética de la Clínica 4 de Gineco Obstetricia “Luis Castelazo Ayala” del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran (INCMNSZ).

6.1 Cultivo de trofoblasto humano

Con la finalidad de realizar el cultivo celular de trofoblastos humanos, las placentas obtenidas fueron inmediatamente trasladadas al laboratorio del Departamento de Biología de la Reproducción del INCMNSZ para ser procesadas bajo los lineamientos establecidos por Kliman en 1986 [74] con algunas modificaciones: con material de cirugía (pinzas y tijeras; Stainless, Pakistan), se extrajeron los cotiledones placentarios, los cuales se lavaron con solución salina al 0.9 % en vasos de precipitado de 500 mL para eliminar el exceso de sangre. Inmediatamente se retiraron las membranas corioamnióticas, el tejido decidual, los vasos sanguíneos y se pesaron los cotiledones en 3 porciones de 50 g en 3 matraces erlenmeyer (Pirex, EUA) de 1 L. Para realizar las digestiones enzimáticas se utilizó tripsina a una concentración de 1 mg/5 μ L (Sigma-Aldrich, Alemania) y DNasa I de páncreas bovino 41.4 mg/mL (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) en solución balanceada de Hank's 1X (HBSS) libre de calcio y

magnesio (Gibco,Life technologies. Grand Island, NY, EUA), como se muestra en la tabla 2, en cada digestión los matraces se incubaron durante 20 minutos (min) en baño maría a 37°C con agitación constante.

Tabla 2. Volumen y cantidad de reactivos para cada digestión enzimática.

Digestiones	HBSS 1x (mL)	Tripsina (μL)	DNAsa I (μL)
1^a	150	850	300
2^a	100	550	200
3^a	75	350	100

Posteriormente se colectó el sobrenadante de cada matraz, el cual fue depositado sobre 5 mL de suero fetal de ternera (SFT) (Gibco,Life technologies. Grand Island, NY, EUA), en tubos cónicos de 50 mL (DB Falcon, EUA), el SFT fue previamente inactivado en baño maría a temperatura de 56°C durante 45 min. A continuación se centrifugaron a 3 000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 min, el sobrenadante se desechó y al botón celular se le adicionaron 600 μ L de medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco alto en glucosa (DMEM-HG; Gibco,Life technologies. Grand Island, NY, EUA). Con una pipeta de transferencia se recuperó la parte superior del botón celular en un nuevo tubo de 50 mL que se mantuvo en baño maría a 37°C.

Al terminar las tres incubaciones la suspensión celular recolectada se colocó sobre un gradiente continuo de Percoll (GE Healthcare, Bio-Sciences AB) 5 % a 70 % en

HBSS (anexo I), y se sometió a centrifugación a 3 000 rpm durante 20 min (figura 4A). Por densidad los citotrofblastos fueron recuperados de la banda intermedia entre 1.048 y 1.062 g/mL (figura 4B). Los citotrofblastos fueron colocados en un nuevo tubo con medio DMEM-HG y centrifugados a 3 000 rpm durante 10 min y así, se obtuvo el botón celular que se resuspendió en 5 mL de medio DMEM-HG suplementado al 20 % con SFT, 100 unidades de penicilina/mL, estreptomicina 100 μ g/mL y amfotericina 0.25 μ g/mL (Gibco,Life technologies. Grand Island, NY, EUA).

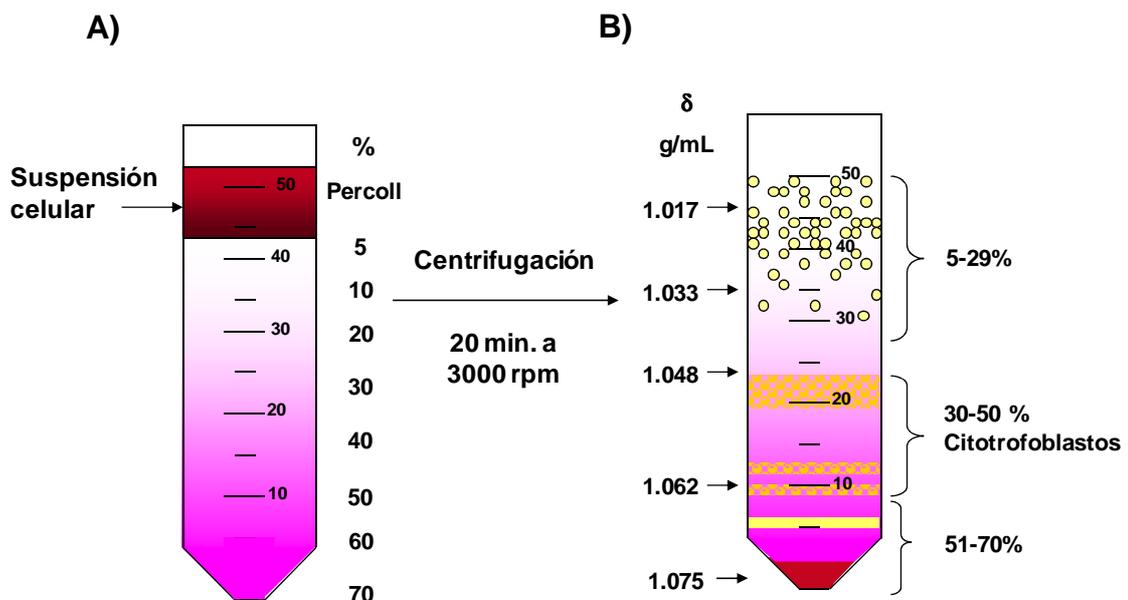


Figura 4. Gradiente de Percoll. A) Las células colectadas se colocaron sobre el gradiente de Percoll 5-70%, B) Separación celular por densidad en 3 bandas: la banda superior con elementos de tejido conectivo, pequeños vasos y fragmentos de tejido velloso fue desechada, en la intermedia estaban las células citotrofblasticas que fueron colectadas y la banda inferior estaba conformada por eritrocitos, linfocitos, neutrófilos y macrófagos que fueron eliminados.

El número total de células en la muestra se determinó con un hemocitómetro (Boeco, Alemania) con una dilución 1:10 en azul tripan. En promedio para cada cultivo se obtuvieron 130 millones de células que se repartieron en cajas de cultivo de 6 pozos de 35 mm con 900 000 células por pozo en 2 mL de medio DMEM-HG suplementado para evaluar la secreción de las citocinas. Para los estudios de expresión génica se utilizaron cajas de 25 cm² con 3 000 000 de células en 5 mL de medio suplementado.

6.2 Cuantificación de citocinas.

Para evaluar la secreción de las citocinas en los diferentes días de diferenciación celular, se tomaron alícuotas del medio cada 24 h durante 3 días consecutivos. El efecto del calcitriol a diferentes concentraciones (1×10^{-10} a 1×10^{-7} M), se evaluó 24 h después de su adición. La secreción fue cuantificada mediante el ensayo de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) descrita brevemente a continuación: La secreción de las citocinas se llevó a cabo con un estuche comercial de inmuno ensayo (R&D Systems; Minneapolis, EUA). En esta técnica se utilizaron placas para ELISA de 96 pozos, en los cuales se adicionó el anticuerpo de captura correspondiente a cada citocina, la cual quedó unida a un segundo anticuerpo en sus sitios de unión (procedimiento tipo sándwich), inmediatamente se eliminó el material no unido mediante un lavado. Después se adicionó estreptavidina-HRP y posteriormente solución sustrato por tiempos determinados. Finalmente la reacción se detuvo con solución de paro. La cantidad de citocina se determinó por

el cambio de color que fue proporcional a la concentración de citocina presente en cada muestra.

En específico el anticuerpo de captura fue reconstituido y diluido a la concentración de trabajo, el cual fue utilizado para preparar las placas de 96 pozos (Costar, Corning Incorporated. NY, EUA), al adicionar 100 μ L del anticuerpo por pozo durante 18 h. Posteriormente a cada pozo se le adicionó 400 μ L de amortiguador de lavado repitiendo el proceso 2 veces e inmediatamente se realizó el cambio por 100 μ L de reactivo de dilución para IL-10, IL-6 y TNF- α o amortiguador de bloqueo para INF- γ durante una hora. Nuevamente se lavó la placa y se adicionó 100 μ L de los estándares y de las muestras en los pozos correspondientes durante 2 h. A continuación se lavó y se añadió 100 μ L de anticuerpo de detección durante 2 h. Después de 2 lavados más se adicionó 100 μ L de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HPR) por 20 min, se lavó la placa y se añadió 100 μ L de solución sustrato (R&D Systems; Minneapolis, EUA) por 20 min. Finalmente, la reacción se detuvo con 50 μ L de solución de paro, Figura 5. Durante las incubaciones la placa fue protegida de la luz y la cantidad de citocina en pozo se determinó leyéndola a 450 nm en un espectrofotómetro (Multiskan MS fotómetro tipo 352, Labsystems, Helsinki, Finlandia) y los resultados fueron obtenidos en pico gramos de citocina por mililitro de medio (pg/mL).

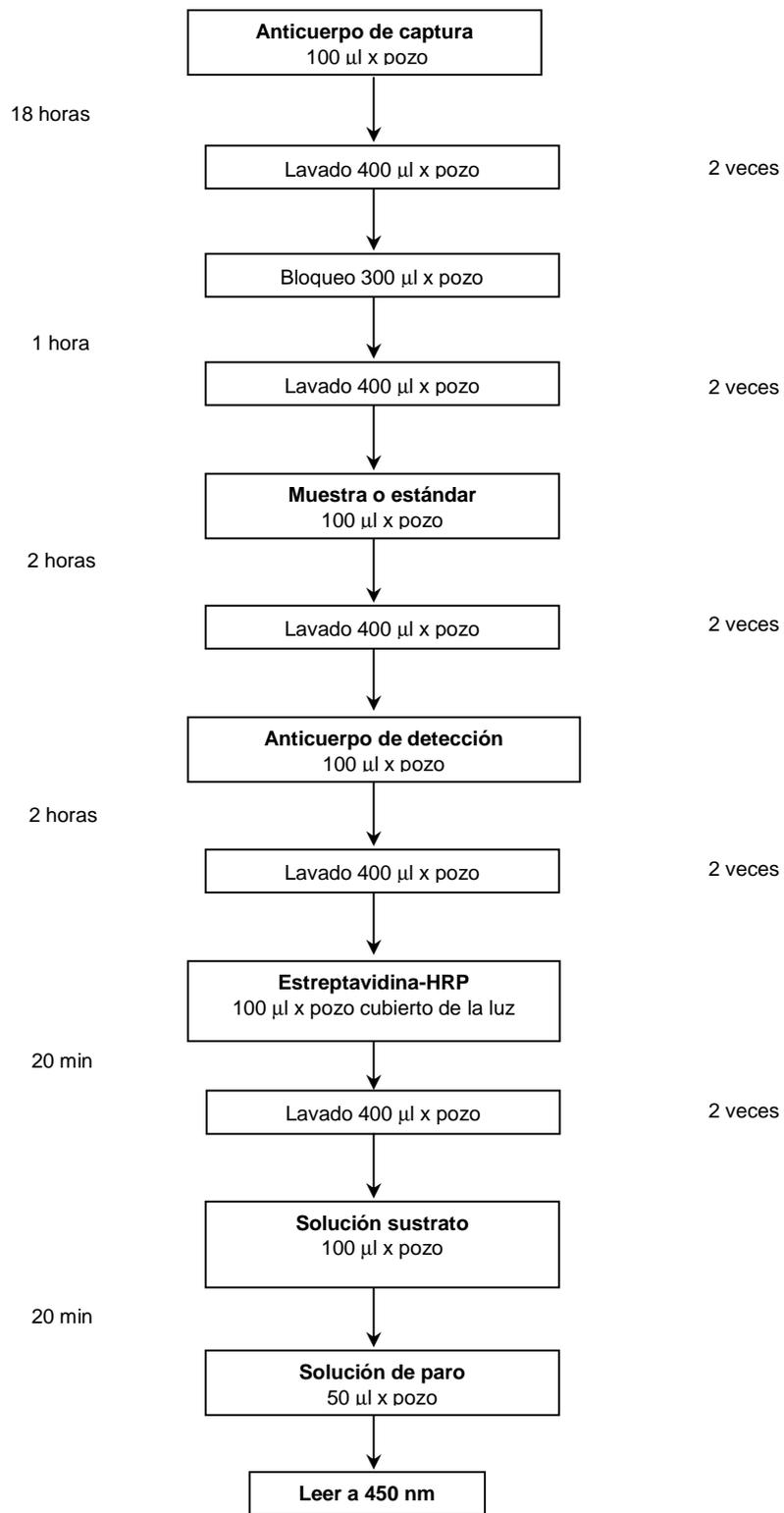


Figura 5. Diagrama de flujo del ELISA

6.3 Estudios de expresión génica

La expresión de las citocinas en los trofoblastos se determinó en distintas etapas de diferenciación celular, así como en ausencia o presencia del calcitriol el cual se adicionó 3 h después de la siembra. Adicionalmente se realizaron pruebas con calcitriol 1×10^{-8} en presencia del antagonista TEI-9647 con el propósito de indagar el posible mecanismo de acción del calcitriol y se extrajo el ácido ribonucleico (RNA) de cada muestra 24 h posteriores a su adición. El procedimiento para la extracción de RNA y su procesamiento hacia ácido desoxirribonucleico complementario (DNAC) se describe a continuación.

6.3.1 Extracción de RNA total

Para aislar el RNA total de los trofoblastos se utilizó Trizol como reactivo comercial (Invitrogen. CA, EUA) de acuerdo a la técnica derivada de Chomczynski y Sacchi [75]. Posterior al tratamiento con calcitriol (24 h), se desecho el medio de cultivo y se agregó 1 mL de Trizol a las células. Con raspadores (Corning, EUA) se homogeneizó y se colectó una alícuota de cada muestra en tubos eppendorf estériles utilizando un raspador diferente por caja. A cada muestra se le adicionó 200 μ L de cloroformo (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) frío y fueron centrifugados a 12 000 rpm durante 20 min a 4°C (microcentrífuga Eppendorf 5417R, EUA), con lo cual se formaron tres distintas fases; una inferior con el DNA, una intermedia con proteínas y una superior con el RNA. La fase superior que contenía el RNA se colectó en nuevos tubos y a cada muestra se le agregó 500 μ L de isopropanol (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA), se agitó y se dejó

reposar a 4°C durante 1 h. Posteriormente se centrifugaron a 13 500 rpm por 20 min a 4°C para precipitar el RNA. El sobrenadante se decantó de un solo golpe y se agregó 1 mL de etanol (Merck. México, S.A.) al 75 %. Se agitaron los tubos, se repitió el último paso de centrifugación y se desechó el sobrenadante. A continuación se invirtieron los tubos para evaporar el etanol y obtener el RNA que fue disuelto en 20 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) para inactivar RNAsas.

La cuantificación del RNA se realizó tomando 2 µL de la muestra diluida en 1 mL de agua desionizada estéril. La lectura de la absorbancia para determinar la cantidad de RNA se realizó a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU-6, EUA). Utilizando una celda de cuarzo (Sigma-Aldrich; Steinheim, Alemania) la concentración de RNA se calculó de la siguiente manera:

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

Lo anterior se basa en que una unidad de densidad óptica es equivalente a 40 µg/mL de RNA. Una relación A260/A280 igual a 2.0 implica que se tiene 100 % de RNA y 0 % de proteínas por lo tanto, en nuestro ensayo se descartaron aquellas que tuvieran una pureza menor a 1.6.

Tabla 3. Condiciones experimentales para la extracción de RNA.

TOTAL DE 3x10⁶ CÉLULAS POR MUESTRA	VOLUMEN (μL)	CENTRIFUGACIÓN rpm/min a 4°C
Trizol	1 000	
Cloroformo	200	12 000/20
Recuperación de fase superior		
Isopropanol	500	13 500/20
Incubación por 1h		
Etanol	1000	13 500/20
Agua tratada con DEPC	20	

6.3.2 Transcripción Reversa

El RNA fue utilizado para obtener el DNAC por RT, para lo cual se utilizó el estuche comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche, Alemania) siguiendo el manual del fabricante.

Para esta técnica se utilizaron tubos eppendorf de un volumen de 200 μ L nuevos y estériles donde se depositaron los mL correspondientes a 1 μ g de RNA total de cada muestra junto con 1 μ L de Oligo dT 50 pmol/ μ L y se ajusto a un volumen final

de 15 μL por tubo con agua grado PCR. Los tubos fueron colocados en un termociclador (Perkin-Elmer 9600, EUA) bajo los siguientes parámetros:

- a) 10 min a 65°C para eliminar la formación de estructuras secundarias en el RNA.
- b) los tubos se retiraron del termociclador y se colocaron sobre hielo por un minuto, y para regresarlos al termociclador se les agregó 7 μL de la mezcla de reacción por tubo (anexo II).
- c) 30 min a 55°C para la alineación.
- d) 5 minutos a 85°C para alargar la cadena.

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

Para realizar la amplificación del DNAC se empleo qPCR que utiliza el sistema de sondas de hidrólisis Taqman (Roche, Alemania). Las sondas de hidrólisis son oligonucleótidos que contienen un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador cuando existe acercamiento entre ellos [76]. En la etapa de extensión la DNA polimerasa, hidroliza la sonda, permitiendo así la emisión de la fluorescencia al separarse ambos fluorocromos. Durante cada ciclo, la cantidad de fluorescencia emitida es determinada siendo proporcional a la cantidad de amplicones presentes en cada ciclo.

La qPCR se llevó a cabo usando el estuche comercial *LightCycler Taqman Master* (Roche, Alemania) como se describe a continuación:

Se realizó una mezcla de reacción que contenía 5.5 μ L de agua grado PCR, 0.1 μ L de iniciador correspondiente al gen a analizar a una concentración 20 mM, 0.1 μ L de sonda *Taqman* y 2 μ L de DNA polimerasa *Taqman* 5X, de la cual se colocó 8 μ L + 2 μ L de DNAc en capilares de vidrio de 20 μ L. Los capilares fueron centrifugados a 1 000 rpm por 30 segundos y después se colocaron en un termociclador previamente programado (LightCycler 2.0, Roche Instrument Center AG, Rotkreuz. Suecia) bajo las condiciones mostradas en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la PCR en tiempo real

	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)
Activación de la enzima <i>Taqman</i>	1	95	600
PCR			
Desnaturalización	45	95	10
Alineación		60	30
Elongación		72	1
Enfriamiento	1	40	10

Los iniciadores y las sondas específicas fueron elegidos usando el *Universal Probe Library Assay Design Center* de Roche (<http://qpcr2.probefinder.com/organism.jsp>), obteniendo las siguientes secuencias:

Tabla 5. Secuencias de los iniciadores y sondas utilizadas en la qPCR

GEN	Orientación del oligonucleótido Secuencia (5'--- 3') sentido (s) antisentido (as)	# de sonda
TBP	gctggcccatagtgatcttt (s) cttcacacgccaagaaacagt (as)	3
INF-γ	ggcatttgaagaattggaaa (s) ttggatgctctggatcatcttt (as)	21
TNF-α	cagcctcttctccttctga (s) gccagagggctgattagaga (as)	29
IL-10	tgggggagaacctgaagac (s) acaggaagaaatcgatgaca (as)	30
IL-6	gatgagtacaaaagtctgatcca (s) ctgcagccactggttctgt (as)	40
hCG	gctcaccacagcatcctat (s) cagcagcaacagcagcag(as)	79

7. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Para el estudio se procesaron 15 placentas y los tratamientos fueron realizados por lo menos en triplicado tanto para la expresión como para la secreción en cada placenta. Los datos obtenidos se compararon y se expresaron como la media \pm la desviación estándar (DE). Los datos obtenidos en los diferentes días de cultivo y entre las diferentes concentraciones de calcitriol utilizadas se analizaron mediante la prueba estadística de ANOVA de una vía. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de $P < 0.05$

8. RESULTADOS

8.1 Viabilidad y funcionalidad del cultivo celular

8.1.1 Cambios Morfológicos

Como parámetro para medir la viabilidad de los trofoblastos en cultivo se evaluó el cambio morfológico mediante microscopía óptica. Así, se observó la diferenciación de los citotrofoblastos que son células mononucleares hacia agregados celulares denominados sinciotrofoblastos (Figura 6). El proceso de diferenciación fue apreciado a partir de las 24 h después de la siembra, donde las células mononucleares modificaban su aspecto celular por las evidentes proyecciones citoplasmáticas para unirse entre ellas creando el fenotipo multinucleado. La formación de sincicios en cultivo depende exclusivamente de la fusión celular, ya que su proliferación es escasamente del 10 % [74].

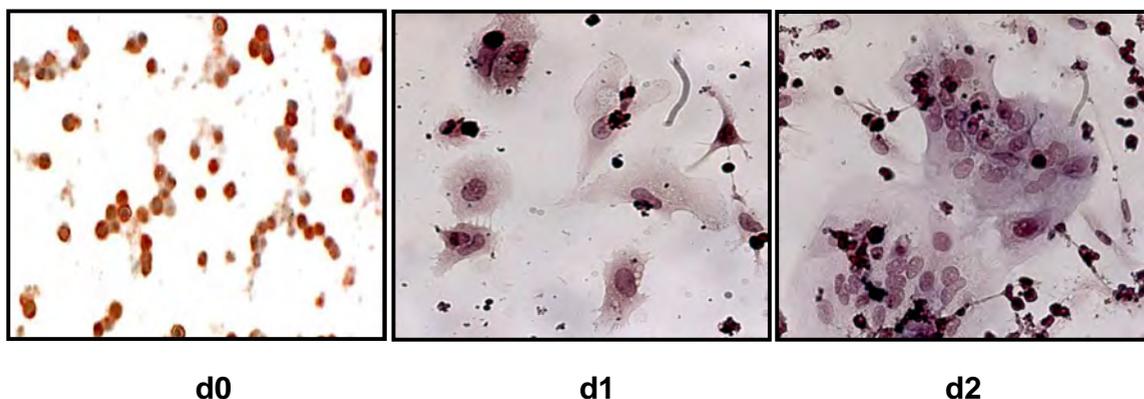


Figura 6. Diferenciación del trofoblasto en cultivo. día 0 citotrofoblastos, día 1 alargamiento celular para fusionarse entre células vecinas (24 h) y día 2 sinciotrofoblastos (48 h).

Por otra parte, la diferenciación celular del trofoblasto se acompaña del aumento en la secreción hormonal de hCG la cual sirvió como un parámetro de la funcionalidad celular. Como se aprecia en la Figura 7 tanto la expresión (a) como la secreción (b) de hCG se incrementó significativamente a los diferentes días con respecto al día 1.

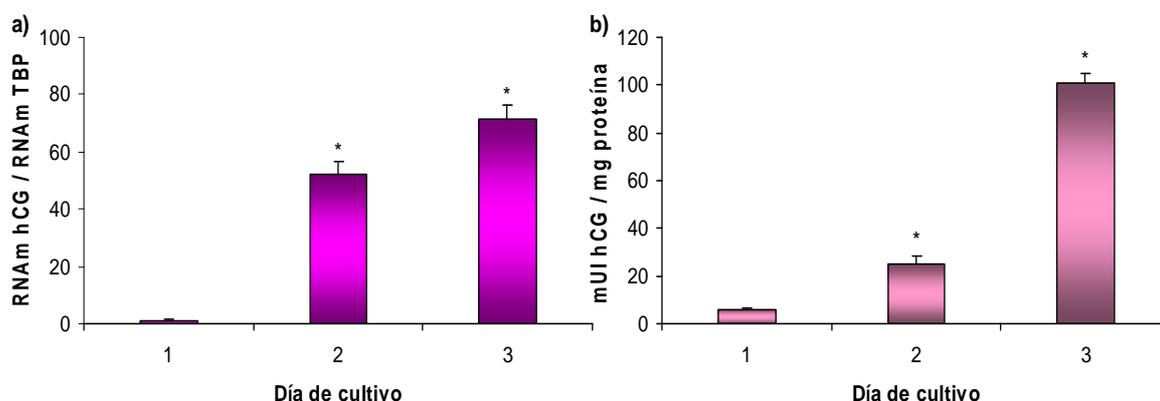


Figura 7. Expresión (a) y secreción (b) de hCG durante 3 días de diferenciación. La expresión de la hCG fue evaluada por qPCR atribuyendo el valor de 1 al día 1. Cada barra representa la media \pm DE (n = 4), * $P < 0.05$ respecto al día 1.

8.2 Determinación de la secreción de citocinas producidas por el trofoblasto.

Las citocinas producidas por el trofoblasto humano en cultivo a los diferentes días mostró que tanto la expresión como la secreción de IL-10, IL-6 y TNF- α disminuyó significativamente con respecto al día 1 (Figura 8 a y b respectivamente). En contraste, la expresión de INF- γ aumentó paulatinamente con respecto al proceso de diferenciación celular. Sin embargo, nuestro sistema de detección no registró INF- γ secretado en ningún día de cultivo.

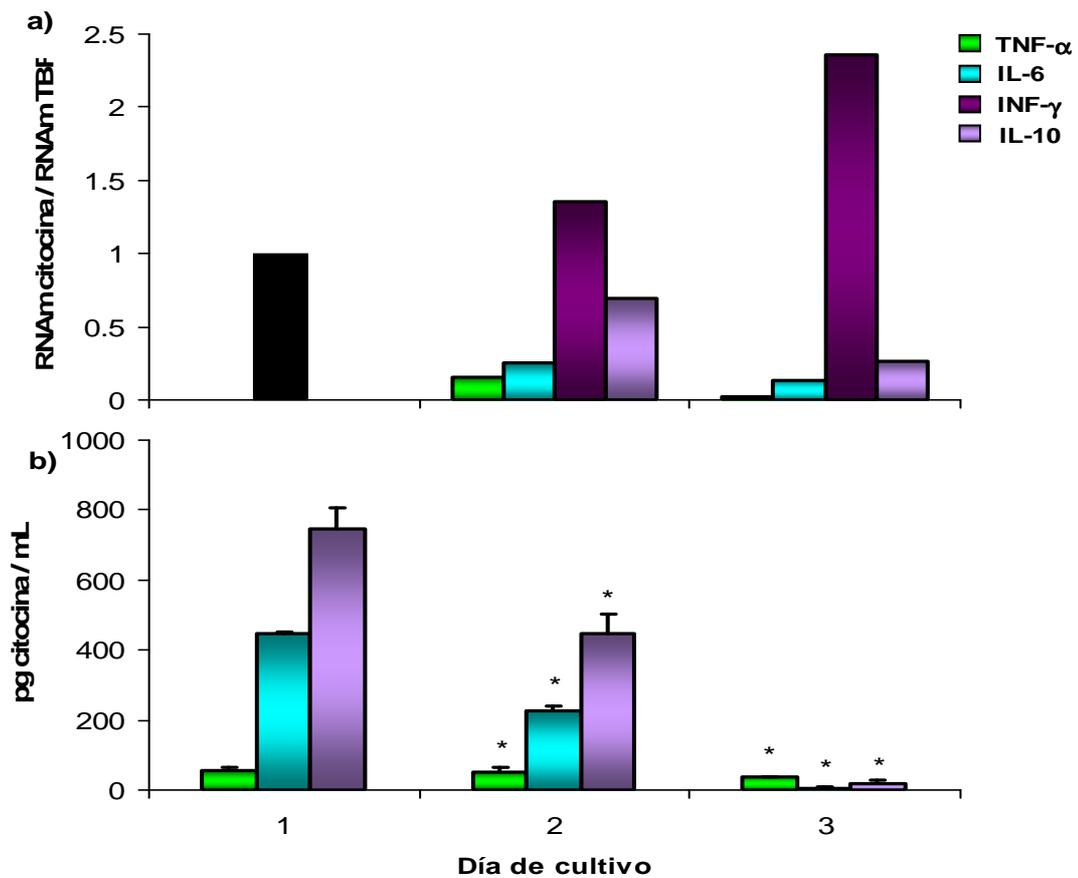


Figura 8. Expresión (a) y secreción (b) de IL-10, IL-6, TNF- α e INF- γ durante 3 días de cultivo. La expresión de las citocinas fue evaluada por qPCR atribuyendo el valor de 1 al día 1 para cada citocina. Los datos de la secreción representan la media \pm DE de n = 3, * $P < 0.05$ respecto al día 1.

8.3 Efecto del calcitriol sobre la expresión y secreción de las citocinas en ausencia o presencia de TNF- α

Considerando que la mayor producción de citocinas se presentó el día 1, los tratamientos con el calcitriol y su vehículo (Vh, etanol 0.1%) se efectuaron 3 h después de realizar el cultivo en ausencia o presencia de TNF- α y se evaluó la secreción y expresión de TNF- α , IL-6, INF- γ e IL-10 24 h posteriores al tratamiento.

8.3.1 Efecto del calcitriol sobre TNF- α

Como se muestra en la Figura 9a el TNF- α estimula 3 veces su propia expresión. En presencia del calcitriol el estímulo de TNF- α se bloqueó significativamente manteniendo la expresión en condiciones basales. Por otro lado el calcitriol inhibió significativamente la secreción de TNF- α (Figura 9b) solo con la mayor concentración probada.

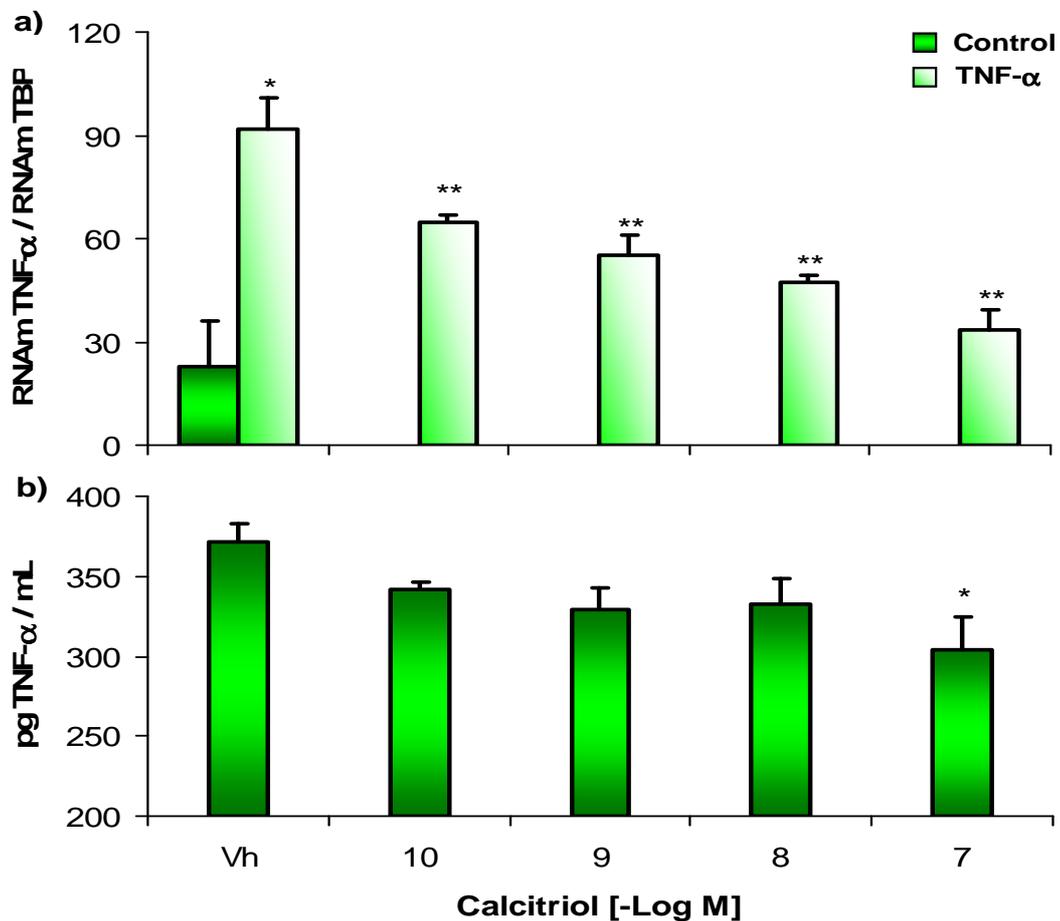


Figura 9. Efecto del calcitriol sobre la expresión (a) y secreción (b) de TNF- α en ausencia o presencia de TNF- α 10 ng/mL. Los datos muestran la media \pm DE ($n = 3$), * $P < 0.05$ respecto al Vh sin TNF- α , ** $P < 0.05$ respecto al Vh con TNF- α .

8.3.2 Efecto del calcitriol sobre IL-6

Con respecto a IL-6, el TNF- α indujo su expresión y secreción 5 y 2 veces respectivamente (Figura 10 a y b). El calcitriol bloqueó significativamente el estímulo de forma dependiente de la concentración tanto de la expresión como de la secreción de IL-6. Sin embargo, en ausencia de TNF- α exógeno la tendencia inhibitoria no fue significativa con respecto al Vh.

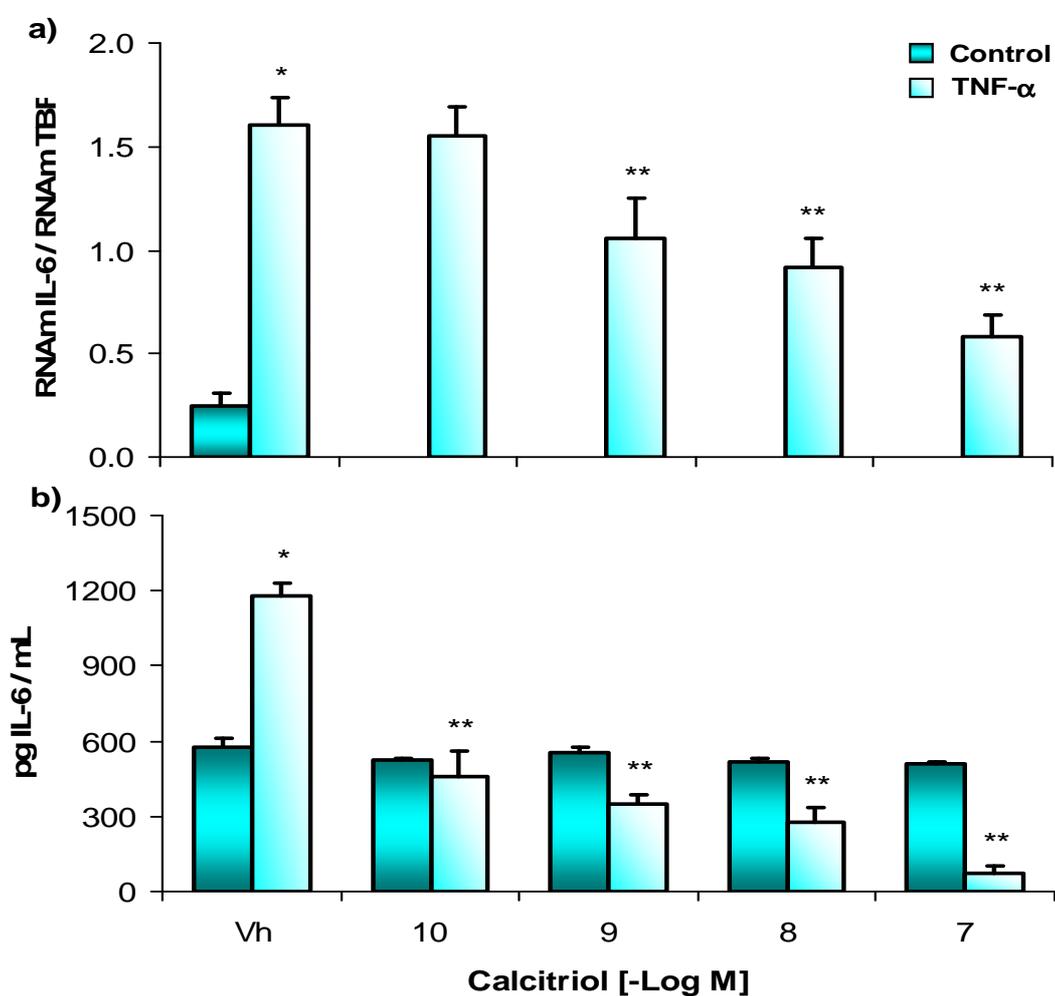


Figura 10. Efecto del calcitriol sobre la expresión (a) y secreción (b) de IL-6 en ausencia o presencia de TNF- α 10 ng/mL. Los datos muestran la media \pm DE ($n = 3$), * $P < 0.05$ respecto al Vh sin TNF- α , ** $P < 0.05$ respecto al Vh con TNF- α .

8.3.3 Efecto del calcitriol sobre INF- γ

Para INF- γ los resultados muestran que el TNF- α indujo 2 veces su expresión, sin embargo no se detectó su secreción en los medios de cultivo. Además se observó que el calcitriol inhibió la expresión de INF- γ inducida por el TNF- α .

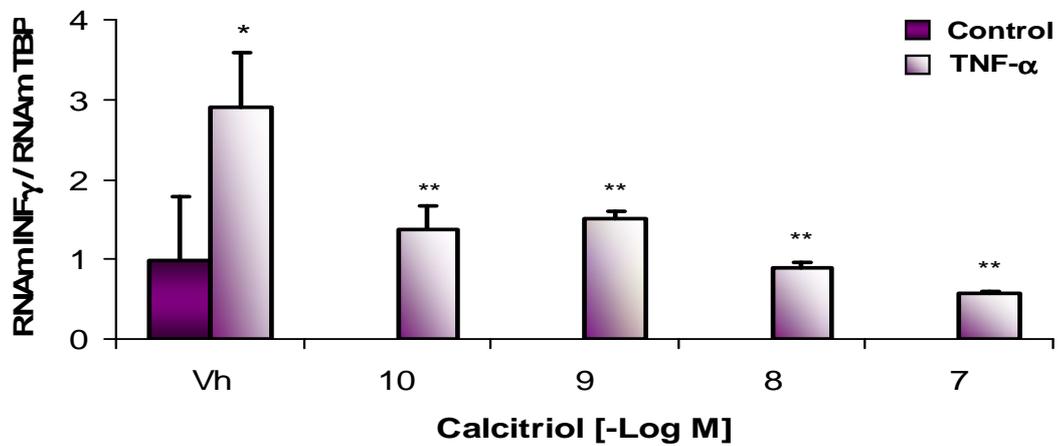


Figura 11. Efecto del calcitriol sobre la expresión de INF- γ en presencia de TNF- α 10 ng/mL. Los datos muestran la media \pm DE (n = 3), * P < 0.05 respecto al Vh sin TNF- α , ** P < 0.05 respecto al Vh con TNF- α .

8.3.4 Efecto del calcitriol sobre TNF- α , IL-6 e INF- γ en presencia de TEI-9647

Para analizar si el calcitriol ejerce sus efectos a través de un mecanismo genómico, se adicionó el antagonista del VDR, TEI-9647. Como se muestra en la Figura 12 el TEI-9647 bloqueó el efecto inhibitor del calcitriol en cada citocina proinflamatoria.

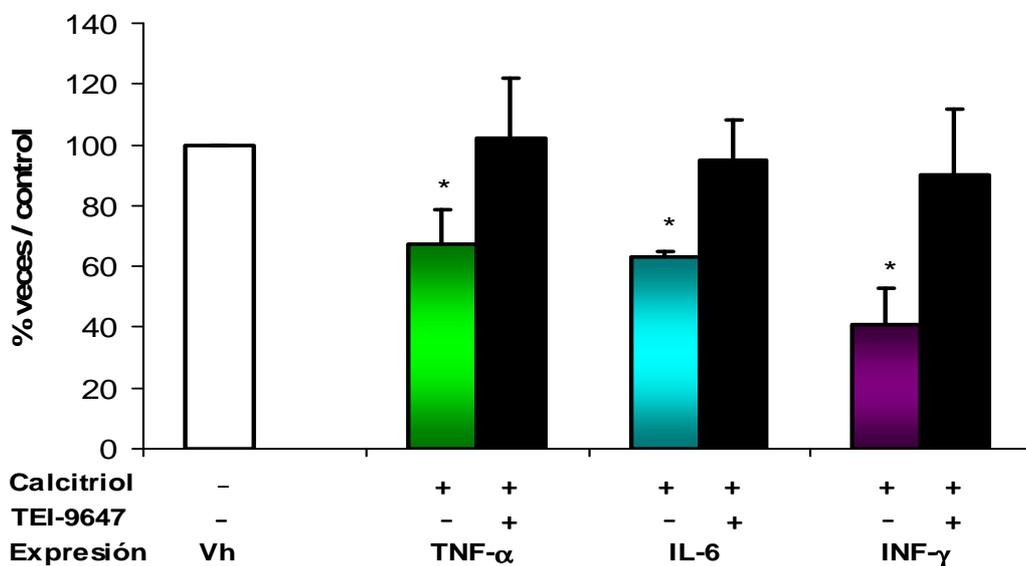


Figura 12. Comparación del efecto del calcitriol (1×10^{-8}) en ausencia o presencia de TEI-9647 (1×10^{-6}) sobre la expresión de TNF- α , IL-6 e INF- γ . Los datos son mostrados como el porcentaje (%) \pm DE de n = 3, en el cual se le atribuyó el valor del 100% al Vh, * $P < 0.05$ respecto al Vh.

8.3.5 Efecto del calcitriol sobre IL-10

Con la intención de comparar el efecto del calcitriol sobre una citocina antiinflamatoria secretada por el trofoblasto se evaluó la expresión y secreción de IL-10. De manera interesante en presencia de TNF- α aumento 3.3 veces la expresión y la secreción de la IL-10, (Figura 13) y el calcitriol inhibió tanto la expresión como la secreción de IL-10 de forma similar a las citocinas proinflamatorias.

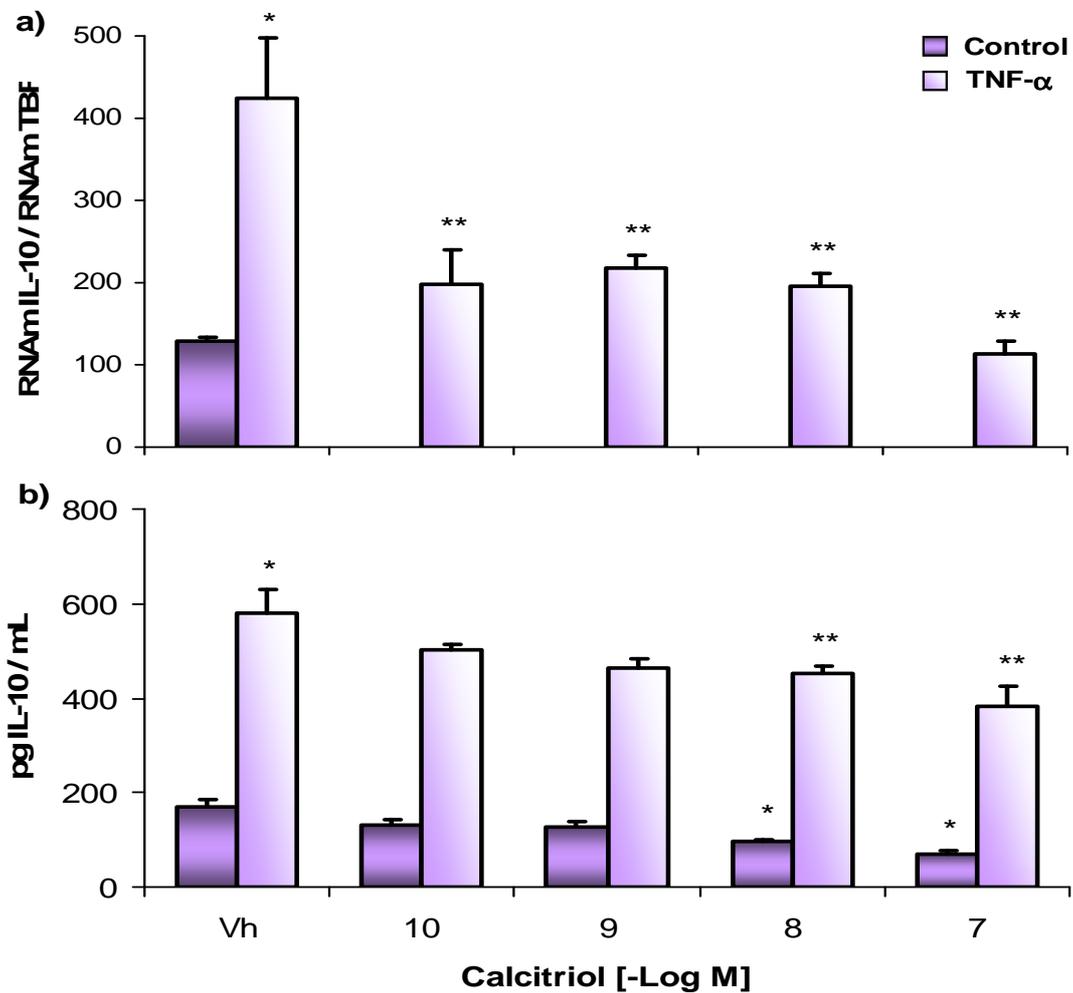


Figura 13. Efecto del calcitriol sobre la expresión (a) y secreción (b) de IL-10 en ausencia o presencia de TNF- α 10 ng/mL. Los datos muestran la media \pm DE (n = 3), * $P < 0.05$ respecto al Vh sin TNF- α , ** $P < 0.05$ respecto al Vh con TNF- α .

9. DISCUSIÓN

9.1 General

El embarazo implica grandes cambios y adaptaciones maternas, con lo cual se evita el rechazo del feto que presenta un perfil antigénico diferente debido a la información paterna. Entre las múltiples adaptaciones se ha descrito que hay un predominio de citocinas antiinflamatorias denominadas tipo Th2 sobre las proinflamatorias o tipo Th1. Ambos tipos son secretados de manera coordinada por las células del sistema inmune como los linfocitos T y los macrófagos con la finalidad de permitir la tolerancia inmunológica materna de manera sistémica. Sin embargo, poco se sabe de la regulación local de citocinas secretadas por la placenta. Por lo tanto, el propósito de esta tesis fue indagar el efecto del calcitriol sobre la síntesis de citocinas producidas por el trofoblasto en cultivo como posible regulador inmunológico en la interfase materno fetal.

9.2 Secreción de citocinas proinflamatorias por el trofoblasto en cultivo

Los resultados demostraron que la secreción y expresión de las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α producidas por el trofoblasto humano en cultivo disminuyó conforme avanzó el tiempo de diferenciación celular, un patrón opuesto al observado con la hCG, la cual fue el control de viabilidad y funcionalidad de las células en cultivo, descartando que la disminución de IL-6 y TNF- α en los medios fuera el resultado de la inactividad o de la muerte celular de los trofoblastos. Además los datos obtenidos concuerdan con la síntesis de IL-6 y TNF- α en el embarazo, que se sabe es mayor durante el proceso de implantación y va

disminuyendo conforme avanza la gestación [60] y con previos reportes en los cuales la producción de IL-6 y TNF- α es menor conforme transcurre el tiempo de cultivo [67]. En contraste la expresión de INF- γ se incrementó día a día, esto coincide con la presencia de INF- γ que está incrementada hacia el final del embarazo [77]. Sin embargo, la secreción de la citocina no fue detectada en los medios recolectados a los diferentes días aún en presencia de TNF- α a pesar de que indujo su expresión. La nula detección de INF- γ en las placentas utilizadas en este estudio podría deberse al límite de detección de nuestros estuches comerciales, o bien debido a que las muestras pertenecían a mujeres que cursaron embarazos sanos y probablemente algunos mecanismos celulares compensadores bloquearon su traducción.

9.3 Efecto del TNF- α sobre la síntesis de citocinas

Los datos mostraron que el TNF- α adicionado a los trofoblastos incremento su propia expresión, así como la de IL-6, INF- γ e IL-10. En concentraciones adecuadas el TNF- α y la IL-6 promueven la invasión del trofoblasto y participan en la angiogénesis [60]. Sin embargo, el exceso de estas citocinas es dañino para el embarazo y se han correlacionado con algunas patologías como la PE, en la cual también existe la deficiencia del calcitriol [71]. Considerada la enfermedad de las teorías, no existe PE sin la presencia de placenta y por esto se le ha relacionado como el origen de esta patología [78]. Aunque algunos autores proponen que la PE es debida al daño celular endotelial materno, este fenómeno es probablemente secundario a factores citotóxicos liberados por la placenta en respuesta a la

hipóxia e isquemia a la que se encuentra sometida [44]. En apoyo a lo anterior se ha descrito que puede llegar a producirse TNF- α y otras citocinas inflamatorias que son capaces de producir activación de las células endoteliales y disfunción de las mismas [45]. Por tal motivo, se añadió al TNF- α como un estímulo proinflamatorio e inductor de citocinas simulando un estado adverso para el embarazo como el que se presenta en la PE, demostrando que las células de trofoblastos normales reaccionan al estímulo exógeno de TNF- α alterando el equilibrio placentario.

9.4 Efecto del calcitriol sobre la expresión y secreción de las citocinas en presencia de TNF- α

En general, los resultados mostraron que el calcitriol indujo un efecto inhibitorio sobre la expresión y secreción de las citocinas de estudio (TNF- α , IL-6, IL-10 e INF- γ) aún en presencia de TNF- α , catalogando al secoesteroide como un fuerte inmunosupresor de las citocinas producidas en el trofoblasto, lo cual coincide con el efecto represor que ejerce sobre la producción de citocinas proinflamatorias en los linfocitos T, las células NK y en los macrófagos [26, 79]. En particular, el efecto inhibitorio del calcitriol sobre las citocinas proinflamatorias sugiere un efecto protector del calcitriol durante el embarazo. Estos resultados son relevantes ya que un importante mecanismo envuelto en la adaptación materna es la supresión de citocinas tipo Th1 para favorecer las del tipo Th2. Así, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que el calcitriol ejerce efectos supresores de las citocinas de una forma autócrina sobre las células de trofoblastos, y que consecuentemente

podrían ejercer un efecto de tipo parácrino sobre la polarización de los linfocitos deciduales, la activación de las células NK, macrófagos o la maduración de las células dendríticas. En apoyo a lo anterior Evans y colaboradores mostraron que el calcitriol inhibe significativamente la expresión de IL-6 y TNF- α producidas por células NK deciduales durante el primer trimestre de gestación [13].

Aunque se desconocen las causas de la PE, las citocinas proinflamatorias de origen sistémico y placentario juegan un papel central en la fisiopatología de la enfermedad [80]. Por tal motivo, el efecto del calcitriol aporta evidencias científicas de un ligando hormonal que en la interfase materno placentaria parece equilibrar su producción. Asimismo no se descarta que las citocinas proinflamatorias influyan en la inhibición de la síntesis del calcitriol en mujeres con PE. Admitidamente hacen falta estudios del efecto del calcitriol sobre la secreción de las citocinas de muestras de mujeres con PE.

Debido a que en la placenta se expresa la enzima CYP27B1 [35], la cual contribuye para incrementar los niveles de calcitriol en la unidad fetoplacentaria y tomando en cuenta todo lo anterior, los datos sugieren al calcitriol como una alternativa preventiva y terapéutica potencial en el embarazo, particularmente en condiciones proinflamatorias como en la PE o los abortos recurrentes, ambos con una respuesta inmune materna exacerbada.

9.5 Estudios sobre el modo de acción del calcitriol

Los resultados mostraron que la actividad del calcitriol sobre las citocinas en estudio fue bloqueada por el TEI-9647, indicando que la inhibición que el calcitriol ejerce es mediado por un mecanismo genómico. Esto sugiere que el antagonista bloqueó el efecto del calcitriol sobre las citocinas proinflamatorias impidiendo la unión del complejo hormona/receptor y subsecuentemente la síntesis de las mismas. Esto se fortalece ya que se ha reportado que TNF- α , IL-6 e INF- γ contienen VDRE en sus regiones promotoras [81-83]. Sin embargo, aún se requieren estudios que ayuden a dilucidar los mecanismos de acción exactos y factores de transcripción a través de los cuales el calcitriol ejerce su acción inhibidora sobre las citocinas en estudio.

9.6 Diferenciación celular, IL-10 y calcitriol

Con respecto a la citocina antiinflamatoria IL-10, los resultados demostraron que su secreción y expresión por el trofoblasto humano en cultivo disminuyó conforme avanzó el tiempo de diferenciación celular. Asimismo se demostró que el TNF- α indujo la producción de IL-10, tal vez como resultado de una respuesta celular al ambiente adverso en el medio causado por el TNF- α . Así, el aumento en la producción de IL-10 podría compensar los efectos contrarios a otras citocinas de tipo proinflamatorio que también son inducidas por el TNF- α como el INF- γ que en conjunto con el TNF- α se sabe induce la apoptosis del trofoblasto [62].

En particular la IL-10 es una citocina que inhibe la producción del linaje Th1, y que ayuda en el crecimiento y diferenciación del trofoblasto durante la placentación [84]. Sin embargo, Rinehat y col. en 1999 reportaron que la expresión de IL-10 se encuentra incrementada en la PE y que la excesiva producción de esta citocina es dañina para el embarazo ya que junto con otras citocinas como IL-1 β inducen disfunción endotelial [85]. Estudios recientes han mostrado que existe controversia respecto a la síntesis de IL-10 en mujeres con PE, en las cuales se ha encontrado disminuida o incrementada [86, 87].

De manera interesante el calcitriol inhibió tanto la expresión como la secreción de IL-10 aún en presencia de TNF- α . En conjunto los resultados anteriores sugieren que el calcitriol es un inmunosupresor general de las citocinas producidas en el trofoblasto y que la regulación negativa del calcitriol tiene un efecto dual al evitar que las citocinas benéficas se produzcan excesivamente y suprimiendo las citocinas dañinas impidiendo que la exacerbada producción de estos mediadores celulares desencadenen disfunción endotelial y/o comprometan la implantación y el correcto desarrollo de la placenta y el feto.

10. CONCLUSIONES

1. La expresión y secreción de TNF- α , IL-6 e IL-10 disminuye conforme avanza la diferenciación celular.
2. La expresión de INF- γ es mayor en el trofoblastos diferenciado.
3. El calcitriol es un agente inmunosupresor de citocinas en el trofoblasto humano.
4. El TNF- α induce la síntesis de IL-10, IL-6, INF- γ y su propia síntesis.
5. El calcitriol inhibe el estímulo inducido por el TNF- α .
6. El efecto inhibitor del calcitriol sobre las citocinas proinflamatorias es mediado por una vía genómica.

11. PERSPECTIVAS

Los resultados de la presente investigación dan pauta para investigar el efecto del calcitriol sobre otras citocinas que potencialmente podrían ser moduladas en la placenta como GM-CSF, IL-1 β , IL-12, IL-8. Asimismo, de comparar el efecto del calcitriol en conjunto con otras hormonas inmunosupresoras como la P₄, con la finalidad de saber si ejercen sus efectos de manera sinérgica o por separado. Del mismo modo resulta de interés utilizar como modelo de estudio placentas de mujeres con preeclampsia y comparar el perfil de secreción de las citocinas estudiadas, indagar el efecto del calcitriol en esta patología y determinar si las citocinas regulan la síntesis y catabolismo del calcitriol. En forma paralela también será necesario determinar si la cascada de segundos mensajeros podría estar involucrada en la regulación hormonal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aplin, J.D., S.J. Kimber, *Trophoblast-uterine interactions at implantation*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004. 2: p. 48.
2. Staun-Ram, E., E. Shalev, *Human trophoblast function during the implantation process*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005. 3: p. 56.
3. Dey, S.K., H. Lim, S.K. Das, J. Reese, B.C. Paria, T. Daikoku, H. Wang, *Molecular cues to implantation*. *Endocr Rev*, 2004. 25(3): p. 341-373.
4. Lee, K.Y., F.J. DeMayo, *Animal models of implantation*. *Reproduction*, 2004. 128(6): p. 679-695.
5. Solomon, E.P., L. Berg, D. Martin, *Biology*. 6ª ed. 2002: McGraw-Hill Companies. p. 1392.
6. Pepe, G.J., E.D. Albrecht, *Regulation of functional differentiation of the placental villous syncytiotrophoblast by estrogen during primate pregnancy*. *Steroids*, 1999. 64(9): p. 624-627.
7. Lunghi, L., M.E. Ferretti, S. Medici, C. Biondi, F. Vesce, *Control of human trophoblast function*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2007. 5: p. 6.
8. Wulff, C., M. Weigand, R. Kreienberg, H.M. Fraser, *Angiogenesis during primate placentation in health and disease*. *Reproduction*, 2003. 126(5): p. 569-577.
9. Huppertz, B., M. Kadyrov, J.C.P. Kingdom, *Apoptosis and its role in the trophoblast*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2006. 195(1): p. 29-39.
10. Barrera, D., E. Avila, and L. Diaz, *Papel inmunológico de la progesterona en el mantenimiento del embarazo*. *Rincon del Residente*, 2007: p. 139-145.
11. Barrera, D., M. Chirinos, R. Garcia-Becerra, *Mecanismos reguladores de la síntesis y secreción de la gonadotropina coriónica humana (hCG) durante el embarazo*. *Rev Invest Clin*, 2008. 60(2): p. 124-132.
12. Evans, K.N., J.N. Bulmer, M.D. Kilby, M. Hewison, *Vitamin D and placental-decidual function*. *J Soc Gynecol Investig*, 2004. 11(5): p. 263-271.
13. Evans, K.N., L. Nguyen, J. Chan, B.A. Innes, J.N. Bulmer, M.D. Kilby, M. Hewison, *Effects of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on cytokine production by human decidual cells*. *Biol Reprod*, 2006. 75(6): p. 816-822.
14. Diaz, L., C. Cariño, and I. Mendez, *Vitamin D: implications for health and pregnancy*. *Rev Invest Clin*, 2001. 53(1): p. 77-85.
15. Dusso, A.S., A.J. Brown, E. Slatopolsky, *Vitamin D*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005. 289(1): p. F8-F28.
16. Holick, M.F., *Resurrection of vitamin D deficiency and rickets*. *J Clin Invest*, 2006. 116(8): p. 2062-2072.
17. Deeb, K.K., D.L. Trump, C.S. Johnson, *Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics*. *Nat Rev Cancer*, 2007. 7(9): p. 684-700.

18. Hayes, C.E., F.E. Nashold, K.M. Spach, L.B. Pedersen, *The immunological functions of the vitamin D endocrine system*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2003. 49(2): p. 277-300.
19. Willheim, M., R. Thien, K. Schratlbauer, E. Bajna, M. Holub, R. Gruber, K. Baier, P. Pietschmann, W. Reinisch, O. Scheiner, M. Peterlik, *Regulatory effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 on the cytokine production of human peripheral blood lymphocytes*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. 84(10): p. 3739-3744.
20. Brown, A.J., A. Dusso, E. Slatopolsky, *Vitamin D*. Am J Physiol, 1999. 277(2 Pt 2): p. F157-175.
21. Sun, T., Y. Zhao, D.J. Mangelsdorf, E.R. Simpson, *Characterization of a region upstream of exon 1.1 of the human CYP19 (aromatase) gene that mediates regulation by retinoids in human choriocarcinoma cells*. Endocrinology, 1998. 139(4): p. 1684-1691.
22. Kinuta, K., H. Tanaka, T. Moriwake, K. Aya, S. Kato, Y. Seino, *Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads*. Endocrinology, 2000. 141(4): p. 1317-1324.
23. Barrera, D., E. Avila, G. Hernandez, A. Halhali, B. Biruete, F. Larrea, L. Diaz, *Estradiol and progesterone synthesis in human placenta is stimulated by calcitriol*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007. 103(3-5): p. 529-532.
24. Barrera, D., E. Avila, G. Hernandez, I. Mendez, L. Gonzalez, A. Halhali, F. Larrea, A. Morales, L. Diaz, *Calcitriol affects hCG gene transcription in cultured human syncytiotrophoblasts*. Reprod Biol Endocrinol, 2008. 6: p. 3.
25. Takeuchi, A., G.S. Reddy, T. Kobayashi, T. Okano, J. Park, S. Sharma, *Nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a molecular target for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3-mediated effects*. J Immunol, 1998. 160(1): p. 209-218.
26. Alroy, I., T.L. Towers, L.P. Freedman, *Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor*. Mol Cell Biol, 1995. 15(10): p. 5789-5799.
27. Cantorna, M.T., C. Munsick, C. Bemiss, B.D. Mahon, *1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease*. J Nutr, 2000. 130(11): p. 2648-2652.
28. Cantorna, M.T., Y. Zhu, M. Froicu, A. Wittke, *Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and the immune system*. Am J Clin Nutr, 2004. 80(6 Suppl): p. 1717S-1720S.
29. Sezer, S., M. Uyar, Z. Arat, F.N. Ozdemir, M. Haberal, *Potential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in renal transplant recipients*. Transplant Proc, 2005. 37(7): p. 3109-3111.
30. Ardalan, M.R., H. Maljaei, M.M. Shoja, A.R. Piri, H.T. Khosroshahi, H. Noshad, H. Argani, *Calcitriol started in the donor, expands the population of CD4+CD25+ T cells in renal transplant recipients*. Transplant Proc, 2007. 39(4): p. 951-953.

31. Johnson, L.E., H.F. DeLuca, *Vitamin D receptor null mutant mice fed high levels of calcium are fertile*. J Nutr, 2001. 131(6): p. 1787-91.
32. Froicu, M., Y. Zhu, M.T. Cantorna, *Vitamin D receptor is required to control gastrointestinal immunity in IL-10 knockout mice*. Immunology, 2006. 117(3): p. 310-318.
33. Reddy, G.S., A.W. Norman, D.M. Willis, D. Goltzman, H. Guyda, S. Solomon, D.R. Phillips, J.E. Bishop, E. Mayer, *Regulation of vitamin D metabolism in normal human pregnancy*. J Clin Endocrinol Metab, 1983. 56(2): p. 363-370.
34. Kovacs, C.S., *Vitamin D in pregnancy and lactation: maternal, fetal, and neonatal outcomes from human and animal studies*. Am J Clin Nutr, 2008. 88(2): p. 520S-528S.
35. Diaz, L., 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, 2000. 85(7): p. 2543-2549.
36. Belkacemi, L., U. Zuegel, A. Steinmeyer, J.P. Dion, J. Lafond, *Calbindin-D28k (CaBP28k) identification and regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human choriocarcinoma cell line JEG-3*. Mol Cell Endocrinol, 2005. 236(1-2): p. 31-41.
37. Fioruci, F., C. Marino, *Calcium homeostasis and bone during pregnancy and lactation in adult and adolescent women*. Perinatol Reproduction Human, 2007. 21: p. 201-209.
38. Glorieux, F.H., A. Arabian, E.E. Delvin, *Pseudo-vitamin D deficiency: absence of 25-hydroxyvitamin D 1 alpha-hydroxylase activity in human placenta decidual cells*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. 80(7): p. 2255-2258.
39. Blond, M.H., F. Gold, F. Pierre, C. Berger, M. Guerois, M.S. Queru, N. Ramponi, *Nutritional fetal rickets. A case report*. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 1997. 26(8): p. 834-836.
40. Memmi, I., R. Brauner, D. Sidi, S. Sauvion, J.C. Souberbielle, M. Garabedian, *Neonatal cardiac failure secondary to hypocalcemia caused by maternal vitamin D deficiency*. Arch Fr Pediatr, 1993. 50(9): p. 787-791.
41. Namgung, R., R.C. Tsang, B.L. Specker, R.I. Sierra, M.L. Ho, *Reduced serum osteocalcin and 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations and low bone mineral content in small for gestational age infants: evidence of decreased bone formation rates*. J Pediatr, 1993. 122(2): p. 269-275.
42. Halhali, A., A.R. Villa, E. Madrazo, M.C. Soria, E. Mercado, L. Diaz, E. Avila, M. Garabedian, F. Larrea, *Longitudinal changes in maternal serum 1,25-dihydroxyvitamin D and insulin like growth factor I levels in pregnant women who developed preeclampsia: comparison with normotensive pregnant women*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004. 89-90(1-5): p. 553-556.
43. Bowen, J.M., L. Chamley, M.D. Mitchell, J.A. Keelan, *Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and*

- roles in establishment of pregnancy in women. Placenta, 2002. 23(4): p. 239-256.*
44. Bowen, J.M., L. Chamley, J.A. Keelan, M.D. Mitchell, *Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition. Placenta, 2002. 23(4): p. 257-273.*
 45. Hunt, J.S., H.L. Chen, L. Miller, *Tumor necrosis factors: pivotal components of pregnancy? Biol Reprod, 1996. 54(3): p. 554-62.*
 46. Hossein, H., M. Mahroo, A. Abbas, A. Firouzeh, H. Nadia, *Cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent miscarriage. Cytokine, 2004. 28(2): p. 83-86.*
 47. Saito, S., A. Shiozaki, A. Nakashima, M. Sakai, Y. Sasaki, *The role of the immune system in preeclampsia. Mol Aspects Med, 2007. 28(2): p. 192-209.*
 48. Pongcharoen, S., J. Somran, S. Sritippayawan, P. Niumsup, P. Chanchan, P. Butkhamchot, P. Tatiwat, S. Kunngurn, R.F. Searle, *Interleukin-17 expression in the human placenta. Placenta, 2007. 28(1): p. 59-63.*
 49. Holick, M.F., J.A. MacLaughlin, M.B. Clark, S.A. Holick, J.T. Potts, Jr., R.R. Anderson, I.H. Blank, J.A. Parrish, P. Elias, *Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. Science, 1980. 210(4466): p. 203-205.*
 50. Zehnder, D., 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, 2001. 86(2): p. 888-894.*
 51. Diaz, L., C. Arranz, E. Avila, A. Halhali, F. Vilchis, and F. Larrea, *Expression and activity of 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase are restricted in cultures of human syncytiotrophoblast cells from preeclampsic pregnancies. J Clin Endocrinol Metab, 2002. 87(8): p. 3876-3882.*
 52. Huhtakangas, J.A., 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 alpha,25(OH)2-vitamin D3 in vivo and in vitro. Mol Endocrinol, 2004. 18(11): p. 2660-2671.*
 53. Christakos, S., F. Barletta, M. Huening, P. Dhawan, Y. Liu, A. Porta, X. Peng, *Vitamin D target proteins: function and regulation. J Cell Biochem, 2003. 88(2): p. 238-244.*
 54. D'Ambrosio, D., M. Cippitelli, M.G. Cocciolo, D. Mazzeo, P. Di Lucia, R. Lang, F. Sinigaglia, P. Panina-Bordignon, *Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. J Clin Invest, 1998. 101(1): p. 252-262.*
 55. Nemere, I., Y. Yoshimoto, A.W. Norman, *Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D3. Endocrinology, 1984. 115(4): p. 1476-1483.*
 56. Avila, E., L. Diaz, D. Barrera, A. Halhali, I. Mendez, L. Gonzalez, U. Zuegel, A. Steinmeyer, F. Larrea, *Regulation of Vitamin D hydroxylases*

- gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblasts. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007. 103(1): p. 90-96.*
57. Maldonado, M.G., F. Martínez, *Mensaje Bioquímico: Las citocinas durante el embarazo*. Vol. XXIV. 2000, México, D.F.: UNAM.
 58. Hernandez-Urzuá, M., A. Alvarado-Navarro, *Interleucinas e inmunidad innata*. Revista biomédica, 2001: p. 272-280.
 59. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, *Cellular and Molecular Immunology*. 5^a ed. 2005: B W Saunders Co. p. 564.
 60. Curry, A.E., I. Vogel, K. Skogstrand, C. Drews, D.E. Schendel, W.D. Flanders, D.M. Hougaard, P. Thorsen, *Maternal plasma cytokines in early- and mid-gestation of normal human pregnancy and their association with maternal factors*. J Reprod Immunol, 2008. 77(2): p. 152-160.
 61. Wilczynski, J.R., *Th1/Th2 cytokines balance--yin and yang of reproductive immunology*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2005. 122(2): p. 136-143.
 62. Molina, R., T. Romero, I. Bermúdez, J. Flores, J. Fuenmayor, R. Núñez, A. Calderón, *Factor de necrosis tumoral-alfa en el suero de embarazadas normales y preeclámpicas*. Gaceta Médica Caracas, 2001: p. 526-531.
 63. Hauguel-de Mouzon, S., M. Guerre-Millo, *The placenta cytokine network and inflammatory signals*. Placenta, 2006. 27(8): p. 794-798.
 64. Robertson, S.A., R.F. Seemark, L.J. Guilbert, T.G. Wegmann, *The role of cytokines in gestation*. Crit Rev Immunol, 1994. 14(3-4): p. 239-292.
 65. Vives, A., J. Balasch, J. Yague, L. Quinto, J. Ordi, J.A. Vanrell, *Type-1 and type-2 cytokines in human decidua tissue and trophoblasts from normal and abnormal pregnancies detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)*. Am J Reprod Immunol, 1999. 42(6): p. 361-368.
 66. Stephanou, A., S. Handwerger, *Interleukin-6 stimulates placental lactogen expression by human trophoblast cells*. Endocrinology, 1994. 135(2): p. 719-723.
 67. Rein, D.T., M. Breidenbach, B. Honscheid, U. Friebe-Hoffmann, H. Engel, U.J. Gohring, L. Uekermann, C.M. Kurbacher, T. Schondorf, *Preeclamptic women are deficient of interleukin-10 as assessed by cytokine release of trophoblast cells in vitro*. Cytokine, 2003. 23(4-5): p. 119-125.
 68. Zenclussen, A.C., S. Blois, R. Stumpo, S. Olmos, K. Arias, I. Malan Borel, M.E. Roux, R.A. Margni, *Murine abortion is associated with enhanced interleukin-6 levels at the fetomaternal interface*. Cytokine, 2003. 24(4): p. 150-160.
 69. Makrigiannakis, A., V. Minas, S.N. Kalantaridou, G. Nikas, G.P. Chrousos, *Hormonal and cytokine regulation of early implantation*. Trends Endocrinol Metab, 2006. 17(5): p. 178-185.
 70. Kossintseva, I., S. Wong, E. Johnstone, L. Guilbert, D.M. Olson, B.F. Mitchell, *Proinflammatory cytokines inhibit human placental 11beta-*

- hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity through Ca²⁺ and cAMP pathways.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. 290(2): p. E282-288.
71. Halhali, A., A.R. Tovar, N. Torres, H. Bourges, M. Garabedian, F. Larrea, *Preeclampsia is associated with low circulating levels of insulin-like growth factor I and 1,25-dihydroxyvitamin D in maternal and umbilical cord compartments.* J Clin Endocrinol Metab, 2000. 85(5): p. 1828-1833.
 72. Avila, E., L. Diaz, A. Halhali, F. Larrea, *Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase, 1,25-dihydroxyvitamin D3 24-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression by 8-bromo cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblast cells.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2004. 89-90(1-5): p. 115-119.
 73. Halhali, A., 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, 1999. 5(8): p. 771-776.
 74. Kliman, H.J., 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, 1986. 118(4): p. 1567-1582.
 75. Chomczynski, P., N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.* Anal Biochem, 1987. 162(1): p. 156-159.
 76. Costa, J., *PCR en tiempo real.* 2004, Hospital Clínico Provincial: Barcelona. España. p. 88-93.
 77. Knofler, M., Simmons, D. G., Lash, Harris, L. K., Armant, D.R., *Regulation of trophoblast invasion - A workshop report.* Placenta, 2007. 22(29): p. s26-s28.
 78. Broughton, P.F., R. PC., *Pre-eclampsia- the`disease of theories'.* Br Med Bull, 1994. 50: p. 381-396.
 79. van Etten, E., C. Mathieu, *Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2005. 97(1-2): p. 93-101.
 80. Raghupathy, R., J. Kalinka, *Cytokine imbalance in pregnancy complications and its modulation.* Front Biosci, 2008. 13: p. 985-94.
 81. Hakim, I., Z. Bar-Shavit, *Modulation of TNF-alpha expression in bone marrow macrophages: involvement of vitamin D response element.* J Cell Biochem, 2003. 88(5): p. 986-998.
 82. Masood, R., S. Nagpal, T. Zheng, J. Cai, A. Tulpule, D.L. Smith, P.S. Gill, *Kaposi sarcoma is a therapeutic target for vitamin D(3) receptor agonist.* Blood, 2000. 96(9): p. 3188-3194.
 83. Cippitelli, M., A. Santoni, *Vitamin D3: a transcriptional modulator of the interferon-gamma gene.* Eur J Immunol, 1998. 28(10): p. 3017-3030.
 84. Kamali-Sarvestani, E., S. Kiany, B. Gharesi-Fard, and M. Robati, *Association study of IL-10 and IFN-gamma gene polymorphisms in Iranian women with preeclampsia.* J Reprod Immunol, 2006. 72(1-2): p. 118-126.
 85. Rinehart, B.K., D.A. Terrone, S. Lagoo-Deenadayalan, W.H. Barber, E.A. Hale, J.N. Martin, Jr., W.A. Bennett, *Expression of the placental*

ANEXO I

Gradiente de percoll

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

Preparación de los tubos a diferentes porcentajes de Percoll para la preparación del gradiente de 70 a 5 % equivalente a densidades que van desde los tubos 1 al 14 de 1.017 a 1.075 g/mL. Percoll al 90%: 18 mL de Percoll al 100% + 2 mL de HBSS 10x (Gibco,Life technologies. Grand Island, NY, EUA).

ANEXO II

Mezcla de reacción

REACTIVO	Cada tubo
Solución amortiguadora 5X	4 μ L
Inhibidor de sa	0.5 μ L
Mezcla de Desoxinucleótido	2 μ L
Transcriptasa reversa	0.5 μ L

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

XLVIII Congreso de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, del 1 al 6 de diciembre de 2008 en la ciudad de Cancún, Quintana Roo.

“Efectos del calcitriol sobre la expresión placentaria de citocinas proinflamatorias”.

Noyola-Martínez Nancy, Barrera David, Ávila Euclides, Larrea Fernando, Halhali Ali, Hernández Guillermo, Díaz Lorenza.

XXI Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH), del 22 al 24 de abril de 2009, en la ciudad de São Paulo, Brasil.

“Calcitriol y citocinas proinflamatorias en la placenta humana”. Barrera D, Díaz L,

Noyola-Martínez N, Avila E, Halhali A, Hernández G, Larrea F.

Con los datos de esta tesis fue publicado en el Journal of Reproductive Immunology el artículo titulado “Calcitriol inhibits TNF-alpha-induced inflammatory cytokines in human trophoblasts”. Lorenza Díaz, **Nancy Noyola-Martínez**, David Barrera, Guillermo Hernández, Euclides Ávila, Ali Halhali, Fernando Larrea.

En prensa.

- cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin 1beta, and interleukin 10 is increased in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol, 1999. 181(4): p. 915-920.*
86. Makris, A., B. Xu, B. Yu, C. Thornton, A. Hennessy, *Placental deficiency of interleukin-10 (IL-10) in preeclampsia and its relationship to an IL10 promoter polymorphism. Placenta, 2006. 27(4-5): p. 445-451.*
 87. Benian, A., R. Madazli, F. Aksu, H. Uzun, S. Aydin, *Plasma and placental levels of interleukin-10, transforming growth factor-beta1, and epithelial-cadherin in preeclampsia. Obstet Gynecol, 2002. 100(2): p. 327-331.*