



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
Maestría en Ciencia de la Salud

Escuela Superior de Medicina

**“Efecto del calcitriol sobre la síntesis
placentaria de citocinas pro- nflammatorias en la
preeclampsia y regulación de CYP27B1 y
CYP24A1 por TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL -1 β ”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias de la Salud

PRESENTA:

NANCY NOYOLA MARTINEZ

Directores de Tesis

Dr. Aldo Arturo Reséndiz Albor

Dr. David Barrera Hernández



México D.F.

Octubre 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 8:00 horas del día 22 del mes de septiembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M para examinar la tesis titulada:

“Efecto del calcitriol sobre la síntesis placentaria de citocinas pro-inflamatorias en la preeclampsia y regulación de CYP27B1 y CYP24A1 por TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β .”

Presentada por la alumna:

Noyola

Martínez

Nancy

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

A	1	0	0	6	4	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Aldo Arturo Reséndiz Albor

Dr. David Barrera Hernández

Dr. Pedro López Sánchez

Dr. Rafael Campos Rodríguez

Dr. Saúl Rojas Hernández

Dra. Lorenza Díaz Nieto

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I.P.N.
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION
“CONTROL ESCOLAR”

Dr. Eleazar Lara Padilla



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 28 del mes septiembre del año 2011, la que suscribe NOYOLA MARTÍNEZ NANCY alumna del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD con número de registro A100649, adscrita a la ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Aldo Arturo Reséndiz Albor, Dr. David Barrera Hernández y cede los derechos del trabajo intitulado “Efecto del calcitriol sobre la síntesis placentaria de citocinas pro-inflamatorias en la preeclamsia y regulación de CYP27B1 y CYP24A1 por TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β ” al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección biolirio_12@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


NOYOLA MARTÍNEZ NANCY
Nombre y firma

INDICE

ABSTRACT	6
RESUMEN	7
1. INTRODUCCION	8
1.1 Generalidades.....	8
1.2 Calcitriol y Embarazo.....	11
1.3 Preeclampsia	13
1.4 Citocinas y embarazo.....	16
1.5 Biosíntesis y regulación del calcitriol.	18
2. JUSTIFICACION.....	22
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVOS.....	24
4.1 Objetivo General.....	24
4.2 Objetivos Particulares.....	24
5. METODOLOGIA	25
5.1 Cultivo de trofoblasto humano	25
5.2 Cuantificación de citocinas.	29
5.3 Estudios de expresión génica.....	31
5.3.1 Extracción de RNA total.....	31
5.3.2 Transcripción Reversa.....	33
5.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	34
5.4 Análisis de los datos.....	36
6. RESULTADOS.....	37

6.1 Viabilidad y funcionalidad del cultivo celular	37
6.1.1 Cambios Morfológicos	37
6.1.2 Evaluación de hCG	38
6.2 Diferencias génicas presentes en el trofoblasto PE vs. NT.....	39
6.3 Patrón de expresión de TNF-α, IFN-γ, IL-6 e IL-1β en trofoblastos de mujeres NT y con PE durante 3 días de cultivo.....	40
6.4 Efecto del calcitriol sobre la expresión de TNF-α, IFN-γ, IL-6 e IL-1β	42
6.5 Secreción de TNF-α, IL-6 e IL-1β en presencia de calcitriol.	44
6.6 Efecto del TNF-α, INF-γ, IL-6 e IL-1β sobre la expresión de CYP27B1 y CYP24A1 en trofoblastos de mujeres NT.....	45
7. DISCUSIÓN	47
7.1 General.....	47
7.2 Controles del cultivo celular NT vs. PE	48
7.3 Patrón de síntesis de citocinas pro-inflamatoria.....	49
7.4 Efecto del calcitriol sobre la síntesis de TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β	50
7.5 Efecto de citocinas pro-inflamatorias sobre la síntesis de calcitriol.....	52
8. CONCLUSIONES	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXO	65
Material y Equipo.....	65
Reactivos	65

ABSTRACT

Placenta is an important source and target of hormones that contribute to immunological tolerance in pregnancy. It is known that in preeclampsia (PE), the placenta $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 (calcitriol) synthesis is low; whereas pro-inflammatory cytokines levels are increased. Since the association of pro-inflammatory cytokines and calcitriol has not been studied in human placenta, the aim of the present work was to investigate the effects of calcitriol upon $TNF-\alpha$, $INF-\gamma$, IL-6 and IL-1 β human trophoblast cultured cells of PE women. In addition, effects these cytokines upon calcitriol metabolism were evaluated in placental cell cultures obtained from normotensive (NT) women. Placentas were obtained immediately after delivery by cesarean section from NT and PE women. Calcitriol effects upon cytokines in PE cell cultures were also determined by qPCR and ELISA. Similarly, cytokine effects upon calcitriol synthesis and degradation in NT cell cultures were evaluated by gene expression of CYP27B1 and CYP24A1 using qPCR. This study shows for the first time that cytokine expression genes decreased as the cells formed syncytia and that calcitriol inhibits $TNF-\alpha$ and IL-6 expression in cultured placental cells obtained from PE pregnancies. Controversely, $TNF-\alpha$, $INF-\gamma$, IL-6 and IL-1 β increased expression of CYP27B1 and CYP24A1. Interestingly, $TNF-\alpha$ increased significantly the ratio of CYP24A1/CYP27B1 gene expression, while $INF-\gamma$ preferentially induced CYP27B1 over CYP24A1. No changes were observed when equimolecular concentrations of IL-1 β and IL-6 were used. Results indicate interrelationships between calcitriol metabolism and cytokines production in the human placenta and suggest that $INF-\gamma$ contributes to calcitriol production whereas $TNF-\alpha$ favors its catabolism.

RESUMEN

La placenta es un órgano productor y blanco de hormonas que contribuyen con la tolerancia inmunológica materna en el embarazo. En la preeclampsia (PE), la síntesis de $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 (calcitriol) es baja, mientras que la producción de citocinas pro-inflamatorias está incrementada. Considerando que la relación entre calcitriol y citocinas pro-inflamatorias aún no está completamente estudiada en la placenta humana, en el presente trabajo se evaluó el efecto del calcitriol sobre $TNF-\alpha$, $INF-\gamma$, IL-6 e IL- 1β en cultivos de trofoblasto obtenido de mujeres con PE. Adicionalmente, se evaluó el efecto de estas citocinas sobre el metabolismo del calcitriol en cultivos de trofoblasto obtenidos de mujeres normotensas (NT). Las placentas fueron obtenidas de mujeres NT y PE sometidas a operación cesárea. El efecto del calcitriol sobre las citocinas producidas por el trofoblasto fue determinado por qPCR y ELISA. Asimismo, el efecto de las citocinas sobre CYP27B1 y CYP24A1 fue evaluado por qPCR. Los resultados muestran que las citocinas pro-inflamatorias disminuyen conforme las células se diferencian hacia sinciotrofoblastos y que el calcitriol inhibe la expresión de $TNF-\alpha$ e IL-6 en cultivos de trofoblasto obtenido de mujeres con PE. Por el contrario, $TNF-\alpha$, $INF-\gamma$, IL-6 e IL- 1β incrementan la expresión de CYP27B1 y CYP24A1. De manera interesante, $TNF-\alpha$ favorece la relación CYP24A1/CYP27B1, mientras que el $INF-\gamma$ induce preferencialmente CYP27B1 sobre CYP24A1. En relación a IL-6 e IL- 1β , no se observaron cambios en la expresión de los citocromos a concentraciones equimolecular. Los resultados muestran la interrelación que existe entre el metabolismo del calcitriol y la producción de citocinas en la placenta humana y sugieren que el $INF-\gamma$ contribuye con la producción del calcitriol mientras que el $TNF-\alpha$ induce su catabolismo.

1. INTRODUCCION

1.1 Generalidades

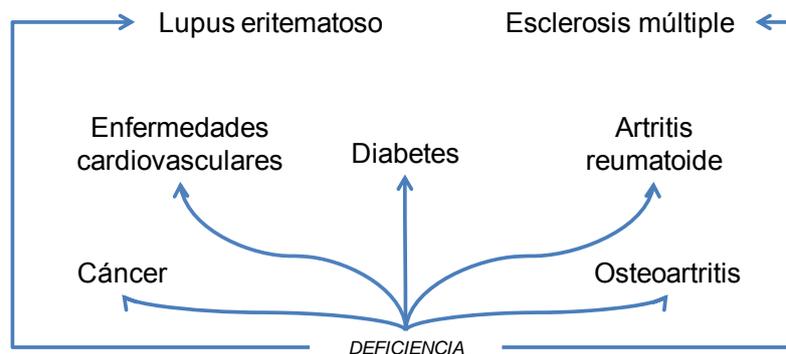
La $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 (calcitriol) es la forma hormonalmente activa de la vitamina D. Históricamente, esta hormona fue descubierta como tratamiento preventivo para el raquitismo y la osteomalacia y se consideraba importante solo en la regulación del metabolismo de calcio y fósforo en el intestino y huesos. Actualmente se sabe que esta hormona es muy versátil y regula diversos procesos fisiológicos como la apoptosis, proliferación y diferenciación celular, así como los sistemas endocrinológico e inmunológico [1]. Sus efectos los lleva a cabo a través de su interacción con el receptor de la vitamina D (VDR) presente en células del sistema inmunológico como macrófagos, células dendríticas (CDs), linfocitos T y en una gran variedad de órganos y/o tejidos como el riñón, colon, cerebro, páncreas, piel, y la placenta [2, 3], sugiriendo un papel más amplio del calcitriol en el organismo.

En general, el calcitriol es capaz de mediar la apoptosis al inducir la activación de la vía de las caspasas, la expresión de proteínas pro-apoptóticas como Bax, Bak y Bad, y al reprimir las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L en células cancerosas de mama y próstata [4]. Por otro lado, el calcitriol ejerce efectos antiproliferativos al frenar la progresión del ciclo celular, al favorecer la diferenciación y al inhibir la angiogénesis en células de cáncer. En particular, el calcitriol regula el proceso de diferenciación, proliferación, maduración y activación de células dendríticas así como la diferenciación de linfocitos T en cultivo obtenidos de sangre periférica [5, 6]. En efecto, se ha demostrado que el calcitriol

incrementa la expresión de los factores de transcripción GATA-3 y c-maf, que favorecen la diferenciación de linfocitos T cooperadores hacia el linaje tipo Th2 [7]. Por otra parte, se ha demostrado que el calcitriol media la producción de diferentes citocinas. Al respecto, se demostró que el calcitriol inhibe la producción de interleucina (IL)-2 en la línea celular Jurkat de linfocitos T y la síntesis de IL-12 producida por monocitos [8], disminuye la expresión del factor estimulador de colonias 2, IL-1, IL-6 y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) en células asesinas naturales (NK) [9] y la expresión de IL-6, IL-17, TNF- α , interferón-gama (IFN- γ), receptores tipo toll (TLR)2 y TLR4 en células mononucleares de sangre periférica estimuladas con *Candida albicans* [10]. En los linfocitos B, el calcitriol inhibe la producción de las inmunoglobulinas IgG e IgM, la proliferación de este tipo celular y su diferenciación hacia células plasmáticas [11]. Adicionalmente, el calcitriol también inhibe la producción de IL-12 e IL-23 en las DCs evitando la polarización de los linfocitos T hacia los linajes de tipo pro-inflamatorio Th1 y Th17, con la subsecuente polarización celular a Th2 y Tregs respectivamente. Por otra parte, en ratones con encefalomiелitis autoinmune experimental se demostró que el calcitriol induce la expresión del factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) y de la IL-4, citocinas que atenúan la gravedad de la enfermedad [12]. Asimismo el calcitriol ayuda en la aceptación de trasplantes evitando su rechazo tanto en modelos murinos como en humanos [13, 14].

Los efectos biológicos abordados anteriormente son importantes ya que destacan la importancia de vitamina D en organismo. Sin embargo, la biosíntesis de la vitamina D en el ser humano es cada vez menor debido a diferentes factores que

minimizan su bioconversión, tales como el tipo de piel, la edad, la obesidad, el lugar de residencia, la contaminación, el uso de bloqueadores, medicamentos entre otros, que desencadenan la susceptibilidad de varias enfermedades a corto y largo plazo. Así, el rechazo de trasplantes y alto riesgo para desarrollar enfermedades autoinmunes, cáncer, padecimientos cardiovasculares, osteoartritis, infecciones y otras complicaciones se asocian con la deficiente producción de vitamina D [15-18] (figura 1). Asimismo, en el embarazo la restricción del crecimiento intrauterino, nacimientos de niños con hipocalcemia y bajo peso al nacer, raquitismo neonatal, diabetes tipo 1, asma e incluso con esquizofrenia se han asociado con la deficiencia de esta hormona. Adicionalmente dicha deficiencia se ha relacionado con abortos recurrentes, parto pre-término y un alto riesgo de desarrollar preeclampsia (PE) [19-22]. Lo anterior destaca que la escasez de esta hormona es un serio problema para lograr un embarazo exitoso.



CALCITRIOL

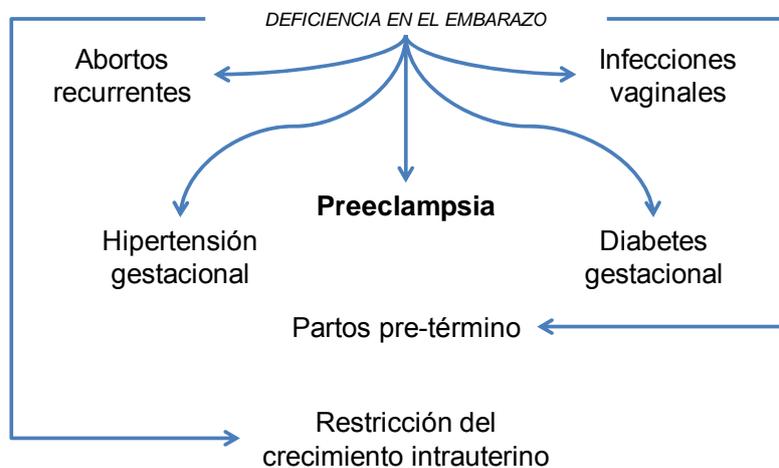


Figura 1. Complicaciones asociadas con bajas concentraciones de calcitriol.

1.2 Calcitriol y Embarazo.

Durante el embarazo, la placenta es el órgano involucrado en el transporte de nutrimentos y la excreción de metabolitos entre la madre y el feto. Además es productora de hormonas tanto esteroides como polipeptídicas, factores de crecimiento, citocinas, etc. La placenta es necesaria para controlar eventos que intervienen en la adecuada y controlada invasión del trofoblasto placentario al endometrio. La invasión trofoblastica primaria determina la eficiencia placental, la

viabilidad y el desarrollo fetal por lo que deficiencias en la invasión del trofoblasto contribuyen al desarrollo de complicaciones en el embarazo [23, 24]. Durante el inicio de la gestación las células de trofoblasto se diferencian para dar lugar a varias sub-poblaciones celulares entre ellas el trofoblasto extraveloso que se encarga de invadir la pared uterina y los vasos sanguíneos [25]. En un embarazo normal las células del trofoblasto adquieren un fenotipo endotelial e invaden las arterias espirales uterinas. Donde se sugiere coexisten los trofoblastos en conjunto con las células endoteliales para modificar las arterias espirales; esto favorece la disminución de la resistencia de las arterias para permitir el adecuado flujo sanguíneo hacia el feto vía la circulación utero-placentar [26].

En el embarazo las concentraciones de calcitriol y su proteína de transporte (DBP) se incrementan desde el primer trimestre hasta el término de la gestación [27, 28] y disminuyen significativamente después del parto [29]. El incremento de calcitriol se debe principalmente al aporte renal materno. Sin embargo, la placenta y la decidua también sintetizan y aportan calcitriol [2]. Lo anterior apoya el concepto de que el calcitriol producido localmente ejerce funciones de naturaleza autocrina y/o paracrina. Al respecto, se ha descrito que en células endometriales el calcitriol promueve la expresión de HOXA10 un gen importante durante el proceso de la implantación [30]. Por otra parte, en células de coriocarcinoma JEG-3 el calcitriol incrementa la expresión de la enzima aromatasa CYP19 responsable de la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos, lo cual concuerda con lo observado en trofoblastos humanos donde la síntesis de estradiol y progesterona se incrementan en presencia de la hormona [31, 32]. Asimismo, en los trofoblastos en

cultivo el calcitriol estimula la producción de hormonas como el lactógeno placentario humano (hLP) [33] e induce la expresión de las calbindinas D9k y D28k que además de favorecer el transporte de calcio abaten la producción del peróxido de hidrogeno inducido por citocinas pro-inflamatorias, funcionando como agente antioxidante [34, 35].

De manera interesante, en el 2009 nuestro grupo de trabajo demostró que en cultivos de trofoblasto humano de mujeres normotensas (NT) expuestos a un microambiente inflamatorio experimental inducido por TNF- α , el calcitriol inhibió la expresión de TNF- α , IL-6 e IFN- γ [36], lo cual coincide con la inhibición que la hormona ejerce sobre las citocinas en otros tipos celulares como los linfocitos T anteriormente descrito. Lo cual sugiere fuertemente que el calcitriol pudiera ser un inmunomodulador importante en padecimientos en los cuales las citocinas de tipo pro-inflamatorio se encuentran incrementadas como es el caso de las mujeres con PE.

1.3 Preeclampsia

La PE es una patología exclusiva del embarazo humano dependiente de la placenta con incidencia de entre 5 y 10% de casos alrededor del mundo [37]. Se caracteriza clínicamente por la presencia de hipertensión arterial a partir de la semana 20 de gestación con cifras mayores a 140/90 mmHg en la PE leve y mayores a 150/110 mmHg en la PE severa en por lo menos dos ocasiones diferentes con intervalos de 6 h. En la PE, la excreción urinaria de proteínas es

superior a 300 mg en orina recolectada durante 24 h [38]. Adicionalmente se observan desordenes endocrinológicos e inmunológicos [39-41]. Funcionalmente, la vasculatura útero-placentaria está alterada y el desarrollo de la placenta y el feto se ven restringidos en el crecimiento. Por otro lado la invasión del trofoblasto durante la implantación es insuficiente [42].

A la fecha se desconoce el origen de esta patología y es considerada la enfermedad de las teorías [43] ya que varios factores maternos predisponen al desarrollo y severidad de la enfermedad como la edad, embarazos múltiples, predisposición genética, raza, nivel socioeconómico y el medio ambiente, entre otros [44-47]. Algunos autores proponen que la PE es debida al daño celular endotelial materno, sin embargo, este fenómeno es probablemente secundario a factores citotóxicos liberados por los trofoblastos placentarios en respuesta a la hipoxia e isquemia a la que se encuentra sometida ya que se ha descrito que la exacerbada síntesis del TNF- α , otras citocinas inflamatorias y la excesiva producción de especies reactivas de oxígeno presentes en este padecimiento derivan en la activación y disfunción de las células endoteliales [48].

En efecto, en la PE la exacerbada producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-2 e IL-1 β a nivel sistémico favorece el cambio de la inmunidad hacia un fenotipo Th1 considerada dañina para el embarazo, ya que este desequilibrio altera la biosíntesis de hormonas esteroides y afecta otros factores que impactan directamente en la invasión del trofoblasto y el remodelado de las arterias espirales maternas que en consecuencia tiene efectos adversos en

la función placentaria [49-51]. Recientemente, Otun y cols. demostraron que TNF- α junto con IFN- γ incrementan la apoptosis en el trofoblasto, la secreción de la pro-MMP-9, la actividad del plasminogeno activador de urocinasas, la actividad del inhibidor del plasminogeno activador, reducen la proliferación del trofoblasto y disminuyen la invasión del trofoblasto extra veloso en un 45% comparadas contra su control [52]. Estudios recientes han demostrado que tanto el TNF- α como la IL-6 inhiben la actividad de la 11-beta hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 2 placentaria, lo cual podría resultar en una excesiva exposición fetal al cortisol materno afectando su desarrollo [53]. Con respecto a la IL-6 se sabe que su concentración se encuentra incrementada en el líquido amniótico, miometrio, decidua y membranas fetales de embarazos que presentan abortos y de mujeres con PE. Esta citocina provoca el aumento de la actividad citotóxica de las células NK al inducir la actividad de IL-2, además de que incrementa la síntesis de hCG en el trofoblasto placentario [54]. De hecho altas concentraciones de hCG incrementan en un 30% el riesgo de desarrollar hipertensión en el embarazo por lo que el aumento en las concentraciones séricas de esta hormona es usado como predictor de PE [55]. Si bien, se desconoce aún la posible relación entre las citocinas y la producción de hCG en la PE, Ashourt y cols., demostraron que la subunidad β de la hCG se encuentra incrementada durante el segundo trimestre de gestación de mujeres con PE [56].

Por otro lado, algunos estudios asocian bajas concentraciones de calcitriol con la PE [57]. En apoyo a lo anterior, se ha observado que las mujeres de piel oscura tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad ya que tienen menor capacidad

de síntesis cutánea de vitamina D comparadas con mujeres de piel blanca [58]. Asimismo, se ha correlacionado mayor riesgo de presentar PE dependiendo de los cambios estacionales, en los cuales la síntesis de la hormona es menor en mujeres embarazadas durante los meses de invierno porque la incidencia de la radiación ultravioleta es limitada a diferencia de los meses con mayor exposición solar [59]. Estudios realizados durante el segundo trimestre de gestación asocian concentraciones menores a 37.5 nmol/mL (20 ng/mL) de calcidiol con un incremento en el riesgo en 5 veces de desarrollar PE [57]. Adicionalmente, otros estudios indican que en la PE se detectan bajas concentraciones de calcitriol en la sangre materna y en el cordón umbilical debido a deficiencias en la actividad de la CYP27B1 durante la patología [19, 60]. Por lo cual, no se descarta la posibilidad de que el TNF- α y otras citocinas pro-inflamatorias influyan sobre las enzimas implicadas en el catabolismo de la hormona en la placenta de mujeres con PE sugiriendo así que la baja concentración de calcitriol en esta patología podría ser consecuencia de este desorden inmunológico.

1.4 Citocinas y embarazo

Las citocinas son un conjunto de proteínas de bajo peso molecular secretadas principalmente por células del sistema inmunológico, así como también por el trofoblasto placentario [61, 62]. Sus efectos son ejercidos de manera autócrina y/o parácrina y participan en la respuesta inmunológica innata y adaptativa mediando procesos inflamatorios que son eventos naturales durante sucesos reproductivos como la ovulación, menstruación y parto [63-65]. Durante la gestación la tolerancia inmunológica entre la madre y el feto es necesaria para la implantación [42].

Aunque, se han descrito efectos adversos de las citocinas de tipo pro-inflamatorias en la PE, la presencia de ellas no se excluye de un embarazo normal donde existe un balance Th2 sobre las Th1 [66]. La presencia de diferentes citocinas como IL-1, 2, 6, TNF- α , IFN- γ , entre otras participan en el desarrollo placentario [67]. En efecto, se sabe que en concentraciones adecuadas IL-2, TNF- α e IFN- γ estimulan la actividad citolítica de las células NK y linfocitos activadores de muerte para restringir la excesiva proliferación e invasión del trofoblasto [68]. Asimismo, el IFN- γ elimina las células trofoblásticas anormales, provee protección al feto contra la transmisión de microorganismos maternos durante el embarazo y junto con otras citocinas regula el crecimiento de las células trofoblásticas de la placenta así como su invasión [66, 69]. Además, el TNF- α participa en la regulación de distintas hormonas tanto esteroides como proteicas entre ellas la progesterona, el estradiol y la hCG en células JEG-3 y en trofoblastos en cultivo [48, 70]. El TNF- α junto con IL-1 β ; estimulan la secreción del factor inhibidor de la leucemia (LIF) que favorece el crecimiento y diferenciación del trofoblasto además induce al factor de crecimiento del endotelio vascular y estimula la expresión de la metaloproteinasa de matriz (MMP)-9 [71]. La propiedad invasiva característica de las células de trofoblasto se relacionada en parte con su capacidad para secretar enzimas proteolíticas como las MMP's por lo que su expresión es importante durante la implantación. Al igual que LIF, la IL-6 incrementa la síntesis de las MMP-9 y 2 e induce la expresión de integrinas en el trofoblasto favoreciendo su migración al mismo tiempo que estimula su crecimiento y diferenciación [72, 73]. Paralelamente, IL-6 modula el proceso de angiogénesis e incrementa la síntesis

de hCG e IL-1 β , esta última subsecuentemente incrementa la producción de P₄ en placentas del primer trimestre de gestación [74]. Lo cual no descarta su posible participación como moduladores de la síntesis y degradación del calcitriol placentario, lo cual hoy en día se desconoce.

1.5 Biosíntesis y regulación del calcitriol.

La vitamina D es un nutrimento que además de ser obtenida de la dieta diaria es producida en el organismo. La síntesis endógena del calcitriol comienza en la piel a partir del 7-dehidrocolesterol. Los rayos ultravioleta (290-315 nm) provenientes de la luz solar rompen el anillo B del núcleo esteroidal formando un intermediario inestable llamado pre-vitamina D, que a través de un proceso fototérmico se isomeriza y da lugar al colecalciferol, este cambio conformacional permite su interacción con la DBP que se encarga de transportar al colecalciferol hasta el hígado. En este órgano la molécula es hidroxilada en el carbono 25 por la enzima 25 hidroxilasa produciendo al 25-hidroxivitamina D₃ (calcidiol), el cual se une a la DBP para ser trasladado al riñón donde por acción de la enzima 1 α -hidroxilasa (CYP27B1) es biotransformado a calcitriol [1, 75] (figura 2). Cabe mencionar que el calcidiol es el indicador del estado nutricional de la vitamina D en el organismo, cuya concentración óptima es considerada por encima de 30 ng/mL [76]. Asimismo, se ha estimado que se requieren concentraciones \geq 60 pg/mL de calcitriol en el organismo para ejercer sus acciones biológicas, que son finamente reguladas por la 24 hidroxilasa (CYP24A1) que convierte al calcitriol en productos

finales e inactivos hasta obtener al ácido calcitróico y/o 1,25-dihidroxitamina D₃-23,26-lactona para ser desechados por el organismo [77] (figura 3).

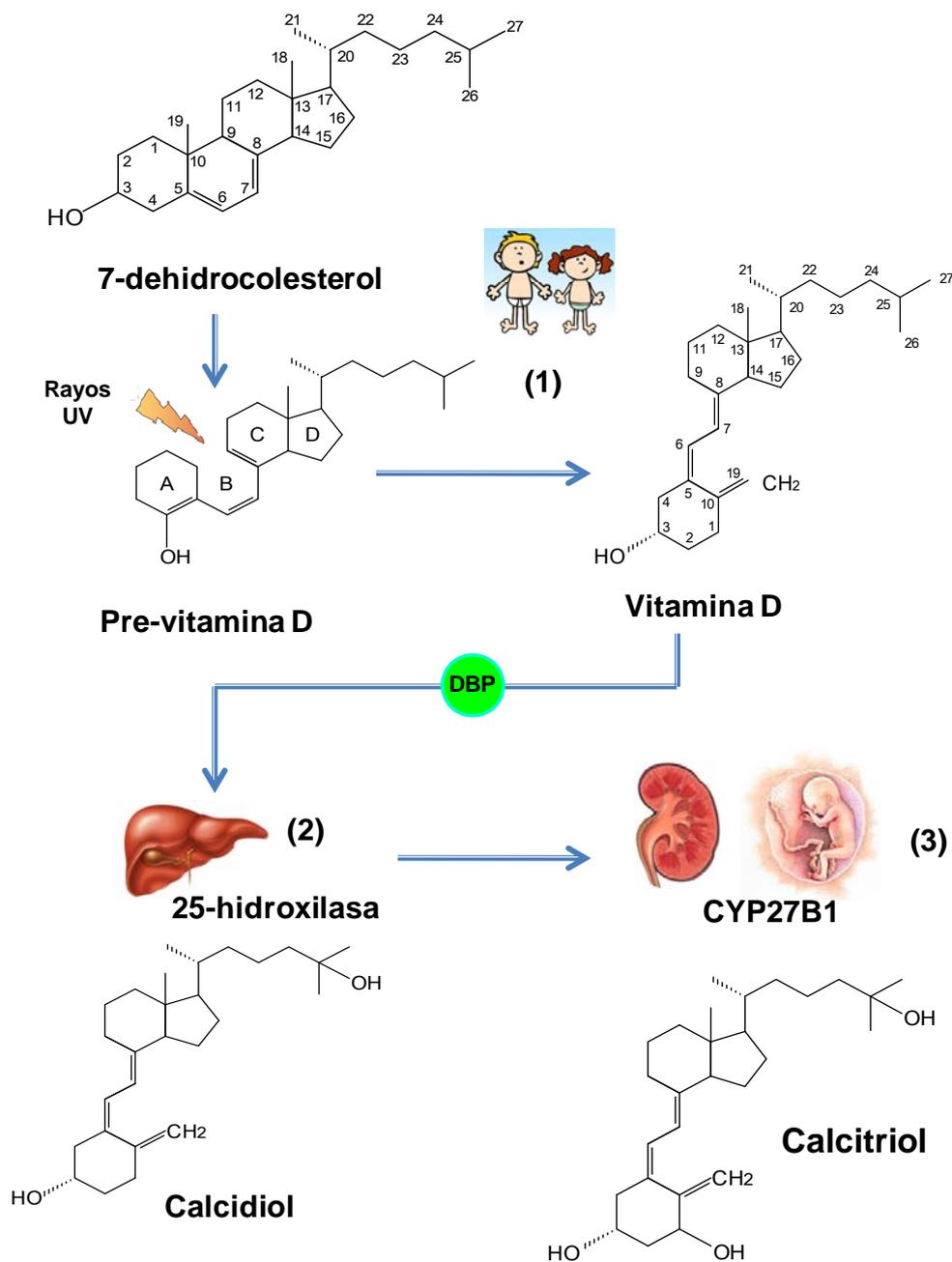


Figura 2. Ruta de síntesis del calcitriol. En la piel (1) la luz solar rompe el anillo B del 7-dehidrocolesterol para formar la vitamina D, la cual se transporta al hígado (2) y es hidroxilada en el carbono 25 para formar al calcidiol. Posteriormente el calcidiol es transportado a tejidos blancos como el riñón y la placenta (3) para producir calcitriol.

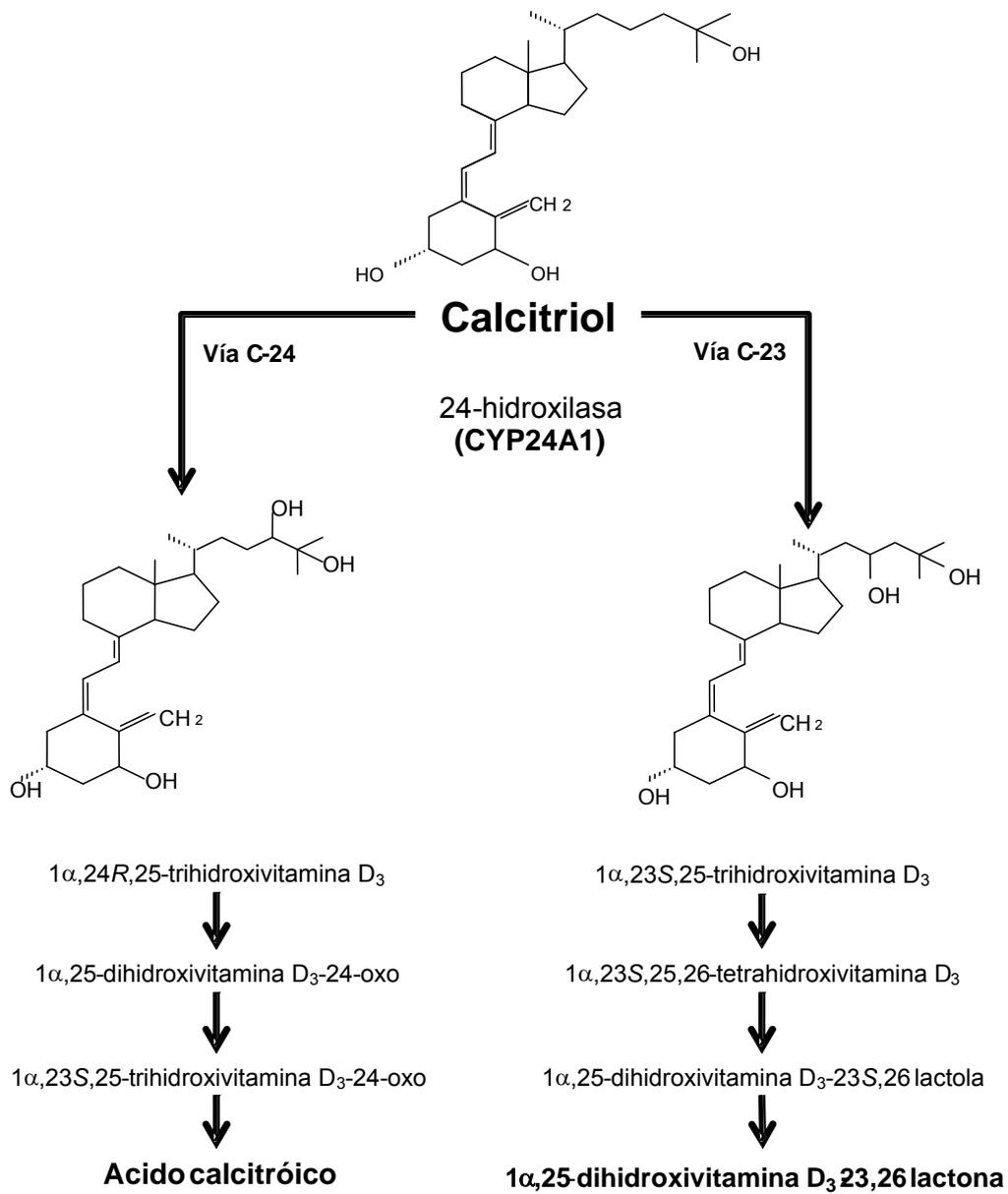


Figura 3. Catabolismo del calcitriol mediado por CYP24A1.

Cabe señalar que el CYP27B1 se ubica abundantemente en las mitocondrias de los túbulos proximales del riñón. La actividad renal de esta enzima es altamente

regulada por diversos factores por ejemplo, la hormona paratiroidea (PTH) es considerada el factor estimulador más potente de esta enzima y es regulada por la concentración de calcio en suero [78]. En efecto Bajwa y cols., demostraron que en líneas celulares epiteliales del túbulo renal, la PTH incrementa la expresión del CYP27B1 [79]. Asimismo, la prolactina y la calcitonina son capaces de inducir tanto la expresión como la actividad del CYP27B1 y por ende la síntesis y secreción de calcitriol [80, 81]. Cabe mencionar que altas concentraciones de calcitriol ejercen un mecanismo de autorregulación en el organismo, inhibiendo la expresión del CYP27B1 y estimulando la del CYP24A1 [82]. De manera interesante, en trofoblasto placentario se demostró que el 8Br AMP cíclico regula la transcripción de ambas enzimas de forma similar al calcitriol [83]. Por otro lado, el ácido litocólico y otros ligandos sintéticos a los receptores RXR (receptor X a retinoides) y PXR (receptor X a pregnano) son capaces de inducir la expresión del CYP24A1 en hepatocitos humanos [77, 84]. En cuanto a la regulación de los citocromos por citocinas solo se ha reportado que la interleucina (IL)-4 e IFN- γ solas o en combinación con lipopéptidos triacilados (TLR-2/1L) incrementan significativamente la expresión del CYP27B1. Asimismo, la IL-4 inhibe la expresión del CYP24A1 y es capaz de bloquear la inducción de este gen por TLR-2/1L [85]. Sin embargo, se desconoce si estas y otras citocinas de tipo pro-inflamatorio pudieran participar en la regulación de los citocromos en otros tipos celulares implicados en eventos reproductivos como lo es la placenta humana.

2. JUSTIFICACION

La preeclampsia es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materno-fetal. Aunque se desconoce su origen se sabe que la PE es una enfermedad hipertensiva del embarazo dependiente de la placenta. Donde existe desorden endocrinológico e inmunológico [49], con deficiente producción de calcitriol y exacerbada síntesis de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β de origen placentario [86, 87]. Por lo que resulta interesante evaluar el efecto del calcitriol sobre la síntesis de citocinas en células de trofoblasto de mujeres con PE y si las citocinas modulan la síntesis y/o degradación del calcitriol de origen placentario en trofoblasto de mujeres NT.

3. HIPÓTESIS

1. Si el calcitriol inhibe a las citocinas pro-inflamatorias inducidas por TNF- α exógeno en placentas de mujeres normotensas, entonces es factible que actúe de manera similar en la placenta con producción exacerbada de TNF- α tales como las que provienen de embarazos con preeclampsia.

2. Considerando que en las mujeres con preeclampsia la concentración de citocinas pro-inflamatorias está exacerbada entonces es probable que regulen el metabolismo del calcitriol en cultivos de trofoblasto de mujeres normotensas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Estudiar el efecto recíproco entre la síntesis del calcitriol y citocinas pro-inflamatorias en el cultivo de trofoblastos obtenidos de mujeres NT y con PE.

4.2 Objetivos Particulares

1. Evaluar el patrón de expresión y secreción de TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β durante 3 días de cultivo celular.
2. Analizar el efecto del calcitriol sobre la expresión y secreción de TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β en trofoblastos obtenidos de mujeres con PE.
3. Investigar el efecto de TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β sobre la expresión del CYP27B1 y CYP24A1 en trofoblastos de mujeres NT.

5. METODOLOGIA

En este estudio se utilizaron placentas humanas, las cuales fueron obtenidas bajo el consentimiento informado de mujeres sometidas a operación cesárea que cursaron embarazos normales y con PE con edad biológica entre 18 y 36 años. Las muestras fueron colectadas bajo la aprobación del comité de ética de la Clínica 4 de Gineco Obstetricia “Luis Castelazo Ayala” del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

5.1 Cultivo de trofoblasto humano

Para realizar el cultivo celular de trofoblastos humanos, las placentas obtenidas en la clínica 4 fueron trasladadas al Departamento de Biología de la Reproducción del INCMNSZ para ser procesadas bajo los lineamientos establecidos por Kliman en 1986 [88] con algunas modificaciones realizadas en nuestro laboratorio como se describe a continuación: con material de cirugía, se cortaron los cotiledones placentarios, los cuales se sumergieron en solución salina al 0.9 % para eliminar el exceso de sangre. Posteriormente, la muestra fue colocada sobre gasas estériles para cortar y retirar las membranas corioamnióticas, el tejido decidual y los vasos sanguíneos. Los cotiledones obtenidos se pesaron en 3 porciones de 35 g, los cuales se trituraron y colocaron en matraces Erlenmeyer de 1L para realizar tres digestiones enzimáticas consecutivas de 20 min a 37°C con agitación constante cada una; con tripsina (1 mg/5 µL) y DNAsa I de páncreas bovino (41.4 mg/mL) en solución salina balanceada de Hank´s 1X (HBSS) libre de calcio y magnesio (tabla 1).

Tabla 1. Volumen y cantidad de reactivos utilizados en cada digestión enzimática.

# digestión/Tiempo	HBSS 1x (mL)	Tripsina (μL)	DNAsa I (μL)
1 ^a /20 min	150	850	100
2 ^a /20 min	100	550	100
3 ^a /20 min	75	350	75

En cada digestión se colectó el sobrenadante de cada matraz que contenía las células disgregadas, las cuales fueron depositadas cuidadosamente en tubos cónicos de 50 mL que contenían 5 mL de suero fetal de ternera (SFT) previamente inactivado. Los tubos se centrifugaron a 3000 revoluciones por minuto (rpm). Al término de la centrifugación se decantaron y al botón celular obtenido se le adicionaron 600 μ L de medio de cultivo DMEM-HG para recuperar las células. En cada etapa el botón celular obtenido se mantuvo en baño maría a 37°C hasta colectar las tres digestiones. La suspensión celular recolectada se colocó sobre tres gradientes continuos de Percoll (tabla 2) del 5 % al 70 % de densidad y se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 min (figura 4A). La obtención de citotrofoblastos se llevo a cabo recuperando la fase intermedia del percoll con una densidad de entre 1.048 y 1.062 g/mL retirando la parte superior del gradiente (figura 4B). Las células obtenidas en tubos falcon nuevos fueron lavadas con medio DMEM-HG. Finalmente se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min y se obtuvo el botón de las células de interés, las cuáles fueron resuspendidas en 20 mL de medio DMEM-HG suplementado al 10% con SFT más penicilina y estreptomicina. Para cuantificar la cantidad de células recuperadas se tomaron 5 μ L de muestra

que fueron depositados en un tubo de 1.5 mL junto con 45 μ L de colorante azul tripan y con ayuda de una cámara de Neubauer se realizó el conteo celular y se calculó la cantidad total de citotrofoblastos presentes en los 20 mL. Así se sembraron 3 000 000 de células en cajas de 25 cm² con 4 mL de medio DMEM-HG suplementado. Después de 18 h de siembra se lavaron en dos ocasiones con 4 mL de HBSS 1X para eliminar las células muertas y se prosiguió a realizar los tratamientos con calcitriol o las citocinas recombinantes en 4 mL de medio DMEM-HG suplementado al 10% con SFT tratado con carbón-dextran. Finalmente, las células se dejaron incubando a 37°C con 80% de humedad y 5% de CO₂ durante 24, 48 o 72 h. Durante los diferentes días de cultivo se tomaron alícuotas de los medios cada 24 h por 3 días consecutivos para cuantificar la secreción de las citocinas, el medio restante se desechó y a las células de cada caja se le adicionaron 850 μ L de trizol para posteriormente evaluar la expresión génica. Se determinó así, el día para realizar los tratamientos con calcitriol (1×10^{-10} a 1×10^{-7} M) y TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β (0.1 a 50 ng/mL) recombinantes.

Tabla 2. Gradiente de percoll. Volumen necesario de percoll y HBSS 1X para la preparación del gradiente de densidad 5-70%. Percoll al 90%: 18 mL de Percoll al 100% + 2 mL de HBSS 10x.

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

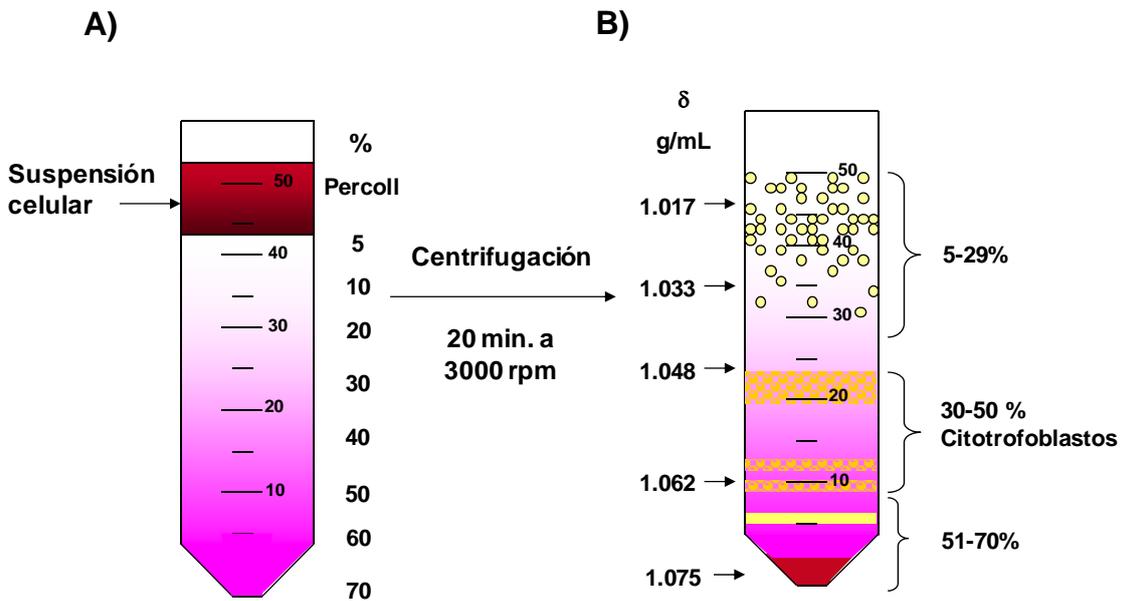
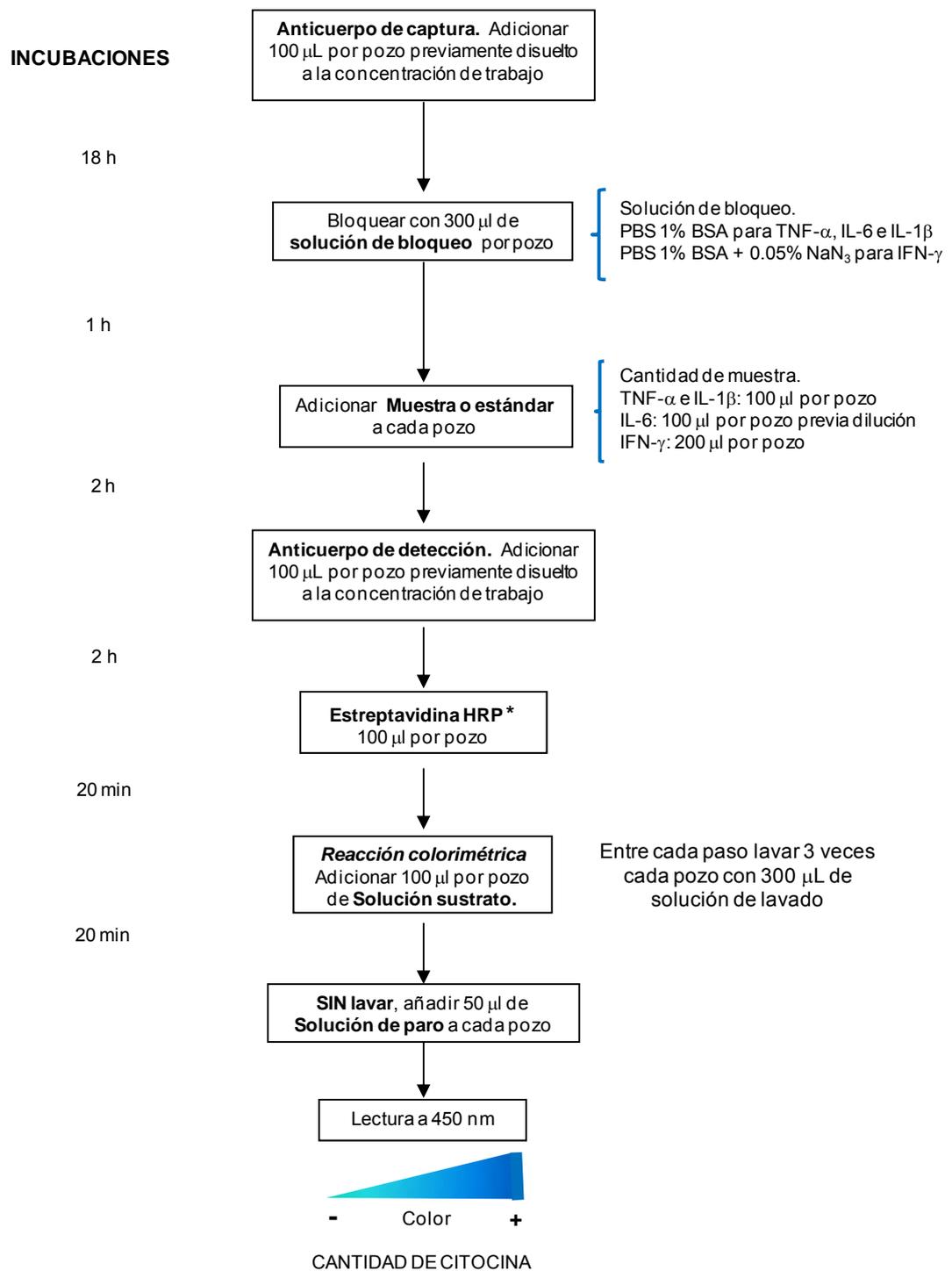


Figura 4. Separación de citotrofbastos. A) La suspensión celular colectada se colocó sobre el gradiente de Percoll 5-70% previamente elaborado. B) Separación celular por centrifugación en 3 bandas: la banda superior 5-29% con elementos de tejido conectivo, pequeños vasos y fragmentos de tejido veloso fue desechada. Las células citotrofbásticas se encontraron en la banda intermedia 30-50% y la banda inferior 51-70% estaba conformada por eritrocitos, linfocitos, neutrófilos y macrófagos que fueron eliminados. δ : densidad

5.2 Cuantificación de citocinas.

Para evaluar la producción de las citocinas de interés se colectó el medio en el que se cultivaron las células y se cuantificó la secreción de cada una de ellas mediante el ensayo de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) con un estuche comercial de la marca R&D Systems como se describe a continuación: en esta técnica se utilizaron placas para ELISA de 96 pozos. En cada uno de los pozos se adicionaron 100 μ L de anticuerpo de captura, reconstituido y diluido a la concentración de trabajo correspondiente a cada citocina y se dejó incubar a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Posteriormente la placa fue lavada y se bloqueo el anticuerpo por 1 h para después adicionar los estándares y las muestras que se incubaron durante 2 h. A continuación se lavo y se colocó el segundo anticuerpo; tras 2 h de incubación se adicionó estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (estreptavidina-HPR) y finalmente solución sustrato por 20 min cada reactivo. En presencia de sustrato se llevo a cabo la reacción colorimétrica, la cual fue detenida al adicionar solución de paro (figura 5). Durante el procedimiento cada placa fue protegida de la luz. La cantidad de citocina se determino utilizando un espectrofotómetro con longitud de onda de 450 nm. La cantidad de citocina se determinó por la coloración obtenida; que fue directamente proporcional a la concentración de citocina presente en cada muestra. Las concentraciones fueron calculadas en pico gramos de citocina por mililitro de medio (pg/mL).



* CUBRIR LA PLACA DE LA LUZ

Figura 5. Diagrama de flujo del método de ELISA

5.3 Estudios de expresión génica

El patrón de expresión de las citocinas en los cultivos de trofoblastos se determinó durante tres días de diferenciación celular. Asimismo, se determinó su expresión en ausencia o presencia de calcitriol. El procedimiento para la extracción de RNA y su procesamiento hacia ácido desoxirribonucleico complementario (DNAC) es descrito a continuación.

5.3.1 Extracción de RNA total

Para aislar el RNA total de los trofoblastos se utilizó Trizol de acuerdo a la técnica derivada de Chomczynski y Sacchi [89]. Brevemente: se separó el medio de cultivo que fue utilizado para la técnica de ELISA como se describió previamente y a las células adheridas en las cajas se les agregó 850 μ L de Trizol para lizarlas y obtener el RNA. Con ayuda de scrappers se rasparon las cajas y se colectó la muestra de trizol en tubos de 1.5 mL estériles. A cada uno de ellos se le adicionó 200 μ L de cloroformo frío, las muestras se agitaron y fueron centrifugadas. Con este procedimiento se formaron tres fases en cada tubo, una inferior que contenía el DNA, una intermedia con proteínas y una superior en fase acuosa transparente conteniendo el RNA. Esta última fase fue colectada en tubos de 1.5 mL (cada muestra en un tubo nuevo) y se le agregó 500 μ L de isopropanol frío, se agitó cada uno y se dejaron reposar a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se agitaron y centrifugaron nuevamente con la finalidad de precipitar el RNA. Posteriormente se decantó el isopropanol de un solo golpe quedando adherido al fondo del tubo el pellet de RNA el cual fue lavado con 1 mL de etanol al 75%. Se

agitaron los tubos, se repitió el último paso de centrifugación y se volvió a desechar el sobrenadante decantando, sacudiendo el exceso de etanol y dejando invertidos los tubos hasta evaporar los residuos de etanol y obtener el RNA total que finalmente fue disuelto en 20 µL de agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC) para protegerlo de RNAsas (tabla 3).

Tabla 3. Condiciones experimentales para la extracción de RNA.

Número de células por muestra 3×10^6	Volumen (µL)	Centrifugación rpm/min a 4°C
Reactivos		
Trizol	850	-
Cloroformo	200	12 500 / 20
Recuperación de fase superior		
Isopropanol	500	13 500 / 20
Incubación por 1h		
Etanol	1000	13 500 / 20
Agua tratada con DEPC	20	

La cuantificación del RNA se realizó con 2 µL de la muestra previamente diluida. La lectura de la absorbancia para determinar la cantidad y pureza del RNA se realizó a 260 y 280 nm. Su concentración se calculó de la siguiente manera:

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

Lo anterior se basa en que una unidad de densidad óptica es equivalente a 40 $\mu\text{g/mL}$ de RNA. Una relación A260/A280 igual a 2.0 implica que se tiene 100 % de RNA y 0 % de proteínas por lo tanto, en nuestros ensayos se descartaron aquellas muestras con pureza menor a 1.6.

5.3.2 Transcripción Reversa

El RNA fue utilizado para obtener DNAc por retrotranscripción, para lo cual se utilizó el estuche *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* siguiendo el manual del fabricante.

Para esta técnica se calculó y se tomaron los mL correspondientes de RNA total para tener una concentración de 1 μg en cada muestra. Así en tubos eppendorf se realizó una primer mezcla que consistió en la cantidad calculada de RNA junto con 1 μL de Oligo dT 50pmol/ μL y se ajustó a un volumen final de 15 μL por tubo con agua grado PCR. Los tubos fueron colocados en un termociclador donde permanecieron 10 min a 65°C para eliminar la formación de estructuras secundarias. Los tubos se retiraron del termociclador y se colocaron sobre hielo durante 1 min y se les agregó 7 μL de mezcla de reacción preparada previamente con 4 μL de solución amortiguadora 5X, 0.5 μL de inhibidor de RNAsas, 2 μL de mezcla de desoxinucleotidos y 0.5 μL de transcriptasa reversa para cada tubo. Una vez agregada la mezcla se regresaron al termociclador para terminar la reacción a 55°C por 30 min y 85°C a 5 min.

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

La qPCR se llevó a cabo usando el estuche *LightCycler Taqman Master* como se describe a continuación: Para realizar la amplificación del DNAC se empleó la técnica de qPCR que utiliza el sistema de sondas Taqman de hidrólisis. Las sondas de hidrólisis son pequeños oligonucleótidos que contienen un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador cuando la sonda está intacta. Sin embargo, durante la amplificación del gen la DNA polimerasa rompe la sonda desprendiendo el extremo aceptor y liberando al fluorocromo [90], la cantidad de fluorescencia emitida es detectada por el equipo siendo esta proporcional a la cantidad de amplicones presentes en cada ciclo.

La sonda específica para cada gen se adicionó a una mezcla de reacción que contenía 6.7 μL de agua grado PCR, 0.1 μL de cada iniciador correspondiente al gen de interés a una concentración de 20 μM y 2 μL de DNA polimerasa *Taqman* 5X, obteniendo 9 μL de la mezcla que fue homogenizada. A la cual, se le añadió 1 μL de DNAC, obteniendo un volumen final de 10 μL por cada reacción. El sistema utiliza capilares de vidrio donde se colocan los 10 μL de la mezcla que fueron centrifugados a 1000 rpm por 30 segundos y posteriormente colocados en un termociclador previamente programado bajo las condiciones que se muestran en la tabla 4.

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

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

Los resultados obtenidos fueron comparados contra el gen constitutivo Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los iniciadores y las sondas específicas fueron diseñados usando el *Universal Probe Library Assay Design Center* de Roche (<http://qpcr2.probefinder.com/organism.jsp>) obteniendo las siguientes secuencias:

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

Gen blanco	Orientación de los oligonucleótidos (secuencia 5'-----3')		Amplicon (nt)	# Sonda
	Sentido	Anti-sentido		
CYP27B1	CTT GCG GAC TGC TCA CTG	CGC AGA CTA CGT TGT TCA GG	123	63
CYP24A1	CAT CAT GGC CAT CAA AAC AA	GCA GCT CGA CTG GAG TGA C	65	88
TNF-α	CAG CCT CTT CTC CTT CCT GA	GCC AGA GGG CTG ATT AGA GA	123	29
IFN-γ	GGC ATT TTG AAG AAT TGG AAA	TTG GAT GCT CTG GTC ATC TTT	111	21
IL-6	GAT GAG TAC AAA AGT CCT GAT CCA	CTG CAG CCA CTG GTT CTG T	130	40
IL-1β	TAC CTG TCC TGC GTG TTG AA	TCT TTG GGT AAT TTT TGG GAT CT	76	78
hCG	GCT CAC CCC AGC ATC CTA T	CAG CAG CAA CAG CAG CAG	131	79
GAPDH	AGC CAC ATC GCT GAG ACA C	GCC CAA TAC GAC CAA ATC C	66	60

5.4 Análisis de los datos

Para el estudio se procesaron por lo menos tres placentas de cada grupo, los tratamientos fueron realizados por triplicado tanto para la expresión como para la secreción en cada placenta. Los resultados se compararon y se expresaron como la media \pm la desviación estándar (DE). Los datos obtenidos en los diferentes días de cultivo y entre las diferentes concentraciones de calcitriol y de TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β se analizaron mediante la prueba estadística de ANOVA. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Viabilidad y funcionalidad del cultivo celular

6.1.1 Cambios Morfológicos

Los citotrofbastos son células especializadas que tienen la capacidad de formar prolongaciones citoplasmáticas para fusionarse con sus células vecinas y formar sinciotrofbastos. Este cambio morfológico en cultivo se puede apreciar paulatinamente conforme pasan los días y es un parámetro para determinar un buen cultivo apreciado mediante observación con microscopio óptico. En la figura 6 se observan células de trofoblasto durante su proceso de diferenciación. Día 0. En el día de siembra se observan citotrofbastos mononucleados. Día 1. A las 24 h posteriores a la siembra las células mononucleares modifican su aspecto con proyecciones citoplasmáticas que permiten contactar células vecinas creando el fenotipo multinucleado. Día 2 y 3 (48 y 72 h). La formación de sincicios es evidente y es debido exclusivamente de la fusión celular, ya que su proliferación es escasamente del 10% [88].

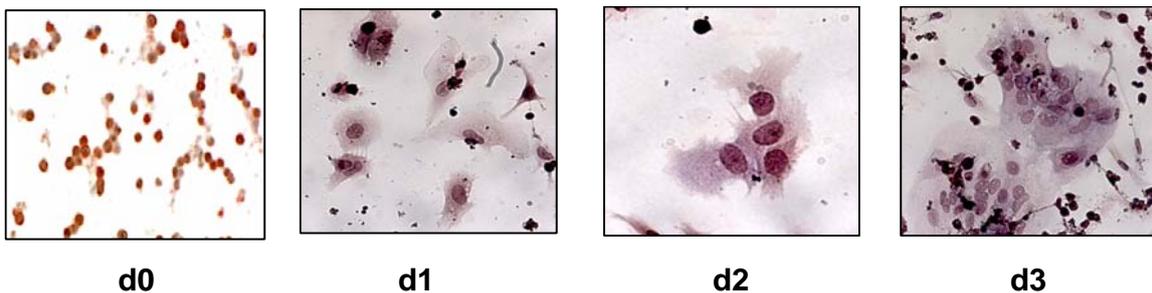


Figura 6. Diferenciación del trofoblasto en cultivo. día 0 citotrofbastos, día 1 las células comienzan presentar proyecciones citoplasmáticas (24h), día 2 fusión de células vecinas para la formación sincicial (48h), día 3 sinciotrofbastos (72h).

6.1.2 Evaluación de hCG

La diferenciación del trofoblasto se acompaña del incremento en la producción hormonal de hCG la cual sirve como un parámetro de la funcionalidad de este tipo celular. Como se aprecia en la figura 7, la expresión de hCG se incrementó significativamente tanto en el trofoblasto de mujeres NT como en el de mujeres con PE a los diferentes días de cultivo con respecto al día 1. Cabe destacar que la expresión de la hCG fue significativamente mayor en el trofoblasto de mujeres con PE. Estos datos coinciden con reportes previos en la literatura donde se demuestra que esta hormona esta incrementada en mujeres que cursan embarazos con PE [55].

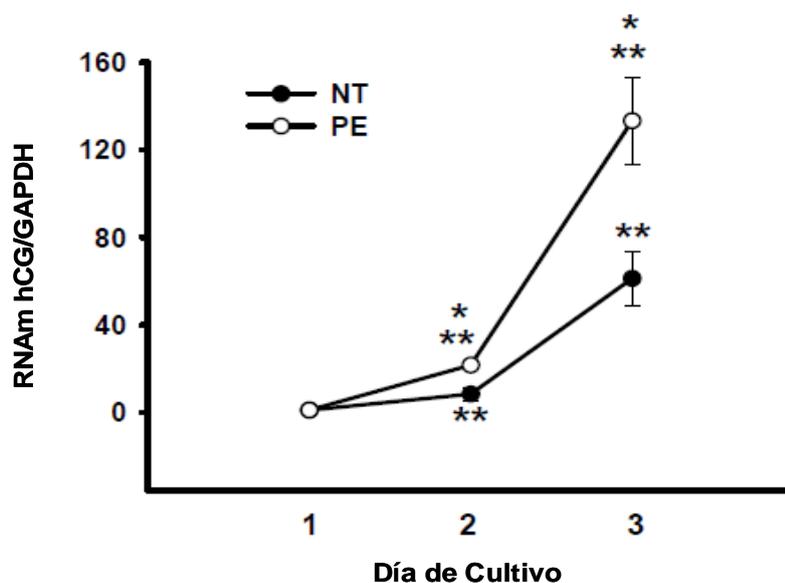


Figura 7. Expresión de la hCG durante 3 días de diferenciación de trofoblastos de mujeres NT (círculos negros) y con PE (círculos blancos). La expresión de la hCG fue evaluada por qPCR atribuyendo el valor de 1 al día 1. Cada barra representa la media \pm DE (n = 4), * P < 0.05 respecto al día 1.

6.2 Diferencias génicas presentes en el trofoblasto PE vs. NT.

Se evaluó la expresión del CYP27B1, CYP24A1, IL-10 y de la tirosincinasa -1 soluble tipo fms (sFlt-1), genes que se sabe están alterados en la PE con respecto a un embarazo normal. En la figura 8, se aprecia que la expresión de CYP27B1 e IL-10 están significativamente disminuidos en los trofoblastos PE comparados con los NT. Por el contrario, la expresión del CYP24A1 y sFlt-1 se encuentra incrementada significativamente en los cultivos PE. Estos resultados muestran que los trofoblastos en cultivo de mujeres con PE conservan algunas de las características observadas en la patología al momento de realizar las evaluaciones .

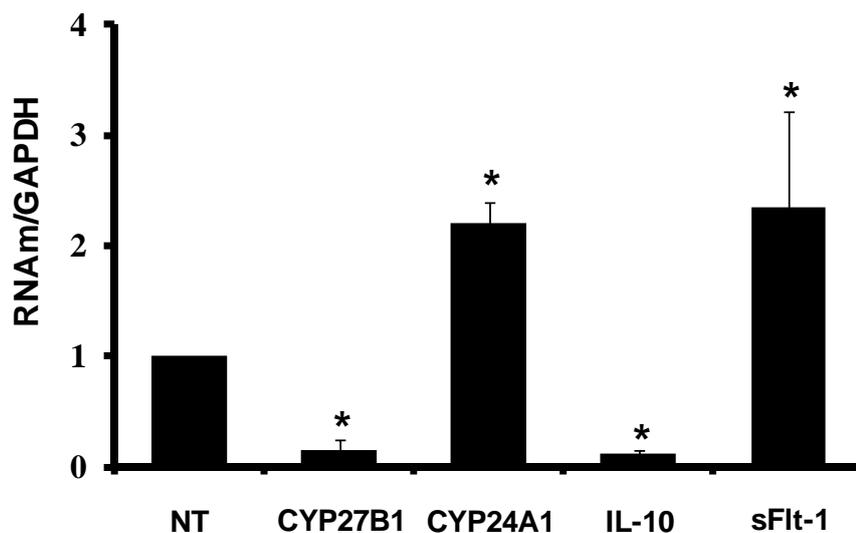


Figura 8. Comparación de la expresión de CYP27B1, CYP24A1, IL-10 y sFlt-1 en trofoblastos de mujeres con PE vs. NT después de 24 h de siembra. La expresión fue evaluada por qPCR. Al dato de NT se les asignó el valor de 1. Las barras representan la media \pm DE de n=4. * $P < 0.05$ vs NT.

6.3 Patrón de expresión de TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β en trofoblastos de mujeres NT y con PE durante 3 días de cultivo.

La expresión génica de las citocinas en estudio mostró que en el trofoblasto de mujeres NT el IFN- γ no se modificó significativamente durante los 3 días de cultivo. En contraste la expresión TNF- α , IL-6 e IL-1 β disminuyeron durante el proceso de diferenciación celular. Asimismo, la expresión de las cuatro citocinas estudiadas disminuyó a través de los diferentes días en el trofoblasto de mujeres con PE. Estos resultados fueron corroborados al evaluar la secreción donde se observa el mismo patrón de disminución durante los días de cultivo tanto en los trofoblasto de NT como en los de PE para el caso de TNF- α , IL-6 e IL-1 β (figura 9). Cabe señalar que no fue posible la detección de IFN- γ , en cada medio de cultivo evaluado.

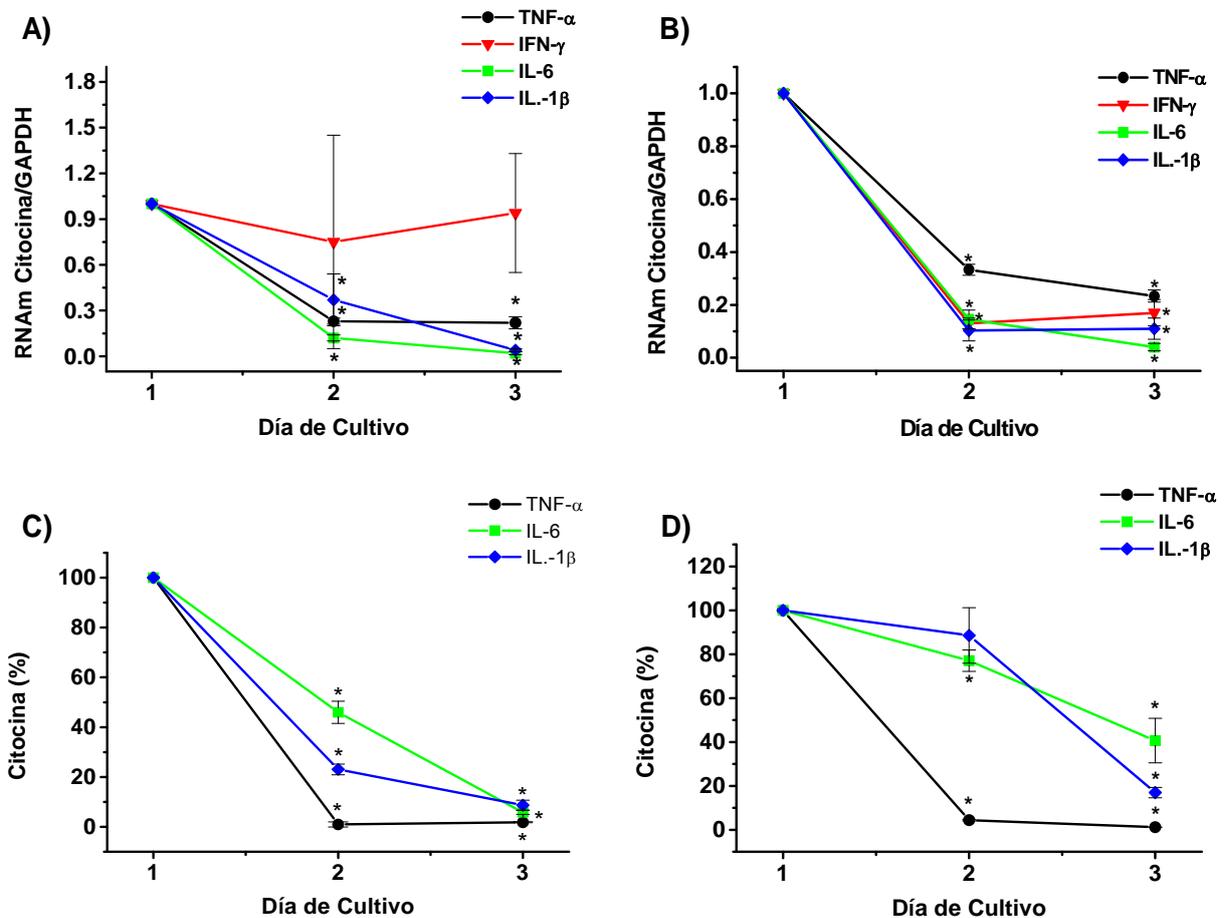


Figura 9. Patrón de expresión de citocinas en trofoblastos humanos durante tres días de cultivo. A) Expresión de TNF- α , INF- γ , IL-6 e IL-1 β en trofoblastos de mujeres NT. B) Expresión de TNF- α , INF- γ , IL-6 e IL-1 β en trofoblastos de mujeres con PE. Porcentaje de secreción de TNF- α , IL-6 e IL-1 β en la placenta de mujeres NT (C) y con PE (D). La expresión de las citocinas fue evaluada por qPCR atribuyendo el valor de 1 al día 1 y la secreción por ELISA atribuyendo 100% al día 1 para cada citocina. Los datos representan la media \pm DE de n = 3, * P < 0.05 respecto al día 1.

Como se aprecia en las graficas de la figura 9 la mayor producción de citocinas se observó en el día 1 de cultivo. Por lo tanto, los tratamientos en ausencia o presencia de calcitriol, su vehículo (Vh, etanol 0.1%) o las citocinas recombinantes se realizaron en el día 1 de cultivo y se evaluó la expresión y secreción 24 h posteriores a la realización de los tratamientos.

6.4 Efecto del calcitriol sobre la expresión de TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β

Como se muestra en la figura 10, la expresión de TNF- α , IFN- γ e IL-6 se encuentra significativamente incrementada en la placenta de mujeres con PE comparada con la de mujeres NT mientras que la de IL-1 β no fue estadísticamente diferente entre ambos grupos. Además se puede observar que el calcitriol inhibió significativamente la expresión de TNF- α e IL-6, mientras que para IFN- γ e IL-1 β se observó la disminución de su expresión de manera no significativa.

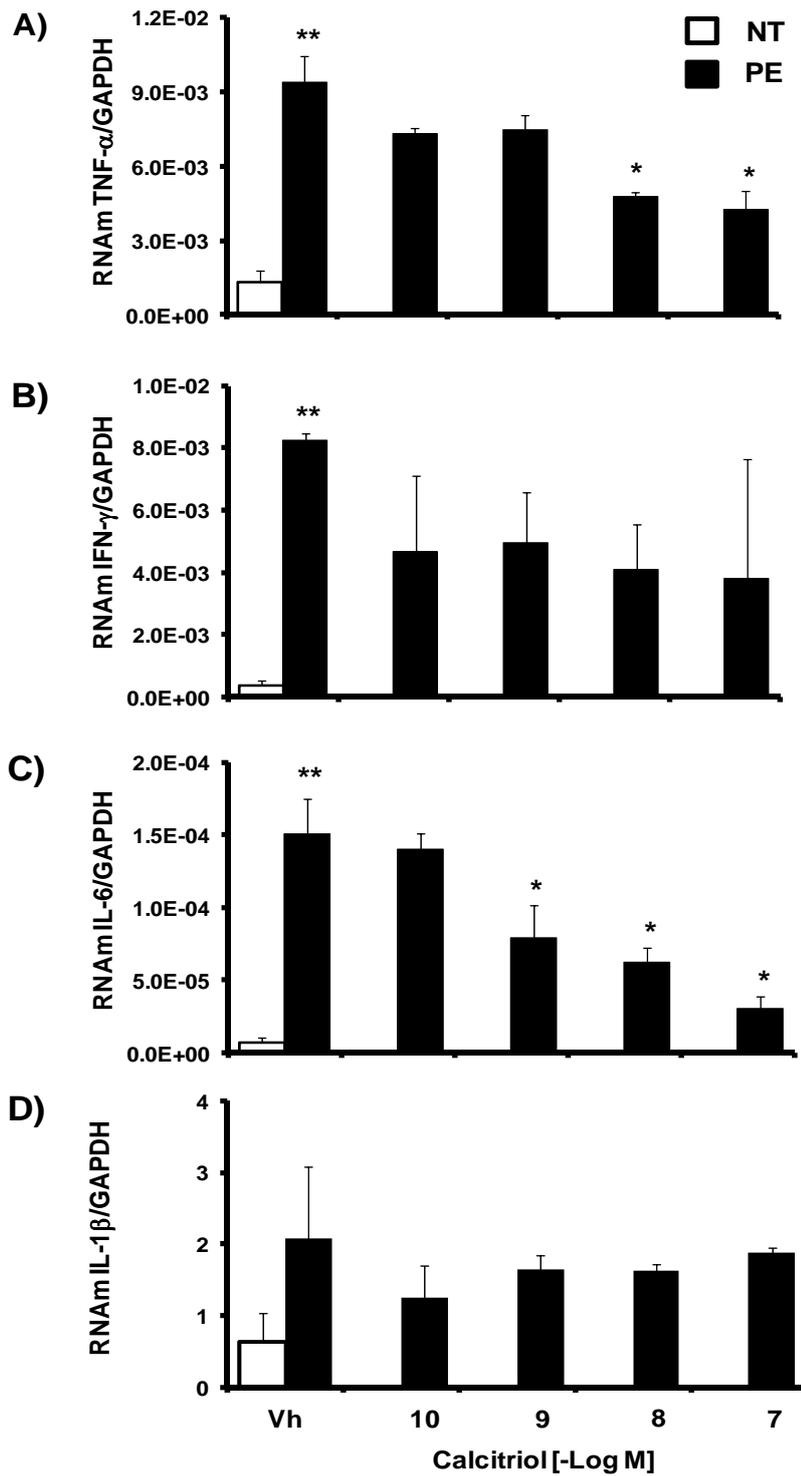


Figura 10. Comparación de la expresión de TNF- α (A), IFN- γ (B), IL-6 (C) e IL-1 β (D) entre NT y PE. Las barras blancas representan la expresión de las citocinas en NT y las barras negras en PE y en presencia de diferentes concentraciones de calcitriol. La expresión fue evaluada por qPCR. Los datos muestran la media \pm DE (n = 3), * P < 0.05 respecto al Vh, ** P < 0.05 Vh NT vs. Vh PE.

6.5 Secreción de TNF- α , IL-6 e IL-1 β en presencia de calcitriol.

Como se observa en la figura 11 el calcitriol inhibió también la secreción de TNF- α , IL-6 e IL-1 β de manera dependiente de la concentración y solo la secreción de IL-6 de las mujeres con PE fue significativamente diferente a las NT.

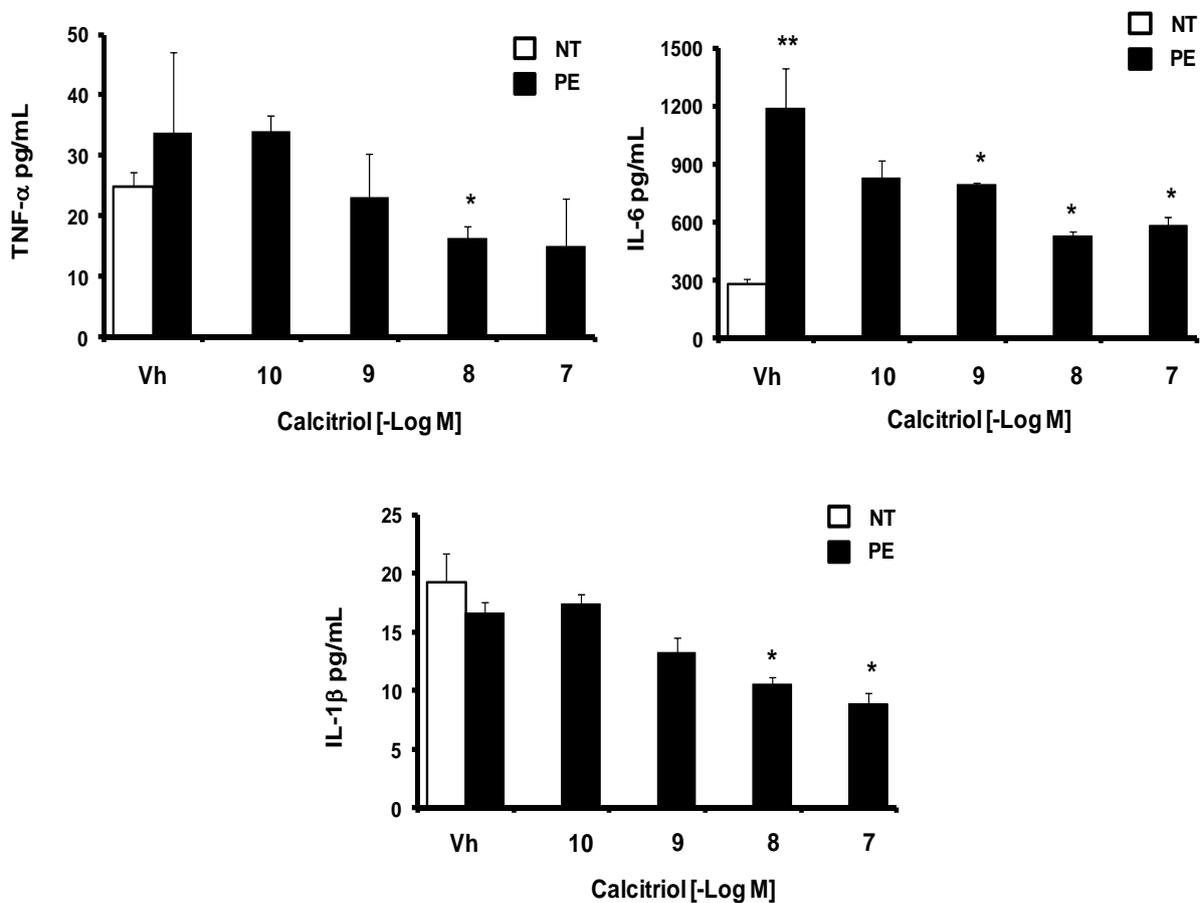


Figura 11. Efecto del calcitriol sobre la secreción de TNF- α (A), IL-6 (B) e IL-1 β (C). La secreción fue evaluada por ELISA. Los datos representan la media + DE (n=3). * $P < 0.05$ respecto al Vh ** $P < 0.05$ Vh NT vs. Vh PE.

6.6 Efecto del TNF- α , INF- γ , IL-6 e IL-1 β sobre la expresión de CYP27B1 y CYP24A1 en trofoblastos de mujeres NT.

Los resultados obtenidos muestran que TNF- α , INF- γ , IL-6 e IL-1 β inducen significativamente la expresión de CYP27B1 y CYP24A1 con respecto a su control. Sin embargo, en presencia de IL-6 e IL-1 β no se encontraron diferencias significativas sobre la regulación de ambos citocromos en concentraciones equimolares de cada citocina. Por el contrario, en presencia de TNF- α se indujo preferencialmente al CYP24A1 sobre el CYP27B1, mientras que el IFN- γ favoreció la expresión del CYP27B1 comparado con la del CYP24A1. Es decir, el análisis muestra que IFN- γ induce la síntesis de calcitriol mientras que el TNF- α induce su degradación (figura 12).

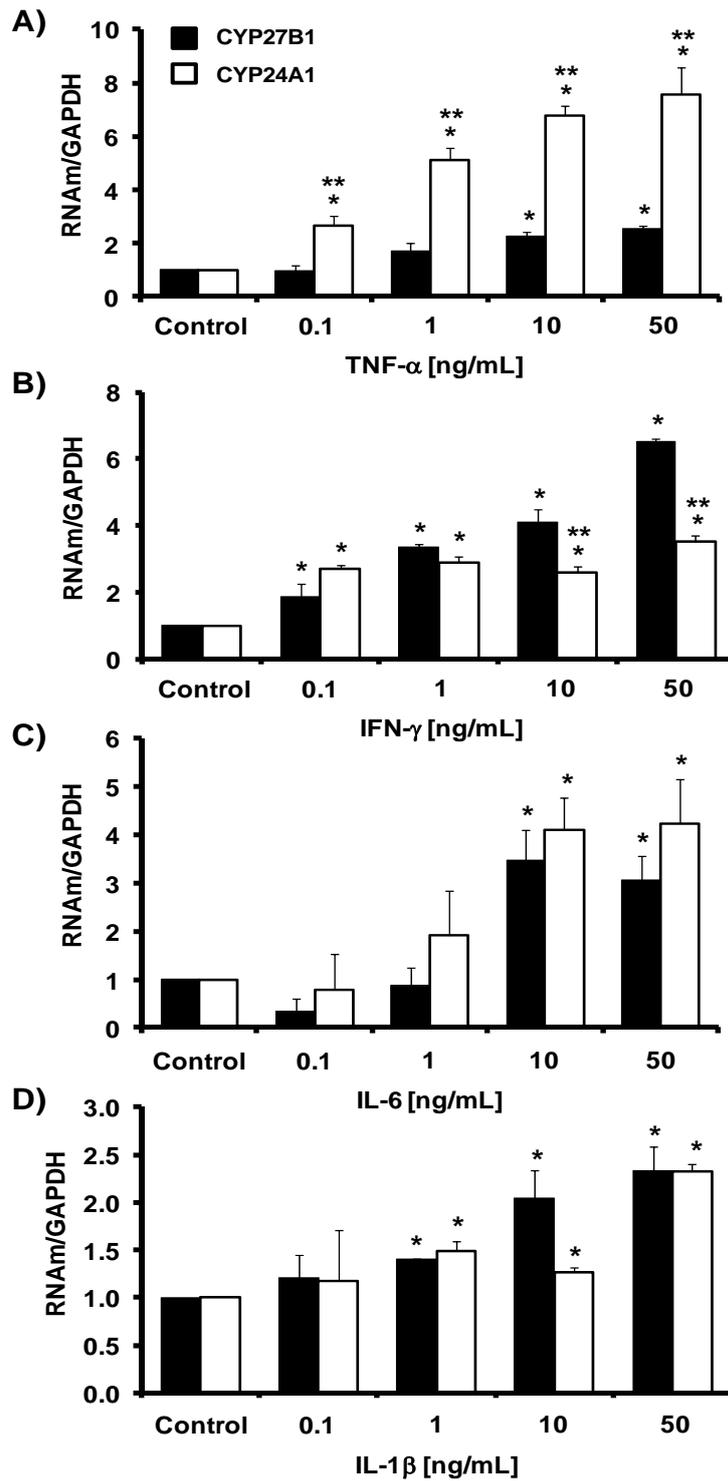


Figura 12. Efecto de TNF- α (A), INF- γ (B), IL-6 (C) e IL-1 β (D) sobre la expresión de CYP27B1 y CYP24A1. La expresión fue evaluada por qPCR. Los datos representan la media \pm DE de n = 3 placentas NT donde se le atribuyó el valor de 1 al control en ambos casos. * $P < 0.05$ vs. Control, ** $P < 0.05$ entre la misma concentración de la citocina para CYP27B1 vs CYP24A1.

7. DISCUSIÓN

7.1 General

El embarazo es un evento transitorio que implica cambios fisiológicos y metabólicos en la madre desde la implantación y durante el crecimiento, el desarrollo y la maduración tanto de la placenta como del feto hasta llegar al término de la gestación. Durante este periodo se dan fluctuaciones de hormonas polipeptídicas, esteroides, factores de crecimiento y citocinas anti- y pro-inflamatorias, que en concentraciones adecuadas y de manera coordinada interactúan mediando cascadas de señalización intracelular con efectos autócrinos, parácrinos y endócrinos favoreciendo la adaptación y la tolerancia materna. Sin embargo, alteraciones en la producción de cada compuesto puede ser causa o consecuencia de diferentes patologías observadas en el embarazo como la PE. Por ejemplo, se ha asociado la baja concentración de calcitriol y la exacerbada producción de citocinas pro-inflamatorias con la PE. Sin embargo, a la fecha no hay reportes del efecto recíproco entre ellos para mediar su producción en el embarazo.

Considerando lo anterior, en este trabajo se analizaron: 1) algunos genes que se expresan diferencialmente en el cultivo de placenta de mujeres NT vs. PE, 2) la expresión y síntesis de algunas citocinas a lo largo del cultivo celular NT vs. PE, 3) los efectos del calcitriol sobre la expresión y secreción del TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β en células de trofoblasto de mujeres con PE y 4) el efecto de estas citocinas sobre la expresión de los citocromos CYP27B1 y CYP24A1 en células de trofoblasto de mujeres NT.

7.2 Controles del cultivo celular NT vs. PE

La validación del cultivo celular es muy importante y como control de viabilidad se evaluó la expresión del RNAm de la hCG durante 3 días de diferenciación celular tanto de cultivos de placentas de mujeres NT como PE. Los resultados mostraron que en ambos grupos la expresión de la hCG se incrementa significativamente a medida que las células se transforman a sinciciotrofbastos como previamente se ha descrito, lo cual avala lo observado al microscopio sobre el cambio morfológico hacia células multinucleares. De manera interesante la expresión de la hormona fue estadísticamente mayor en los trofbastos de mujeres con PE comparados con las células de cultivos NT, lo cual además concuerda con datos reportados en el suero y placenta de mujeres con PE donde la concentración de hCG se incrementa conforme aumenta la severidad de la enfermedad [55]. Reportes indican que la expresión génica de las diferentes isoformas que codifican para la sub-unidad β de la hCG se encuentran incrementadas entre 3 y 6 veces en la placenta de mujeres con PE comparadas con placentas de embarazos normales [91].

Por otro lado, el análisis de la expresión basal de CYP27B1, CYP24A1, IL-10 y sFlt-1 entre muestras de placenta de mujeres NT vs. PE, cuya evaluación fue realizada 24 horas después de la siembra, mostró que en la placenta de mujeres con PE la expresión génica del CYP27B1 e IL-10 están disminuidos mientras que el CYP24A1 y el sFlt-1 están incrementados con respecto a las muestras de mujeres NT. Estos datos son consistentes con la literatura donde se reportan bajas concentraciones de CYP27B1, disminución de 1.7 veces la expresión de la

IL-10 y el incremento de 3 veces la expresión de sFlt-1 en placentas a término de mujeres con PE [60, 91, 92]. Adicionalmente los resultados mostraron que la expresión génica tanto de TNF- α , como de IFN- γ e IL-6 se encuentra significativamente incrementada en la placenta de mujeres con PE comparadas con NT. Estos hallazgos son importantes ya que el tejido utilizado para el cultivo celular conserva en este tiempo algunas características observadas en el fenotipo preeclámptico.

7.3 Patrón de síntesis de citocinas pro-inflamatoria

En relación a la producción de las citocinas a lo largo del cultivo celular, se determinó que el TNF- α , IL-6 e IL-1 β producidas por el trofoblasto humano en cultivo de mujeres NT y con PE, disminuyeron su expresión y síntesis conforme avanza el tiempo de diferenciación celular, un patrón opuesto al observado con la expresión de hCG. Estos datos coinciden con previos resultados obtenidos en trofoblastos de embarazos NT donde la expresión de la IL-6 e IL-1 β disminuyen en un 72 y 60% respectivamente durante el proceso de diferenciación evaluado durante 9 días de cultivo [93]. Contrario a lo esperado, cuando se evaluó la expresión del IFN- γ se observó que solo en células de mujeres con PE disminuyó significativamente mientras que no se observó un cambio significativo en el trofoblasto de mujeres NT. Inexplicablemente, la secreción de IFN- γ no fue detectada en los medios recolectados de los grupos en estudio a los diferentes días de cultivo, aún en tejido PE donde existen reportes que indican la producción incrementada de esta citocina [37]. Aunque la nula detección del IFN- γ en las

placentas utilizadas en este estudio podría deberse al límite de detección de los estuches comerciales usados, el resultado final indica que la producción de esta citocina en ambos grupos es muy baja.

7.4 Efecto del calcitriol sobre la síntesis de TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β

Debido a las propiedades inmunomoduladoras del calcitriol en diferentes tipos celulares, se ha sugerido a esta hormona benéfica para la gestación y la prevención de diversas patologías del embarazo [20]. Por lo tanto resultó interesante evaluar el potencial efecto del secoesteroide sobre células provenientes de una condición inflamatoria natural como es el tejido placentario de mujeres con PE.

En los cultivos de trofoblasto de mujeres con PE incubados en presencia de diferentes concentraciones de calcitriol, se demostró que el calcitriol disminuyó significativamente la síntesis de las citocinas pro-inflamatorias, TNF- α e IL-6. Lo cual corrobora evidencias experimentales demostradas por nuestro grupo de trabajo en el 2009, donde se demostró que el calcitriol inhibió significativamente la expresión de citocinas de tipo pro-inflamatorio como el TNF- α , IFN- γ e IL-6 inducidas por TNF- α adicionado exógenamente en trofoblastos humanos de mujeres NT [28, 36], las cuales son consideradas dañinas cuando se producen de manera exacerbada durante el embarazo, como es el caso de las mujeres con PE. Cabe señalar que en el presente trabajo el efecto del calcitriol ejercido sobre la expresión de IFN- γ e IL-1 β mostró solo tendencias a la baja pero no fueron

significativamente diferentes al control. De manera interesante, al evaluar la secreción de $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 e IL-1 β , las 3 citocinas fueron inhibidas sugiriendo que hay implicaciones traduccionales importantes que podrían mediar la inhibición de IL-1 β , un tema que necesita ser abordado posteriormente.

Estos resultados son relevantes ya que un importante mecanismo envuelto en la adaptación y tolerancia materna en el embarazo es el predominio del fenotipo Th2 sobre el tipo Th1, para así evitar la muerte excesiva de los trofoblastos, permitir su invasión en la pared uterina y así permitir la anidación del feto. Además de disminuir varias complicaciones durante la gestación que están estrechamente relacionadas con la exacerbada síntesis de citocinas pro-inflamatorias. Estos resultados apoyan la necesidad de suplementos de vitamina D para equilibrar el sistema inmunológico de las mujeres con PE y de otras patologías inflamatorias del embarazo disminuyendo la morbilidad y/o mortalidad derivadas de estas complicaciones gestacionales.

El efecto inhibitor ejercido por el calcitriol coincide con estudios previos donde se ha reportado que esta hormona reduce la expresión de varias citocinas anti- y pro-inflamatorias producidas por células NK's uterinas durante el primer trimestre de gestación [9]. En particular, el efecto inmunomodulador del calcitriol en la interface materno-fetal sugiere que la hormona lleva a cabo sus efectos de manera autócrina sobre las células del trofoblasto ejerciendo un efecto protector durante el embarazo. Asimismo no se descarta que la deficiente producción de calcitriol por la placenta sea un factor limitante para controlar las concentraciones adecuadas

de las citocinas en este tipo celular o ejerciendo un efecto parácrino sobre la polarización de los linfocitos, sobre la activación de células NK deciduales o sobre células adyacentes productoras de citocinas.

7.5 Efecto de citocinas pro-inflamatorias sobre la síntesis de calcitriol

Tomando en cuenta que las citocinas tienen la capacidad de modular la expresión génica de los citocromos involucrados en la ruta de síntesis y degradación del calcitriol en monocitos y macrófagos [85, 94]. Resultó interesante conocer si TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β , que se ha reportado están incrementadas en la PE y son reguladas negativamente por el calcitriol pudieran recíprocamente afectar la síntesis del calcitriol en la placenta de mujeres NT.

Cabe señalar que previamente se había observado que el TNF- α induce la expresión génica del CYP24A1 [36]. Sin embargo, en este estudio demostramos que en los cultivos de trofoblasto de mujeres NT incubados en presencia de diferentes concentraciones de cada citocina se inducen la expresión de CYP27B1 y CYP24A1 de manera significativa y dependiente de la concentración comparada con el control, sugiriendo que la síntesis y degradación del calcitriol es susceptible a la acción de las citocinas en este tejido. El análisis minucioso de los datos muestra que el TNF- α favorece la expresión del CYP24A1 sobre la del CYP27B1, mientras que IFN- γ induce preferencialmente CYP27B1 sobre CYP24A1. Es decir, que mientras el IFN- γ promueve la síntesis de calcitriol en la placenta el TNF- α favorece su degradación. Lo anterior era esperado, considerando que el IFN- γ es

un potente estimulador de la expresión de CYP27B1 y de la síntesis de calcitriol en tejido extrarrenal como los monocitos y macrófagos mediada por la vía de señalización de las JAK-STAT [85, 94].

Lo relevante aquí es la comparación del posible efecto competitivo para favorecer la síntesis o degradación del calcitriol. En primer lugar descartamos alguna participación trascendental de IL-6 e IL-1 β sobre la regulación de CYP27B1 y CYP24A1 ya que la comparación entre cada concentración equimolecular no es significativamente diferente entre los citocromos. Sin embargo, los resultados analizados en presencia de TNF- α e IFN- γ muestran datos interesantes inclinados la balanza hacia un efecto que favorece la degradación del calcitriol en placentas de mujeres con PE por: 1) el hecho de que la transcripción del gen de IFN- γ disminuye durante la diferenciación de los trofoblastos cultivados de mujeres con PE a diferencia de las NT, 2) que la secreción de IFN- γ no fue detectada en los medios de cultivo evaluados en el estudio, mientras que existe una alta producción de TNF- α , 3) que la expresión inter-ensayo es mayor de TNF- α que de IFN- γ y 4) que el TNF- α está particularmente incrementado en el suero y placenta de mujeres con PE comparado con mujeres NT [95, 96]. Lo anterior apoya el concepto de que los efectos mediados por TNF- α sobre la síntesis de calcitriol son predominantemente ejercidos en la placenta y se sugiere que el calcitriol que es sintetizado es inmediatamente degradado debido a un entorno rico en TNF- α como lo observado en la PE.

8. CONCLUSIONES

1. La diferenciación del trofoblasto disminuye significativamente la expresión y secreción de TNF- α , IL-6 e IL-1 β conforme avanzan los días de cultivo tanto en placentas de mujeres NT y con PE.
2. La expresión de IFN- γ se mantiene constante en los trofoblasto de mujeres NT, mientras que en los de PE su expresión disminuye significativamente durante los 3 días de cultivo.
3. El calcitriol inhibió de manera dependiente de la concentración la expresión y secreción de TNF- α e IL-6 en la placenta de mujeres con PE.
4. La expresión de IFN- γ e IL-1 β no es afectada por el calcitriol. Sin embargo, a elevadas concentraciones el calcitriol inhibió la secreción de IL-1 β .
5. Tanto TNF- α , como IFN- γ , IL-6 e IL-1 β inducen la expresión de CYP27B1 y CYP24A1 en los trofoblastos de mujeres NT
6. El TNF- α favorece la síntesis de CYP24A1/CYP27B1, mientras que IFN- γ induce CYP27B1/CYP24A1.
7. IL-6 e IL-1 β no modifican la expresión de CYP27B1 y CYP24A1 a concentraciones equimoleculares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dusso, A.S., A.J. Brown, and E. Slatopolsky, *Vitamin D*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(1): p. F8-28.
2. Diaz, L., I. Sanchez, E. Avila, A. Halhali, F. Vilchis, and F. Larrea, *Identification of a 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene transcription product in cultures of human syncytiotrophoblast cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(7): p. 2543-9.
3. Hewison, M., D. Zehnder, R. Chakraverty, and J.S. Adams, *Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 alpha-hydroxylase*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **215**(1-2): p. 31-8.
4. Deeb, K.K., D.L. Trump, and C.S. Johnson, *Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(9): p. 684-700.
5. Piemonti, L., P. Monti, M. Sironi, P. Fraticelli, B.E. Leone, E. Dal Cin, P. Allavena, and V. Di Carlo, *Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells*. J Immunol, 2000. **164**(9): p. 4443-51.
6. Rigby, W.F., T. Stacy, and M.W. Fanger, *Inhibition of T lymphocyte mitogenesis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol)*. J Clin Invest, 1984. **74**(4): p. 1451-5.
7. Baeke, F., H. Korf, L. Overbergh, E. van Etten, A. Verstuyf, C. Gysemans, and C. Mathieu, *Human T lymphocytes are direct targets of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the immune system*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010. **121**(1-2): p. 221-7.
8. Alroy, I., T.L. Towers, and L.P. Freedman, *Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(10): p. 5789-99.
9. Evans, K.N., L. Nguyen, J. Chan, B.A. Innes, J.N. Bulmer, M.D. Kilby, and M. Hewison, *Effects of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3*

- on cytokine production by human decidual cells. Biol Reprod, 2006. 75(6): p. 816-22.*
10. Khoo, A.L., L.Y. Chai, H.J. Koenen, B.J. Kullberg, I. Joosten, A.J. van der Ven, and M.G. Netea, *1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates cytokine production induced by Candida albicans: impact of seasonal variation of immune responses. J Infect Dis, 2011. 203(1): p. 122-30.*
 11. Peelen, E., S. Knippenberg, A.H. Muris, M. Thewissen, J. Smolders, J.W. Tervaert, R. Hupperts, and J. Damoiseaux, *Effects of vitamin D on the peripheral adaptive immune system: A review. Autoimmun Rev, 2011.*
 12. Cantorna, M.T., W.D. Woodward, C.E. Hayes, and H.F. DeLuca, *1,25-dihydroxyvitamin D3 is a positive regulator for the two anti-encephalitogenic cytokines TGF-beta 1 and IL-4. J Immunol, 1998. 160(11): p. 5314-9.*
 13. Cantorna, M.T., D.A. Hullett, C. Redaelli, C.R. Brandt, J. Humpal-Winter, H.W. Sollinger, and H.F. Deluca, *1,25-Dihydroxyvitamin D3 prolongs graft survival without compromising host resistance to infection or bone mineral density. Transplantation, 1998. 66(7): p. 828-31.*
 14. Sezer, S., M. Uyar, Z. Arat, F.N. Ozdemir, and M. Haberal, *Potential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in renal transplant recipients. Transplant Proc, 2005. 37(7): p. 3109-11.*
 15. Holick, M.F., *Vitamin D: its role in cancer prevention and treatment. Prog Biophys Mol Biol, 2006. 92(1): p. 49-59.*
 16. Zittermann, A., *Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. Prog Biophys Mol Biol, 2006. 92(1): p. 39-48.*
 17. Lee, P. and R. Chen, *Vitamin D as an analgesic for patients with type 2 diabetes and neuropathic pain. Arch Intern Med, 2008. 168(7): p. 771-2.*
 18. Cantorna, M.T. and B.D. Mahon, *Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. Exp Biol Med (Maywood), 2004. 229(11): p. 1136-42.*
 19. Halhali, A., A.R. Tovar, N. Torres, H. Bourges, M. Garabedian, and F. Larrea, *Preeclampsia is associated with low circulating levels of insulin-like growth factor I and 1,25-dihydroxyvitamin D in maternal and umbilical cord compartments. J Clin Endocrinol Metab, 2000. 85(5): p. 1828-33.*

20. Baker, A.M., S. Haeri, C.A. Camargo, Jr., J.A. Espinola, and A.M. Stuebe, *A nested case-control study of midgestation vitamin D deficiency and risk of severe preeclampsia*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(11): p. 5105-9.
21. Shin, J.S., M.Y. Choi, M.S. Longtine, and D.M. Nelson, *Vitamin D effects on pregnancy and the placenta*. Placenta, 2010. **31**(12): p. 1027-34.
22. Bodnar, L.M., J.M. Catov, J.M. Zmuda, M.E. Cooper, M.S. Parrott, J.M. Roberts, M.L. Marazita, and H.N. Simhan, *Maternal serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with small-for-gestational age births in white women*. J Nutr, 2010. **140**(5): p. 999-1006.
23. Bischof, P., A. Meisser, and A. Campana, *Mechanisms of endometrial control of trophoblast invasion*. J Reprod Fertil Suppl, 2000. **55**: p. 65-71.
24. Bischof, P., A. Meisser, and A. Campana, *Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion--a review*. Placenta, 2000. **21 Suppl A**: p. S55-60.
25. Gauster, M., G. Moser, K. Orendi, and B. Huppertz, *Factors involved in regulating trophoblast fusion: potential role in the development of preeclampsia*. Placenta, 2009. **30 Suppl A**: p. S49-54.
26. Kharfi, A., Y. Giguere, V. Sapin, J. Masse, B. Dastugue, and J.C. Forest, *Trophoblastic remodeling in normal and preeclamptic pregnancies: implication of cytokines*. Clin Biochem, 2003. **36**(5): p. 323-31.
27. Brannon, P.M. and M.F. Picciano, *Vitamin d in pregnancy and lactation in humans*. Annu Rev Nutr, 2011. **31**: p. 89-115.
28. Kovacs, C.S. and H.M. Kronenberg, *Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation*. Endocr Rev, 1997. **18**(6): p. 832-72.
29. Elenkov, I.J., R.L. Wilder, V.K. Bakalov, A.A. Link, M.A. Dimitrov, S. Fisher, M. Crane, K.S. Kanik, and G.P. Chrousos, *IL-12, TNF-alpha, and hormonal changes during late pregnancy and early postpartum: implications for autoimmune disease activity during these times*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(10): p. 4933-8.

30. Du, H., G.S. Daftary, S.I. Lalwani, and H.S. Taylor, *Direct regulation of HOXA10 by 1,25-(OH)₂D₃ in human myelomonocytic cells and human endometrial stromal cells*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(9): p. 2222-33.
31. Sun, T., Y. Zhao, D.J. Mangelsdorf, and E.R. Simpson, *Characterization of a region upstream of exon 1.1 of the human CYP19 (aromatase) gene that mediates regulation by retinoids in human choriocarcinoma cells*. Endocrinology, 1998. **139**(4): p. 1684-91.
32. Barrera, D., E. Avila, G. Hernandez, A. Halhali, B. Biruete, F. Larrea, and L. Diaz, *Estradiol and progesterone synthesis in human placenta is stimulated by calcitriol*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007. **103**(3-5): p. 529-32.
33. Stephanou, A., R. Ross, and S. Handwerger, *Regulation of human placental lactogen expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃*. Endocrinology, 1994. **135**(6): p. 2651-6.
34. Belkacemi, L., U. Zuegel, A. Steinmeyer, J.P. Dion, and J. Lafond, *Calbindin-D28k (CaBP28k) identification and regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human choriocarcinoma cell line JEG-3*. Mol Cell Endocrinol, 2005. **236**(1-2): p. 31-41.
35. Halhali, A., A.G. Figueras, L. Diaz, E. Avila, D. Barrera, G. Hernandez, and F. Larrea, *Effects of calcitriol on calbindins gene expression and lipid peroxidation in human placenta*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010. **121**(1-2): p. 448-51.
36. Diaz, L., N. Noyola-Martinez, D. Barrera, G. Hernandez, E. Avila, A. Halhali, and F. Larrea, *Calcitriol inhibits TNF-alpha-induced inflammatory cytokines in human trophoblasts*. J Reprod Immunol, 2009. **81**(1): p. 17-24.
37. Szarka, A., J. Rigo, Jr., L. Lazar, G. Beko, and A. Molvarec, *Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array*. BMC Immunol, 2010. **11**: p. 59.
38. Mc Carthy, F.P. and L.C. Kenny, *Hypertension in pregnancy*. Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine, 2009. **19**(5): p. 136-141.

39. Laivuori, H., R. Kaaja, E.M. Rutanen, L. Viinikka, and O. Ylikorkala, *Evidence of high circulating testosterone in women with prior preeclampsia*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(2): p. 344-7.
40. Saito, S., M. Sakai, Y. Sasaki, A. Nakashima, and A. Shiozaki, *Inadequate tolerance induction may induce pre-eclampsia*. J Reprod Immunol, 2007. **76**(1-2): p. 30-9.
41. Darmochwal-Kolarz, D., B. Leszczynska-Gorzela, J. Rolinski, and J. Oleszczuk, *T helper 1- and T helper 2-type cytokine imbalance in pregnant women with pre-eclampsia*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1999. **86**(2): p. 165-70.
42. von Rango, U., *Fetal tolerance in human pregnancy--a crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion*. Immunol Lett, 2008. **115**(1): p. 21-32.
43. Dekker, G.A. and B.M. Sibai, *Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts*. Am J Obstet Gynecol, 1998. **179**(5): p. 1359-75.
44. Mostello, D., D. Kallogjeri, R. Tungsiripat, and T. Leet, *Recurrence of preeclampsia: effects of gestational age at delivery of the first pregnancy, body mass index, paternity, and interval between births*. Am J Obstet Gynecol, 2008. **199**(1): p. 55 e1-7.
45. Sibai, B.M., M. Ewell, R.J. Levine, M.A. Klebanoff, J. Esterlitz, P.M. Catalano, R.L. Goldenberg, and G. Joffe, *Risk factors associated with preeclampsia in healthy nulliparous women. The Calcium for Preeclampsia Prevention (CPEP) Study Group*. Am J Obstet Gynecol, 1997. **177**(5): p. 1003-10.
46. Trogstad, L., P. Magnus, and C. Stoltenberg, *Pre-eclampsia: Risk factors and causal models*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2011. **25**(3): p. 329-42.
47. Trogstad, L.I., A. Eskild, P. Magnus, S.O. Samuelsen, and B.I. Nesheim, *Changing paternity and time since last pregnancy; the impact on pre-eclampsia risk. A study of 547 238 women with and without previous pre-eclampsia*. Int J Epidemiol, 2001. **30**(6): p. 1317-22.

48. Haider, S. and M. Knofler, *Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium*. *Placenta*, 2009. **30**(2): p. 111-23.
49. Saito, S., A. Shiozaki, A. Nakashima, M. Sakai, and Y. Sasaki, *The role of the immune system in preeclampsia*. *Mol Aspects Med*, 2007. **28**(2): p. 192-209.
50. Kilani, R.T., M. Mackova, S.T. Davidge, B. Winkler-Lowen, N. Demianczuk, and L.J. Guilbert, *Endogenous tumor necrosis factor alpha mediates enhanced apoptosis of cultured villous trophoblasts from intrauterine growth-restricted placentae*. *Reproduction*, 2007. **133**(1): p. 257-64.
51. Leisser, C., L. Saleh, S. Haider, H. Husslein, S. Sonderegger, and M. Knofler, *Tumour necrosis factor-alpha impairs chorionic gonadotrophin beta-subunit expression and cell fusion of human villous cytotrophoblast*. *Mol Hum Reprod*, 2006. **12**(10): p. 601-9.
52. Otun, H.A., G.E. Lash, B.A. Innes, J.N. Bulmer, K. Naruse, T. Hannon, R.F. Searle, and S.C. Robson, *Effect of tumour necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma on first trimester extravillous trophoblast invasion*. *J Reprod Immunol*, 2011. **88**(1): p. 1-11.
53. Kossintseva, I., S. Wong, E. Johnstone, L. Guilbert, D.M. Olson, and B.F. Mitchell, *Proinflammatory cytokines inhibit human placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity through Ca²⁺ and cAMP pathways*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006. **290**(2): p. E282-8.
54. Zenclussen, A.C., S. Blois, R. Stumpo, S. Olmos, K. Arias, I. Malan Borel, M.E. Roux, and R.A. Margni, *Murine abortion is associated with enhanced interleukin-6 levels at the feto-maternal interface*. *Cytokine*, 2003. **24**(4): p. 150-60.
55. Basirat, Z., S. Barat, and M. Hajjahmadi, *Serum beta human chorionic gonadotropin levels and preeclampsia*. *Saudi Med J*, 2006. **27**(7): p. 1001-4.
56. Ashour, A.M., E.S. Lieberman, L.E. Haug, and J.T. Repke, *The value of elevated second-trimester beta-human chorionic gonadotropin in predicting development of preeclampsia*. *Am J Obstet Gynecol*, 1997. **176**(2): p. 438-42.

57. Bodnar, L.M., J.M. Catov, H.N. Simhan, M.F. Holick, R.W. Powers, and J.M. Roberts, *Maternal vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(9): p. 3517-22.
58. Bodnar, L.M. and H.N. Simhan, *Vitamin D may be a link to black-white disparities in adverse birth outcomes*. Obstet Gynecol Surv, 2010. **65**(4): p. 273-84.
59. Algert, C.S., C.L. Roberts, A.W. Shand, J.M. Morris, and J.B. Ford, *Seasonal variation in pregnancy hypertension is correlated with sunlight intensity*. Am J Obstet Gynecol, 2010. **203**(3): p. 215 e1-5.
60. Diaz, L., C. Arranz, E. Avila, A. Halhali, F. Vilchis, and F. Larrea, *Expression and activity of 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase are restricted in cultures of human syncytiotrophoblast cells from preeclamptic pregnancies*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(8): p. 3876-82.
61. Hernandez-Urzuza, M. and A. Alvarado-Navarro, *Interleucinas e inmunidad innata*. Revista biomédica, 2001: p. 272-80.
62. Bowen, J.M., L. Chamley, J.A. Keelan, and M.D. Mitchell, *Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition*. Placenta, 2002. **23**(4): p. 257-73.
63. Spaniel-Borowski, K., *Ovulation as danger signaling event of innate immunity*. Mol Cell Endocrinol, 2011. **333**(1): p. 1-7.
64. Salamonsen, L.A., *Current concepts of the mechanisms of menstruation: a normal process of tissue destruction*. Trends Endocrinol Metab, 1998. **9**(8): p. 305-9.
65. Peltier, M.R., *Immunology of term and preterm labor*. Reprod Biol Endocrinol, 2003. **1**: p. 122.
66. Wilczynski, J.R., *Th1/Th2 cytokines balance--yin and yang of reproductive immunology*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2005. **122**(2): p. 136-43.
67. Aagaard-Tillery, K.M., R. Silver, and J. Dalton, *Immunology of normal pregnancy*. Semin Fetal Neonatal Med, 2006. **11**(5): p. 279-95.
68. Robertson, S.A., R.F. Seamark, L.J. Guilbert, and T.G. Wegmann, *The role of cytokines in gestation*. Crit Rev Immunol, 1994. **14**(3-4): p. 239-92.

69. Hauguel-de Mouzon, S. and M. Guerre-Millo, *The placenta cytokine network and inflammatory signals*. Placenta, 2006. **27**(8): p. 794-8.
70. Pedersen, A.M., S.K. Fulton, L. Porter, and G.L. Francis, *Tumor necrosis factor-alpha affects in vitro hormone production by JEG-3 choriocarcinoma cell cultures*. J Reprod Immunol, 1995. **29**(1): p. 69-80.
71. Meisser, A., D. Chardonens, A. Campana, and P. Bischof, *Effects of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha, macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor beta on trophoblastic matrix metalloproteinases*. Mol Hum Reprod, 1999. **5**(3): p. 252-60.
72. Meisser, A., P. Cameo, D. Islami, A. Campana, and P. Bischof, *Effects of interleukin-6 (IL-6) on cytotrophoblastic cells*. Mol Hum Reprod, 1999. **5**(11): p. 1055-8.
73. Jovanovic, M. and L. Vicovac, *Interleukin-6 stimulates cell migration, invasion and integrin expression in HTR-8/SVneo cell line*. Placenta, 2009. **30**(4): p. 320-8.
74. Seki, H., A. Zosmer, M.G. Elder, and M.H. Sullivan, *The regulation of progesterone and hCG production from placental cells by interleukin-1beta*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1336**(2): p. 342-8.
75. Holick, M.F., J.A. MacLaughlin, M.B. Clark, S.A. Holick, J.T. Potts, Jr., R.R. Anderson, I.H. Blank, J.A. Parrish, and P. Elias, *Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences*. Science, 1980. **210**(4466): p. 203-5.
76. Vieth, R., *What is the optimal vitamin D status for health?* Prog Biophys Mol Biol, 2006. **92**(1): p. 26-32.
77. Schuster, I., *Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1814**(1): p. 186-99.
78. Avila, E., D. Barrera, and L. Diaz, *[Calcitropic actions of parathyroid hormone and vitamin D-endocrine system]*. Rev Invest Clin, 2007. **59**(4): p. 306-17.
79. Bajwa, A., M.N. Forster, A. Maiti, B.L. Woolbright, and M.J. Beckman, *Specific regulation of CYP27B1 and VDR in proximal versus distal renal cells*. Arch Biochem Biophys, 2008. **477**(1): p. 33-42.

80. Wongsurawat, N. and H.J. Armbrecht, *Calcitonin stimulates 1,25-dihydroxyvitamin D production in diabetic rat kidney*. *Metabolism*, 1991. **40**(1): p. 22-5.
81. Ajibade, D.V., P. Dhawan, A.J. Fechner, M.B. Meyer, J.W. Pike, and S. Christakos, *Evidence for a role of prolactin in calcium homeostasis: regulation of intestinal transient receptor potential vanilloid type 6, intestinal calcium absorption, and the 25-hydroxyvitamin D(3) 1alpha hydroxylase gene by prolactin*. *Endocrinology*, 2010. **151**(7): p. 2974-84.
82. Lechner, D., E. Kallay, and H.S. Cross, *1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 downregulates CYP27B1 and induces CYP24A1 in colon cells*. *Mol Cell Endocrinol*, 2007. **263**(1-2): p. 55-64.
83. Avila, E., L. Diaz, D. Barrera, A. Halhali, I. Mendez, L. Gonzalez, U. Zuegel, A. Steinmeyer, and F. Larrea, *Regulation of Vitamin D hydroxylases gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblasts*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007. **103**(1): p. 90-6.
84. Pascussi, J.M., A. Robert, M. Nguyen, O. Walrant-Debray, M. Garabedian, P. Martin, T. Pineau, J. Saric, F. Navarro, P. Maurel, and M.J. Vilarem, *Possible involvement of pregnane X receptor-enhanced CYP24 expression in drug-induced osteomalacia*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(1): p. 177-86.
85. Edfeldt, K., P.T. Liu, R. Chun, M. Fabri, M. Schenk, M. Wheelwright, C. Keegan, S.R. Krutzik, J.S. Adams, M. Hewison, and R.L. Modlin, *T-cell cytokines differentially control human monocyte antimicrobial responses by regulating vitamin D metabolism*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(52): p. 22593-8.
86. Halhali, A., L. Diaz, E. Avila, A.C. Ariza, M. Garabedian, and F. Larrea, *Decreased fractional urinary calcium excretion and serum 1,25-dihydroxyvitamin D and IGF-I levels in preeclampsia*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007. **103**(3-5): p. 803-6.
87. Redman, C.W. and I.L. Sargent, *Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response--a review*. *Placenta*, 2003. **24 Suppl A**: p. S21-7.

88. Kliman, H.J., J.E. Nestler, E. Sermasi, J.M. Sanger, and J.F. Strauss, 3rd, *Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae*. *Endocrinology*, 1986. **118**(4): p. 1567-82.
89. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*, 1987. **162**(1): p. 156-9.
90. Costa, J., [*Real-time PCR*]. 2004, Hospital Clínico Provincial: Barcelona. España. p. 88-93.
91. Sitras, V., R.H. Paulssen, H. Gronaas, J. Leirvik, T.A. Hanssen, A. Vartun, and G. Acharya, *Differential placental gene expression in severe preeclampsia*. *Placenta*, 2009. **30**(5): p. 424-33.
92. Rein, D.T., M. Breidenbach, B. Honscheid, U. Friebe-Hoffmann, H. Engel, U.J. Gohring, L. Uekermann, C.M. Kurbacher, and T. Schondorf, *Preeclamptic women are deficient of interleukin-10 as assessed by cytokine release of trophoblast cells in vitro*. *Cytokine*, 2003. **23**(4-5): p. 119-25.
93. Stephanou, A., L. Myatt, A.L. Eis, N. Sarlis, H. Jikihara, and S. Handwerker, *Ontogeny of the expression and regulation of interleukin-6 (IL-6) and IL-1 mRNAs by human trophoblast cells during differentiation in vitro*. *J Endocrinol*, 1995. **147**(3): p. 487-96.
94. Stoffels, K., L. Overbergh, R. Bouillon, and C. Mathieu, *Immune regulation of 1alpha-hydroxylase in murine peritoneal macrophages: unravelling the IFNgamma pathway*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007. **103**(3-5): p. 567-71.
95. Rinehart, B.K., D.A. Terrone, S. Lagoo-Deenadayalan, W.H. Barber, E.A. Hale, J.N. Martin, Jr., and W.A. Bennett, *Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin 1beta, and interleukin 10 is increased in preeclampsia*. *Am J Obstet Gynecol*, 1999. **181**(4): p. 915-20.
96. Wang, Y. and S.W. Walsh, *TNF alpha concentrations and mRNA expression are increased in preeclamptic placentas*. *J Reprod Immunol*, 1996. **32**(2): p. 157-69.

ANEXO

Material y Equipo

- Balanza. Mettler. Suiza.
- Tubos cónicos de 50 mL. DB Falcon, EUA.
- Cámara de Neubauer 1/10 mm. Boeco. W. Alemania.
- Placas para ELISA de 96 pozos. Costar, Corning Incorporated. NY, EUA.
- Sinergy HT, Biotek Instruments. EUA
- Scrappers. Biologix, Research Company. EUA.
- Espectrofotómetro. Multiskan MS fotómetro tipo 352, Labsystems, Helsinki, Finlandia.
- Tubos de 1.5 mL. Corning, EUA.
- Microcentrífuga refrigerada. Eppendorf 5417R, EUA.
- Termociclador RT. Perkin-Elmer 9600, EUA.
- Termociclador qPCR. LightCycler 2.0, Roche Instrument Center AG, Rotkreuz. Suecia.

Reactivos

- Tripsina de páncreas bovino (1 mg/5 µL). Sigma-Aldrich, Alemania.
- DNasa I de páncreas bovino (41.4 mg/mL). Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA.
- Solución salina balanceada Hank's 1X (HBSS) libre de Ca²⁺ y Mg⁺. Gibco,Life technologies. Grand Island; NY, EUA.
- Suero fetal de ternera (SFT). Gibco,Life technologies. Grand Island, NY, EUA.
- Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco alto en glucosa (DMEM-HG) Gibco,Life technologies. Grand Island, NY, EUA.
- Percoll. GE Healthcare, Bio-Sciences AB.
- Colorante azul tripan

- HBSS 10x libre de libre de Ca^{2+} y Mg^{+} con rojo fenol. Gibco, Life technologies. St Louis MO, EUA.
- Calcitriol ($1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferol). Hoffmann-La Roche. Ltd, Suiza.
- Citocinas recombinantes
 - TNF- α 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. R&D Systems. MN, EUA.
 - IFN- γ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. eBiocience.
 - rhIL-6 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sigma. St. Louis MO, EUA.
 - rhIL-1 β 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. R&D Systems. MN, EUA.
- Estuches de ELISA para cada citocina. Limite de detección para TNF- α e IFN- γ 15.62 a 1000 pg/mL, para IL-6 9.37 a 600 pg/mL y para IL-1 β 3.91 a 250. R&D Systems. MN, EUA.
- Solución sustrato. R&D Systems; MN, EUA.
- Trizol. Invitrogen. CA, EUA.
- Cloroformo grado PCR. Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA.
- Isopropanol. Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA.
- Etanol. Merck. México, S.A.
- Estuche para retro transcripción. Transcriptor First Strand cDNA Synthesis. Roche, Alemania.
- Estuche para reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real LightCycler Taqman Master. Roche, Alemania.
- Oligonucleótidos. Invitrogen. CA, EUA.
- Biblioteca de sondas de hidrólisis Taqman. Roche, Alemania.