



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO  
DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

**EFFECTO DEL CALCITRIOL SOBRE LA  
EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS CALBINDINAS 9K  
Y 28K Y SU RELACIÓN CON LA PEROXIDACIÓN  
DE LÍPIDOS EN PLACENTA DE MUJERES  
EMBARAZADAS SANAS**

**T E S I S**

**Que para obtener el título de  
Licenciada en Nutrición**

**P R E S E N T A**

**Ana Guadalupe Figueras Guevara**

**Bajo la dirección de:**

**Dr. Ali Halhali Baghdad**

**Pachuca, Hgo., febrero del 2008.**



## **Dedicatoria**

**A todas las personas que caminaron junto a mí durante esta etapa de mi vida, les estoy infinitamente agradecida:**

**Guillermo Hernández y David Barrera; por el tiempo que me dedicaron no sólo brindándome su amistad, cariño y apoyo sino también compartiendo sus conocimientos. Gracias a ustedes lo logré!**

**Dr. Ali; por ser mi tutor, apoyarme durante este trayecto y formación profesional.**

**A mi padre; su incondicional apoyo, cariño y principalmente por creer en mí.**

**A mi abuela; gracias a su constante amor y ayuda lo he logrado.**

**Compañeros del departamento; Euclides, Nancy, Lore, Isela, por brindarme su linda amistad, apoyo y confianza.**

**A mis amigos; Gizela, Enrique, Elena, amigos... con los que compartí mis buenos y difíciles momentos.**

**Durante esta etapa de mi vida no sólo obtuve conocimientos, sino que la vida me permitió conocer a personas valiosas que me contagiaron y que fueron ejemplos a seguir. Ahora soy una persona más fuerte, madura, feliz, a punto de ser independiente y muy afortunada!**

**Con todo el corazón**

## Abreviaturas

$\mu$ L	microlitros
24(OH)asa	24 hidroxilasa
8-Br AMPc	8- Bromo AMP cíclico
ABS	absorbancia
aG	ácido graso
AMPc	adenosín 3'-5'-monofosfato cíclico
ATP	adenosín-5'-trifosfato
BHT	butirilhidroxitolueno
BSA	albúmina bovina en suero
Ca	calcio
CaBP	calbindina
CaBP-28k	calbindina 28 kilodaltones
CaBP-9k	calbindina 9 kilodaltones
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CRE	elemento de respuesta al AMPc
1	gen de la 1 $\alpha$ -hidroxilasa
DBP	proteína transportadora
DE	desviación estándar
DEPC	agua libre de RNAsas
DMEM	medio de Tagle Modificado por Dulbecco
DMEM-HG	medio de Tagle Modificado por Dulbecco con L-alanil-L glutamina
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario
EGF-R	factor de crecimiento epidermal
EIA	ensayo Inmuno Enzimático
GLUT	transportador de glucosa
g.	gramos
h.	horas
H89	inhibidor de la proteína cinasa A
HBSS	solución salina balanceada de Hank's
hCG	hormona gonadotrófica humana
IL	interleucina
LogM	logaritmo de la molaridad
MAPcinasas	quinasas de proteínas
MDA	malondialdehído
min	minutos
mL	mililitro
mM	mili molar
Mr	masa molecular relativa
mUI	mili unidades internacionales
mVDR	receptor de membrana
n	número de muestras
Na	sodio
NaCl	cloruro de sodio

NADPH	nicotiamida adenina dinucleotido fosfato
NaOH	hidróxido de sodio
nm	nano molar
nVDR	receptor nuclear
O <sub>2</sub>	oxígeno
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PE	preeclampsia
pH	potencial hidrógeno
PKA	proteincinasa
PTH	hormona paratiroidea
RIPA	solución de lisis
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensajero
RNS	especies reactivas de nitrógeno
ROS	especies reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
RT	transcriptasa reversa
RXR	receptor retinoico X
SFT	suero fetal de ternera
TA	temperatura ambiente
TBA	ácido tiobarbitúrico
TMP	tetrametoxipropano
TRPV	receptor de potencial transitorio
VDR	receptor
VDREs	elemento de respuesta
vh	vehículo
μM	micromol

## Índice

1. Resumen	1
2. Abstract	2
3. Marco teórico	3
3.1. Embarazo	3
3.2. Crecimiento fetal	3
3.3. Placenta humana	4
3.4. Intercambio de gases y transporte de nutrientes en la placenta	
3.4.1. Intercambio de O <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub>	7
3.4.2. Transporte transplacentario de nutrientes	7
3.4.3 Transporte placentario de calcio	8
3.4.4. Transporte activo de calcio	8
3.5. Vitamina D	10
3.6. Calcitriol	11
3.6.1. Efecto y mecanismos de acción del calcitriol	11
3.7. Calcitriol y calbindinas	12
3.8. Placenta, vitamina D y calbindinas	13
3.9. Peroxidación de lípidos durante el embarazo	14
3.9.1. Etapas de la peroxidación de lípidos	15
3.10. Vitamina D, calbindinas y estrés oxidativo	16
3.11. Calcio, vitamina D, estrés oxidativo y preeclampsia	16
4. Problema de investigación	18
5. Justificación	18
6. Objetivo general	19
7. Objetivos específicos	19
8. Hipótesis	19
9. Metodología	20
9.1. Muestra	20
9.2. Placentas	21
9.3. Métodos	22
9.3.1. Cultivo de trofoblastos de placentas humanas a término	22
9.3.2. Análisis morfológico	26
9.3.3. Determinación de la concentración de hCG por ensayo inmunoenzimático	26
9.3.4. Peroxidación de lípidos	27
9.3.5. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	29
9.3.6. Purificación de RNA total por el método de un solo paso	
9.3.7. Transcripción inversa (RT)	30
9.3.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real	31

9.4. Presentación y análisis estadístico de los resultados	33
10. Resultados	34
10.1. Aspectos morfológicos	34
10.2. Secreción de hCG en diferentes días de cultivo	35
10.3. Efecto del calcitriol sobre la expresión placentaria de la CaBP-9k y asociación entre las concentraciones de calcitriol y la expresión placentaria de la CaBP-9k	36
10.4. Efecto del calcitriol sobre la expresión placentaria de la CaBP-28k y asociación entre las concentraciones de calcitriol y la expresión placentaria de la CaBP-28k	37
10.5. Efecto del 8-Br AMPc y del H89 sobre la expresión placentaria de las CaBPs-9k y -28k	38
10.6. Efecto del calcitriol sobre la concentración de MDA	40
10.6.1. Asociación entre las concentraciones de MDA y el calcitriol	40
10.6.2. Asociación entre las concentraciones de MDA y las CasBPs - 9k y 28k	41
11. Discusión	43
12. Conclusiones	47
13. Perspectivas	47
14. Referencias bibliográficas	48

## Anexos

I. Carta de consentimiento informado

II. Inactivación del suero fetal de ternera

III. Preparación de reactivos del cultivo de trofoblastos de placentas humanas a término

## 1. RESUMEN

El embarazo implica ajustes fisiológicos tales como aumento en el paso transplacentario de calcio para responder a las necesidades de mineralización del esqueleto fetal. Las calbindinas 9k y 28k (CaBP-9k y -28k) forman parte de los factores involucrados en el transporte activo de calcio y tanto la expresión de sus genes como la síntesis de estas proteínas son dependientes del calcitriol. Debido a que ambos factores son considerados como antioxidantes, el objetivo fue estudiar el efecto del calcitriol sobre la expresión génica de las CaBP-9k y -28k y la peroxidación de lípidos en células sinciciotrofoblásticas en cultivo. Para el cultivo se utilizaron placentas a término de mujeres sanas. Los aspectos morfológico y funcional del cultivo fueron evaluados mediante observación microscópica y determinación de las concentraciones de la hormona gonadotrófica humana (hCG), respectivamente. La peroxidación de lípidos fue estimada a través de la concentración de malondialdehído (MDA). La expresión de las CaBPs se realizó por transcripción reversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. La máxima secreción de hCG se observó a las 72 horas de cultivo, por lo que los experimentos se llevaron a cabo al tercer día del cultivo. El presente estudio mostró que los sinciciotrofblastos en cultivo expresan los RNAm de las CaBP-9k y -28k. Además, el calcitriol estimuló la expresión de estos genes de manera dosis-dependiente. Cantidades bajas ó fisiológicas ( $10^{-11}$  y  $10^{-9}$  M) no se asociaron con cambios significativos en las concentraciones de MDA. Los estudios de regresión mostraron asociación positiva y significativa entre la peroxidación de lípidos con calcitriol y con CaBP-9k, pero no con CaBP-28k. Estas observaciones sugieren la participación del calcitriol y de las CaBPs en el aumento del paso transplacentario de calcio durante el embarazo.

**Palabras clave:** placenta, citotrofoblasto, sinciciotrofoblasto, expresión génica, CaBP-9k y -28k, calcitriol, peroxidación de lípidos.

## 2. ABSTRACT

Pregnancy is associated with physiological adjustments such as increased transplacental calcium transfer for fetal skeletal mineralization needs. Calbindins 9k and 28k (CaBP-9k and -28k) are members of the factors involved in active calcium transport and the expression of their genes as well as the synthesis of these proteins are dependent of calcitriol. Due to the fact both factors are considered as antioxidant, the following objective was formulated to study the effect of calcitriol on CaBP-9k and -28k gene expression and lipid peroxidation in cultured syncytiotrophoblast cells. Placentas from healthy women were used for the obtainment of cultured syncytiotrophoblast cells. The morphologic and functional aspects were evaluated by microscopy examination and human chorionic gonadotrophin hormone (hCG) secretion, respectively. Malondialdehyde (MDA) concentration was used as lipid peroxidation marker. Reverse transcription (RT) and real time polymerase chain reaction (PCR) techniques were used for the determination of CaBPs gene expression. Maximal hCG secretion was observed at 72 hours of culture, reason why the experiments performed at day 3 of culture. This study showed that syncytiotrophoblast cells in culture express the mRNAs of CaBP-9k and -28k. In addition, calcitriol stimulated the expression of these genes in a dose-dependent manner. Low or physiological amounts ( $10^{-11}$  and  $10^{-9}$ M) of calcitriol were not associated with significant changes in MDA concentrations. However, regression analysis showed that lipid peroxidation were positively and significantly associated with calcitriol and CaBP-9k, but not with CaBP-28k. These observations suggest that calcitriol and the CaBPs are involved in the increase of the transplacental calcium transfer during the pregnancy.

**Key words:** placenta, cytotrophoblast, syncytiotrophoblast, gene expression, CaBP-9k and -28k, calcitriol, lipid peroxidation.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1. Embarazo**

En condiciones normales, el embarazo se asocia con cambios fisiológicos que permiten el crecimiento fetal. Durante esta etapa se presenta un incremento del 50% en el volumen del plasma materno y estímulo de la producción de eritrocitos cuya masa aumenta un 33%. En cambio, el hematocrito y la concentración de proteínas disminuyen como consecuencia del incremento del volumen extracelular. Debido al aumento en las necesidades de oxígeno, se presentan incrementos del 40% en el gasto cardiaco y del 12% en el tamaño del corazón así como un aumento en el metabolismo basal del 20%. A nivel renal, se presentan aumentos de la filtración glomerular en un 50% y del flujo plasmático renal del 25 al 50%. Por otra parte, la motilidad intestinal disminuye a consecuencia del incremento en la concentración de progesterona, lo cual resulta en mayor tiempo de permanencia de los nutrientes en el intestino lo que conlleva a mayor absorción. La energía necesaria para el crecimiento fetal es aportada por la glucosa en un 50-70% y por los aminoácidos en un 20%. El resto de la energía (10-30%) proviene de los lípidos <sup>1</sup>.

#### **3.2. Crecimiento fetal**

El crecimiento fetal es un fenómeno continuo que inicia a partir de la concepción y es dependiente de la unidad madre-placenta-feto. A partir de las 12-13 semanas, la talla del feto aumenta de manera proporcional a la edad gestacional: 10, 25 y 50 cm. en las semanas de gestación 12, 20 y 40, respectivamente. A las 7 semanas, el peso es de 10 g. y se multiplica por 10 cada vez que la edad gestacional se duplica siendo de 100 g. a las 14 semanas y de 1000 g. a las 28 semanas de gestación. De este tiempo a término, el peso del recién nacido alcanza entre los 2500 a 3500 g <sup>2</sup>.

Durante las dos primeras semanas de gestación los nutrientes provienen de las células endometriales y deciduales por lo que se habla de nutrición histotrófica. A partir de esta etapa y hasta término, la nutrición es de tipo

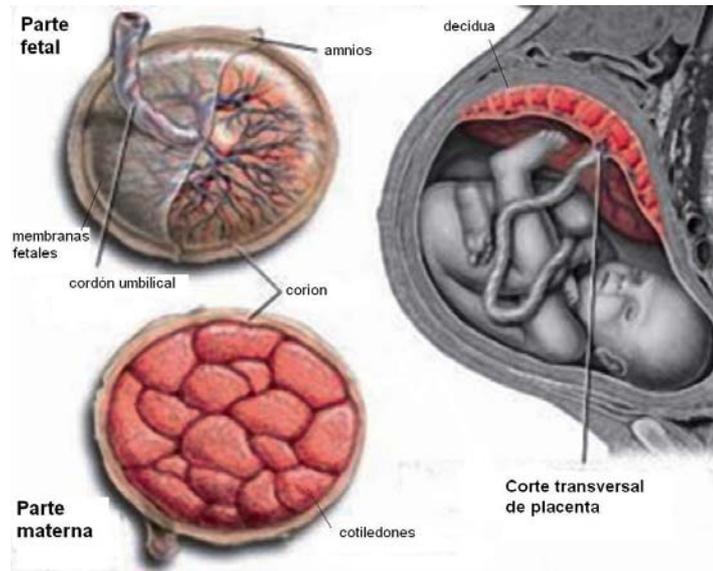
hemotrófica ya que el aporte de nutrimentos es garantizado por la circulación materna a través de la placenta<sup>3</sup>.

### **3.3. Placenta humana**

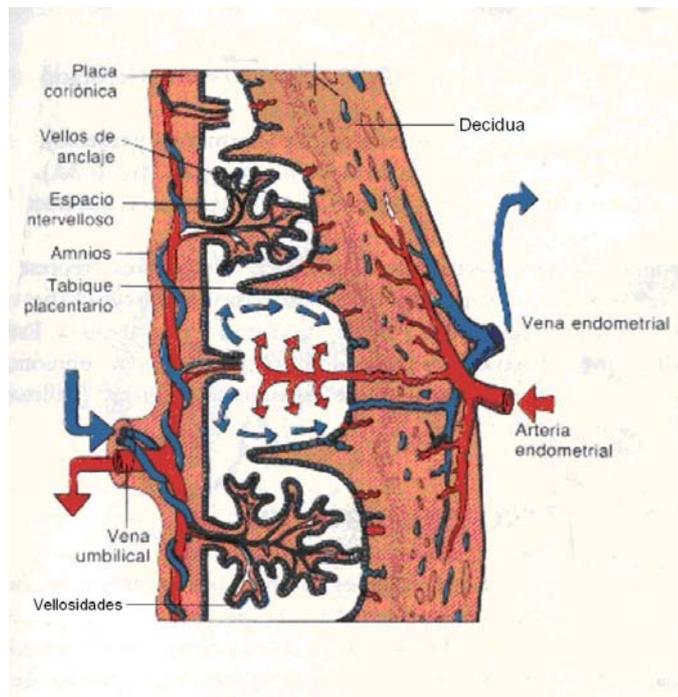
La placenta humana es un órgano de tipo hemocorial y su contacto con el útero es discoidal. La placenta a término pesa en promedio 500 g. su grosor es de 3 cm. y posee un diámetro de 25 cm<sup>4</sup>.

La placenta está conformada por dos partes, la materna y la fetal (figura 1). La decidua representa la parte materna y es producto de la diferenciación de las células endometriales en células deciduales. La parte fetal está compuesta por el corion frondoso y por las membranas fetales, amnios y corion liso, que abrigan al feto. El corion frondoso está compuesto por varios cotiledones, unidades conformadas por vellosidades coriónicas que nacen desde la placa coriónica en forma de tronco con ramificaciones. Como se aprecia en la figura 2, el espacio intervelloso está delimitado por los tabiques placentarios, proyecciones de la decidua y las vellosidades. Los tabiques placentarios son remanentes de la erosión de la decidua por parte de los sinciotrofoblastos. Existe una intercomunicación entre los espacios intervellosos ya que los tabiques placentarios no llegan a unirse con la placa coriónica<sup>3</sup>.

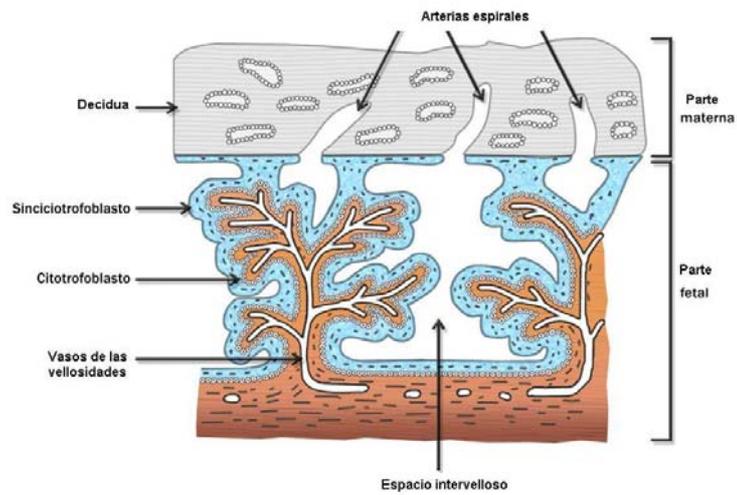
Los espacios intervellosos son reservorios en los cuales se vierten las sustancias provenientes de los compartimentos materno y fetal. De la madre hacia el feto, los nutrimentos, las inmunoglobulinas y el oxígeno transitan a través de lo siguiente: arterias espirales maternas, espacios intervellosos placentarios, vasos de las vellosidades, vasos de la placa coriónica, vena umbilical y feto (figura 3). Los productos de desecho y el CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) llegan a la placenta a través de dos arterias umbilicales y toman el camino contrario para verterse en el espacio intervelloso y de éste pasan al compartimiento materno a través de las venas endometriales<sup>5</sup> (Figura 4).



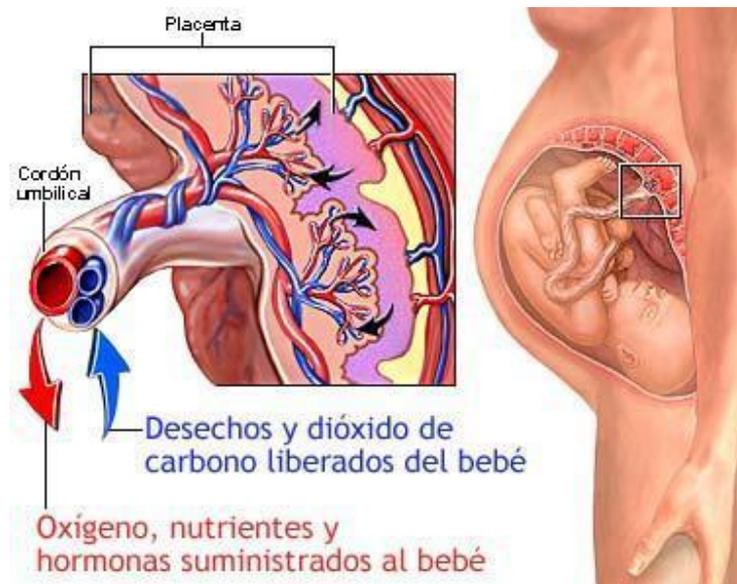
**Figura 1.** Parte materna y parte fetal de la placenta humana <sup>61</sup>.



**Figura 2.** Componentes de la placenta involucrados en transporte de gases, nutrimentos y productos de desecho <sup>62</sup>.



**Figura 3.** Localización de los citotrofoblastos y sinciotrofoblastos en las vellosidades coriónicas así como los vasos sanguíneos maternos y fetales involucrados en el transporte placentario <sup>63</sup>.



**Figura 4.** Vasos sanguíneos que conforman el cordón umbilical y sentido del transporte de la placenta hacia el feto y *viceversa* <sup>61</sup>.

### **3.4. Intercambio de gases y transporte de nutrientes en la placenta**

Además de ser considerada como órgano endocrino, trófico e inmunológico, la placenta garantiza el intercambio de gases y el aporte de nutrientes para su propio desarrollo y el del feto.

#### **3.4.1. Intercambio de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>**

A pesar de que la superficie de intercambio de la placenta a término es menor a la del pulmón de un recién nacido y de que su membrana es más espesa que la membrana alveolo-capilar, el feto no sufre deficiencia de oxigenación. Lo anterior se debe a que:

- La hemoglobina fetal presenta mayor afinidad para el oxígeno que la hemoglobina del adulto.
- La concentración de hemoglobina es mayor del lado fetal que del materno<sup>2</sup>.

#### **3.4.2. Transporte transplacentario de nutrientes**

El paso transplacentario de los nutrientes, el oxígeno y las inmunoglobulinas hacia el feto se lleva a cabo por difusión pasiva, difusión facilitada, transporte activo y endocitosis. En cambio, los productos de excreción incluyendo al CO<sub>2</sub> pasan del feto a la madre a través de la placenta por difusión pasiva<sup>2,6</sup>.

El oxígeno, gases de anestesia, agua, ácidos grasos e iones de sodio; de cloro y de potasio cruzan la placenta por difusión pasiva. Debido a que el agua representa del 75 al 80% del peso fetal, su transferencia neta sobrepasa cualquier otra sustancia incluyendo al oxígeno.

La concentración de glucosa en la circulación fetal representa al 80% de la glucemia materna, por lo que el transporte de este nutriente a favor del gradiente se lleva a cabo por difusión simple y por difusión facilitada a través de canales proteínicos conocidos como GLUT-1 (transportador de glucosa). Hacia el final de la gestación, el feto utiliza mayor cantidad de glucosa que el conjunto de todos los tejidos maternos.

La placenta es metabólicamente muy activa. Por kilogramo y por minuto, el consumo de oxígeno es mayor en la placenta que en el feto siendo de 4 a 6 mL de oxígeno. El ATP (adenosín 3'-5'-monofosfato cíclico) producido en la placenta se utiliza para el transporte activo de sustancias en contra del gradiente de concentración tales como los aminoácidos y calcio.

El transporte de macromoléculas tales como inmunoglobulinas G se realiza mediante endocitosis. En este proceso, las macromoléculas se unen a sus receptores de membrana lo que induce la formación de vesículas a partir de la membrana plasmática. Una vez llenas, las vesículas se separan de la membrana trofoblástica, se dirigen hacia la membrana basal y vierten su contenido en la sangre fetal por exocitosis <sup>2,3</sup>.

Además del CO<sub>2</sub>, el feto excreta por difusión pasiva hacia la madre otros compuestos tales como la urea, el ácido úrico y la creatinina <sup>2</sup>.

Debido a que el objetivo principal del presente estudio fue investigar a las calbindinas, proteínas que participan en el metabolismo del calcio, se describen a continuación algunos aspectos sobre el transporte del calcio.

### **3.4.3. Transporte placentario de calcio**

El recién nacido a término contiene 28 g. de calcio de los cuales las dos terceras partes se acumulan en el tercer trimestre del embarazo. El calcio pasa de la circulación materna al feto en contra de un gradiente de concentración lo que implica la participación de un transporte activo.

### **3.4.4. Transporte activo de calcio**

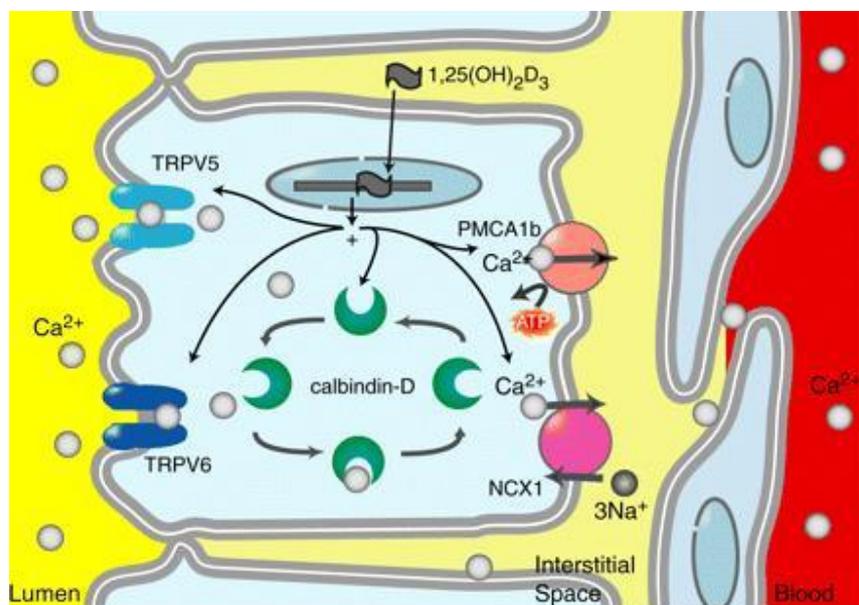
A partir de las semanas 20 a 26 de gestación se instala el gradiente de calcio a favor del feto por lo que la placenta utiliza el transporte activo a través de la vía transcelular. Como se muestra en la figura 5, el transporte activo de calcio se lleva a cabo en tres etapas:

- Entrada de calcio de la circulación materna a través de la membrana placentaria apical. En esta etapa el calcio entra de mayor a menor concentración a

través de canales conocidos como receptores de potencial transitorio (TRPV5 y TRPV6).

- Transporte intracelular de calcio citosólico en el cual el calcio es transportado por proteínas conocidas como calbindinas.

- Salida del calcio del citosol hacia la circulación a través de la membrana basolateral. El calcio pasa en contra de un gradiente de concentración por transporte activo mediado por la ATPasa dependiente de calcio. Además, el contratransportador  $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ayuda a extraer el calcio desde el trofoblasto hacia la circulación fetal <sup>1,7</sup>.



**Figura 5.** Transporte activo de calcio. Efecto estimulador del calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) sobre la expresión génica de los canales TRPV5 y TRPV6 que facilitan la entrada de calcio a través de la membrana apical, de la calbindina-D, proteína transportadora de calcio citosólico, de la ATPasa (PMCA1b) y del contratransportador  $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  involucrados en la extracción de calcio en contra del gradiente de concentración a través de la membrana basolateral <sup>7</sup>.

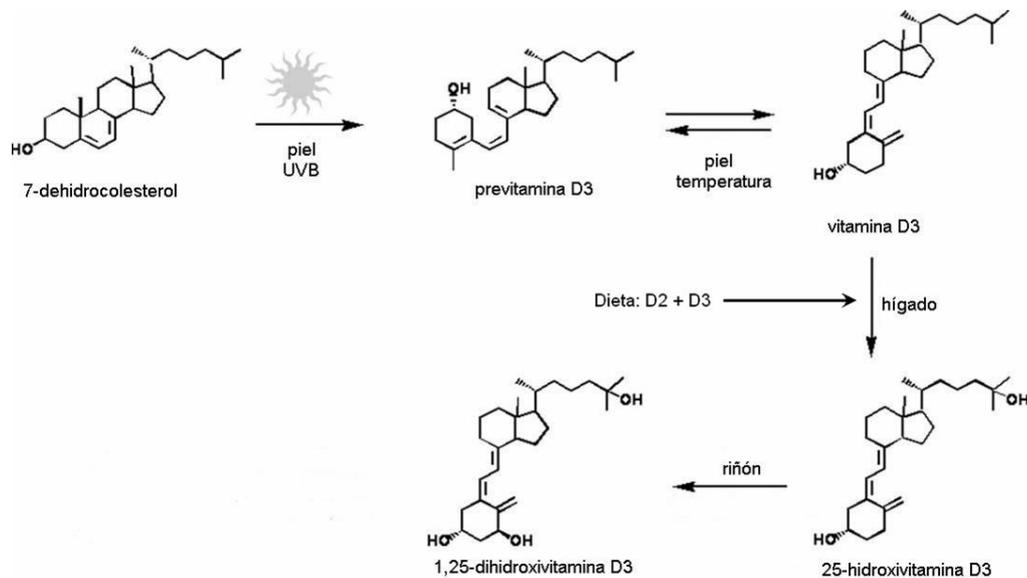
Cada una de estas etapas es estimulada por el calcitriol, forma hormonal y más activa de la vitamina D. Durante el embarazo, la absorción intestinal en el compartimiento materno y el paso transplacentario de calcio aumentan significativamente para responder a las demandas fetales, durante esta etapa fisiológica, las concentraciones de calcitriol aumentan también a consecuencia del incremento en la síntesis renal y/o placentaria de esta hormona <sup>8</sup>. Debido a su

importancia en la homeostasis del calcio, se describen a continuación la síntesis y el metabolismo de la vitamina D.

### 3.5. Vitamina D

La vitamina D fue identificada como un factor nutricional liposoluble que protege del raquitismo<sup>9</sup>. Estudios epidemiológicos demuestran 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<sup>10</sup>.

La figura 6 resume la síntesis y metabolismo de la vitamina D. La vitamina D no es una vitamina en el sentido estricto de la palabra, ya que gran parte de ella se sintetiza en la piel de manera endógena a partir de su precursor, el 7 dehidrocolesterol. El 7 dehidrocolesterol se biotransforma en colecalciferol bajo la acción de la luz UV a una longitud de onda de 290-315 nm. Las dos formas circulantes de la vitamina D, D<sub>2</sub> (de origen vegetal) y D<sub>3</sub> (de origen animal), se unen a una proteína transportadora en la sangre DBP (del inglés, Vitamin D Binding Protein) y tienen como destino al hígado, en el cual se obtiene a la 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] gracias a la acción de la vitamina D 25-hidroxilasa. La 25(OH)D es la principal forma circulante y el mejor indicador del estado nutricional de la vitamina D del organismo. Posteriormente, la 25(OH)D unida a DBP es transportada hacia los riñones, y en este sitio es biotransformada entre otros en calcitriol o 1,25-dihidroxivitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>D), forma hormonal más activa de la vitamina D, síntesis mediada por la 25-hidroxivitamina D 1 $\alpha$ -hidroxilasa, cuyo gen es el CYP27B1<sup>11,12</sup>.



**Figura 6.** Metabolismo de la vitamina D. El organismo recibe la vitamina D por síntesis endógena en forma de vitamina D<sub>3</sub> o colecalfiferol o a partir de la dieta la cual aporta vitamina D<sub>3</sub> de origen animal y ergocalciferol o vitamina D<sub>2</sub> de origen vegetal. En el hígado la vitamina D es hidroxilada para dar lugar a la 25(OH)D la cual llega al riñón para formar al calcitriol, la 1,25(OH)<sub>2</sub>D, forma hormonal y más activa de la vitamina D<sup>9</sup>.

### 3.6. Calcitriol

El calcitriol de origen renal presenta efectos endocrinos, el más conocido es el de la regulación de la homeostasis del calcio. Los efectos paracrin y autocrin han sido también descritos, promueven la inhibición de la proliferación y la estimulación de la diferenciación celular<sup>9</sup>. Interesantemente, se considera a esta hormona como posible tratamiento clave contra el cáncer<sup>13</sup> y se habla también de su capacidad para modular al sistema inmune<sup>10</sup>.

#### 3.6.1. Efectos y mecanismos de acción del calcitriol

Los mecanismos a través de los cuales el calcitriol presenta sus efectos involucran a la vía genómica que se presenta después de horas ó días y la no genómica la cual se observa en minutos ó segundos. Como muestra la figura 7, en la vía genómica, la más estudiada, el calcitriol se une a su receptor nuclear nVDR (del inglés, Vitamin D nuclear) receptor que a su vez se une al receptor retinoico X (RXR)

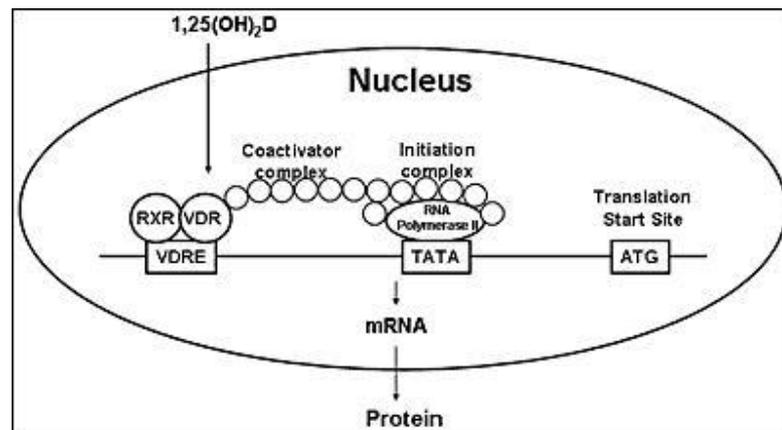
formando así un heterodímero capaz de unirse a los elementos de respuesta de la vitamina D, VDREs (Vitamin D Response Elements), localizados en la región promotora de los genes blanco de la vitamina D tales como las calbindinas. El calcitriol puede también unirse a receptores de membrana, mVDR (del inglés Vitamin D membranar receptor), para presentar efectos no genómicos mediados por la vía del AMPc y/o de la fosfolipasa C. Sin embargo, la unión del calcitriol a los mVDR puede presentar efectos genómicos mediados por el AMPc en los genes que presentan elementos de respuesta al AMPc, CRE (del inglés Cyclic AMPc Response Elements), y/o por la activación de la proteína cinasa C inducida por diacilglicerol, la cual estimula la vía de las MAP cinasas (cinasas de proteínas) cuyo efecto es genómico para regular principalmente a la mitogénesis.

Los efectos genómicos del calcitriol pueden ser directos, a través de los nVDRs que juegan un papel de factores de transcripción, o indirectos a través de la inducción de la síntesis de otros factores que regulan la transcripción de genes. Los efectos genómicos del calcitriol pueden ser estimuladores o inhibidores. Como efectos estimuladores, el calcitriol aumenta la expresión de genes involucrados en el metabolismo del calcio y remodelamiento del hueso tales como calbindinas, osteocalcina, osteopontina. En cambio, el calcitriol reprime la transcripción de los genes de la hormona paratiroidea (PTH) cuando la concentración de calcio se encuentra en los límites superiores normales. Además, el calcitriol inhibe también a genes involucrados en la inflamación y en la proliferación tales como los genes de interleucinas (IL) y del receptor del factor de crecimiento epidermal, EGF-R (del inglés, Factor Epidermal Growth), respectivamente <sup>9,14</sup>.

### **3.7. Calcitriol y calbindinas**

Uno de los efectos más importantes del calcitriol consiste en el estímulo de la síntesis de calbindina (CaBP), proteína involucrada en el control de la homeostasis del calcio y que pertenece a la gran familia de proteínas transportadoras de calcio. Las dos principales CaBPs incluyen a la CaBP-9k (9000 Mr) que se encuentra en el riñón de ratón e intestino de mamíferos y a la CaBP-28k (28000 Mr) que se localiza

en el riñón, páncreas y cerebro de mamíferos y en riñón, intestino y páncreas de aves. Los primeros estudios sobre CaBPs en el intestino y riñón han mostrado que esta proteína es responsable del transporte de calcio intracelular desde el lado apical hacia el basolateral donde el calcio es exportado al medio extracelular por la acción de bombas de calcio localizadas en la membrana citoplasmática <sup>15,16</sup>.



**Figura 7.** Mecanismo general de la regulación de la transcripción de genes blanco del calcitriol <sup>64</sup>.

### 3.8. Placenta, vitamina D y calbindinas

La placenta tiene un papel primordial en el transporte de nutrientes e inmunoglobulinas y es considerada como un órgano endocrino y transitorio.

Aunque la expresión y la actividad del gen CYP27B1, ocurre principalmente en el riñón, su presencia en sitios extrarrenales ha sido demostrada. Las células del trofoblasto (parte fetal de la placenta) aisladas de la placenta sintetizan el calcitriol. Este sitio extrarrenal de síntesis de calcitriol se encuentra relacionado con la regulación de la proliferación y diferenciación celular, en la modulación de la respuesta inmune y en la homeostasis del calcio a nivel materno, fetal y/o local.

En la placenta humana, se ha demostrado la presencia de productos de transcripción del gen CYP27B1 de talla y secuencia de bases idénticas a los descritos para el gen que codifica a la enzima renal, así como la presencia del receptor del calcitriol (VDR) <sup>17-20</sup>. Por lo tanto, la presencia simultánea del calcitriol y VDR indica que la vitamina D presenta efectos biológicos en la placenta. Como se

mencionó anteriormente, uno de los efectos más reconocidos del calcitriol consiste en estimular la síntesis de la CaBP-28k, cuyo RNA mensajero ha sido demostrado recientemente en la placenta humana <sup>21</sup>.

### **3.9. Peroxidación de lípidos durante el embarazo**

Además de los leucocitos y el endotelio maternos, la placenta representa una fuente importante de ROS y RNS <sup>22</sup>.

En efecto, se ha mostrado la presencia en la placenta de las enzimas xantina oxidasa y de la NADPH oxidasa (Nicotiamida Adenina Dinucleótido Fosfato), enzimas generadoras del anión superóxido así como de la nitrotirosina, metabolito del anión peroxinitrito, especies reactivas que tienen efecto en los compartimientos materno y placentario alterando la función endotelial y por ende la circulación materna y el flujo útero placentario. Sin embargo, el estrés oxidativo que se genera es contrareestado por el adecuado estado nutricional materno a través de las vitaminas E y C,  $\beta$ -carotenos y selenio. Además, la placenta contiene las enzimas antioxidantes; superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Estudios recientes incluyen a la vitamina D y a la CaBP-28k, proteína transportadora del calcio intracelular, como sustancias antioxidante <sup>16,23-26</sup>.

Con la finalidad de tener mayor conocimiento sobre el estrés oxidativo, a continuación se abre un paréntesis sobre las especies reactivas y las etapas de la peroxidación de lípidos.

La peroxidación de lípidos es el resultado de reacciones entre especies reactivas de oxígeno, ROS (del inglés, Reactive Oxygen Species), y de nitrógeno, RNS (del inglés, Reactive Nitrogen Species), particularmente, con ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en forma de fosfolípidos en las membranas citoplásmicas de las células.

Las siguientes reacciones están involucradas en la generación de las ROS:

- $O_2 + e^-$ , la reducción del oxígeno da lugar al anión superóxido,  $O_2^{\cdot-}$
- $2 O_2^{\cdot-} + 2H^+$  produce al peróxido de hidrogeno,  $H_2O_2 + O_2$

-  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\cdot-}$  genera los radicales hidroxilos,  $\text{HO}^{\cdot}$  y  $\text{HO}^{\cdot} + \text{O}_2$

Las RNS comprenden al óxido nítrico ( $\text{NO}^{\cdot}$ ) y al peroxinitrito ( $\text{ONOO}^{\cdot-}$ ). El  $\text{ONOO}^{\cdot-}$  se genera a través de la reacción  $\text{NO}^{\cdot} + \text{O}_2^{\cdot-}$ <sup>27</sup>.

### 3.9.1. Etapas de la peroxidación de lípidos

Tal como se muestra en la tabla 1 la peroxidación de lípidos se lleva a cabo en tres etapas: la iniciación, la propagación y la terminación.

Etapa	Reacciones
Iniciación	$\text{RH (AG poliinsaturado)} + \text{iniciador (HO}^{\cdot}) \rightarrow \text{R}^{\cdot} \text{ (radical alilo)} + \text{H}_2\text{O}$
Propagación	$\text{R}^{\cdot} + \text{O}_2 \rightarrow \text{ROO}^{\cdot}$ (radical peroxilo) $\text{ROO}^{\cdot} + \text{RH} \rightarrow \text{ROOH (hidroperóxido)} + \text{R}^{\cdot}$ $\text{ROOH} \rightarrow \text{RO}^{\cdot}$ (radical alcoxilo) + $\text{HO}^{\cdot}$ $2\text{ROOH} \rightarrow \text{ROO}^{\cdot} + \text{RO}^{\cdot} + \text{H}_2\text{O}$
Terminación	$\text{ROO}^{\cdot} + \text{ROO}^{\cdot} \rightarrow \text{O}_2 + \text{productos no radicales}$

**Tabla 1.** Etapas de la peroxidación de lípidos<sup>67</sup>.

Durante la iniciación cualquier especie ROS o RNS oxida un lípido generando así una especie reactiva conocida como radical alilo (R), el cual es el propagador de la peroxidación de lípidos. En la propagación se pueden generar hasta seis radicales. Los productos finales que se generan durante la terminación de la peroxidación de lípidos comprenden a los hidrocarburos volátiles, los alcoholes, los aldehídos y el malondialdehído (MDA), los cuales se difunden en el organismo alterando la permeabilidad vascular, provocando inflamación, edema, entre otros efectos. La determinación de la concentración del MDA sirve como indicador de la peroxidación de lípidos<sup>22,28</sup>.

Cabe mencionar que la generación de ROS y RNS ocurre normalmente en las células y no presenta efectos dañinos siempre y cuando el sistema antioxidante se encuentre en equilibrio con estas especies reactivas<sup>28</sup>.

### **3.10. Vitamina D, calbindina y estrés oxidativo**

La vitamina D se asocia de manera directa o a través de la CaBP-28k con el estrés oxidativo. En la experimentación animal, la presencia de vitamina D revierte la peroxidación de lípidos en homogenados de cerebro de rata, efecto antioxidante mayor a lo observado con el trolox, análogo de la vitamina E <sup>23</sup>. La ausencia del receptor intracelular de la vitamina D en el ratón se asocia con el incremento en la expresión del 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, indicador del daño del DNA por estrés oxidativo, lo que indica que la acción genómica de la vitamina D es necesaria para prevenirlo <sup>24</sup>. Además, la presencia de calcitriol en cultivos celulares de cerebro de rata revierte el aumento en la concentración intracelular de especies reactivas de oxígeno inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> <sup>25</sup>. Como se mencionó anteriormente, la expresión y síntesis de la CaBP-28k es inducida principalmente por el calcitriol <sup>15,16</sup>. De esta manera, los efectos antioxidantes de la vitamina D pueden estar asociados a esta proteína transportadora de calcio intracelular. Interesantemente, la CaBP-28k disminuye significativamente la concentración de la nitrotirosina, indicador de peroxinitritos, en línea celular de islotes de páncreas <sup>26</sup>.

### **3.11. Calcio, vitamina D, estrés oxidativo y preeclampsia**

El calcio se obtiene a través de la ingesta y precisa de la vitamina D para su absorción intestinal. El calcio participa en la mineralización del hueso y en funciones vitales, como la transmisión nerviosa, la contracción muscular, la coagulación sanguínea, las secreciones hormonales y digestivas, la diferenciación, la unión y la proliferación celulares <sup>29</sup>.

La preeclampsia (PE) es un síndrome que se diagnostica por la presencia simultánea de hipertensión y proteinuria con ó sin edema <sup>30</sup>. La PE es más frecuente en jóvenes durante el primer embarazo y en nulíparas de mayor edad. Por falta de control prenatal, la PE puede complicarse en eclampsia (forma convulsiva de la PE) ó en síndrome de HELLP (H del inglés, hemolysis), (EL del inglés, elevated liver enzymes) (LP del inglés, low platelet counten), los síntomas son: enzimas hepáticas elevadas, desintegración de glóbulos rojos y bajo número de plaquetas, lo que hace

de la PE la principal causa de muerte materna en el mundo <sup>31</sup> y en México <sup>65,66</sup>. En estas condiciones, la interrupción del embarazo es imperativa para evitar la muerte y/o del feto. Además de la hipertensión, la PE se asocia con retraso del crecimiento fetal a consecuencia de la reducción en el flujo útero-placentario <sup>30</sup>, lo que hace de los recién nacidos de mujeres PE como sujetos de riesgo para alteraciones metabólicas en su vida adulta <sup>32</sup>. La etiología de la PE es seguramente multifactorial incluyendo al calcio como factor nutricional. En efecto, se ha observado una relación inversa entre la ingestión de calcio y la incidencia de la eclampsia <sup>33</sup>. Además, estudios de suplementación con calcio a mujeres embarazadas han mostrado una reducción en la presentación de PE, particularmente en mujeres cuya ingestión de calcio se encontraba por debajo de las recomendaciones <sup>34</sup>. La PE se asocia con alteraciones en el metabolismo de calcio y de la vitamina D. Las mujeres con PE presentan hipocalciuria <sup>35</sup>, bajas concentraciones de calcio y de calcitriol <sup>36</sup> y disminución en la actividad y expresión de la enzima involucrada en la síntesis de esta hormona <sup>19</sup>. Por otra parte, la PE se asocia con aumento en la peroxidación de lípidos <sup>37</sup>.

#### **4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

El embarazo es una condición fisiológica que implica readaptaciones del sistema endocrino de la vitamina D necesarias para que se presente un incremento en el paso transplacentario de calcio hacia el feto <sup>38</sup>. En el embarazo normal, la concentración de calcitriol, forma hormonal de la vitamina D, en la sangre materna aumenta desde el primer trimestre hasta alcanzar valores mayores al doble en la gestación a término <sup>8</sup>. Estas elevadas concentraciones de calcitriol tienen como finalidad aumentar la absorción intestinal de calcio en la madre para así cumplir el requerimiento nutricional de 7 mmol/día al final del embarazo<sup>38</sup>. En la placenta se expresan las calbindinas 9k y 28k, proteínas que participan en la transferencia de calcio hacia el feto <sup>29</sup>, cuya expresión génica y síntesis son dependientes del calcitriol <sup>39</sup>. La preeclampsia representa la principal causa de muerte materna en México <sup>65,66</sup> y en el mundo <sup>31</sup>, es una enfermedad hipertensiva inducida por el embarazo que presenta una disminución en la capacidad antioxidante <sup>22</sup> y un aumento en la peroxidación de lípidos en el organismo <sup>37</sup>, ocasionando daños en la permeabilidad vascular, inflamación, edema, mutaciones en el DNA y apoptosis <sup>22</sup>. Debido a que la placenta sintetiza al calcitriol y a las calbindinas y a que autores han propuesto a ambos como factores antioxidantes <sup>16,23-26</sup>, el problema de nuestra investigación consistió en establecer la existencia de un posible efecto del calcitriol sobre la expresión génica de las calbindinas así como su relación con la peroxidación de lípidos en la placenta de mujeres embarazadas sanas.

#### **5. JUSTIFICACIÓN**

La preeclampsia se asocia con bajas concentraciones de calcitriol <sup>19,20</sup>. Además, la actividad y expresión de la enzima involucrada en la síntesis de calcitriol está disminuida en placentas de mujeres preeclámpticas <sup>16</sup>. Teóricamente estas alteraciones darían lugar a una reducción en la expresión de las calbindinas, proteínas transportadoras de calcio, lo que explicaría un incremento en la peroxidación de lípidos en la placenta de mujeres PE, relaciones que no han sido estudiadas. Por lo anterior, el estudio del efecto del calcitriol sobre la expresión

génica de las CaBPs y su asociación con la peroxidación de lípidos en placentas obtenidas de mujeres normotensas representa una primera etapa para aportar información sobre algunos componentes que conllevan al estrés oxidativo que se presenta en la PE <sup>22</sup>.

## **6. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto del calcitriol sobre la expresión de las CaBPs 9k y 28k y su relación con la peroxidación de lípidos en células sinciotrofoblásticas en cultivo obtenidas de placentas humanas.

## **7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

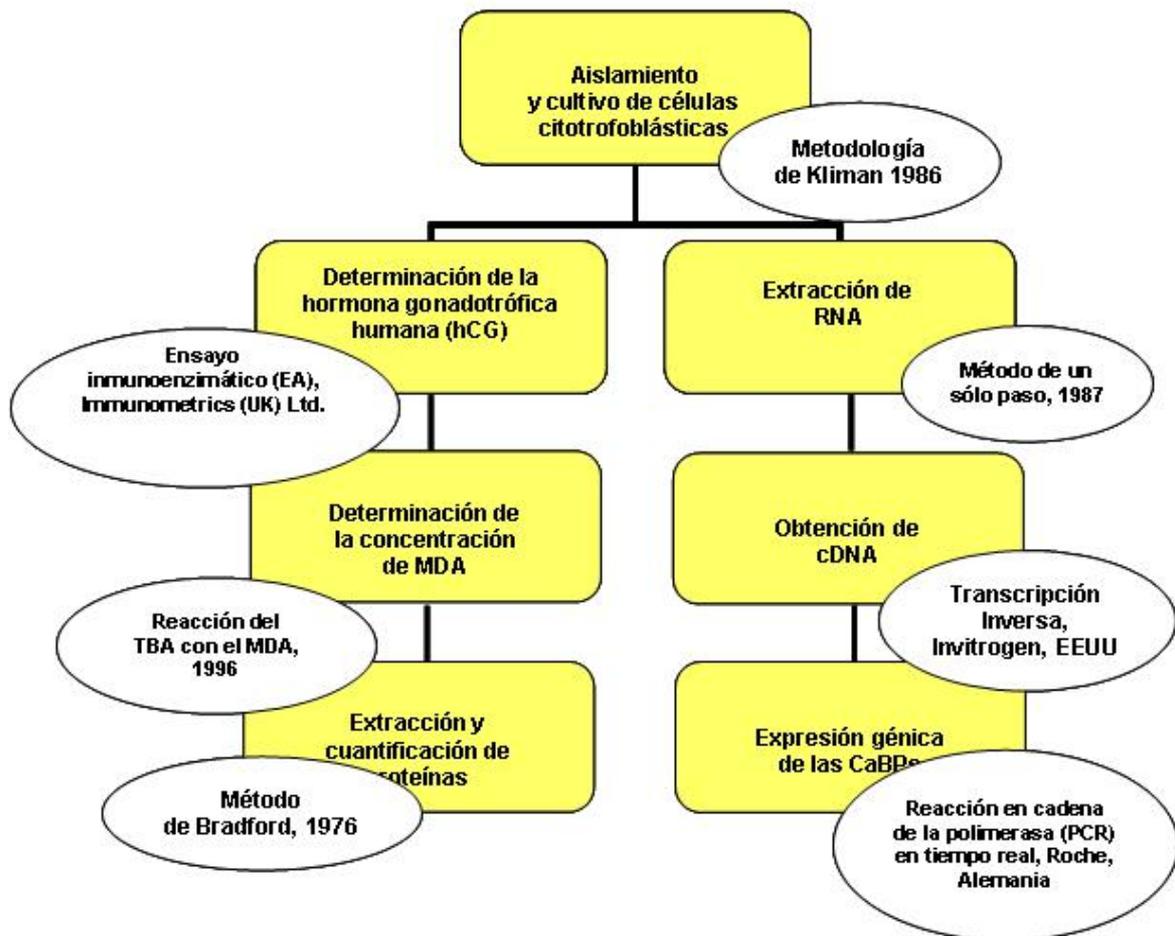
- Determinar si los sinciotrofoblastos en cultivo expresan los genes de las CaBPs -9k y -28k.
- Evaluar el efecto del calcitriol sobre la expresión génica de las CaBPs -9k y -28k en células sinciotrofoblásticas en cultivo.
- Evaluar el efecto del calcitriol sobre la concentración de malondialdehído.
- Observar la existencia de asociación entre el calcitriol y las CaBPs -9k y -28k con la peroxidación de lípidos en células sinciotrofoblásticas en cultivo.

## **8. HIPÓTESIS**

Debido a que el calcitriol estimula la expresión de las CaBPs y estos presentan efectos antioxidantes, entonces se esperaría una relación inversa entre el calcitriol y las CaBPs con la peroxidación de lípidos.

## 9. METODOLOGÍA

Para la realización del presente trabajo se llevaron a cabo los siguientes pasos metodológicos:



### 9.1. Muestra

Se identificó a pacientes programadas a operación cesárea. En el momento de la admisión se registraron los datos clínicos de las pacientes: nombre, edad, biológica, edad gestacional y número de gestas. En el parto, una vez expulsada la placenta se trasladó inmediatamente al laboratorio para realizar el cultivo celular.

## **Tamaño de la muestra**

Se colectaron en total 8 placentas, 3 para determinar el tiempo de experimentación y 5 para realizar los experimentos.

## **9.2. Placentas**

Las placentas fueron obtenidas por donación de mujeres embarazadas a término sometidas a operación cesárea. La realización del presente estudio fue aprobada por los Comités de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, institución en la cual se efectuó el estudio experimental. El Hospital General Manuel Gea González y la Clínica 4 de Ginecología y Obstetricia Luis Castelazo Ayala fueron las instituciones en las cuales se invitó a participar a las mujeres con embarazo a término. Durante la invitación se les informó del contenido del estudio y las que accedieron a participar se les solicitó firmar una carta de consentimiento informado, en la cual se especificó la naturaleza del estudio, los riesgos y beneficios del mismo, así como la donación de su placenta una vez expulsada (anexo I).

Los siguientes criterios se aplicaron durante la realización del estudio:

- *Criterios de Inclusión:* Mujeres con edad biológica de 18 a 35 años y embarazos a término (edad gestacional  $\geq$  37 semanas). Que tuvieron un solo recién nacido con Apgar de 7-10. Se incluyeron únicamente a mujeres normotensas, presión arterial sistólica  $<140$  mm Hg y/o presión arterial diastólica  $< 90$  mm Hg en por lo menos dos ocasiones. Además, la proteinuria de las participantes debía ser negativa o encontrarse en forma de trazas.
- *Criterios de Exclusión:* Antecedentes de hipertensión o preeclampsia. Mujeres embarazadas con enfermedades endocrinas, renales, hepáticas ó cardiovasculares.
- *Criterios de Eliminación:* Mujeres que decidieron abandonar voluntariamente el estudio.

Pacientes	Edad	Gestas	Semanas
1	34	2	38
2	28	3	38
3	26	2	38
4	32	2	38.5
5	28	3	39
6	19	2	39
7	27	2	39
8	24	3	40
9	24	3	39
10	33	2	39

### 9.3. Métodos

La descripción detallada de la preparación de reactivos se muestra en la parte de anexos. A continuación se describen las partes fundamentales de la metodología aplicada.

#### 9.3.1. Cultivo de trofoblastos de placentas humanas a término

Con la finalidad de obtener y cultivar citotrofoblastos provenientes de placentas humanas a término, capaces de crecer y diferenciarse a sinciotrofoblastos endocrinológicamente funcionales se realizaron las siguientes actividades.

El aislamiento de citotrofoblastos se basó en el método Kliman y col<sup>40</sup> con algunas modificaciones reportadas en trabajos previos publicados por el Departamento de Biología de la Reproducción<sup>17-19</sup>.

De las placentas recién colectadas, se tomaron muestras de los cotiledones, a las cuales se les eliminaron las membranas corioamnióticas y el tejido decidual. Posteriormente, las muestras se cortaron en pequeñas porciones que fueron sometidas a lavado con solución salina para quitar el exceso de sangre. Finalmente, los vasos sanguíneos y la decidua remanente se eliminaron de las muestras. Lo que resultó, dos submuestras de 50 g. cada una fueron colocadas en un matraz

Erlenmeyer de 2 L, reducidas en pequeños fragmentos y sometidas a tres digestiones enzimáticas (tabla 2).

Digestiones	HBSS 1x (mL)	Tripsina (0.5 mg/mL) (mL)	DNAsa I (0.1 µg/mL) (mL)
1 <sup>a</sup>	280	1.400	0.280
2 <sup>a</sup>	150	1.260	0.100
3 <sup>a</sup>	100	0.980	0.075

**Tabla 2.** Serie de digestiones con los reactivos que aparecen en la tabla.

\* HBSS 1x: Solución salina balanceada de Hanks' 1x (anexo III). Las enzimas se disolvieron en HBSS 1x. Desoxirribonucleasa I (DNAsa I) de páncreas bovino. (Reactivos de Sigma, Aldrich, EEUU)

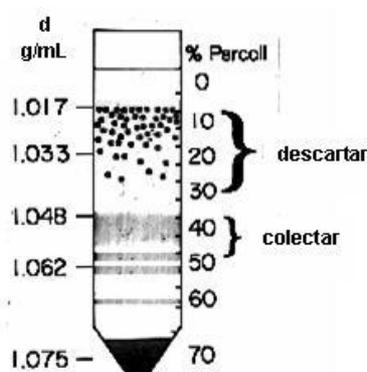
Debido a que el método para las tres digestiones fue similar, a continuación se describe el procedimiento aplicado a una de ellas. La muestra contenida en la solución de digestión se incubó en baño María durante 20 min. con agitación constante. El sobrenadante se aspiró y se colocó en un vaso de precipitado de 500 mL a cuyo cuello se le dispuso una red de pecera para evitar el paso de fragmentos de tejido. Posteriormente, el sobrenadante se colocó a razón de 45 mL en tubos Falcon de 50 mL. En la parte inferior de cada tubo Falcon se colocaron 5 mL de suero fetal de ternera (SFT, previamente inactivado y filtrado, (anexo II) (Invitrogen, EEUU) evitando mezclarlo con el sobrenadante. Los tubos se centrifugaron a 3,000 rpm (revoluciones por minuto) (centrífuga Sorvall RT7, USA) durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA) y el sobrenadante se aspiró y se descartó. El pellet obtenido se resuspendió con 0.6 mL de Medio de Tagle modificado por Dulbecco (DMEM) con L-alanil-L-glutamina, glucosa y piruvato de sodio (DMEM-HG) previamente mantenido a 37°C. Con este procedimiento se logró recuperar a los precipitados en un volumen total de 17 mL aproximadamente, provenientes de la suma de los 6 precipitados de las tres digestiones de cada submuestra de 50 g. los cuales fueron repartidos sobre los gradientes de Percoll previamente preparados como lo muestra la tabla 3.

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

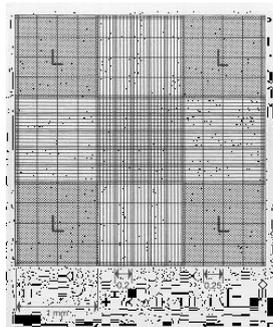
**Tabla 3.** Preparación de los tubos a diferentes porcentajes de Percoll para la preparación del gradiente de 70 a 5% equivalente a densidades que van desde los tubos 1 al 14 de 1.017 a 1.075 g/mL. Percoll al 90%: 18 mL de Percoll al 100% + 2 mL de HBSS 10x.

La preparación del gradiente se realizó como sigue. Después de mezclar con vórtex, el contenido de cada tubo se aspiró y se colocó con la ayuda de una bomba peristáltica en un tubo Falcon de 50 mL, iniciando con el tubo 1 (70% de Percoll) y terminando con el 14 (5% de Percoll). Fue importante fijar la velocidad del flujo de la bomba para permitir que las gotas del líquido resbalaran suavemente por la pared del tubo Falcon formando así capas sucesivas del gradiente. Después de colocar la muestra, los tubos del gradiente se centrifugaron a 3,000 rpm durante 20 min. a TA (Sorvall RT7, USA). Como resultado de la centrifugación, la muestra se distribuyó en 3 bandas tal como se muestra en la figura 8. La banda superior (5-30% de gradiente), contiene elementos de tejido conectivo, pequeños vasos y fragmentos de tejido velloso, se eliminó. La banda inferior (> 50% de gradiente) conformada por eritrocitos, linfocitos, neutrófilos y macrófagos no se tomó en cuenta. La banda intermedia; (40-50% de gradiente), fue la fase de interés en la cual estaban presentes las células citotrofoblásticas que se aspiraron, se colocaron en un tubo Falcon y se llevó a lavar con DMEM-HG previamente mantenido a 37°C.

Inmediatamente se centrifugaron a 3,000 rpm (Sorvall RT7, USA) durante 10 min. a TA, el sobrenadante se descartó y al precipitado se le agregaron 5 mL de medio DMEM-HG suplementado con SFT y antibióticos. Finalmente, se mezclaron las fases de interés de los tubos en uno sólo obteniendo un volumen de 15 mL y se tomó una alícuota de 10  $\mu$ L como muestra, la cual se diluyó con 90  $\mu$ L de solución de azul de tripán (dilución 1:10). De esta dilución se tomaron 10  $\mu$ L que fueron depositados sobre en un hemocitómetro (Boeco, Germany), figura 9, para el conteo celular con la ayuda de un microscopio óptico (Olympus CK2, Japón).



**Figura 8.** Bandas del gradiente de Percoll



**Figura 9.** Hemocitómetro o cámara de Neubauer. Se obtuvo el promedio de células presentes en las 4 áreas sombreadas (L), se multiplicaron por el factor de dilución (en este caso 10) y por 10,000 (constante) dando el número de células/mL.

La siembra se realizó en cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> a razón de 3'500,000 de células en 5 mL de medio DMEM-HG suplementado con SFT y antibióticos. A las 24 horas (h), se retiró el medio, se lavaron con 3 mL de HBSS 1x y se agregó 5 mL de medio DMEM-HG suplementado con SFT y antibióticos. A las 72 h. del cultivo se cambió por 5 mL de DMEM libre de SFT y suplementado con antibióticos (anexo III). La incubación se llevó a cabo en atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> 5% y aire 95% a 37° C durante 72 h. observando en microscopio óptico la evolución de las células cada 24 h. En el tercer día (72 h. de cultivo), se llevaron a cabo los diferentes estudios. Lo cual consistió en determinar la secreción de hCG (hormona gonadotrófica humana), la peroxidación de lípidos, la expresión de las calbindinas 9k y 28k y de la 25-hidroxitamina D-24 hidroxilasa, enzima que se consideró como control positivo de la acción del calcitriol. La evaluación de estas variables se realizó en presencia de diferentes concentraciones de calcitriol comparadas contra el vehículo.

### **9.3.2. Análisis morfológico**

Como se mencionó anteriormente, la observación del aspecto morfológico se realizó posterior a la siembra de las células y en cada día del cultivo, esto para determinar la adherencia, el grado de fusión y diferenciación de los citotrofoblastos. Lo anterior se realizó con la ayuda de un microscopio óptico marca Olympus CK2, Japón.

### **9.3.3. Determinación de la concentración de hCG por ensayo inmunoenzimático.**

La determinación de la concentración de hCG en el medio de cultivo se realizó mediante un ensayo inmunoenzimático (EIA) tipo "sandwich" utilizando un kit comercial (Immunometrics, Inglaterra). La cantidad de hCG en la muestra se determinó mediante dos anticuerpos monoclonales anti-hCG. Las partículas magnéticas del primer anticuerpo se unen a la región 'C-terminal de la cadena β de la hCG. Después mediante dos lavados se eliminaron los excesos de partículas libres y otros compuestos de la muestra, el segundo anticuerpo marcado con la enzima fosfatasa alcalina se une a las partículas magnéticas unidas a la hCG y el exceso del segundo

anticuerpo es eliminado por dos lavados sucesivos. Finalmente se agrega un sustrato cuya reacción con la enzima desarrolla un cambio de color (de amarillo a rosa) como consecuencia de la desfosforilación del sustrato. El cambio de color es proporcional a la cantidad de hCG presente en la muestra.

Este ensayo consistió como sigue. Los tubos de plástico conteniendo 100  $\mu$ L de muestra ó de estándar hCG (0, 8, 14, 65, 250 y 900 UI/L) y 100  $\mu$ L del primer anticuerpo se sometieron a incubación a 37°C por 15 min. en baño María. Al finalizar la incubación, los tubos se colocaron en una gradilla cuya base es magnética durante 10 min., lo que atrae de manera firme hacia el fondo al complejo anticuerpo-partículas magnéticas-hCG, dejando por encima a los demás componentes de la muestra y al exceso de anticuerpo libre, los cuales se eliminaron mediante dos lavados y decantación con 500  $\mu$ L de amortiguador. Los tubos conteniendo al complejo primer anticuerpo-hCG se incubaron en baño María durante 1 h. a 37°C en presencia de 250  $\mu$ L del segundo anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina. De esta manera se formó otro complejo conformado por primer anticuerpo-hCG-segundo anticuerpo que se mantiene al fondo de los tubos, y el exceso del segundo anticuerpo se eliminó mediante dos lavados y decantación con 500  $\mu$ L de amortiguador. Al complejo primer anticuerpo-hCG-segundo anticuerpo contenido en los tubos se le agregaron 500  $\mu$ L de sustrato de la enzima y se dejó incubar en baño maría por 30 min. a 37° C, lo que resultó en un cambio de color debido a la desfosforilación del sustrato. Al cabo de la incubación se agregó 1 mL de solución de paro para detener la reacción, lo que permitió leer las densidades ópticas de la curva estándar y de las muestras a 550 nm. en un espectrofotómetro (Clima Plus 1093, Europa) previamente calibrado. La concentración de hCG fue expresada como UI/mg de proteína.

#### **9.3.4. Peroxidación de lípidos**

El malondialdehído (MDA) es uno de los productos finales y estables de la peroxidación de lípidos, razón por la cual su determinación es utilizada como indicador de la lipoperoxidación. La determinación de la concentración del MDA se

realizó según el método conocido como agentes reactivos con el ácido tiobarbitúrico (TBA) <sup>41</sup>. El procedimiento para la determinación del MDA se llevó a cabo tal como se describe a continuación. A un volumen de 900 µL de medio de cultivo se les agregaron 90 µL de butirilhidroxitolueno (BHT) 2 mM para detener la peroxidación endógena de lípidos en las muestras. Para la preparación de la curva estándar de MDA se utilizó el 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP). El TMP es el MDA bis dimetil acetato:  $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$  A partir de la solución de trabajo de TMP 0.2 mM se realizaron 5 diluciones con agua desionizada para obtener las concentraciones de MDA que se muestran a la tabla 4.

Tubo	TMP (0.2 mM) µL	Agua desionizada µL	Volumen final µL	Concentración de MDA (µM)
0	0.00	400.0	400	0.00
1	0.50	399.5	400	0.01
2	1.00	399.0	400	0.02
3	1.50	398.5	400	0.03
4	2.00	398.0	400	0.04
5	3.00	397.0	400	0.06

**Tabla 4.** Curva estándar de MDA a partir de TMP.

El ensayo se llevó a cabo como sigue. A cada tubo de la curva y muestras se le agregaron 50 µl de BHT 12.6 mM para detener cualquier peroxidación residual, 400 µl de ácido ortofosfórico para catalizar la reacción y 50 µl de TBA 0.11 M. Los tubos fueron cerrados con tapón de rosca y se procedió a incubarlos en baño María a 90°C durante 45 min., se enfriaron en hielo y se agregó 1 mL de n-butanol, solvente en el cual se recuperó la fase lipídica y 100 µl de solución saturada de NaCl para separar las fases, inferior acuosa y superior lipídica. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 3,000 rpm durante 3 min. (centrífuga Beckman J-6B, USA). La fase lipídica se transfirió a tubos de vidrio y se procedió a la lectura de su absorbancia a

535 nm y 572 nm en el espectrofotómetro (Beckman DU-6, USA), tomando en cuenta la absorbancia (ABS) que resultó de la diferencia entre ABS a 572 nm – ABS a 535 nm. En nuestro experimento, las absorbancias a 535 nm. fueron generalmente equivalentes a 0 ó cercanas a este valor. Los resultados de MDA fueron expresados como  $\mu\text{m}/\text{mg}$  de proteína.

### **9.3.5. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

Con la finalidad de cuantificar la cantidad de proteínas totales obtenidas de las células en cultivo se utilizó el método de Bradford <sup>42</sup>. El principio de éste método consiste en que el azul brillante de Coomassie en solución ácida (conocido como reactivo de Bradford de coloración café cuando no reacciona con proteínas) forma uniones con los aminoácidos básicos y aromáticos, particularmente arginina, produciendo color azul cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas. A las células se les retiró el medio de cultivo, se les agregaron 500  $\mu\text{L}$  de solución de lisis (RIPA), se rasparon y se homogenizaron en la solución de lisis. La albúmina bovina en suero (BSA) se utilizó para preparar la curva estándar (0.0, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5  $\text{mg}/\text{mL}$ ) a partir de una solución de trabajo de 0.2  $\text{mg}/\text{mL}$ . En placas de 96 pozos se colocaron por duplicado los estándares y 8  $\mu\text{L}$  de muestras diluidas 1:3, seguido de lo cual se agregaron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford diluido 1:5. Después de 5 min. de incubación, se procedió a la lectura de la absorbancia a la longitud de onda de 595 nm. en un espectrofotómetro (Labsystems 352, USA) en un lapso de tiempo no mayor a 30 min.

### **9.3.6. Purificación de RNA total por el método de un solo paso**

La extracción del RNA total de las células se llevó a cabo por el método de un solo paso <sup>43</sup>. A las cajas de cultivo de 25  $\text{cm}^2$  se les retiró el medio de cultivo y se agregó a cada una 1 mL de TRIzol. Las células fueron raspadas y colectadas en tubos Eppendorf, a los cuales se les adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo frío para favorecer la formación de fases. Después se centrifugaron a 12,000 rpm. durante 20 min. a 4° C (microcentrífuga Eppendorf 5417R, USA), obteniendo una fase superior

acuosa que contenía los RNAs, la cual fue transferida a otro tubo Eppendorf evitando arrastrar proteínas de la interfase. Para precipitar el RNA, se agregaron 500  $\mu$ L de isopropanol a los tubos que fueron centrifugados a 12,000 rpm. durante 10 min. a 4° C. El sobrenadante se descartó y el precipitado conteniendo el RNA fue lavado con 1 mL de etanol (75% en agua libre de RNAsas DEPC). Posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 min. a 4°C, el sobrenadante se eliminó y se invirtieron los tubos para evaporar cualquier gota de etanol dejando únicamente el precipitado, el cual fue disuelto agregando 20  $\mu$ L de agua DEPC.

Para la cuantificación de RNA, 2  $\mu$ L de la muestra se colocaron en tubos conteniendo 1 mL de agua desionizada estéril. Las absorbancias de las muestras y del blanco (agua desionizada estéril) fueron leídas a 260 y 280 nm. en un espectrofotómetro (Beckman DU-6, USA) y se procedió a calcular la concentración de RNA de la siguiente manera. Tomando en cuenta que una absorbancia con valor de 1 equivale a 40  $\mu$ g/mL y que se utilizaron 2  $\mu$ L de muestra de RNA diluida en 1 mL, la concentración de RNA sería:

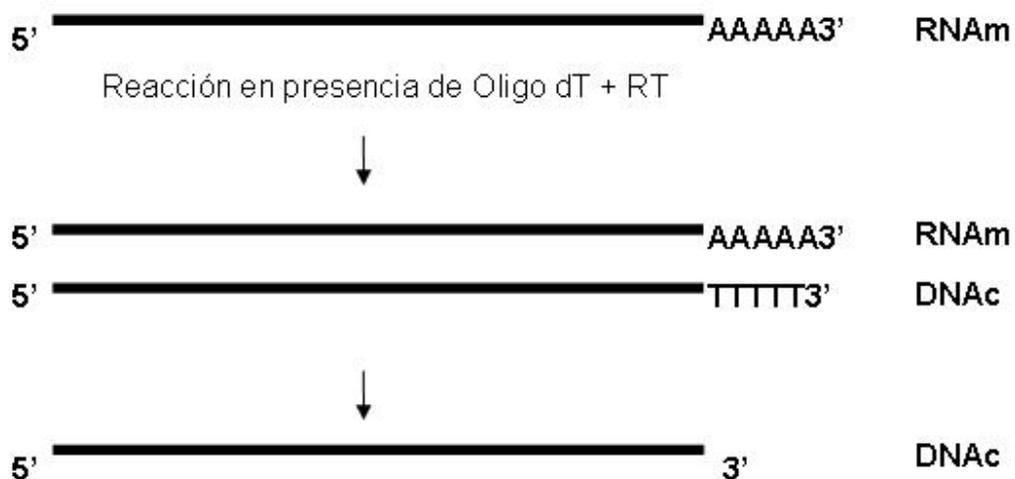
$$\text{Concentración de RNA (en } \mu\text{g}/\mu\text{L)} = A_{260 \text{ nm}} \times 40/2 = A_{260 \text{ nm}} \times 20$$

Como indicador de la pureza del RNA se dividió la absorbancia a 260 nm. entre la absorbancia a 280 nm., y se tomaron en cuenta únicamente las muestras que presentaron valores entre 1.8 y 2, rango que indica pureza aceptable de RNA. Por ejemplo para un valor de 0.57, la muestra contiene 0% de RNA y 100% de proteínas. En cambio cuando el valor es de 2, la muestra contiene 100% de RNA y 0% de proteínas.

### **9.3.7. Transcripción inversa (RT)**

Para los estudios de RT y de PCR en tiempo real se utilizaron los estuches comerciales Transcriptor First Strand cDNA Synthesis y Light Cycler Taqman Master así como sondas marcadas de Roche (Mannheim, Alemania). Para la obtención del DNAc, se utilizó 1  $\mu$ g de RNA, al cual se le agregó 1  $\mu$ L de iniciador oligo (dT) y se

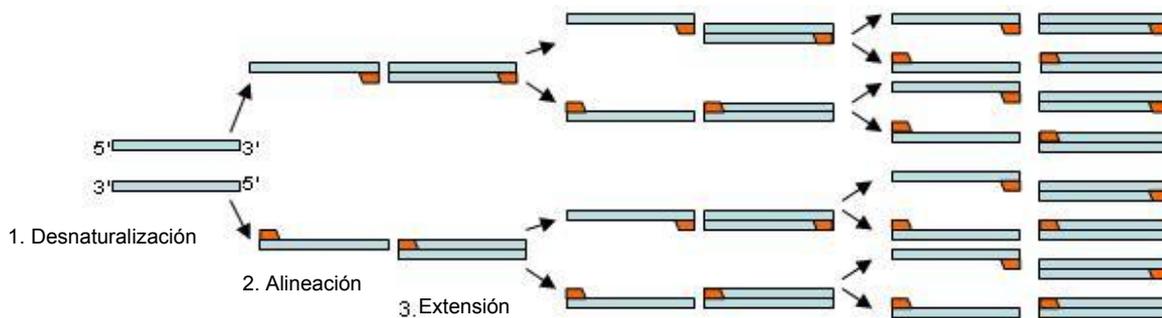
llevó a un volumen final de 15  $\mu$ L con agua grado PCR y se dejó incubar por 10 min. a 65°C en el termociclador (Perkin-Elmer 9600, EEUU). Durante el tiempo de incubación se preparó la mezcla RT. En un tubo Eppendorf se preparó un volumen de mezcla RT suficiente para el número total de muestras + 2. Para cada muestra, se agregaron 4  $\mu$ L de amortiguador 5x, 0.5  $\mu$ L de inhibidor de RNAsa, 2  $\mu$ L de una mezcla de los cuatro desoxiribonucleótidos (dNTPs) y 0.5  $\mu$ L de transcriptasa reversa. Al finalizar la incubación con los oligos (dT), los tubos se colocaron en hielo durante 1 min., se agregó 7  $\mu$ L de la mezcla RT previamente preparada y se procedió a la reacción RT en el termociclador incubando a 55° C por 30 min. seguido de otra incubación a 85° C por 5 min. y finalmente se dejó enfriar a 4° C. Debido a la presencia de los iniciadores oligo (dT), la enzima transcriptasa reversa tomó como moldes de lectura únicamente los RNAs mensajeros los cuales presentan una cola poli A en su extremo 3' tal como se observa en la figura 10.



**Figura 10.** Síntesis de DNA complementario (DNAc) a partir del RNA mensajero (RNAm)

### 9.3.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

La PCR en tiempo real involucra a los procesos de amplificación y cuantificación del gen de interés de manera simultánea (figura 11).



**Figura 11.** Reacción en cadena de la polimerasa.

Las sondas de hidrólisis consisten en secuencias complementarias a un segmento del gen de interés y marcadas con un fluorocromo donador localizado en el extremo 5' y de un aceptor ubicado en el extremo 3' de la sonda. Cuando la sonda se encuentra íntegra, el donador no emite fluorescencia que pueda ser detectada. Durante la PCR el desplazamiento de la DNA polimerasa que tiene actividad 5' exonucleasa la sonda se hidroliza a partir del extremo 5' liberando al donador, los nucleótidos y el aceptor. De esta manera, el donador libre emite fluorescencia que es captada por un lector con una intensidad de emisión proporcional a la cantidad de amplicones generados en cada ciclo y de manera indirecta a la cantidad inicial del RNAm extraído de la muestra. En el presente estudio la expresión génica de la CaBP-28k y la 24 hidroxilasa fue normalizada con la expresión de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), gen constitutivo cuya expresión es independiente de cualquier estímulo o inhibición, pero refleja la cantidad de RNA colocada de cada muestra. Por lo anterior, su expresión es muy importante cuando hay riesgo de no reproducibilidad en la carga de las muestras. Para la amplificación del DNAc y cuantificación de la expresión génica se utilizó el equipo LightCycler 2.0 de Roche (Mannheim, Alemania). Tomando en cuenta el número de muestras (n) se preparó una mezcla PCR cuyo volumen fue equivalente a (n + 2) (2.5 µL de agua grado PCR, 0.1 µL de sonda + 0.2 µL de iniciador (primer) sentido + 0.2 µL de iniciador antisentido + 2 µL de DNA polimerasa Taqman). En tubos capilares se agregaron 5 µL de la mezcla PCR y 5 µL de DNAc, se procedió a su centrifugación a 1,000 rpm a

4°C durante 1 min., tiempo después del cual los capilares se colocaron en el carrusel el cual se colocó dentro del equipo previamente programado para realizar la PCR según las características siguientes:

- Preincubación a 95 °C por 10 min.
- Desnaturalización a 95°C por 10 s.
- Alineación a 60°C por 20-40 s.
- Extensión a 72°C por 1 s.
- Enfriamiento a 40°C por 30 s.

Las sondas de hidrólisis utilizadas para la CaBP28k y la GADPH fueron las etiquetadas con los números 40 y 60, respectivamente. Además la secuencia de los iniciadores sentido y antisentido utilizados se muestra en la tabla 6.

Producto	Secuencia	Orientación
CaBP28k	5'GGAGCTGCAGAACTTGATCC3'	Sentido
	5'TTTTCATTTTCAGGTGATAACTCCA3'	Antisentido
GADPH	5'AGCCACATCGCTGAGACAC3'	Sentido
	5'GCCCAATACGACCAAATCC3'	Antisentido

**Tabla 5.** Secuencia de los iniciadores utilizados <sup>68</sup>.

Con estos iniciadores se produjeron amplicones de 77 pb y de 66 pb para CaBP-28k y GADPH, respectivamente.

#### **9.4. Presentación y análisis estadístico de los resultados**

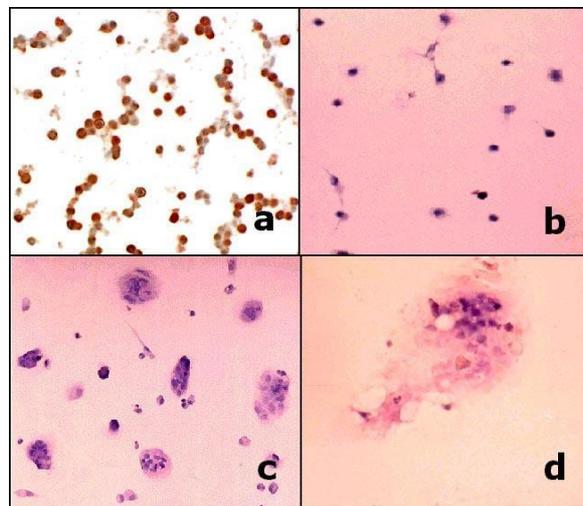
Para realizar la estadística se utilizó el software StatView para Macintosh, Abacus Concept, versión 4.02, 1992. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  DE (desviación estándar). Fueron obtenidos del análisis de varianza (ANOVA) y se sometieron a la prueba de Fisher para establecer diferencias estadísticas entre grupos. Las posibles asociaciones entre variables han sido analizadas mediante la prueba de regresión simple. En ambas pruebas utilizadas la significancia estadística se estableció a un valor de  $p < 0.05$ .

## 10. Resultados

Cabe mencionar que calcitriol utilizado durante la experimentación fue disuelto en etanol al 0.1%. Como control o testigo se utilizó al vehículo (vh) etanol al 0.1%. En las figuras las concentraciones de calcitriol están expresadas como logaritmo de la molaridad (LogM).

### 10.1. Aspectos morfológicos

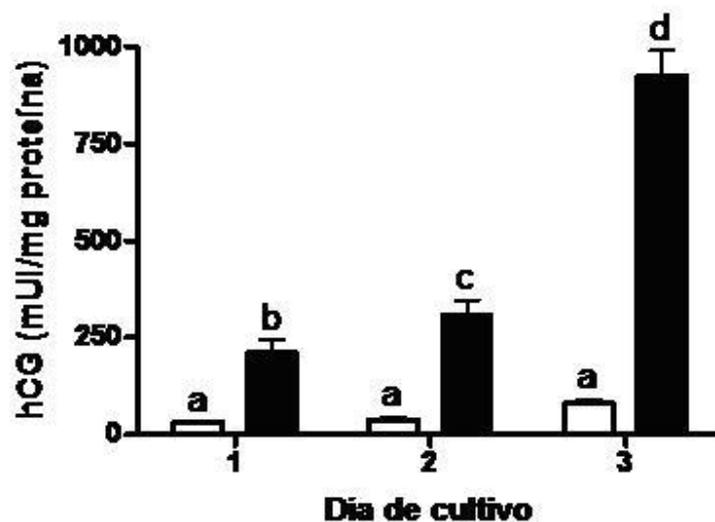
Como se observa en la figura 12, las células citotrofoblásticas aparecen en forma circular y son mononucleares al día 1 (figura 13a). A partir del día 2 (figura 13b) se observan proyecciones celulares para iniciar su fusión en el día 3 (figura 13c) formando los sinciciotrofoblastos que se caracterizan por ser multinucleares. En la figura 13d, se muestra un acercamiento para observar de manera detallada la morfología de un sinciciotrofoblasto del día 3. Cabe mencionar que los resultados que a continuación se describen fueron obtenidos de experimentos llevados a cabo durante el día 3 de los cultivos.



**Figura 13.** Se observó la caracterización morfológica y funcional de los trofoblastos en cultivo a través de un microscopio óptico, con objetivo 10x. Las células mononucleares ( $4 \times 10^6$  células/mL) se sembraron en cajas de RNA y se cultivaron durante 3 días. En la figura se observa la diferenciación del trofoblastos in vitro durante los días 1 (a), 2 (b), 3 (c) y acercamiento del día 3 (d) del cultivo.

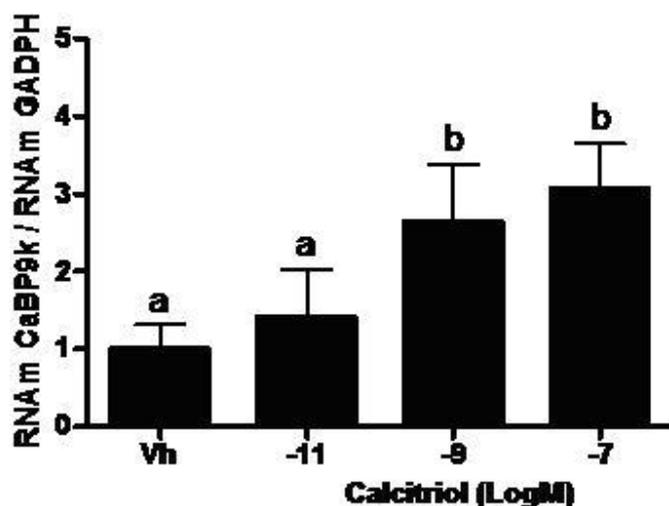
## 10.2. Secreción de hCG en diferentes días del cultivo

La secreción de hCG fue detectable desde el día 1 del cultivo (figura 13). Aún en ausencia de estímulo por el 8 Bromo AMP cíclico (8-Br AMPc), análogo estable del AMPc que actúa en la activación de la PKA para la síntesis de la hCG <sup>44</sup>. La concentración de hCG fue de  $31 \pm 4$  mUI/mg proteína al día 1 y aumentó a  $80 \pm 10$  mUI/mg proteína al día 3, presentando un aumento en cada día pero sin observarse diferencias significativas entre los días de cultivo. La presencia de 8-Br AMPc estimuló de manera significativa ( $p < 0.0001$ ) la secreción de hCG en cada uno de los días del cultivo. Además, el estímulo de la secreción de hCG inducido por el 8-Br AMPc aumentó de manera significativa en los días 2 y 3. Comparando al día 1 en el cual la concentración de hCG fue de  $210 \pm 36$  mUI/mg proteína, con los días 2 y 3 la concentración aumentó a  $308 \pm 38$  mUI/mg proteína y  $925 \pm 66$  mUI/mg proteína,  $p < 0.001$ .



**Figura 13.** Figura representativa de la secreción de hCG a diferentes días de cultivo en ausencia (barra clara) y en presencia de 8-Br AMPc (0.6 mM) (barra oscura). Los valores fueron normalizados con la cantidad de proteínas extraídas en cada caja. Los datos representan la media  $\pm$  DE del promedio de duplicados de 3 placentas. Caracteres diferentes muestran significancia estadística,  $p < 0.05$ .

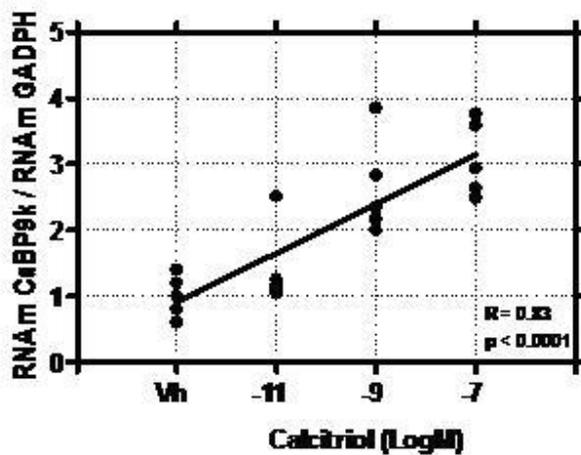
### 10.3. Efecto del calcitriol sobre la expresión placentaria de la CaBP-9k y asociación entre el efecto del calcitriol y la expresión placentaria de la CaBP-9k.



**Figura 14.** Efecto del calcitriol sobre la expresión placentaria de la CaBP-9k. Datos obtenidos por PCR en tiempo real. Los valores fueron normalizados con la expresión del gen constitutivo GADPH. Los datos representan la media  $\pm$  DE del promedio de duplicados de 5 placentas. Caracteres diferentes muestran significancia estadística,  $p < 0.05$ .

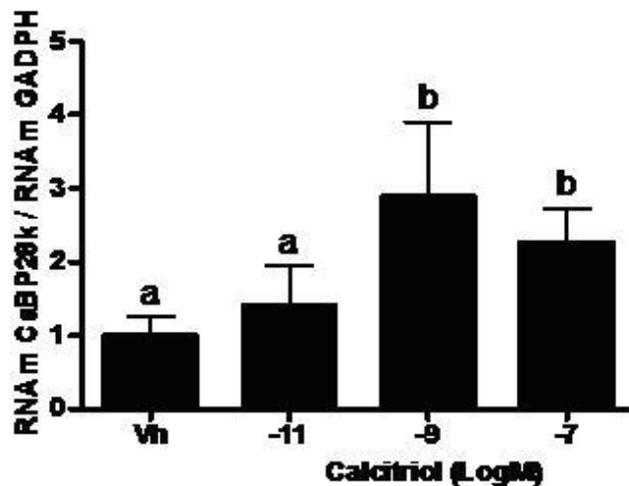
La figura 14 muestra los efectos del calcitriol sobre la expresión placentaria de la CaBP-9k. En comparación al vh, la expresión de la CaBP-9k no fue significativamente mayor a la concentración  $10^{-11}$ M ( $p = 0.28$ ), pero aumentó significativamente a las concentraciones  $10^{-9}$ M ( $p < 0.001$ ) y  $10^{-7}$ M ( $p < 0.0001$ ), sin presentarse cambios significativos entre los valores a éstas últimas concentraciones ( $p = 0.25$ ).

Tal como se observa en la figura 15, el análisis de regresión simple mostró una asociación significativa entre la expresión placentaria de la CaBP-9k y el efecto del calcitriol ( $R = 0.83$ ,  $p < 0.0001$ ).



**Figura 15.** Asociación entre el efecto del calcitriol y la expresión placentaria de la CaBP-9k. Datos obtenidos por PCR en tiempo real. Los valores fueron normalizados con la expresión del gen constitutivo GADPH. Cada punto representa la media del promedio de duplicados de 5 placentas.

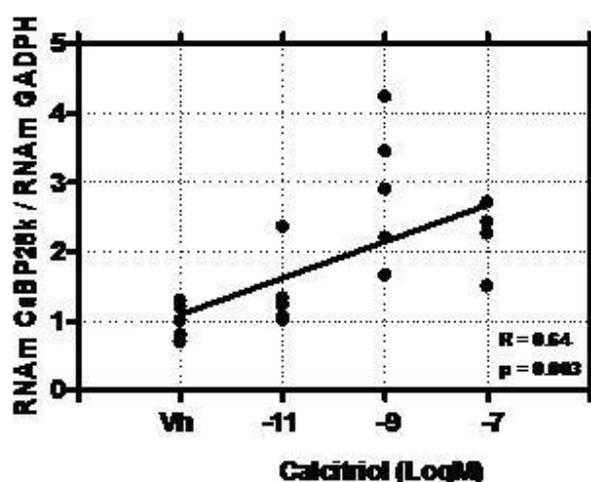
**10.4. Efecto del calcitriol sobre la expresión placentaria de la CaBP-28k y asociación entre el efecto del calcitriol y la expresión placentaria de la CaBP-28k.**



**Figura 16.** Efecto del calcitriol sobre la expresión placentaria de la CaBP-28k. Datos obtenidos por PCR en tiempo real. Los valores fueron normalizados con la expresión del gen constitutivo GADPH. Los datos representan la media ± DE del promedio de duplicados de 5 placentas. Caracteres diferentes muestran significancia estadística,  $p < 0.05$ .

De manera similar a lo observado en la expresión de la CaBP-9k, el efecto del calcitriol comparado con el del vh mostró que la expresión placentaria de la CaBP-28k fue 2.89 y 2.27 veces mayor a las concentraciones  $10^{-9}$  M ( $p < 0.001$ ) y  $10^{-7}$  M ( $p < 0.01$ ) (figura 16).

La expresión placentaria de la CaBP-28k fue dependiente de la concentración de calcitriol ya que se observó una asociación significativa entre estas dos variables ( $R = 0.64$ ,  $p = 0.003$ ) como se ilustra en la figura 17.



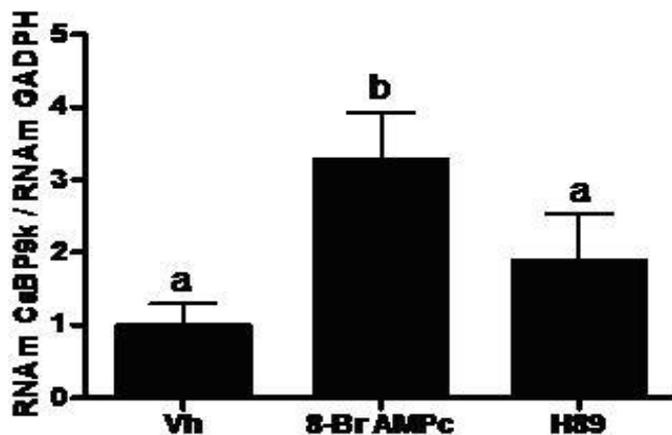
**Figura 17.** Asociación entre el efecto del calcitriol sobre la expresión placentaria de la CaBP-28k. Datos obtenidos por PCR tiempo real. Los valores fueron normalizados con la expresión del gen constitutivo GADPH. Cada punto representa la media del promedio de duplicados de 5 placenta.

Además de sus efectos a través de receptores nucleares, el calcitriol actúa a través de receptores de membrana que conllevan a la acumulación de AMPc<sup>45</sup> por lo que a continuación se presentan resultados sobre el efecto del 8 Br-AMPc, análogo que activa a la vía AMPc y del inhibidor selectivo de la proteína cinasa A (H89)<sup>46</sup>.

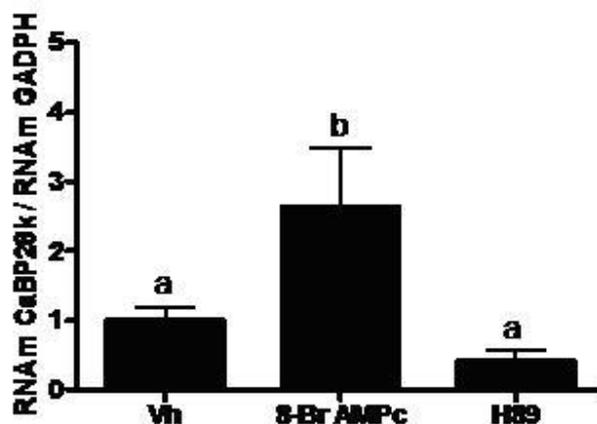
### 10.5. Efecto del 8-Br AMPc y del H89 sobre la expresión placentaria de las CaBPs-9k y-28k

Tal como se observa en las figuras 18 y 19, la expresión placentaria de las CaBPs-9k y-28k fue de 3.27 y 2.64 veces mayor, respectivamente, en presencia del

8-Br AMPc con respecto al vh ( $p < 0.01$ ). El H89 revertió el estímulo inducido por el 8-Br AMPc ya que las expresiones placentarias de las CaBPs -9k y-28k representaron el 57% y el 16%, respectivamente, de las observadas con el 8-Br AMPc ( $p < 0.0001$ ).



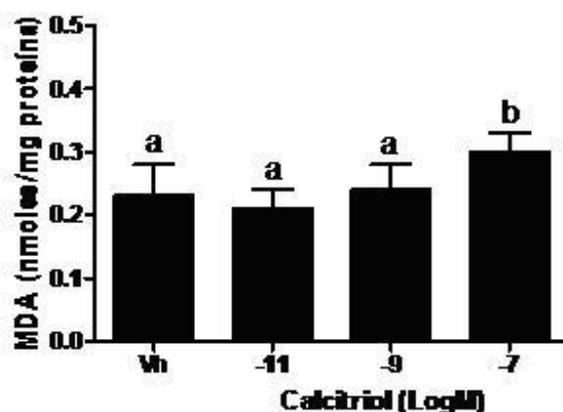
**Figura 18.** Efecto del 8-Br AMPc (0.6 mM) y del H89 (5  $\mu$ M) sobre la expresión placentaria de la CaBP-9k obtenida por PCR en tiempo real. Los valores fueron normalizados con la expresión del gen constitutivo GADPH. Los datos representan la media  $\pm$  DE del promedio de duplicados de 3 placentas. Caracteres diferentes muestran significancia estadística,  $p < 0.05$ .



**Figura 19.** Efecto del 8-Br AMPc (0.6 mM) y del H89 (5  $\mu$ M) sobre la expresión placentaria de la CaBP-D28k obtenida por PCR en tiempo real. Los valores fueron normalizados con la expresión del gen constitutivo GADPH. Los datos representan la media  $\pm$  DE del promedio de duplicados de 3 placentas. Caracteres diferentes muestran significancia estadística,  $p < 0.05$ .

## 10.6. Efectos del calcitriol sobre la concentración placentaria de MDA

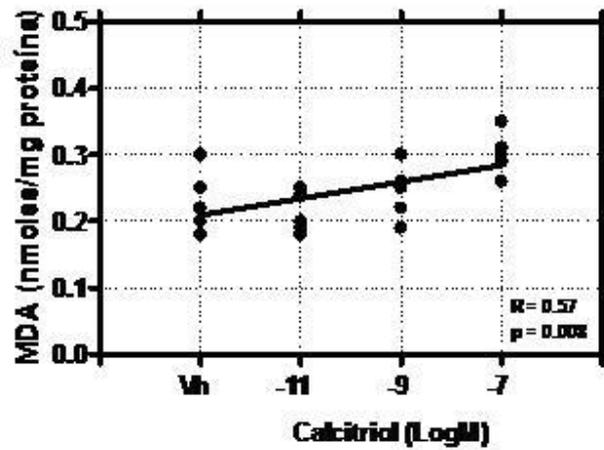
Como se observa en la figura 20, la concentración de MDA fue de  $0.23 \pm 0.05$  nmoles/mg proteína en las células tratadas con vehículo y no se observaron cambios significativos en presencia de calcitriol a las concentraciones de  $10^{-11}$  y  $10^{-9}$ M. Sin embargo, a la concentración más alta  $10^{-7}$ M, el calcitriol presentó un efecto estimulador ya que con este tratamiento la concentración de MDA fue 30% mayor a la observada con el vh ( $p = 0.03$ ).



**Figura 20.** Efecto del calcitriol sobre la concentración de MDA. Los valores fueron normalizados con la cantidad de proteínas extraídas de las células en cada caja. Los datos representan la media  $\pm$  DE del promedio de duplicados de 5 placentas. Caracteres diferentes muestran significancia estadística,  $p < 0.05$ .

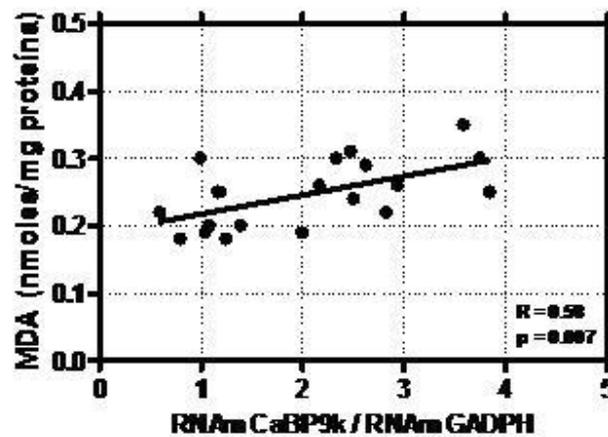
### 10.6.1. Asociación entre las concentraciones de MDA y el calcitriol

Las concentraciones de MDA y de calcitriol presentaron una asociación significativa ( $R = 0.57$ ,  $p = 0.008$ , figura 21).

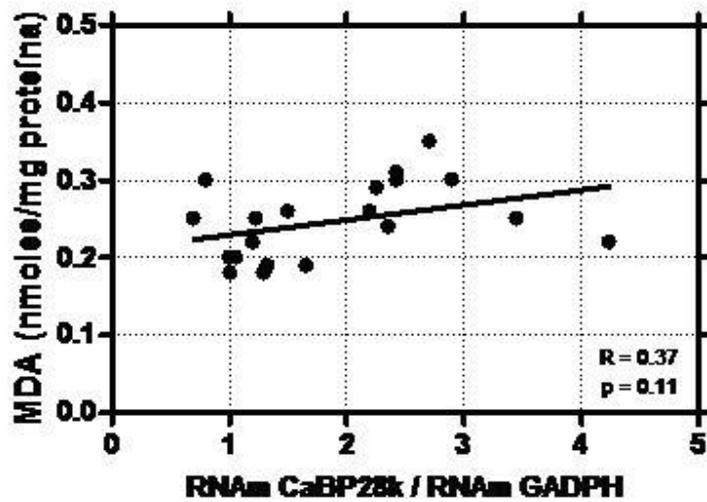


**Figura 21.** Asociación entre la concentración de MDA y los efectos de calcitriol. Los valores fueron normalizados con la cantidad de proteínas extraídas en cada caja. Cada punto representa la media del promedio de duplicados de 5 placentas.

### 10.6.2. Asociación entre las concentraciones de MDA y las CaBPs-9k y-28k



**Figura 22.** Asociación entre la concentración de MDA y la expresión placentaria de la CaBP-9k obtenida por PCR en tiempo real. Los valores fueron normalizados con la cantidad de proteínas extraídas en cada caja y los valores de la CaBP-9k con la expresión del gen constitutivo GADPH. Cada punto representa la media del promedio de duplicados de 5 placentas.



**Figura 23.** Asociación entre la concentración de MDA y la expresión placentaria de la CaBP-28k obtenida por PCR en tiempo real. Los valores fueron normalizados con la cantidad de proteínas extraídas en cada caja y los valores de la CaBP-28k con la expresión del gen constitutivo GADPH. Cada punto representa la media del promedio de duplicados de 5 placentas.

Las figuras siguientes muestran la asociación entre las concentraciones de MDA con las expresiones placentarias de las CaBPs-9k y-28k. Las concentraciones de MDA se asociaron de manera significativa con la expresión de CaBP-9k ( $R = 0.58$ ,  $p = 0.007$ ) pero no con la CaBP -28k ( $R = 0.37$ ,  $p = 0.11$ ), figuras 22 y 23, respectivamente.

## 11. DISCUSIÓN

El embarazo es una condición fisiológica que implica cambios morfológicos, metabólicos y endocrinológicos cuya finalidad es responder a las demandas feto-placentarias <sup>1</sup>. Durante esta etapa la placenta juega un papel primordial para el intercambio de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> así como el transporte de nutrimentos. Además, la placenta es un sitio de síntesis de hormonas peptídicas, esteroideas y de factores de crecimiento, sustancias que favorecen el desarrollo de la propia placenta y del feto <sup>47</sup>.

El objetivo del presente estudio consistió en estudiar los efectos del calcitriol, forma hormonal de la vitamina D sobre la expresión placentaria de las calbindinas 9k y 28k así como la relación entre estas proteínas transportadoras de calcio citosólico con la concentración de malondialdehído (MDA), indicador de la peroxidación de lípidos en un modelo de células de placenta humana en cultivo.

La metodología utilizada nos permitió observar la diferenciación y fusión de los citotrofblastos lo que resultó en la obtención de células sinciotrofblasticas cuyas características morfológicas (células multinucleadas) correspondieron a las descritas por otros autores <sup>20,48</sup>. Como indicador bioquímico de la función placentaria, se evaluó la capacidad de los sinciotrofblastos en secretar a la hormona gonadotrófica coriónica (hCG) <sup>49</sup>. La capacidad de síntesis y secreción de hCG es característica de las células placentarias. En el embarazo, la secreción de hCG se observa a partir de la implantación del trofoblasto en el útero, la cual se presenta a los 6-7 días post-concepción. La importancia de esta secreción radica en que la hCG estimula la síntesis y secreción de la progesterona por parte del cuerpo amarillo, hormona que garantiza el mantenimiento del embarazo hasta que la placenta inicie la síntesis y secreción de este esteroide <sup>47</sup>. La secreción de hCG se observó desde el primer día del cultivo sin cambios significativos en los demás días, lo que indica que la función endocrina de la placenta esta presente tanto en los citotrofblastos como en los sinciotrofblastos. Además, la secreción de hCG por los citotrofblastos demuestra la importancia de esta hormona desde etapas tempranas del embarazo. Es bien conocido que el AMP cíclico (AMPc) estimula la síntesis de hCG <sup>49</sup>. La presencia de 8 Br-AMPc, análogo estable del AMPc, aumentó significativamente las

concentraciones de hCG alcanzando un máximo al tercer día de cultivo, día que correspondió a la completa formación de los sinciotrofoblastos. Esta observación concuerda con los resultados obtenidos en estudios previos <sup>50</sup>.

Como se mencionó en el marco teórico el calcio citosólico es transportado por proteínas que presentan alta afinidad por este nutrimento y que son conocidas como calbindinas (CaBPs). La calbindina 9k (CaBP-9k) esta involucrada en la absorción intestinal de calcio mientras que la calbindina 28k (CaBP-28k) participa en la reabsorción renal de este ion <sup>15,16</sup>. En el presente estudio, los sinciotrofoblastos expresaron el RNAm de las dos formas de CaBPs lo que confirma los resultados previamente publicados por otros autores <sup>21,51</sup>. Belkacemi y col. <sup>21</sup> han observado mayor expresión de los RNAm de las dos formas de CaBPs en los sinciotrofoblastos que en los citotrofoblastos lo que indica su importancia en el incremento del paso transplacentario de calcio durante el tercer trimestre del embarazo.

El calcitriol es el principal factor que regula la homeostasis del calcio ya que estimula la síntesis de los canales que favorecen la entrada de calcio, de las CaBPs para fomentar su transporte intracelular y de la ATPasa dependiente de este ión así como del contratransportador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  para sacarlo de la célula <sup>7</sup>.

Durante el embarazo, la concentración del calcitriol aumenta lo que favorece el incremento en la absorción intestinal de calcio y el paso transplacentario de éste nutrimento <sup>52</sup>. Además del riñón, la placenta representa un sitio adicional de síntesis de calcitriol. En efecto, se ha demostrado que la placenta presenta capacidad de sintetizar el calcitriol <sup>17</sup>. Además, la 25-hidroxivitamina D-1 $\alpha$ -hidroxilasa, enzima responsable de sintetizar esta hormona a partir de su sustrato, la 25-hidroxivitamina D, ha sido identificada en la placenta humana <sup>18</sup>. Por otra parte, la placenta humana presenta el receptor de la vitamina D, el VDR <sup>20</sup>. Lo anterior hace de la placenta un sitio de síntesis y de acción del calcitriol.

La regulación de las CaBPs representa una de las acciones del calcitriol. El calcitriol aumentó la expresión de la CaBP-9k y de la CaBP-28k de manera dependiente de la dosis, observación apoyada por la presencia de una asociación

positiva y significativa entre las concentraciones del calcitriol y la expresión placentaria de cada una de estas proteínas transportadoras de calcio. El efecto estimulador del calcitriol puede ser mediado por su receptor, el VDR, ya que los genes blanco de esta hormona tales como los de la hormona paratiroidea (PTH), de la osteocalcina y de las CaBPs entre otros presentan elementos de respuesta a la vitamina D, VDREs, dentro de las 1000 bases de su promotor localizado antes del sitio de inicio de la transcripción. Los VDREs de estos genes presentan una cierta homología y están conformados por una secuencia de 15 bases. La CaBP-9k de rata presenta un VDRE localizado entre las bases -488 a -474 y su secuencia esta compuesta por GGGTGT CGG AAGCCC, mientras que los VDREs de la CaBP-28k de ratón presentan la siguiente secuencia GGGGAT GTG AGGAGA localizada entre las bases -197 a -182 <sup>53</sup>. En la literatura disponible actualmente no se encontró información acerca de los VDREs de las CaBPs en la placenta humana, lo que hace de este punto un tema que merece ser investigado.

Estudios han demostrado que el calcitriol aumenta la síntesis de AMPc en la placenta humana <sup>49</sup> lo que confirma los efectos rápidos del calcitriol. Debido a esta observación, en el presente estudio se valoró el efecto del 8-bromo AMPc, análogo estable del AMPc, sobre la expresión placentaria de las CaBPs. Interesantemente, el tratamiento de los sinciotrofoblastos con el análogo del AMPc estimuló significativamente la expresión placentaria de las dos formas de CaBPs. En cambio, cuando las células placentarias fueron tratadas con el inhibidor de la proteína cinasa A, el H89, las expresiones placentarias de la CaBP-9k y de la CaBP-28k no presentaron cambios significativos al ser comparadas con las del vehículo, lo que indica que las CaBPs responden al AMPc a través de sus elementos de respuesta a este segundo mensajero, CRE <sup>9,14</sup>, que merecen ser identificados en el promotor de los genes de estas proteínas transportadoras de calcio.

Resultados previos han mostrado que la CaBP-28k presenta un efecto antioxidante en líneas de células  $\beta$  del páncreas <sup>26</sup>. Por lo que toca al calcitriol, principal estimulador de la síntesis de las CaBPs, los estudios han sugerido a esta hormona como antioxidante <sup>54</sup>, prooxidante <sup>55</sup> ó sin efecto sobre la peroxidación de

lípidos <sup>56</sup>. Estos antecedentes permitieron justificar la introducción del estudio de la concentración del malondialdehído (MDA) en el medio de cultivo de las células placentarias y valorar el efecto del calcitriol sobre este indicador de la peroxidación de lípidos. El tratamiento con calcitriol, a las concentraciones  $10^{-11}$  y  $10^{-9}$  M consideradas dentro del rango fisiológico, no se asoció con cambios significativos en la concentración de MDA, excepto con el uso de calcitriol a la concentración de  $10^{-7}$  M con la cual se observó un aumento significativo en la peroxidación de lípidos. Además, se observó una asociación positiva y significativa entre el calcitriol y el MDA lo que apoya el efecto prooxidante, particularmente con el uso de cantidades farmacológicas de vitamina D, lo que concuerda con los resultados obtenidos por autores que indican que la vitamina D es prooxidante <sup>57</sup>. Cabe mencionar que el efecto antioxidante de la CaBP-28k ha sido observado cuando las células pancreáticas han sido transfectadas por el gen de la CaBP-28k lo que resultó seguramente en la síntesis de una gran cantidad de esta proteína transportadora de calcio y por ende en una disminución significativa en la peroxidación de lípidos <sup>58</sup>. Además, la ausencia de una asociación negativa entre CaBPs y MDA en el presente estudio puede deberse a la baja expresión placentaria de los genes estudiados. La 25-hidroxivitamina D-24-hidroxilasa (24(OH)asa) es la enzima involucrada en el catabolismo del calcitriol y su expresión es regulada a la alta por esta hormona <sup>49</sup>. La expresión placentaria de las CaBPs representa del 1 al 10% la de la 24(OH) asa en condiciones basales y solamente el 1% cuando las células placentarias fueron tratadas con calcitriol a concentración de  $10^{-9}$  M (resultados no mostrados en el presente estudio). Además, la baja expresión de la CaBP-9k ha sido observada en la placenta de ratas en la cual la expresión de este gen representó únicamente el 20% de la que se observa en el intestino <sup>59</sup>. El estradiol y la progesterona cuya concentración aumenta durante el embarazo son estimuladores adicionales de la expresión de CaBPs <sup>60</sup> lo que puede contribuir con el calcitriol al aumento en la síntesis de estas proteínas transportadoras de calcio y por ende al paso transplacentario de este nutrimento para la mineralización del feto. El efecto de estas

hormonas esteroideas en la expresión placentaria de las CaBPs merece ser valorado en otros estudios.

## **12. CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten formular las siguientes conclusiones:

- Las células citotrofoblásticas en cultivo se transforman en sinciotrofoblastos, modelo que permite el estudio de la fisiología placentaria.
- La placenta humana expresa a las proteínas transportadoras de calcio, CaBP-9k y CaBP-28k.
- El calcitriol estimula la expresión placentaria de las CaBP-9k y CaBP-28k.
- La placenta humana secreta el MDA, indicador de la peroxidación de lípidos.
- Cantidades fisiológicas de calcitriol no modifican la concentración de MDA.
- La expresión de la CaBP-28k no se asocia con la peroxidación de lípidos.

## **13. PERSPECTIVAS**

La presencia de los genes de la CaBP-9k y de la CaBP-28k y el estímulo de su transcripción por el calcitriol sugiere la participación de estos factores en el aumento del paso transplacentario de calcio durante el embarazo.

#### 14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Turner RE. Nutrition during pregnancy. In: Shils LE (eds): *Modern Nutrition in Health and Disease*, Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 771-83.
2. Micheli J, Schutz, Y., Jéquier, E. Croissance Fetale et Néonatale. In: Ricour C (eds): *Traité de Nutrition Pédiatrique*, Paris, Francia: Maloine; 1993. p. 312-35.
3. Durá MFR. Fundamentos de Embriología y Fisiología de la Reproducción. In: Ciencias Fd (eds): *Adaptaciones embrionarias y su relación con la conservación y terminación del desarrollo*, México, D.F.: UNAM; 1988. p. 207-47.
4. Karck U, Breckwoldt, M. Functions of the placenta. In: Greger R (eds): *Comprehensive Human Physiology*, Berlin, Germany: Springer-Verlag; 1996. p. 2291-304.
5. Kaufmann P, Hans-Georg, Frank. Placenta and Intrauterine Environment. In: Abman PF (eds): *Fetal and Neonatal Physiology*, USA: Saunders; 2004. p. 85-96.
6. Colin P, Boyd, R. Mechanisms of Transfer Across the Human Placenta. In: Saunders (eds): *Fetal and Neonatal Physiology*, USA: 2004. p. 111-18.
7. Van de Graaf SF, Hoenderop JG, Bindels RJ. Regulation of TRPV5 and TRPV6 by associated proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F1295-302.
8. Kovacs CS, Kronenberg HM. Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. *Endocr Rev* 1997; 18: 832-72.
9. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F8-28.
10. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92: 4-8.

11. Halhali A, Soledad, D., Díaz, L., Avila, E., Díaz, E., Frank S., Larrea F. Vitamina D. In: R. HB (eds): *Recomendaciones de Ingestión de Nutrientes para la Población Mexicana*, México, D.F.: Editorial Médica Panamericana; 2005. p. 42-54.
12. Holick M. Vitamin D. In: Shils ME (eds): *Modern Nutrition in Health and Disease*, Philadelphia, USA.: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 376-93.
13. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 684-700.
14. Haussler M, Jurutka PW., Hsieh, JC., Thompson PD., Haussler, CA., Selznick, SH., Remus, LS. and Whitfield, K. Nuclear Vitamin D Receptor: Structure-Function, Phosphorylation, and Control of Gene Transcription. In: David F (eds): *Vitamin D*, California, USA.: Academic Press; 1997. p. 149-77.
15. Christakos S, Gill R, Lee S, Li H. Molecular aspects of the calbindins. *J Nutr* 1992; 122: 678-82.
16. Christakos S, Barletta F, Huening M, Dhawan P, Liu Y, Porta A, Peng X. Vitamin D target proteins: function and regulation. *J Cell Biochem* 2003; 88: 238-44.
17. Halhali A, Diaz L, Sanchez I, Garabedian M, Bourges H, Larrea F. Effects of IGF-I on 1,25-dihydroxyvitamin D(3) synthesis by human placenta in culture. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 771-6.
18. Diaz L, Sanchez I, Avila E, Halhali A, Vilchis F, Larrea F. Identification of a 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene transcription product in cultures of human syncytiotrophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2543-9.
19. Diaz L, Arranz C, Avila E, Halhali A, Vilchis F, Larrea F. Expression and activity of 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase are restricted in cultures of human syncytiotrophoblast cells from preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3876-82.

20. Avila E, Diaz L, Halhali A, Larrea F. Regulation of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> 24-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression by 8-bromo cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblast cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90: 115-9.
21. Belkacemi L, Gariépy G, Mounier C, Simoneau L, Lafond J. Expression of calbindin-D28k (CaBP28k) in trophoblasts from human term placenta. *Biol Reprod* 2003; 68: 1943-50.
22. Hubel CA. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222: 222-35.
23. Lin AM, Chen KB, Chao PL. Antioxidative effect of vitamin D<sub>3</sub> on zinc-induced oxidative stress in CNS. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1053: 319-29.
24. Kallay E, Bareis P, Bajna E, Kriwanek S, Bonner E, Toyokuni S, Cross HS. Vitamin D receptor activity and prevention of colonic hyperproliferation and oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 2002; 40: 1191-6.
25. Ibi M, Sawada H, Nakanishi M, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, Shimohama S, Akaike A. Protective effects of 1  $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> against the neurotoxicity of glutamate and reactive oxygen species in mesencephalic culture. *Neuropharmacology* 2001; 40: 761-71.
26. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Sooy K, Strynadka K, Christakos S. Expression of calbindin-D(28k) in a pancreatic islet beta-cell line protects against cytokine-induced apoptosis and necrosis. *Endocrinology* 2001; 142: 3649-55.
27. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.

28. Thomas JA. Oxidant Defense in Oxidative and Nitrosative Stress. In: Shils ME (eds): *Modern Nutrition in Health and Disease*, Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 685-94.
29. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 2005; 85: 373-422.
30. National High Blood Pressure Education Program Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 1691-712.
31. Roberts JM, Pearson GD, Cutler JA, Lindheimer MD. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 2003; 22: 109-27.
32. Yucesoy G, Ozkan S, Bodur H, Tan T, Caliskan E, Vural B, Corakci A. Maternal and perinatal outcome in pregnancies complicated with hypertensive disorder of pregnancy: a seven year experience of a tertiary care center. *Arch Gynecol Obstet* 2005; 273: 43-9.
33. Belizan JM, Villar J. The relationship between calcium intake and edema-, proteinuria-, and hypertension-gestosis: an hypothesis. *Am J Clin Nutr* 1980; 33: 2202-10.
34. Hofmeyr GJ, Duley L, Atallah A. Dietary calcium supplementation for prevention of pre-eclampsia and related problems: a systematic review and commentary. *Bjog* 2007; 114: 933-43.
35. Halhali A, Diaz L, Avila E, Ariza AC, Garabedian M, Larrea F. Decreased fractional urinary calcium excretion and serum 1,25-dihydroxyvitamin D and IGF-I levels in preeclampsia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103: 803-6.
36. Halhali A, Tovar AR, Torres N, Bourges H, Garabedian M, Larrea F. Preeclampsia is associated with low circulating levels of insulin-like growth factor I

and 1,25-dihydroxyvitamin D in maternal and umbilical cord compartments. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1828-33.

37. Gupta S, Agarwal A, Sharma RK. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv* 2005; 60: 807-16.

38. Diaz L, Carino C, Mendez I. [Vitamin D: implications for health and pregnancy]. *Rev Invest Clin* 2001; 53: 77-85.

39. Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, MacLeod NB, Nagai Y, Bourdeau V, Konstorum A, Lallemant B, Zhang R, Mader S, White JH. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> target genes. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 2685-95.

40. Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF, 3rd. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 1986; 118: 1567-82.

41. Jentsch AM, Bachmann H, Furst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 251-6.

42. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.

43. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.

44. Knofler M, Saleh L, Bauer S, Vasicek R, Griesinger G, Strohmer H, Helmer H, Husslein P. Promoter elements and transcription factors involved in differentiation-dependent human chorionic gonadotrophin-alpha messenger ribonucleic acid expression of term villous trophoblasts. *Endocrinology* 2000; 141: 3737-48.

45. Fleet JC. Rapid, membrane-initiated actions of 1,25 dihydroxyvitamin D: what are they and what do they mean? *J Nutr* 2004; 134: 3215-8.
46. Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T, Hidaka H. 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* 1990; 265: 5267-72.
47. Malassine A, Cronier L. Hormones and human trophoblast differentiation: a review. *Endocrine* 2002; 19: 3-11.
48. Pidoux G, Gerbaud P, Tsatsaris V, Marpeau O, Ferreira F, Meduri G, Guibourdenche J, Badet J, Evain-Brion D, Frenco JL. Biochemical characterization and modulation of LH/CG-receptor during human trophoblast differentiation. *J Cell Physiol* 2007; 212: 26-35.
49. Avila E, Diaz L, Barrera D, Halhali A, Mendez I, Gonzalez L, Zuegel U, Steinmeyer A, Larrea F. Regulation of Vitamin D hydroxylases gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblasts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103: 90-6.
50. Handschuh K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, Fournier T. Human chorionic gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells. *Placenta* 2007; 28: 175-84.
51. Choi KC, Leung PC, Jeung EB. Biology and physiology of Calbindin-D9k in female reproductive tissues: involvement of steroids and endocrine disruptors. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 66.
52. Halhali A, Villa AR, Madrazo E, Soria MC, Mercado E, Diaz L, Avila E, Garabedian M, Larrea F. Longitudinal changes in maternal serum 1,25-

dihydroxyvitamin D and insulin like growth factor I levels in pregnant women who developed preeclampsia: comparison with normotensive pregnant women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90: 553-6.

53. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1689S-96S.

54. Noyan T, Balaharoglu R, Komuroglu U. The oxidant and antioxidant effects of 25-hydroxyvitamin D3 in liver, kidney and heart tissues of diabetic rats. *Clin Exp Med* 2005; 5: 31-6.

55. Pletsityi KD, Davydova TV, Fomina VG, Nikushkin EV, Kucherianu VG, Iurasov VV. [Interrelationship between pro-oxidant and immunomodulating properties of vitamin D]. *Vopr Pitan* 1996; 11-3.

56. Faulkner L, Aruoma OI, Brickell PM, Davies MJ, Halliwell B, Woolf N, Katz DR. Effects of the synthetic anti-oxidant, probucol, on the U937 monoblastoid cell line. *Atherosclerosis* 1993; 99: 1-13.

57. Peery SL, Nemere I. Contributions of pro-oxidant and anti-oxidant conditions to the actions of 24,25-dihydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on phosphate uptake in intestinal cells. *J Cell Biochem* 2007; 101: 1176-84.

58. Reddy D, Pollock AS, Clark SA, Sooy K, Vasavada RC, Stewart AF, Honeyman T, Christakos S. Transfection and overexpression of the calcium binding protein calbindin-D28k results in a stimulatory effect on insulin synthesis in a rat beta cell line (RIN 1046-38). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 1961-6.

59. Krisinger J, Dann JL, Jeung EB, Leung PC. Calbindin-D9k gene expression during pregnancy and lactation in the rat. *Mol Cell Endocrinol* 1992; 88: 119-28.

60. Ji YK, Lee GS, Choi KC, Jeung EB. Anti-progestogenic effect of flutamide on uterine expression of calbindin-D9k mRNA and protein in immature mice. *Reprod Toxicol* 2006; 22: 694-701.
61. Enciclopedia Medline Plus. <http://medlineplus.gov/placenta>. Fecha de consulta: 02-octubre-2007. Última actualización: 30-octubre-2007
62. Facultad de Ciencias Médicas-Escuela de Medicina, Universidad Católica de Santiago Guayaquil. Guayaquil, Ecuador. [http://www.ucsg.edu.ec/catolica/secundarias/html/facultad\\_medicina/carrera\\_medicina/tutoria/materias/embriologia/datos/principal.htm](http://www.ucsg.edu.ec/catolica/secundarias/html/facultad_medicina/carrera_medicina/tutoria/materias/embriologia/datos/principal.htm). Fecha de consulta: 03-agosto-2007. Última actualización: 26-julio-2007
63. Preeclampsia: Interrogantes y desafíos en el tercer milenio. Dr. Ricardo Ferreira. Revista de Antioxidantes, Vitaminas y Nutrientes, 2005. <http://www.antioxidantes.com.ar/Art263.htm>. Fecha de consulta: 07-agosto-2007. Última actualización: 06-agosto-2007.
64. Vitamin D: production, metabolism, and mechanisms of action. Daniel D. Bikle, M.D., PH.D. Chapter 3, enero 2006. <http://www.endotext.org/parathyroid/parathyroid3/parathyroidframe3.htm>. Fecha de consulta: 31-octubre-2007. Última actualización: 31-octubre-2007.
65. Secretaría de Salud. Comunicado de prensa No. 039. [http://www.salud.gob.mx/ssa\\_app/noticias/datos/2005-02-01\\_1188.html](http://www.salud.gob.mx/ssa_app/noticias/datos/2005-02-01_1188.html). Fecha de consulta: 10-diciembre-2007. Última actualización: 01-febrero-2005
66. Instituto Mexicano del Seguro Social. Boletín de prensa No. 395. <http://www.imss.gob.mx>. Fecha de consulta: 10 diciembre-2007. Última actualización: 19-octubre-2007.

67. Daño celular inducido por radicales libres, protección celular. Curso 05/06  
<http://www2.uah.es/sancho/quimica/Tema%2016/Tema%2016.pdf>. Fecha de consulta: 14-agosto-2006. Última actualización: 15-mayo-2006.

68. Universal ProbeLibrary for Human. Roche Applied Science.  
<https://qpcr1.probefinder.com/roche3.html>. Fecha de consulta: -2006. 17-septiembre-07. Última actualización: 14-septiembre-2007.

ANEXO I.

**Carta de consentimiento informado**

Yo \_\_\_\_\_ he sido informada de los objetivos y procedimientos del estudio titulado: **“Expresión de la calbindina D 28k y su relación con la peroxidación de lípidos en la placenta humana”** y he decidido participar en él de manera voluntaria. Es de mi conocimiento que las placentas se coleccionarán de la Clínica #4 de Ginecobstetricia Luis Castelazo Ayala y que el estudio se llevará a cabo en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Mi participación consistirá únicamente en donar mi placenta y se que será utilizada exclusivamente para los fines que me fueron señalados. Además, se me han aclarado las dudas acerca del proyecto y he sido informada de que mi participación no traerá riesgo ni beneficio alguno. En el caso de que lo considere conveniente para mis intereses, puedo negar mi participación en este estudio, sin que esto afecte la atención que recibimos mi bebé y yo en este Hospital.

México, D.F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del año \_\_\_\_\_

---

Nombre y firma de la voluntaria

---

Nombre y firma del testigo 1, y relación con la voluntaria

---

Nombre y firma del testigo 2 y relación con la voluntaria

---

Nombre y firma del Investigador

## **Información a las voluntarias participantes en el proyecto:**

### **“Expresión de la calbindina D 28k y su relación con la peroxidación de lípidos en la placenta humana”**

Estimada voluntaria:

El presente estudio para el cual le estamos solicitando su generosa participación tiene como finalidad conocer algunas de las funciones de la placenta. Se considera a la placenta como un órgano muy importante para el mantenimiento del embarazo y la nutrición del feto durante el desarrollo embrionario. Además, la placenta puede producir hormonas que son importantes para mantener y asegurar el desarrollo del feto durante la gestación. Entre estas hormonas esta la vitamina D. El presente trabajo consiste en estudiar la expresión placentaria de la calbindina D 28k y su relación con la peroxidación de lípidos. Con esta finalidad, se requiere la colección de varias placentas que serán procesadas en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. La participación de usted en este estudio consistirá únicamente en aceptar la donación voluntaria de su placenta ya expulsada. La placenta se utilizará exclusivamente para fines de este estudio. Si usted no acepta participar en este estudio, ello no afectará de ninguna manera la calidad y calidez de la atención para usted y su bebé en este Hospital.

La información obtenida será estrictamente confidencial. Los resultados que se obtengan no implicarán riesgo o beneficio alguno para usted o para su bebé.

Para cualquier duda o pregunta que tenga sobre este estudio podrá dirigirse al Dr. Ali Halhali Baghdad, investigador responsable, tel.: 5487-0900 ext. 2418, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Depto. de Biología de la Reproducción.

## ANEXO II.

### Inactivación del suero fetal de ternera (SFT)

- Colocar el SFT en baño maría a 55 °C por 1 hora.
- Filtrar en papel filtro con poro de tamaño 0.22 µM.

## ANEXO III.

### Preparación de reactivos del cultivo de trofoblastos de placentas humanas a término

#### Solución de Hanks' 1x libre de Ca y Mg.

- Disolver un sobre del polvo Hanks' 1x en un litro de agua desionizada.
- Agregar 0.35g de bicarbonato de sodio.
- Ajustar pH entre 7 y 7.5 y filtrar.

#### Preparación de los medios de cultivo

- Medio de Tagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con penicilina 100 U/mL, estreptomycin 0.1mg/mL.
- Medio de Tagle modificado por Dulbecco (DMEM) con L-alanil-L-glutamina, glucosa y piruvato de sodio (DMEM-HG) suplementado con penicilina 100 U/mL, estreptomycin 0.1mg/mL y SFT inactivado al 20%.

## ANEXO IV.

### Preparación de reactivos para peroxidación de lípidos

- **Solución madre de TMP** a una concentración de 1mM. Se prepara disolviendo 17 µl de TMP en 100mL de agua deionizada.
- **Solución de trabajo** a una concentración de 0.2mM. Se prepara tomando 1mL de la solución madre y diluirlo en 4mL de agua deionizada (dilución 1:5). Esta solución se preparará cada vez que se corra la curva.
- **Butiril-hidroxitolueno (BHT)** a una concentración de 12.6mM. Se prepara disolviendo 0.278g de BHT en 100mL de etanol grado reactivo.
- **Butiril-hidroxitolueno (BHT)** a una concentración de 2mM. Se prepara disolviendo 0.044g de BHT en 100mL de etanol grado reactivo.
- **Ácido ortofosfórico** a una concentración de 0.2M. Se prepara diluyendo 1.369mL de ácido ortofosfórico en 100mL de agua deionizada.
- **Ácido tiobarbitúrico** a una concentración de 0.11M. Disuelva 800mg de TBA en 50mL de NaOH 0.1M.
- **Hidróxido de sodio** 0.1M. Pesar 400mg de NaOH y disolverlo en 100mL de agua deionizada.

- Solución saturada de Cloruro de Sodio (NaCl). Disolver cloruro de sodio en agua deionizada en agitación hasta que no se disuelva más.