

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTOS DE LA PROSTAGLANDINA E₁ EXÓGENA
EN LA BIOSÍNTESIS DEL CALCITRIOL (1,25[OH]₂D₃)
EN CONEJOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

FRANCISCO H. VELÁSQUEZ FORERO

Directora:
Dra. Marisa Cabeza Salinas

Asesores:
Dr. Rubén Román Ramos
Dr. James T. Triffitt

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93

El alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana Francisco Hernany Velásquez Forero, recibió beca del CONACYT de septiembre de 2003 a agosto de 2005.

Registro 176326

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la
Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la Tesis que

Presentó:

FRANCISCO H. VELÁSQUEZ FORERO

El día 12 de diciembre del año 2006

Sinodales:

DRA. MARISA CABEZA SALINAS

DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS

DR. JAMES T. TRIFFITT

DRA. CRISTINA REVILLA MONSALVE

DR. ALFONSO EFRAÍN CAMPOS SEPÚLVEDA

COMITÉ TUTORAL:

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARISA CABEZA SALINAS

Depto. de Sistemas Biológicos - UAM Xochimilco.
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I

ASESORES

DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS

Profesor Distinguido, Universidad Autónoma Metropolitana,
Unidad Iztapalapa

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II

DR. JAMES T. TRIFFITT

Profesor Emérito, Oxford University, U. K.

La presente investigación se realizó en el:

Laboratorio de Metabolismo Mineral Óseo
de la División de Investigación Científica del
Hospital Infantil de México “Federico Gómez”

INDICE

1. RESUMEN Y ABSTRACT	1
1.1. Resumen.....	1
1.1. Abstract.....	4
2. INTRODUCCIÓN	6
2.1. Origen y estructura de las prostaglandinas.....	6
2.2. Receptores de las prostaglandinas.....	7
2.3. Origen y estructura del calcitriol y análogos.....	13
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	17
3.1. Planteamiento del problema.....	17
3.2. Justificación.....	17
3.3. Hipótesis.....	18
3.4. Objetivos específicos.....	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1. Experimento <i>in vivo</i>	20
4.2. Experimento <i>in vitro</i>	21
4.3. Análisis estadístico.....	30
5. RESULTADOS	32
5.1. Experimento <i>in vivo</i>	32
5.2. Experimento <i>in vitro</i>	33
6. DISCUSIÓN	39
7. CONCLUSIONES	46
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
9. AGRADECIMIENTOS	70
10. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS	71

GLOSARIO

1 α -OHasa = 1 α -hidroxilasa.

1,25(OH)₂D₃ = Calcitriol.

1-IL = Interleucina-1

24,25(OH)₂D = 24,25 dihidrocoleciferol.

25(OH)D₂ = Ergocalciferol producido en plantas.

25(OH)D₃ = Ergocalciferol producido en mamíferos (calcitriol).

ACTH = Hormona adrenocorticotrofica.

AH6809 = Ácido 6-isopropoxi-9-oxoxanthene-2-carboxilico (bloqueador de receptores de PGs).

AKPh = Fosfatasa alcalina.

AKPhO = Fracción ósea de la fosfatasa alcalina.

AMPc = Adenosin monofosfato cíclico.

Ca = Calcio.

Ca²⁺ = Calcio iónico.

Carbógeno = Gas: 95% de O₂ y 5% de CO₂.

COX = Ciclooxygenasa.

CTRP = Células tubulares renales proximales.

DMSO = Dimetilsulfoxido (disolvente orgánico).

DP = Receptor de la prostaglandina PGD.

EP = Receptor de la prostaglandina PGE₂.

EP₁, EP₂, EP₃ y EP₄ = Receptores subtipos de la PGE₂.

FP = Receptor de la prostaglandina (PGF).

g* = Unidades gravitacionales.

I¹²⁵ = Yodo radiactivo.

IGF1 = Factor de crecimiento, parecido a la insulina, tipo 1.

IP = Receptor de la prostaglandina I (PGI).

KH = Solución nutriente de Krebs Henseley.

Mg = Magnesio.

Mg²⁺ = Magnesio iónico.

MLT = Intervalo de tiempo entre el depósito pequeñísimo de osteoide y su mineralización promediada con la duración total del osteoide.

P = Fósforo.

P450c24 = Enzima citocrómica mitocondrial que cataliza la hidroxilación del carbón 24 de la vitamina D.

P450c25 = Enzima citocrómica mitocondrial que cataliza la hidroxilación del carbón 25 de la vitamina D.

PGHS₁ = Sintetasa 1 de las prostaglandinas.

PGHS₂ = Sintetasa 2 de las prostaglandinas.

PGs = Prostaglandinas.

PTHi = Paratohormona, molécula íntegra.

RIA = Radioinmunoanálisis.

RNA_m = Ácido ribonucleico mensajero.

Síndrome de Bartter = Enfermos con alcalosis, hiperreninemia, hiperaldosteronismo, hipocalcemia y normotensión.

TNF α = Factor necrosante tumoral alfa.

TNF β = Factor necrosante tumoral beta.

TP = Receptor del tromboxano.

TRP = Túbulo renales proximales.

TxA₂ = Tromboxano.

UI/g = Unidades internacionales por gramo.

VDR = Receptor celular del calcitriol.

Vehículo = Solución salina-etanol.

1. RESUMEN Y ABSTRACT

1.1. RESUMEN

EFFECTOS DE LA PROSTAGLANDINA E₁ EXÓGENA EN LA BIOSÍNTESIS DEL CALCITRIOL (1,25[OH]₂D₃) EN CONEJOS

Las prostaglandinas (PGs) son potentes reguladores del metabolismo óseo, se conoce que las de la serie E son activadoras efectivas de la resorción ósea. Se ha demostrado que las PGs E tienen efectos anabólicos en el tejido óseo y que la PGE₂ estimula la síntesis del calcitriol *in vitro*, pero esto no ha sido investigado con la PGE₁. Estudios de fracturas palatinas en gatos y conejos en nuestro laboratorio, indican que la PGE₁ reduce significativamente el tiempo de mineralización ósea, lo que sugiere que la aceleración de la formación ósea se debe a un aumento en la producción de calcitriol. El objetivo del presente estudio fue el determinar tanto *in vivo* como *in vitro*, los efectos de la PGE₁ sobre la síntesis del calcitriol

Se utilizaron 20 conejos adultos machos de la cepa Nueva Zelanda, dividiéndolos en dos grupos; diez recibieron diariamente por vía intravenosa el vehículo durante 20 días y los otros diez recibieron diariamente por la misma vía 50 µg de PGE₁ en el vehículo durante 20 días. El día 20, se obtuvieron muestras de sangre donde se determinaron los niveles séricos de calcio total e iónico, magnesio total e iónico, fósforo, fosfatasa alcalina total y su isoenzima ósea, hormona paratiroidea (PTHi), calcitonina, 25-hidroxivitamina D₃ (25(OH)D₃) y 1,25-dihidroxivitamina D₃.

Para el estudio *in vitro* se obtuvieron diez riñones de cinco conejos mantenidos en condiciones iguales a los utilizados en el experimento *in vivo*. Se preparó una

solución enriquecida con los túbulos renales proximales (TRP) mediante el método de gradiente de Percoll. En el cultivo de la solución de TRP se hicieron dos estudios cinéticos del tipo dosis-respuesta: el primero fue para buscar la concentración adecuada de 25(OH)D₃ a emplearse como sustrato en la producción de calcitriol, en el segundo se buscó la concentración adecuada de PGE₁ a emplearse como estimuladora para la producción de calcitriol.

Se realizó un tercer experimento, utilizando cuatro viales que contenían TRP, los cuales se sometieron a pre-incubación por 20 minutos. Después se inició la reacción agregando a todos los viales 8 µM de 25(OH)D₃, como sustrato. A los viales II, III y IV, se les agregó una concentración de PGE₁ de 2.82 x 10⁻⁶ M y a los viales III y IV, una concentración de 10⁻⁴M de AH6809 (antagonista del receptor de las PGs). En los viales I, II y III la reacción se suspendió a los 5 minutos y en el vial IV a los 30 minutos, adicionándoles 1 mL de acetonitrilo. La producción de calcitriol se midió por el método de radioinmunoanálisis empleando I¹²⁵ como marcador y expresando los resultados en pg/mg de proteína a los 5 y a los 30 minutos, respectivamente.

En el experimento *in vivo*, los niveles séricos de calcio y magnesio fueron significativamente elevados en el grupo que recibió PGE₁ cuando se les compara con el grupo que recibió vehículo. Los niveles séricos de hormona paratiroidea (PTHi), 25(OH)D₃ y calcitonina fueron semejantes en los dos grupos, pero se observó un incremento significativo en los niveles séricos de calcitriol (p<0.01) en el grupo que recibió PGE₁.

En el experimento *in vitro*, los resultados muestran que existe un incremento significativo (p<0.04) de la síntesis de calcitriol en presencia de PGE₁, mientras

que el AH6809 en presencia de PGE₁ a los 30 minutos disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la síntesis de calcitriol hasta niveles basales.

El estudio demuestra claramente que tanto *in vivo* como *in vitro* la PGE₁ incrementa la síntesis del calcitriol. El incremento de la síntesis del calcitriol con PGE₁ es similar al que ha sido reportado con PGE₂. El antagonista del receptor de las PGs (AH6809) bloquea la síntesis del calcitriol al estímulo con PGE₁.

1.2. ABSTRACT

EFFECTS OF EXOGENOUS PROSTAGLANDIN E₁ ON CALCITRIOL BIOSYNTHESIS IN RABBITS

It is well known that prostaglandins are potent regulators of bone metabolism. Prostaglandins of the E serie stimulate bone resorption and have anabolic effects on bone formation.

Previously reports indicate that prostaglandin E₂ increases calcitriol synthesis *in vitro*. However the role of prostaglandin E₁ in the bone metabolism has not been investigated.

The fact of PGE₁ treatment reduces bone mineralization lag time on palatine bone fractures in cats and rabbits, suggests an increase in calcitriol synthesis produced by the PGE₁. The aim of this study was to determine the *in vivo* and *in vitro* effect of PGE₁ on calcitriol synthesis.

For *in vivo* studies, daily intravenous injections of vehicle or prostaglandin E₁ (50 µg) were applied to two different groups of rabbits. Twenty days later, serum samples were taken to measure total and ionic calcium, total and ionic magnesium, phosphorus, total and bone alkaline phosphatases, parathyroid hormone, calcitonin, 25 hydroxyvitaminD₃ and 1,25 dihydroxyvitaminD₃ levels.

For *in vitro* studies, the kidneys of the rabbits were removed and an enriched preparation of renal proximal tubes (RPT), using the Percoll gradient method, was prepared. Using RPT, two *in vitro* studies were carried out in order to obtain adequate doses of 25(OH)D₃ to be used as substrate and PGE₁ as stimulator, to produce optimal amounts of calcitriol. A third *in vitro* experiment was carried out

with four vials containing PRT that were submitted to preincubation for 20 minutes. After the reaction was started, we added to all the vials 8 μM of $25(\text{OH})\text{D}_3$, and to vials II, III and IV: 2.82×10^{-6} M of PGE_1 and to vials III and IV: 10^{-4} M AH6809 (receptor PGs antagonist). In vials I, II and III, the reaction was suspended at 5 min and in vial IV at 30 min, adding 1 mL acetonitrile. Calcitriol production was measured by radioimmunoassay employing I^{125} as tracer.

The results showed that serum levels of Ca, Mg and P were increased in the group treated with daily injections of PGE_1 . Serum levels of PTHi, $25(\text{OH})\text{D}_3$ and calcitonin remained similar to those determined in the control group, however a significant increase in calcitriol serum levels was observed.

On the other hand, *in vitro* experiments showed that PGE_1 increased significantly calcitriol synthesis. After 30 min of incubation in the presence of AH6809, $25(\text{OH})\text{D}_3$ and PGE_1 , the RPT decreased significantly the synthesis of calcitriol, until basal levels.

The present study shows clearly that PGE_1 increases the synthesis of calcitriol *in vivo* and *in vitro*. The increase of calcitriol synthesis observed with PGE_1 , is similar to that reported for PGE_2 . The antagonist of prostaglandin receptor (AH6809) blocked calcitriol synthesis.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Origen y estructura de las prostaglandinas.

Las prostaglandinas (PGs) y el tromboxano son conocidos como prostanoides y son el producto de la acción de la enzima fosfolipasa A_2 sobre los ácidos grasos no saturados de 20 carbonos que se localizan en las membranas celulares. Estos compuestos posteriormente se convierten en otros prostanoides por la acción de la ciclooxigenasa y sus respectivas sintetasa dentro de las células, para de inmediato liberarse extracelularmente.^{1,2}

La estructura de las PGs está compuesta por un anillo ciclopentano y dos cadenas alifáticas. Las modificaciones del anillo ciclopentano nos permiten clasificarlas de la A a la I, siendo la A, B, y C, no naturales.² Las prostaglandinas PGG_2 y PGH_2 comparten la estructura del mismo anillo ciclopentano, pero difieren en que por medio de la catalización de la ciclooxigenasa se agrega al carbono 15 un grupo hidroperoxi o un grupo hidroxilo, respectivamente (Figura 1). La PGH_2 bajo la acción catalítica de una sintetasa específica modifica los componentes del anillo ciclopentano obteniéndose las prostaglandinas, PGD, PGE, PGF y la PGI, respectivamente. Otra sintetasa que actúa sobre el anillo ciclopentano de la PGH_2 lo transforma en un anillo oxano, permitiéndonos obtener el tromboxano (TXA).²

Las PGs también se han clasificado con base al número de dobles enlaces en las cadenas alifáticas en tres series: 1, 2 y 3. Las PGs de la serie 1, se sintetizan a partir del ácido homolinoléico (8, 11, 14-eicosatrienóico) Figura 1, los de la serie 2, del ácido araquidónico Figura 2 (5, 8, 11, 14-eicosatetraenóico) y los de la serie 3,

del ácido eicosapentanoico (5, 8, 11, 14, 17-eicosapentanoico). En los mamíferos las derivadas del ácido araquidónico, son las más abundantes.²

2.2. Receptores de las Prostaglandinas.

Las PGs fueron consideradas como compuestos hidrofóbicos, que atravesaban las membranas celulares alterando el fluido lipídico de éstas.³ Hoy se sabe que esto no es así, sino que cada prostanoides tiene un perfil único de actividad que difiere de los otros, indicando que su sitio de acción es específico. Esto se hizo aparente al desarrollar bioensayos que permitieron comparar en varios tejidos las potencias de diferentes prostanoides y de sus análogos. Siguiendo esta línea y también con estudios bioquímicos y de radioinmunoanálisis, se demostró la presencia de múltiples receptores para los prostanoides en diferentes tejidos y células, que culminó en 1982 con la propuesta de una clasificación.⁴⁻⁶ Coleman y col. recopilaron la información disponible sobre el tema y elaboraron una clasificación comprensible.^{7,8} Ellos propusieron la presencia específica de receptores para TX, PGI, PGE, PGF y PGD y los nombraron como P al receptor de cada uno de los prostanoides, adicionando esta letra a la del nombre que identifica a cada una de ellas así: TP, IP, EP, FP y DP. Estos mismos autores más adelante clasificaron el EP en 4 subtipos: EP₁, EP₂, EP₃ y EP₄.

Estos subtipos de receptores responden a agonistas naturales de la PGE₂, pero responden diferente a varios análogos o algunos otros ligandos.^{7,9}

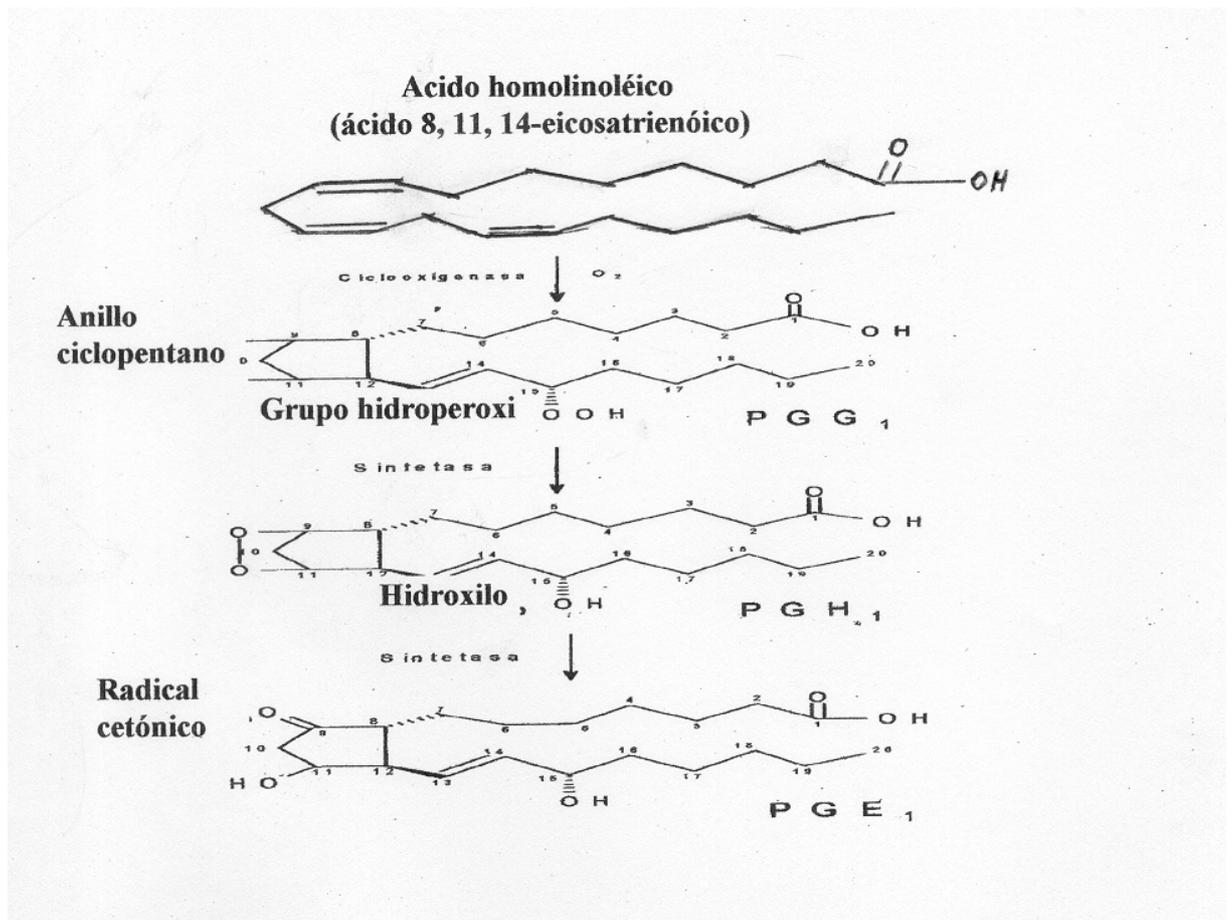


Figura 1: Biosíntesis de prostanoideos a partir del ácido homolinolico. Formación de prostaglandinas a partir de ácido homolinolico para producir la PGG₁, PGH₁ y PGE₁. El primer paso es la conversión del ácido homolinolico a PGG₁ por acción de una ciclooxigenasa formándose un anillo ciclopentano para originar la PGG₁ sobre la cual actúa una enzima sintetasa reduciendo al carbono 15 y formando la PGH₁; sobre ésta actúa otra enzima sintetasa la cual reduce el carbono 11 y forma un radical cetónico en el carbono 9 para originar la PGE₁.

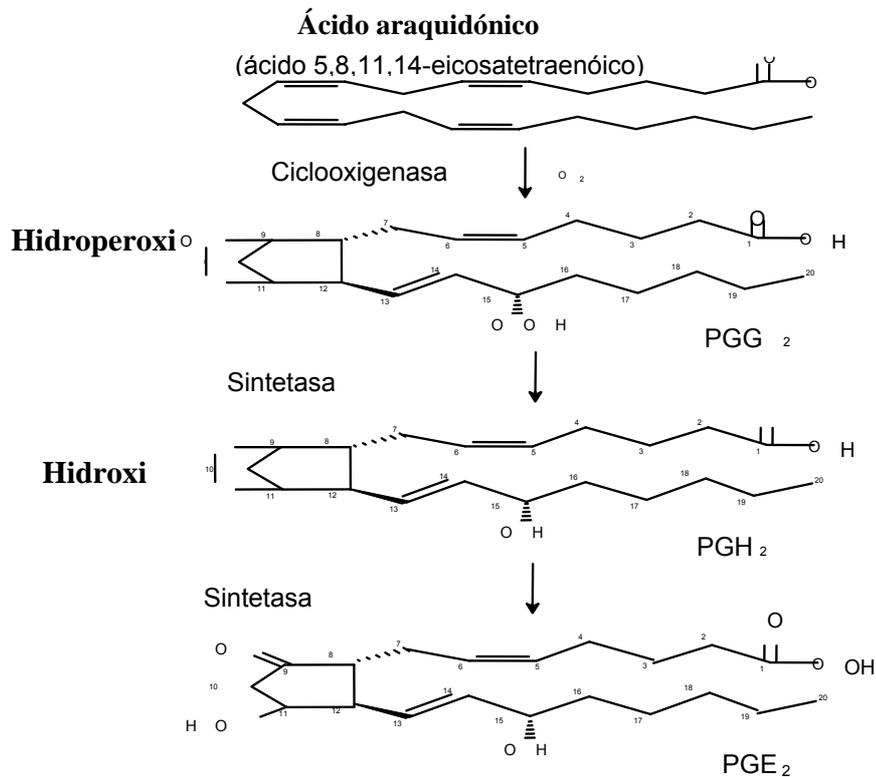


Figura 2: Biosíntesis de prostanoides a partir del ácido araquidónico. Formación de Prostaglandina (PGs) PGG_2 , PGH_2 y PGE_2 a partir del ácido araquidónico. El primer paso es la conversión del ácido araquidónico a la PGG_2 , este paso es catalizado por una ciclooxygenasa formándose un anillo ciclopentano para originar la PGG_2 , sobre la cual actúa una enzima sintetasa que reduce el carbono 15 produciendo la PGH_2 , sobre la cual actúa nuevamente una sintetasa que reduce al carbono 11 de la PGH_2 para formar la PGE_2 .

En 1991 Hirata y col¹⁰ aislaron y clonaron el receptor del tromboxano (TXA₂), éste se caracterizó como una proteína compuesta de 343 aminoácidos acoplada a una proteína G del tipo rodopsina con 7 dominios transmembranales.⁹⁻¹⁰ Homológamente en varias especies, todos los tipos y subtipos de receptores de los prostanoïdes definidos farmacológicamente fueron identificados con base en sus secuencias genéticas. Los genes que codifican en humanos a los receptores EP₁, EP₃, EP₄, FP, IP y TP han sido mapeados en los cromosomas 19p13.1, 1p31.2, 5p13.1, 1p31.1, 19q13.3 y 19p13.3, respectivamente.¹¹⁻¹³

Con base a la señal de transducción que utilizan y de sus acciones, los receptores de los prostanoïdes se agrupan en tres categorías: 1° receptores relajantes que incrementan su efecto mediante el aumento del AMPc e inducen la relajación del músculo liso (ejemplos; TP, DP, EP₂ y EP₄); 2° receptores de tipo contráctil, los cuales movilizan Ca²⁺ y producen la contracción del músculo liso (ejemplos; IP, FP y EP₁) y 3° receptores inhibidores, que actúan disminuyendo el AMPc e inhiben la relajación del músculo liso (ejemplo; EP₃).¹³⁻¹⁸

Las PGs son importantes generadoras de fiebre, en especial las de la serie E¹⁹⁻²⁶ y lo hacen aparentemente a través de su receptor EP₃.²⁷ Experimentalmente la inyección intrahipotalámica de PGE₂, estimula la secreción de ACTH.²⁸ La PGD₂ ha sido propuesta como una de las sustancias endógenas que estimulan el sueño a través de su receptor DP, el cual está presente en leptomeninges y en plexos coroides.^{29,30} La PGE₂, PGE₁ y PGI₂ a través de los receptores EP o IP ejercen un efecto mayor que otras PGs en la inducción del dolor en los procesos inflamatorios.³¹⁻³³ Además, hay algunas evidencias que las PGs también juegan un papel fisiológico en la regulación de la inmunidad y de los procesos

alérgicos.^{34, 35} La mayoría de las PGs estimulan la contracción y relajación del músculo liso vascular. La PGI₂ es un vasodilatador potente mientras que TXA₂ es un vasoconstrictor² potente. La TXA₂ ha sido implicada en los mecanismos de trombosis y de hemostasis, habiéndose observado alteraciones en el receptor de la TXA₂ (TP)^{36, 37} en pacientes que cursan con tendencias hemorrágicas.

El conducto arterioso en mamíferos, incluyendo al hombre, se mantiene permeable durante el periodo fetal por efecto de las PGs.^{38,39} En la fecundación, las PGs F y E desempeñan varias funciones importantes. Hoy se acepta que la PGE₂ actuando sobre el hipotálamo incrementa la secreción de hormona luteinizante.⁴⁰ La PGF_{2α} induce luteólisis (falla el cuerpo lúteo en secretar progesterona) durante el ciclo ovárico;^{41, 42} la acción más conocida de las PGs es la de incrementar la contractilidad uterina durante el parto.⁴³

Las PGs juegan un papel importante en el metabolismo del tejido óseo^{44, 45}. La interleucina-1(IL-1) y TNF α (factor α necrosante tumoral) son estimuladores de la formación de PGE₂ en células óseas.^{46, 47} TGF α y TGF β son reguladores de la citodiferenciación y crecimiento celular y pueden estimular la producción de PGs en células óseas a través de la sintetasa (PGHS).⁴⁸ También se ha observado incremento de las PGs con la presencia de la paratohormona (PTH).^{49,50} La fuerza mecánica sobre el tejido óseo intacto, incrementa la producción de PGs.^{51,52} En cultivo de células óseas provenientes de ratas oforectomizadas, incrementa la producción de PGs por un incremento en la actividad de la PGHS.⁵³⁻⁵⁵

Las PGs de la serie E, son de las activadoras más potentes de la resorción ósea.⁴⁴ Recientemente se demostró que la PGE₁ y la PGE₂, estimulan la citodiferenciación de células parecidas a los osteoclastos en cultivos de células óseas de roedores

de tipo múridos.⁵⁶ Hay observaciones que sugieren que la PGI₂ es producida principalmente por los osteocitos mientras que la PGE₂ se produce principalmente en los osteoblastos.⁵⁷

Las PGs estimulan la síntesis del DNA, la replicación celular ósea y la síntesis de la colágena en osteoblastos humanos.⁵⁸⁻⁶⁰ La PGE₂, en hueso es un potente estimulante de la síntesis del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1)⁶¹⁻⁶⁴ aumentando los niveles de IGF-1 RNAm y actuando selectivamente sobre el promotor de la transcripción del EXON-1, el sitio de mayor regulación de los osteoblastos.⁶⁵

Los receptores de los subtipos de la prostaglandina E₂, el EP₂ y el EP₄, son los que a través de la activación de la adenilciclasa, parecen ser los receptores que tienen efecto sobre la resorción ósea.^{66,67} El efecto anabólico de las PGs sobre el tejido óseo es una propiedad importante ya que se tienen pocos medicamentos con estas características. La administración prolongada de la prostaglandina E₁ en niños con malformaciones cardíacas, produce hiperosteosis cortical.⁶⁸ En perros, la administración de PGE₂, estimula la formación ósea.⁶⁹ La osteopenia que ocasiona la ciclosporina "A", en ratas, se corrige al administrarla combinada con PGE₂.⁷⁰ Estudios experimentales *in vivo*, han demostrado que la administración de PGs, estimulan la formación ósea endosteal y periosteal nuevas,⁷¹⁻⁷³ y que también aceleran la formación de callo en las fracturas óseas.⁷⁴ El efecto anabólico sobre el tejido óseo de las PGs, depende de su efecto mitogénico y del estímulo hacia la citodiferenciación osteoblástica;⁷⁵ esta propiedad anabólica ósea, puede ser aprovechada terapéuticamente al administrar PGs en pacientes con enfermedades osteopénicas.

2.3. Origen y estructura del calcitriol y de sus análogos.

La vitamina D existe como ergocalciferol (vitamina D₂) producida en plantas,⁷⁶ o colecalciferol (vitamina D₃) producida en tejidos animales por acción de radiación ultravioleta (290-330 nm) sobre el 7-dehidrocolesterol en la piel humana.⁷⁷ Ambas vitaminas D son biológicamente inactivas (pro-hormonas), que deben hidroxilarse en los carbonos-1 y 25 antes de unirse al receptor de la vitamina D (Figura 3). La 25 hidroxilación de la vitamina D ocurre en el hígado y es catalizada por el citocromo mitocondrial P450 (P450c25) dando origen a la 25-hidroxivitamina (25[OH]D₃) que es el metabolito más abundante de la vitamina D, proveniente de la dieta y que se forma por la exposición a la luz solar.⁷⁸ En túbulos renales proximales la 25(OH)D₃ sufre una 1 α -hidroxilación produciendo la 1,25(OH)₂D₃, que es el metabolito más activo de la vitamina D.⁷⁹⁻⁸¹ (Figura 3). El calcitriol (1,25[OH]₂D₃) juega un papel central en la homeostasis del Ca y del P, promoviendo su absorción a nivel intestinal, para mantener su concentración plasmática a niveles suficientes para el crecimiento y mineralización ósea. Estos efectos clásicos se llevan a cabo por acción del calcitriol sobre células blanco en intestino, hueso, riñones y glándulas paratiroideas. Los receptores del calcitriol (VDR) han sido identificados en varios tejidos, como: piel, esqueleto, tracto digestivo, sistema nervioso, sistema inmune, vasos, corazón, pulmones y otros órganos.⁸²⁻⁸⁷ El calcitriol ejerce su acción sobre blancos celulares a través de vías moleculares. Se han identificado dos vías que son mediadoras de la acción de la vitamina D: una vía génica ejerciendo una acción con el receptor de la vitamina D (VDR)⁸⁸⁻⁹² y otra vía no génica en la que su acción se ejerce sobre un receptor localizado en la superficie celular.⁹²⁻⁹⁵

Los niveles séricos de calcitriol reflejan su síntesis en el riñón, siendo la actividad de la 1α -hidroxilasa su marcador limitante. Su actividad está regulada por la PTH, calcio, fósforo y por la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ misma. Hoy, se ha observado actividad de la 1α -hidroxilasa en otros tejidos como en los keratocitos⁹⁶ macrófagos⁹⁷ y en las células trofoblásticas de la placenta.⁹⁸

Otra importante enzima en el metabolismo de la vitamina D, que puede hidroxilar a la 25OHD, es la 24-hidroxilasa (encontrada en varios tejidos).⁹⁹ Esta enzima puede catalizar la 24-hidroxilación de 25OHD a $24, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y también en la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a $1,24,25 (\text{OH})_3\text{D}_3$ (Figura 3). Estos dos metabolitos pueden ser iniciadores de la inactivación del calcitriol. En 1990, el gene de la 25-hidroxilasa fue identificado y purificado en las células hepáticas de rata.^{100, 101} En 1991 el gene que codifica a la 24-hidroxilasa fue también identificado y purificado de las mitocondrias de células renales de la rata.¹⁰²⁻¹⁰⁵ En 1997 cuatro grupos de investigadores simultáneamente identificaron el gene que codifica a la 1α -hidroxilasa,^{97,104-107} sin embargo, hasta la fecha no se ha podido purificar la enzima (1α -hidroxilasa), a pesar de grandes esfuerzos.

Posiblemente porque la cantidad de enzima citocrómica P450 mitocondrial es escasa.⁹⁶ Es por esto que en la actualidad se mide la actividad de la 1α -hidroxilasa en forma indirecta, en ensayos que la cuantifican relacionándola con la cantidad de calcitriol producido.^{108,109}

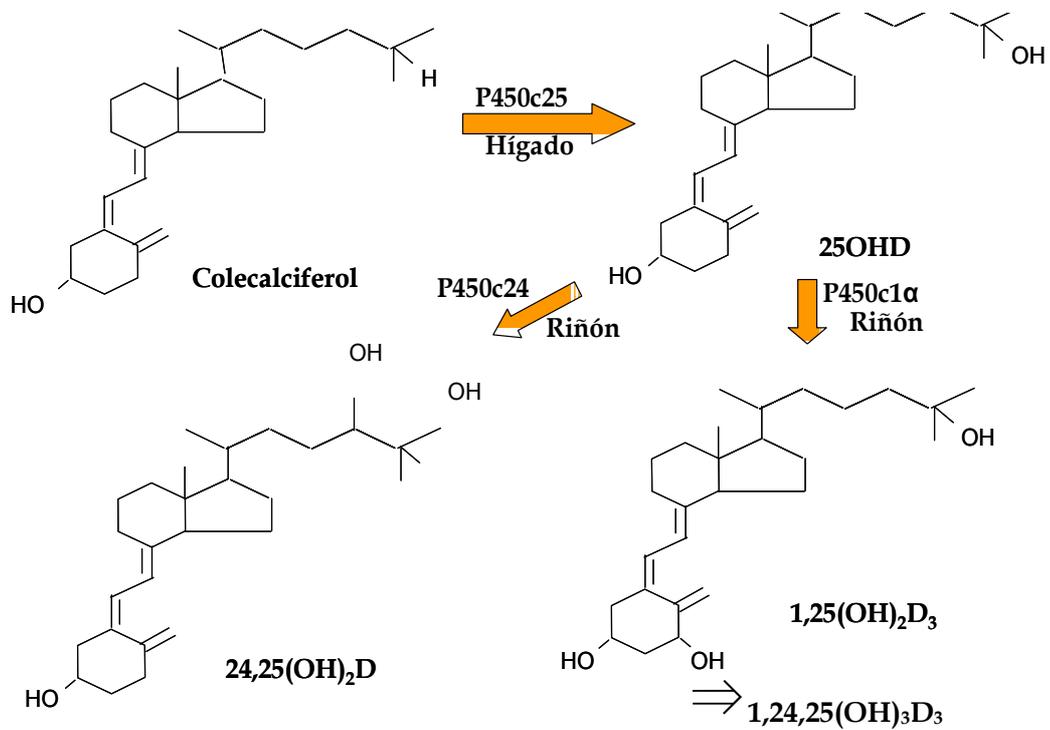


Figura 3: Biosíntesis de la vitamina D₃. La vitamina D₃ (colecalfiferol) en el hígado por acción de la enzima P450c25 se hidroxila en el carbono 25 produciéndose la 25(OH)D₃, la cual en el riñón sufre una hidroxilación en el carbono 1 por acción de la P450c1α, originando el calcitriol (1,25[OH]₂D₃). También en riñón, la 25(OH)D₃ puede ser hidroxilada en el carbón 24 por la P450c24 produciéndose la 24,25(OH)₂D₃ y la 1,24,25(OH)₃D₃.

En los últimos años al calcitriol y sus análogos se les han encontrado propiedades inhibitorias de la proliferación celular (glomerulonefritis)^{110,111} y en la disminución de la diseminación de las metástasis de cáncer,^{112,113} por lo que el calcitriol podrá someterse en un futuro a estudios protocolizados en humanos.

En cultivo de células tubulares renales de pollos, se ha observado que al agregar PGE₂, se estimula la actividad de la 1 α -hidroxilasa, incrementando la síntesis del calcitriol,^{114,115} esto no ha sido estudiado con PGE₁.

En nuestro laboratorio, hemos observado que la PGE₁ aplicada local o intravenosamente, aceleraba la mineralización (MLT) en la cicatrización de fracturas palatinas en gatos y conejos estudiados con histomorfometría previo doble marcaje con tetraciclina,^{116,117} El presente estudio se originó en este hallazgo, ya que el calcitriol es la hormona que fundamentalmente estimula la mineralización ósea, lo que nos hizo pensar que probablemente la PGE₁ estimula su síntesis.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

3.1. Planteamiento del problema

A las prostaglandinas se les considera reguladores del metabolismo óseo. La mayoría de ellas tienen una acción bimodal, lo que ha hecho difícil la interpretación de su papel fisiológico; así, a las prostaglandinas de la serie E se les reconoce como potentes activadores de la resorción ósea y favorecedoras del incremento de la masa ósea.

Este aumento de la masa ósea ha sido estudiado experimentalmente utilizando las prostaglandinas de la serie E₂, aunque esta propiedad no ha sido explorada mediante las otras prostaglandinas, incluyendo a la E₁.

3.2. Justificación

La capacidad de las prostaglandinas de aumentar la masa ósea podría representar, previos estudios a nivel experimental y clínico, una posibilidad terapéutica en el tratamiento de pacientes que cursan con enfermedades osteopénicas.

Dado que las prostaglandinas de la serie E tienen la propiedad de acelerar la mineralización ósea y producir hipercalciuria en algunas condiciones clínicas, es menester aclarar los mecanismos por los cuales se llevan a cabo estas acciones y, específicamente, esclarecer si las prostaglandinas estimulan la síntesis de calcitriol, una de las principales hormonas que participan en la mineralización ósea. De esta manera tal vez será posible plantear nuevas alternativas terapéuticas en algunas alteraciones del metabolismo óseo.

3.3. Hipótesis

La PGE₁ exógena incrementa la síntesis del calcitriol.

3.4. Objetivos

Objetivo general: Investigar el efecto de la PGE₁ sobre la producción del calcitriol.

Objetivos específicos:

1. Determinar los niveles séricos de Ca, Mg, P, fosfatasa alcalina total (AKPh) y ósea (AKPhO) en conejos tratados con prostaglandina E, (PGE₁) y con vehículo.
2. Determinar los niveles séricos de calcitriol, hormona paratiroidea, calcitonina y calcidiol (25(OH)D₃) por el método de RIA en conejos tratados con PGE₁ y con vehículo.
3. Determinar los niveles de calcitriol formado *in vitro* en preparaciones de túbulos proximales renales de conejo (TRP) conteniendo calcidiol y en presencia o no de PGE₁.
4. Determinar los niveles de calcitriol formado *in vitro* en preparaciones de TRP de conejos, conteniendo calcidiol, PGE₁ y en presencia o no del antagonista de prostaglandinas conocido como AH6809.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

La PGE₁, el 6-isopropoxi-9-oxoxanthene-2-carboxili-ácido (AH6809), la colagenasa, el Percoll, la albúmina sérica de bovino y la glutamina fueron obtenidas de Sigma Chemical Co. (*St. Louis MO, USA*). Las hormonas calciotropas (hormona paratiroidea molécula íntegra, calcitonina, 25-hidroxicolecalciferol (25[OH]D₃) y calcitriol (1,25[OH]₂D₃) se determinaron por técnicas de radioinmunoanálisis (RIA) utilizando el I¹²⁵ como marcador. Los paquetes se obtuvieron en DiaSorin, Inc (*Stillwater MN, USA*). Los paquetes para el estudio de fosfatasa alcalina total y fosfatasa alcalina ósea se obtuvieron de Spinreact, S. A. (*Sant Esteve de Bas [Gi], España*). El resto de reactivos se obtuvieron a través de distribuidores locales (alcoholes, azul tripano y estuches para determinar proteínas, fueron marca Randox).

Se utilizaron conejos Nueva Zelanda, machos, de 3 meses de edad y 3 kg de peso aproximadamente, criados en el bioterio del Hospital Infantil de México Federico Gómez, con los que se siguieron los estándares aceptados para el cuidado de animales que se utilizan en laboratorio, siguiendo estrictamente los principios éticos para investigación con animales propuestos por el Comité Canadiense, el Comité de Ética del hospital y la Norma Oficial Mexicana en manejo de animales de laboratorio.^{118,119}

Estudio experimental prospectivo en dos etapas:

En la primera etapa: Se determinaron los niveles de calcitriol *in vivo*, previa estimulación con PGE₁ exógena por vía intravenosa (50 µg/día), administrada por

20 días a conejos normales. Los niveles de calcitriol sérico se midieron por el método de radioinmunoanálisis.

En la segunda etapa: Se determinó la actividad de la PGE₁ *in vitro* con base en la producción de calcitriol en cultivo de células de túbulos renales proximales (TRP) de conejo, obtenidos por la técnica de gradiente de Percoll. En esta etapa se realizaron estudios dosis-respuesta para conocer la cantidad óptima de 25(OH)D₃ para ser utilizada como sustrato de la reacción y de la cantidad PGE₁ óptima para agregar como estimulante de la síntesis del calcitriol.

4.1. Experimento *in vivo*

En este experimento se valoró el papel de la PGE₁, como activador de la síntesis del calcitriol.

Se utilizaron 20 conejos machos con las características descritas, colocándose en jaulas para su adaptación y alimentándose, durante 2 semanas, con una dieta balanceada de calcio (Ca: 1.2%); fósforo (P: 0.8%) y vitamina D₃ (vit-D₃: 1 UI/g), y con agua desionizada *ad libitum*. Después de 15 días de adaptación y durante el estudio, los animales fueron examinados por un veterinario especialista en pequeñas especies, quien confirmó en todos un estado saludable y normal. Los animales fueron divididos al azar en dos grupos de 10 animales cada uno. Un grupo se identificó como control (grupo "A"), a los que se les administró por vía intravenosa (I.V.), utilizando la vena marginal de la oreja 1.0 mL diario de solución salina con 10 µL de etanol (vehículo). El grupo experimental (grupo "B") recibió una dosis de 50 µg/mL/día de PGE₁ disuelta en 1.0 mL de vehículo (solución

salina-etanol) I.V. en la vena marginal de la oreja. Los grupos se trataron de esta manera durante 20 días. La dosis empleada de PGE₁ en el presente estudio se utilizó con base en un estudio cinético previamente informado,¹²⁰ en donde dosis de 5 ng/mL de PGE₁ administradas por vía intravenosa, se inactivaban en el 95% a su paso por los pulmones, mientras que dosis de 5 µg/mL de PGE₁ solamente se inactivaban el 8%.

En el día 20 se tomaron muestras de sangre directamente de la aorta, y se obtuvo el suero por centrifugación, utilizando una centrifuga refrigerada a 4°C, para después medir los niveles de hormona paratiroidea (PTH), calcitonina, 25(OH)D₃ y 1,25(OH)₂D₃ por el método de RIA.¹²¹⁻¹²³

También se midieron niveles totales de Ca y de Mg por el método de espectrofotometría de absorción atómica^{124, 125} y sus fracciones iónicas (Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺) por el método de ion selectivo con electrodo.¹²⁶ El fósforo fue determinado cuantitativamente usando fosfomolibdato y espectrofotometría del complejo,^{126,127} fosfatasa alcalina total (AKPh) y su fracción termolábil ósea (AKPhO) por determinación espectrofotométrica de Gutman y su isoenzima ósea con el método de desnaturalización por calentamiento.^{128, 129}

4.2. Experimento *in vitro*

Se utilizaron cinco conejos machos con las mismas características, que se mantuvieron en condiciones iguales al experimento *in vivo*. Los conejos se sacrificaron bajo anestesia con pentobarbital sódico intraperitoneal (30 mg/kg de peso), extirpándoles los dos riñones (total de 10), de los que se obtuvieron túbulos

renales proximales (TRP) por el método de gradiente de Percoll de Vinay y col. 1981 y de Favus 1986.^{130,131}

Técnica de radioinmunoanálisis (RIA) para investigación de los niveles de calcitriol (1,25[OH]₂D₃)

El análisis de 1,25(OH)₂D₃ de DiaSorin se hace en tres pasos: Extracción, purificación y determinación del calcitriol por radioinmunoanálisis (RIA).

Para medir niveles de calcitriol, tanto en suero como en cultivos de células de túbulos renales proximales en conejos,^{122, 123} se utilizó el kit comercial con número de catalogo: 65100E, obtenido de la casa DiaSorin (Stillwater Minnesota USA).

El kit está compuesto por: Solución tampón (NSB) de fosfato de potasio-gelatina que contiene como conservador isotiazidina al 0.2% (Proclin 300). Tampón de fosfato conteniendo proteínas de suero de bovino y Proclin 300 al 0.2% (estándar 0). Cinco estándares liofilizados (estándares A-E) que contienen 5, 15, 30, 75 y 200 pg/mL de calcitriol en suero humano y Proclin 300 al 0.2%. Suero anti-1,25 dihidroxicolecalciferol obtenido en conejos, en tampón de fosfato gelatinoso, conteniendo Proclin 300 al 0.2%. 1,25(OH)₂D₃ (antígeno) marcado con I¹²⁵ diluido en solución tampón de fosfatos, conteniendo etilenglicol. Tampón de fosfato potásico (solución de pre-tratamiento). Controles de 1,25(OH)₂D₃ compuestos por 2 sueros humanos y Proclin 300 al 0.2% (uno con una concentración elevada de calcitriol y el otro con una concentración normal del

mismo). Como precipitante del complejo (antígeno-anticuerpo) se utilizó un segundo antisuero de cabra anticonejo (GAR), con polietilenglicol y tampón de borato con BSA y azida de sodio 0.1% reconstituido con 35 mL de agua destilada o desionizada, mezclándose hasta que la suspensión se observó homogénea, durante un mínimo de 30 minutos. Etanol al 95%. **Disolventes orgánicos** (se prepararon antes de utilizarse: **a)** 350 mL metanol con 150 mL de agua. **b)** 450 mL de hexano con 50 mL de cloruro de metileno. **c)** 495 mL de hexano con 5 mL de alcohol isopropilico. **d)** 460 mL de hexano con 40 mL de alcohol isopropilico (se prepararon antes de utilizarse). **Secado de eluidos:** secador tipo Manifold con baño maría a 37°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). **Muestras utilizadas:** 1.5 mL de suero y/o 1.5 mL de suspensión de túbulos renales proximales para determinar los niveles de calcitriol (se utilizan 500 μL x 2 por muestra).

Procedimiento

Extracción preliminar de los metabolitos de la vitamina D: La preparación de los disolventes y la reconstrucción de los estándares se llevó a cabo a temperatura ambiente, preparándose antes de ser utilizados. Se etiquetaron tubos de 12 x 75 mm (de borocilicato) para los estándares, controles y muestras. Se dosificaron 500 μL de cada estándar, control y muestras a los tubos previamente etiquetados. Se le añadió a cada uno 500 μL de acetonitrilo y se mezclaron en el vortex al menos 3 veces, durante 10 minutos. Se centrifugaron los tubos a 760 x g* durante 10 minutos a 25°C. Se decantó el sobrenadante a otros tubos de 12 x 75 mm previamente etiquetados. Se añadió a cada uno 500 μL de solución de

pretratamiento y se mezcló en el vortex. En este momento las muestras estuvieron listas para ser aplicadas en los cartuchos de C₁₈OH.

Purificación de los metabolitos de la vitamina D: Previamente se etiquetaron tubos de 12 x 75 mm para cada uno de los estándares, controles, muestras y se colocaron vacíos en el interior del aparato de vacío VacElut (extractor de vacío PS24 de Varian Harbo City CA.). La tapa se colocó en la posición de desecho "waste". Se colocaron las columnas de C₁₈OH en la parte superior de la tapa identificándose para cada uno de los estándares, controles y muestras. Se añadió 1 mL de metanol a cada columna y se activó el vacío, (este paso fue para eliminar sustancias que pudieran interferir en el proceso de purificación de los metabolitos de la vitamina D), una vez que pasó el metanol por las columnas se desactivó el vacío (el vacío debe de estar a < 254 mm de Hg). Se agregaron los estándares, controles y muestras experimentales a las columnas correspondientes y se activo el vacío, una vez que pasaron las muestras se desactivó el vacío. Se añadieron 5 mL de metanol-agua (70:30) a cada columna y se activo el vacío, una vez pasado el metanol-agua se desactivo el vacío (este paso fue para eliminar pigmentos, sales y lípidos que podrían interferir en la purificación de los metabolitos de la vitamina D). Se añadieron a cada columna 5 mL de hexano-cloruro de metileno y se activó el vacío, una vez pasados se desactivó el vacío (este paso fue para eliminar los metabolitos de la 25(OH)D). Se añadieron 5 mL de hexano-isopropanol 99:1, se activó el vacío y una vez pasada la mezcla se desactivó el vacío (este paso fue para eliminar los remanentes de los metabolitos de 25(OH)D, 24,25(OH)₂D₂ y 25,26(OH)₂D). En este paso se giró la tapa del VacElut a la

posición de “colección”. Se añadieron 3 mL de hexano-isopropanol, 92:8, se activó el vacío y una vez pasada la mezcla se desactivó el vacío (en este paso se recolecta en los tubos internos el extracto de 1,25(OH)₂D purificado). Se extrajeron los tubos del VacElut con los eluidos y se secaron en un secador tipo Manifold con baño maría a 37°C ± 2°C hasta su deshidratación completa.

Procedimiento del análisis de RIA (medición del calcitriol): Posteriormente se reconstituyeron cada uno de los estándares, controles y muestras deshidratadas con 50 µL de etanol al 95% agitando a velocidad baja o media en el vortex. Se añadió 125 µL de trazador a los tubos que contenían etanol al 95%, se agitaron a velocidad baja en el vortex. Se etiquetaron aparte 2 tubos para cuentas totales (CT) y 2 para unión no específica (NSB) a éstos se les añadieron 50 µL de etanol al 95% y 125 µL de trazador. En nuevos tubos de 12 x 75 mm etiquetados por duplicado, se les añadió 75 µL de cada estándar, controles, muestras, TC y NSB (se separaron las cuentas totales por no necesitar más procedimiento). A los tubos NSB se les agregaron 300 µL de tampón NSB. Se añadió 300 µL de anticuerpo primario en todos los tubos excepto a los tubos CT y NSB. Se mezclaron bien y se incubaron 2 h (± 15 minutos) a 20 – 25°C. Después de la incubación se les añadió 500 µL del complejo de precipitación GAR a todos los tubos (excepto al CT) y se incubaron 20 minutos (± 5 minutos) a 20 – 25°C. Se centrifugaron todos los tubos x 20 minutos a 20 – 25°C a 1800xg* a excepción de los tubos CT. Se decantaron los sobrenadantes (excepto los CT) y se colocaron los tubos invertidos en un papel absorbente 2-3 minutos, hasta la eliminación del líquido, aquí el exceso de líquido remanente se limpió con papel filtro, sin tocar el precipitado.

Se midió la radiactividad en todos los tubos, durante 1 minuto en un contador gama.

Interpretación de resultados: Revisado el conteo de CPM obtenidas de los estándares, controles, muestras NSB y CT se realizaron los cálculos con la siguiente fórmula:

$$\% B/B_0 = \frac{\text{CPM prom ST (A-E) (y/o muestra)} - \text{CPM prom (NSB)}}{\text{CPM prom (ST0)} - \text{CPM prom de (NSB)}} \times 100$$

ST (A-E) = estándares A; B, C, D y E; CPM= cuentas por minuto. NSB = unión no específica. ST0 = estándar cero. En donde B es igual a las cuentas/minuto promedio del estándar (A-E) y/o la muestra desconocida menos las CPM de NSB (unión no específica) y B₀ es igual a las CPM promedio del ST0 menos las CPM del NSB.

Reactivos utilizados para la técnica del gradiente de percoll: Solución tampón Krebs Henseley (KH) pH = 7.4, solución de percoll pH =7.4, con densidad de 300 mOsm/kg, solución de colagenasa >125 U/mg peso seco, solución de albúmina sérica bovina al 5% y solución de azul de Tripano.

Se preparó la solución de Krebs Henseley agregando solución amortiguadora de Krebs Henseley (cloruro de sodio 2M, cloruro de potasio 100 mM, bicarbonato de sodio 1M, acetato de sodio 1M, fosfato dibásico de K, 40 mM, cloruro de calcio 100 mM, 250 mg de glucosa, 125 mg de albúmina sérica bovina y 89 mg de alanina) en un volumen de 250 mL.

Solución de colagenasa: 25 mL Krebs Henseley, 0.5 mL solución de albúmina y 15 mg de colagenasa. **Solución de Percoll:** 60 mL Krebs Henseley doble concentración, 60 mL Percoll y gasificar durante 30 minutos con carbógeno. **Solución de albúmina:** 1 g de albúmina sérica bovina se disuelve en 20 mL de Krebs Henseley.

Técnica para aislamiento de túbulo renales proximales: A los conejos bajo anestesia (pentobarbital sódico) se les extrajeron los riñones y se colocaron en la solución de KH fría (4°C) gasificada y se dejaron en ella por 30 minutos. Después de los 30 minutos, a los riñones se les retiró la cápsula y se dividieron sagitalmente a la mitad y se eliminó la médula, quedando sólo la corteza la cual se fragmentó finamente y se lavaron 3 veces con KH. La preparación se centrifugó por 30 segundos a 900 rpm, y se decantó el sobrenadante. Se repitió el lavado hasta que la preparación quedó libre de sangre. Una vez lavado, el sedimento se incubó en un matraz Erlen Meyer en presencia de 25 mL solución KH, 0.5 mL de solución de albúmina, 0.028 g de colagenasa tipo IV y se colocó en baño maría a 37°C con agitación a 40 rpm, gasificado con carbógeno por espacio de 30 a 45 minutos (dependiendo de la actividad de la colagenasa).

Después de la incubación, la actividad de la enzima colagenasa se detuvo añadiendo 30 mL de solución KH frío, agitando suavemente el matraz 3 veces, durante 1 minuto para dispersar los fragmentos de tejido. Posteriormente la solución se filtró a través de un colador de té (filtro de té) para remover las fibras de colágena, el filtrado se colocó en tubos de 50 mL y se centrifugó 30 segundos a 900 rpm haciéndoles 3 lavados con solución KH frío. Después del último lavado el

precipitado se resuspendió en KH con albúmina al 5% en un volumen 6 veces mayor, y se enfrió con hielo (4°C), durante 5 minutos. La solución se centrifugó a 1000 rpm y se decantó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en una solución de KH y de Percoll frío en proporción de 1:1 (300 mOsmol/kg pH: 7.4) y se centrifugó a 15,000 rpm, durante 40 minutos a 4°C. Al término de la centrifugación, el tejido renal se separó en 4 bandas. En la banda F4 (inferior), en donde se localizaron los túbulos proximales, los cuales se recuperaron con una pipeta automática de 1 mL y se colocaron en tubos de 50 mL. Los túbulos proximales se lavaron 3 veces con 30 mL de solución de KH frío, se centrifugaron 1 minuto a 900 rpm, se decantó el sobrenadante y resuspendió el precipitado en 80 mL de KH.

Se estudió la viabilidad de los túbulos proximales tomando alícuotas de la suspensión, tiñéndolas con azul tripano y observándolas al microscopio. Los túbulos que no se tiñeron son viables; los teñidos están autolisados (aproximadamente <del 20%). En esta etapa, también se tomó una muestra para determinar las proteínas totales, por el método de Lowry.¹³² La suspensión de los TRP se conservó en hielo hasta el momento en que se determinó la síntesis del calcitriol por RIA e indirectamente se estimó la actividad de la 1 α -hidroxilasa.

Determinación de la concentración necesaria de 25(OH)D₃ para obtener la producción óptima de calcitriol en TRP: Con la finalidad de conocer la producción óptima de 1,25(OH)₂D₃ (calcitriol), formada a partir de la 25(OH)D₃ en los TRP se realizó el siguiente procedimiento: Preincubación de la suspensión de los TRP en 7 alícuotas x 3, conteniendo cada una 1.5 mL de suspensión, 5 mmol/L

de glutamina y 20 mg de albúmina sérica bovina fracción V, en baño maría a 37°C, agitando a 40 oscilaciones por minuto y gasificados con carbógeno durante 20 minutos. A los 20 minutos de preincubación se agregaron diferentes concentraciones de 25(OH)D₃ (1-10 μM), diluida en 0.04 mL de etanol al 95%, por triplicado. Después de 5 minutos, la reacción se detuvo agregando 1.0 mL de acetonitrilo. Después se midió la cantidad de 1,25(OH)₂D₃ producida, por el método de RIA en cada uno de los tubos, expresando el resultado como 1,25(OH)₂D₃ producido en pg/mg de proteína/5 minutos.

Determinación de la concentración de la PGE₁ óptima para estimular la síntesis de calcitriol en los TRP: Para determinar la cantidad óptima de PGE₁ necesaria para estimular la síntesis de calcitriol se utilizó como sustrato la (25[OH]D₃) y se desarrolló el siguiente procedimiento: Preincubación en 5 alícuotas x 3, se colocó 1.5 mL de la suspensión de los TRP, 5 mmol/L de glutamina y 20 mg de albúmina sérica de bovino fracción V, en baño maría, agitado a 40 oscilaciones por minuto y a 37°C, gasificado con carbógeno durante 20 minutos. A los 20 minutos de preincubación se agregó 25(OH)D₃ (8μM) y la PGE₁ a concentraciones progresivas, 2.82×10^{-10} – 2.82×10^{-4} M. Después de 5 minutos, se detuvo la reacción agregando 1 mL de acetonitrilo. Posteriormente se midió en cada alícuota la actividad de la PGE₁ cuantificando la cantidad de calcitriol producida en presencia de esta prostaglandina en diferentes concentraciones. La cantidad de calcitriol producida se midió por RIA, (en cultivo de células renales de túbulo proximal en presencia de PGE₁, ésta aparentemente activa la 1α-hidroxilasa que estimula la síntesis del calcitriol, el que

se mide por RIA, en donde se utilizó calcitriol marcado con I¹²⁵. Los resultados se expresaron en pg de calcitriol/mg de proteína/5 minutos.

Efecto del AH6809 sobre la síntesis de calcitriol en presencia de PGE₁: Para determinar el efecto del AH6809 sobre la síntesis de calcitriol en presencia de PGE₁ se realizó el siguiente procedimiento:¹³³ Se colocaron 1.5 mL de la suspensión de TRP en 4 alícuotas x 3, 5 mmol/L de glutamina y 20 mg de albúmina sérica bovina fracción V, llevándolos a baño maría, agitado a 40 oscilaciones por minuto, a 37°C y gasificados con carbógeno por 20 minutos. A los 20 minutos de preincubación se agregó a todas las alícuotas 25(OH)D₃ como sustrato (8 µM). También se agregó PGE₁ (2.82 x 10⁻⁶) a las alícuotas II, III y IV. Finalmente se agregó una concentración de 10⁻⁴ M de AH6809¹³⁴ diluido con dimetilsulfóxido (DMSO) a las alícuotas III y IV. La reacción se detuvo a los 5 minutos adicionando 1 mL de acetonitrilo a las alícuotas I, II y III y a los 30 minutos a la alícuota IV. Se midió la cantidad de calcitriol formada en cada tubo que contiene TRP por el método de RIA y el resultado se expresa en pg de calcitriol/mg de proteína/5 minutos en las tres primeras alícuotas y en la cuarta a los 30 minutos.

4.3. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba *t* de student para comparar las medias de los datos obtenidos. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con un valor de $p < 0.05$. Para el experimento *in vitro* se realizó un análisis de varianza de un factor

con ajuste de Games-Howell para comparaciones múltiples.¹³⁵ Todos los procedimientos se llevaron a cabo con el programa estadístico SPSS versión 12.0.

5. RESULTADOS

5.1. Experimento *in vivo*

Los resultados de los niveles séricos de calcio, magnesio y fósforo del grupo control vs grupo experimental, se muestran en el Tabla 1. En éstos se puede observar un incremento significativo de los niveles de calcio ($p < 0.01$) y del magnesio séricos ($p < 0.05$) en los animales que recibieron PGE_1 . También se observa un ligero aumento del fósforo pero éste no es significativo. En la misma Tabla 1 también se pueden observar los resultados de los niveles de calcio y magnesio iónicos. En estos datos se puede notar que los niveles de Ca^{2+} se mantuvieron similares en ambos grupos, pero el Mg^{2+} disminuyó de forma significativa ($p < 0.05$) en los animales que recibieron PGE_1 . Los niveles de la fosfatasa alcalina total (AKPH) y su isoenzima ósea (AKPH ósea) no presentan diferencias significativas entre grupo control y el experimental.

Los resultados de los niveles séricos de las hormonas calciotropas, tanto del grupo control como del grupo experimental, se muestran en la Tabla 2. En ella se puede observar que la $25(OH)D_3$, la hormona paratiroidea (PTHi) y la calcitonina mantuvieron sus valores en forma similar en los dos grupos. Los niveles de $1,25(OH)_2D_3$ (calcitriol) obtenidos en ambos grupos, muestran un incremento significativo ($p < 0.001$) del calcitriol en el grupo de animales que recibió PGE_1 . (Tabla 2).

5.2. Experimento *in vitro*

El resultado de la viabilidad celular de TRP realizado con azul tripano, reveló que más del 80% de las células renales tubulares eran viables. La cantidad de proteínas en la resuspensión del precipitado de TRP fue de 7.9 mg/mL.

Los resultados de la producción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ por células tubulares proximales de riñón incubadas en presencia de diferentes concentraciones de $25(\text{OH})\text{D}_3$ se muestran en la Figura 4. La gráfica presenta una tendencia sigmoidea lo que sugiere la presencia de una enzima ($1\alpha\text{-OHasa}$) alostérica.¹³⁶ También puede observarse que al aumentar las concentraciones de $25(\text{OH})\text{D}_3$, la producción de calcitriol se incrementa significativamente. La concentración de 8 μM de $25(\text{OH})\text{D}_3$ es suficiente para triplicar la producción de calcitriol, por lo que se consideró como la concentración óptima para utilizarse en los siguientes experimentos *in vitro*.

Los resultados de la producción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ por células tubulares proximales de riñón incubadas en presencia de 8 μM de $25(\text{OH})\text{D}_3$ y diferentes concentraciones de PGE_1 , se muestran en la Figura 5 en donde la concentración de 2.82×10^{-6} M de PGE_1 triplica la producción de calcitriol, por lo que ésta se utilizó en el siguiente experimento *in vitro*.

El efecto del AH6809 (antagonista del receptor de prostaglandinas) sobre la producción de calcitriol estimulada por la PGE_1 , se muestra en la Figura 6.

Tabla 1.- Niveles séricos de marcadores del remodelamiento óseo de conejos.

Los resultados se expresan como el valor promedio en las unidades que se indican \pm D.E. (n=2).

PARAMETROS	CONTROL (vehículo)	EXPERIMENTAL (PGE₁ intravenosa 50μg/día)
Ca (mg/dL)	10.5 \pm 0.72	12.1 \pm 0.72**
Ca ²⁺ (nmol/dL)	1.5 \pm 0.14	1.5 \pm 0.07
Mg (mg/dL)	2.2 \pm 0.27	2.9 \pm 0.23*
Mg ²⁺ (nmol/dL)	0.65 \pm 0.04	0.59 \pm 0.04*
P (mg/dL)	5.2 \pm 0.65	5.3 \pm 0.14
AKPH(UI/L)	72.4 \pm 24.4	61.4 \pm 16.2
AKPH ósea (%)	53.1 \pm 10.5	50.0 \pm 16.2

*p< 0.05

**p<0.01

TABLA 2.- Niveles séricos de hormonas calciotropas de conejos. Los resultados se expresan como el valor promedio en las unidades que se indican \pm D.E. (n=2) .

PARAMETROS	CONTROL (vehículo)	EXPERIMENTAL (PGE₁ intravenoso) 50μg/día
25(OH)D ₃ (ng/mL)	47.1 pg \pm 18.1	38.8 \pm 26.8
PTHi (pg/mL)	27.0 \pm 17.5	26.7 \pm 9.9
Calcitonina (pg/mL)	31.3 \pm 12.2	24.5 \pm 14.5
1,25(OH) ₂ D ₃ (pg/mL)	54.5 \pm 14.0	80.0 \pm 14.0*

*p<0.001

La producción de calcitriol determinada por RIA en cada uno de los viales, arrojó los siguientes resultados: en los viales III, una producción media de calcitriol de 112.5 \pm 2.2 pg/mg de proteína/5 minutos y en los viales IV una producción media de calcitriol de 77.5 \pm 2.6 pg/mg de proteína/ 30 minutos. Al comparar la producción de calcitriol en los viales II (132.8 \pm 14.7 pg/mg de proteína/5 minutos) con la observada en los viales III, se nota una moderada disminución de calcitriol que no fue significativa (112.5 \pm 2.2 pg/mg de proteína/5 minutos), pero al

comparar la producción del calcitriol en los viales II con su producción, en los viales IV, se observa una disminución significativa ($p < 0.05$) a 77.5 ± 2.6 pg/mg de proteína/30 minutos, regresando aproximadamente a sus niveles basales. (Figura 6).

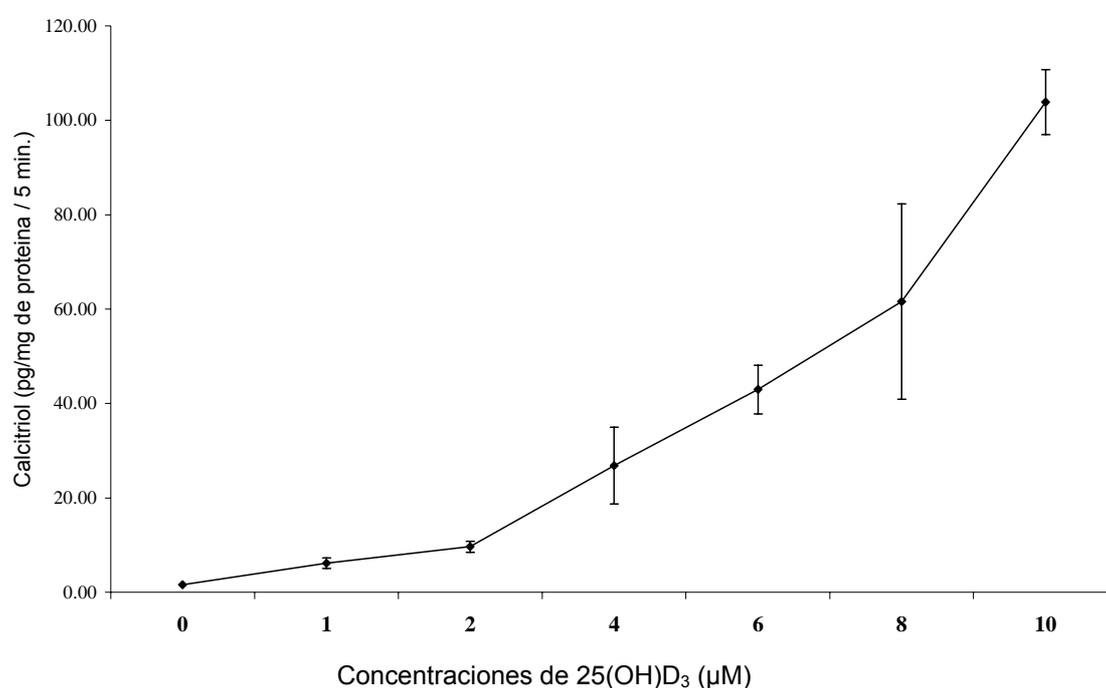


Figura 4: Estudio *in vitro*, en el que se utilizó como sustrato la 25(OH)D₃ a diferentes concentraciones (0-10 µM), para determinar la producción óptima de calcitriol, expresado en pg de 1,25(OH)₂D₃/mg de proteína/5 minutos. Los resultados corresponden al valor promedio \pm DE (n=3).

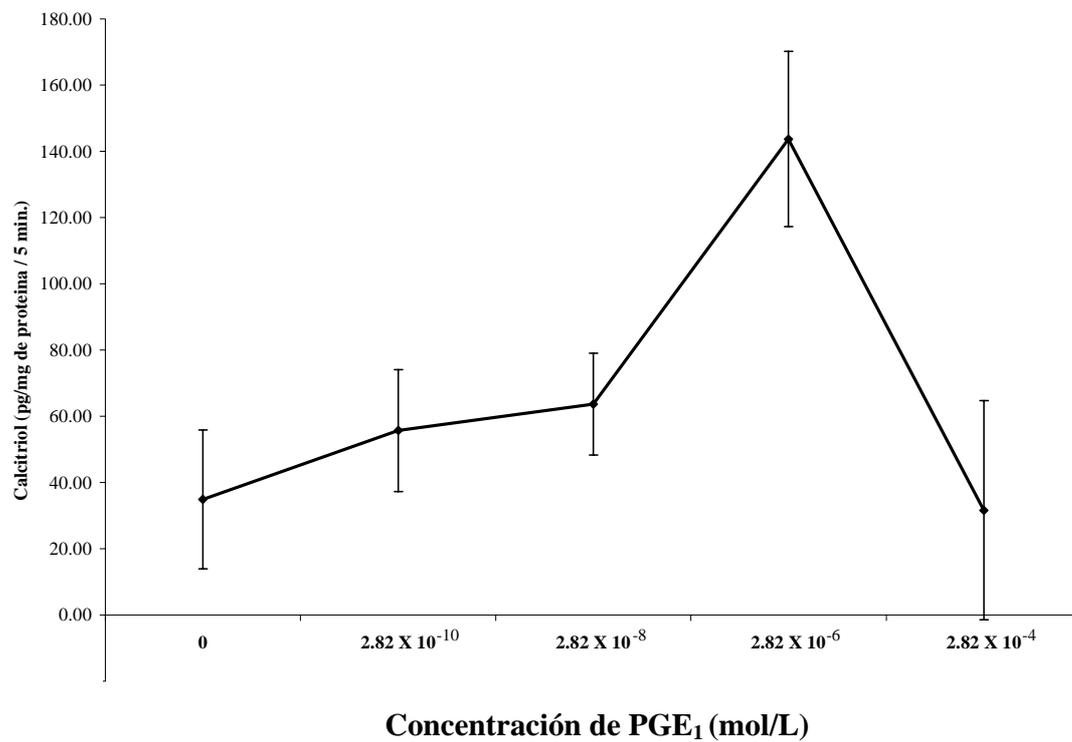


Figura 5: Estudio *in vitro* en el que se utilizaron 8 μ M de 25(OH)D₃ como sustrato y PGE₁ a diferentes concentraciones, con el objeto de estimular la producción de calcitriol, se observa que la concentración de 2.82×10^{-6} M de PGE₁, incrementa aproximadamente tres veces la producción del calcitriol. Los resultados se expresan como el valor promedio \pm D.E. (n=3).

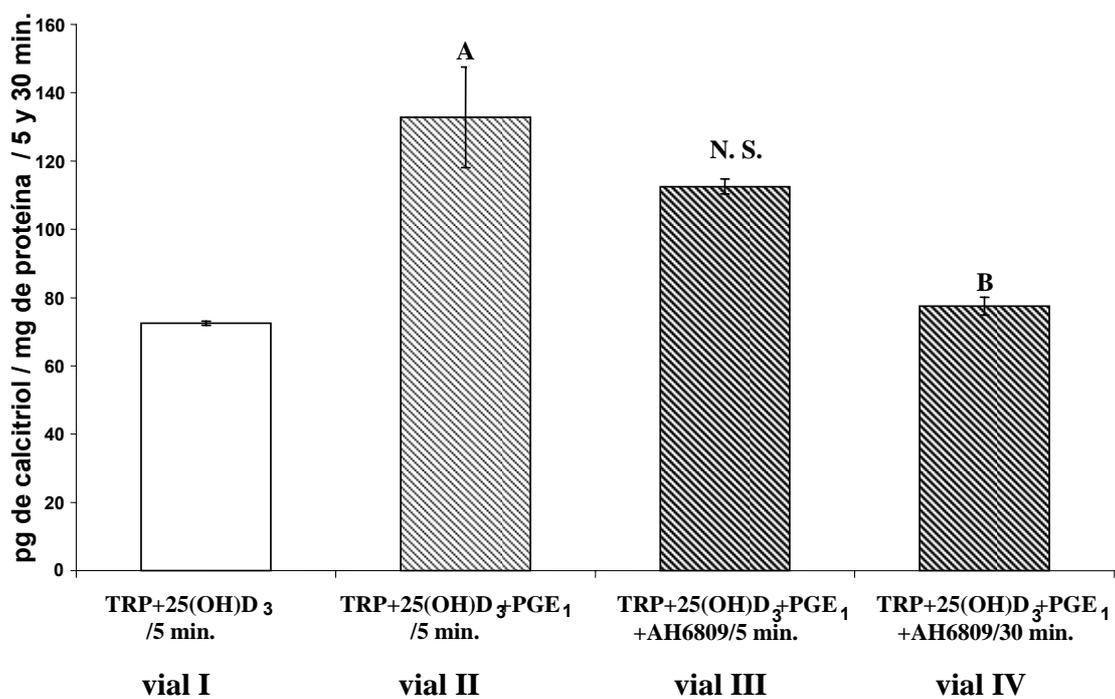


Figura 6: Efecto de la PGE₁ y del AH6809 sobre la producción de calcitriol en células de túbulos renales proximales. Los resultados se expresan como la producción de calcitriol en pg/mg de proteína/5 ó 30 minutos (grupo IV) ± DE (N=3 por grupo) “A”= diferencia significativa (p<0.04) entre vial control con vial II. “B”= diferencia significativa (p<0.05) entre grupo II con grupo IV. “N.S.” = no significativa.

6. DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra claramente que la PGE₁ incrementa la síntesis del calcitriol, tanto *in vivo* como *in vitro*. Se sabe que los niveles séricos de calcitriol se incrementan en condiciones asociadas a hipocalcemia, hipofosfatemia, hiperparatiroidismo, intoxicación con vitamina D y en terapia con furosemida. Una posible explicación del efecto *in vivo* de la PGE₁ sobre el incremento en la síntesis del calcitriol podría deberse a que la PGE₁ ocasionara hiperfosfaturia, lo cual incrementaría la síntesis del calcitriol. Sin embargo, en este estudio los niveles séricos de fósforo fueron similares en ambos grupos de animales, lo que descarta este posible mecanismo de acción.

La actividad de la 1 α -OHasa se manifiesta principalmente en el riñón, pero recientemente se ha demostrado en macrófagos,^{97,137} en los keratocitos^{97,138} y en trofoblasto.^{98,139}

El incremento de la síntesis del calcitriol obtenido con PGE₁ exógena, es similar al observado con PGE₂ en cultivo de células tubulares renales de pollo. Aparentemente esta prostaglandina estimula la actividad de la 1 α -OHasa, lo que ocasiona un incremento significativo de los niveles de calcitriol.^{114,115} Es posible que el incremento en la biosíntesis del calcitriol observado en animales del grupo experimental los cuales tuvieron niveles normales de 25(OH)D₃, se debió a estimulación de la PGE₁ sobre la 1 α -OHasa, en forma similar a como ha sido observado con la PGE₂.^{114,156}

En el estudio *in vivo*, el incremento del calcitriol en los animales del grupo experimental se acompañó de una hiperabsorción de calcio, magnesio y fósforo totales a nivel intestinal, lo cual se refleja en el incremento de estos tres elementos

observado a nivel sérico. También se observó, una disminución significativa en los niveles séricos de magnesio iónico en el grupo experimental. Esta disminución podría explicarse como una hipoabsorción del magnesio iónico secundaria a la presencia de hipercalcemia.¹⁴⁰

El receptor celular de la PGE_1 no ha sido identificado, por lo que hasta el momento no ha sido posible contar con un antagonista específico. El AH6809 (6-isopropoxi-9-oxoxantano-2-carboxili-ácido) es un antagonista de algunos receptores de otras PGs,¹³³ por lo cual se utilizó como un probable antagonista del receptor de la PGE_1 . Los resultados obtenidos sugieren que el AH6809 actuó como un antagonista del receptor de PGE_1 , ya que a los 30 minutos la PGE_1 disminuyó su estimulación sobre la 1α -OHasa observándose que la producción del calcitriol fue similar a la basal. Es probable que el retardo en el efecto antagónico se haya debido al tiempo tomado (30 minutos), para ocasionar una asociación/disociación del AH6809, con el receptor.¹³⁴ La PGE_1 al unirse a su receptor, probablemente estimuló su acoplamiento con una proteína Gs, cuya subunidad α activó a la adenilato ciclasa, que convirtió el ATP en adenosinmonofosfato cíclico (AMPc). El AMPc probablemente activó una proteincinasa A, la cual catalizó la fosforilación de la 1α -OHasa, incrementando así la síntesis de la $1,25(OH)_2D_3$, como lo hace la PGE_2 .^{114,115} Los resultados sugieren que el AH6809 bloqueó la unión de la PGE_1 al receptor, disminuyendo la estimulación de algunas de las enzimas o proteínas citoplasmáticas a sus niveles normales, ya que la actividad de 1α -OHasa, produjo niveles de calcitriol similares a los basales.

En pacientes que cursan con síndromes de hipercalciuria, se han encontrado concentraciones altas de PGE₂, acompañadas de niveles altos de calcitriol. En ellos se ha sugerido que la hipercalciuria es secundaria a una estimulación en la síntesis del calcitriol por la PGE₂, lo que ocasiona una hiperabsorción de calcio. Esta hipótesis se confirma, ya que cuando estos pacientes se tratan con inhibidores de la síntesis de PGE₂ (aspirina, indometacina, etc.) la hipercalciuria desaparece.^{141,142} En 1997 Welch y col,¹⁴² observaron que algunos niños con Síndrome de Bartter, (hipocalemia, alcalosis, hiperreninemia, hiperaldosteronismo y normotensión) cursaban con hipercalciuria debido a una excreción de prostaglandinas urinarias elevada. Más adelante aparecieron reportes en los que la hipercalciuria en niños con Síndrome de Bartter se reducía al administrar inhibidores de las PGs del tipo de la indometacina, sin explicación clara para su causa.¹⁴⁴ En 1975 Seyberth y col¹⁴⁵ informaron de seis pacientes con tumores sólidos del tipo carcinoma que cursaron con hipercalcemia y elevada excreción de metabolitos de la PGE en la orina, que desaparecieron con tratamiento de inhibidores de las PGs (aspirina, indometacina). En 1984 Houser y col¹⁴⁶ reportaron el caso de un niño con una patología parecida al síndrome de Bartter con hipercalciuria y elevada excreción urinaria de PGE₂, que se corrigió con terapia inhibidora de las PGs. En 1985 Seyberth y col¹⁴⁴ mencionan que la hipopotasemia con hipercalciuria e hiperprostaglandinuria en niños prematuros, era una entidad diferente al síndrome de Bartter, ya que la suspensión de la actividad de la PGE₂ con indometacina, mejora significativamente a los niños afectados.

En 1989 Restrepo y col¹⁴¹ en seis niños con Síndrome de Bartter, observaron hipercalciuria e incremento en la excreción urinaria de PGE₂, nefrocalcinosis sin datos de raquitismo ni de hiperparatiroidismo. Todos cursaron con altos niveles séricos de calcitriol y todos respondieron a la terapia con inhibidores de la síntesis de PGs. Los estudios metabólicos del calcio en estos niños sugirieron que la hipercalciuria era por exceso de absorción intestinal de calcio. Estos autores concluyeron que la asociación de hipercalcemia e hipercalciuria al síndrome de Bartter era debida a anomalías de la vitamina D. A fines de 1997 por primera vez, Thomas Welch¹⁴² reportó en un niño pre-púber, el síndrome caracterizado por exceso de prostaglandina E con hipercalciuria, considerándolo como una variante del síndrome de Bartter. Los niveles plasmáticos de hormona paratiroidea, fueron normales pero los niveles séricos del calcitriol siempre fueron elevados, así como la excreción urinaria de PGE₂. Una electrosonografía renal reveló nefrocalcinosis, el estudio radiográfico óseo no reveló raquitismo, pero sí osteopenia. Se estableció el diagnóstico de Síndrome por exceso de prostaglandina E en un paciente con Síndrome de Bartter manifestado desde la edad perinatal. Se inició terapia a base de indometacina y cloruro de potasio durante 10 años, permaneciendo sus niveles de calcitriol, calcemia y calciuria dentro de valores normales. Estas alteraciones reaparecían cuando la indometacina se discontinuaba.¹⁴² En estudios *in vitro* se ha observado que la PGE₂ estimula la actividad de 1 α -OHasa, incrementando la producción del calcitriol, de tal manera que la PGE₁ podría estar alterando el metabolismo del calcio a través de este mecanismo^{114,115,144-146} casi simultáneamente al reporte de Welch, un grupo de investigadores, encontraron en 20 niños con hipercalciuria idiopática, un

incremento de la PGE₂ en orina, con un incremento simultáneo del calcitriol sérico y con una paratohormona normal. Ellos sugirieron que la PGE₂ juega un papel importante en la patogénesis de la hipercalcemia ya que incrementaba la síntesis del calcitriol.¹⁴³

Los estudios experimentales y en humanos mencionados, son muy sugestivos de que las PGs incrementan la síntesis del calcitriol, ocasionando hipercalcemias e hipercalcemias. Habiéndose observado que la PGE₁ estimula la síntesis del calcitriol en forma similar a la PGE₂, se desarrolló un modelo experimental en conejos en los que al inyectar intravenosamente PGE₁, se produce un aumento significativo de la calcemia, magnesemia y la calciuria, manteniéndose las hormonas calciotropas en niveles basales, excepto por un incremento significativo del calcitriol. Estos resultados comprobaron que la PGE₁ sí incrementa la síntesis del calcitriol, ocasionando hipercalcemia y reproduciendo el síndrome de exceso de la prostaglandina E en conejos.¹⁴⁷ Estos resultados se reportaron como un hallazgo adicional al conocimiento de la fisiopatología del síndrome.

En una primera etapa del estudio *in vitro*, se utilizó 25(OH)D₃ como sustrato y en su valoración cinética observamos que la producción del calcitriol era directamente proporcional a la concentración de 25(OH)D₃. La respuesta cinética de la producción del calcitriol, en relación con la concentración del sustrato, se observó una curva con tendencia sigmoidea lo que indica que la 1 α -OHasa es una enzima alostérica.¹³⁶

En el estudio cinético de PGE₁, en el que se buscaba la concentración óptima para obtener un incremento en la síntesis de calcitriol se pudo apreciar que la PGE₁

incrementó la producción del calcitriol en forma proporcional a la concentración de PGE₁.

En el estudio experimental diseñado para investigar la estimulación *in vitro* de la PGE₁ sobre la síntesis del calcitriol, los resultados corroboran que la PGE₁ incrementa significativamente los niveles de calcitriol en los túbulos renales proximales.

Se conocen pocos medicamentos con efecto anabólico del tejido óseo como el que se ha observado con las PGs. Esto se ha reportado en niños con malformaciones cardíacas, sometidos a administración prolongada de PGE₁ para mantener abierto el conducto arterioso y en los que después de seis meses exhiben hiperostosis cortical.¹⁴⁸ También se ha observado, experimentalmente en perros, un incremento de la formación ósea al administrarles PGE₂.¹⁴⁹ Recientemente se ha reportado en ratas, que el efecto osteopénico producido por la ciclosporina A, puede ser prevenido, al administrarla combinada con PGE₂.¹⁵⁰ En contraste a lo anterior, también se ha observado que al administrar medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos, como inhibidores de la ciclooxigenasa, se ha observado una inhibición en la cicatrización de fracturas, tanto en animales como en humanos.¹⁵¹

Estos efectos anabólicos observados con la PGs aparentemente se deben a que incrementan la síntesis del calcitriol, promoviendo la absorción intestinal de calcio y acelerando la mineralización del osteoide. Esta propiedad anabólica ósea de las PGs, podría ser utilizada como objetivo principal en una investigación en pacientes osteopénicos (estrategia de tratamiento). Vale la pena comentar que a pesar de la importancia de las observaciones experimentales y clínicas reportadas, en las que

se comprueba que las PGs estimulan la síntesis del calcitriol, es una alternativa que no ha sido considerado en revisiones recientes.

Se reporta incremento del calcitriol sérico en pacientes con hipocalcemia, hipofosfatemia, hiperparatiroidismo, intoxicación exógena de vitamina D, en terapia con furosemida y ahora su incremento sérico es un marcador importante del síndrome de exceso de PGE en niños.¹⁴¹⁻¹⁴³ El calcitriol tiene aplicaciones terapéuticas importantes en varias enfermedades graves. Por ejemplo; en desórdenes caracterizados por hiperproliferación celular: como en la glomerulonefritis proliferativa experimental,^{110, 111} en el cáncer,^{112,113} en algunas enfermedades autoinmunes,^{152,153} en la prevención de rechazo de órganos trasplantados¹⁵⁴⁻¹⁶² y en enfermedades endocrinas como el hiperparatiroidismo.¹⁶³⁻¹⁶⁵ Desafortunadamente este potencial terapéutico del calcitriol se ha visto limitado por la hipercalcemia tóxica que ocasiona esta hormona. Es por esto, que en las últimas décadas se han desarrollado análogos de la vitamina D, que han disminuido significativamente la hipercalcemia tóxica, conservando sus propiedades terapéuticas. Existe en la actualidad el análogo del calcitriol conocido como calcipotriol, para el tratamiento de la psoriasis,¹⁶⁶ y para el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario se han desarrollado varios análogos como el paracalcitriol^{163, 165,167-170} el 22-oxacalcitriol y el doxercalciferol que prácticamente no ocasionan hipercalcemia y si disminuyen la síntesis de la PTH.¹⁷¹ Aplicaciones terapéuticas más amplias de estos análogos se encuentran en estudio.

7. CONCLUSIONES

1. La administración de PGE₁ a túbulos renales de conejos estimula significativamente la síntesis del calcitriol tanto *in vivo* como *in vitro*.
2. EL AH6809 actúa como antagonista del receptor de la PGE₁ (AP) bloqueando el estímulo de la PGE₁ sobre la producción de calcitriol.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kraemer S, Meade E, De Witt D. Prostaglandin Endoperoxide Synthase Gene Structure: Identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch Biochem Biophys* 1992; 293:391-400.
2. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi. Prostanoid Receptors: Structures, properties and functions. *Physiol Rev* 1999; 79:1193-1226.
3. Bito L. Accumulation and Apparent Active Transport of Prostaglandins by Some Rabbit Tissues *In Vitro*. *J Physiol (Lond)* 1972; 221:371-387.
4. Andersen N, Eggerman T, Harker L, Wilson C and De B. On the Multiplicity of Platelet Prostaglandin Receptors. Evaluation of competitive antagonism by aggregometry. *Prostaglandins* 1980; 19: 711-735.
5. Gardnier P and Collier H. Specific Receptors for Prostaglandins in Airways. *Prostaglandins* 1980; 19:819-841.
6. Pickles V. The Myometrial Actions of Six Prostaglandins: Consideration of a receptor hypothesis. In: Nobel Symposium. Prostaglandins edited by S Bergstrom and B Samuelson Stock-Holm. Almquist & Wicksell, Sweden 1967; 2:79-83.
7. Coleman R, Kennedy I, Humphrey P, Bunce K, Lumpley P. Prostanoids and their Receptors. In: Emmett JC (ed.) *Comprehensive Medicinal Chemistry. Membranes and Receptors*, vol 3 Pergamon Press Oxford, UK 1990; 643-714.
8. Kennedy I, Coleman R, Humphrey P, Levy G and Lumley P. Studies on the Characterization of Prostanoid Receptors: a Proposed Classification. *Prostaglandins* 1982; 24:667-689.

9. Ushikubi F, Nakajima M, Hirata M, Okuma M, Fujiwara M and Naruyima S. Purification of the Thromboxane A₂/prostaglandin H₂ Receptor From Human Blood Platelets. *J Biol Chem* 1989; 264: 16496-16501.
10. Hirata M, Hayashi Y, Ushikubi F, Yokota Y, Kageyama R, Nakanishi S, Narumiya S. Cloning and Expression of cDNA for a Human Thromboxane A₂ Receptor *Nature* 1991; 349:617-620.
11. Nusing R, Hirata M, Kakizuka A, Eki T, Ozawa K, and Narumiya S. Characterization and Chromosomal Mapping of the Human Thromboxane A₂ Receptor Gene. *J Biol Chem* 1993; 268: 25253-25259.
12. Duncan A, Andersen L, Funk C, Abramovitz M and Adam M. Chromosomal Localization of the Human Prostanoids Receptor Gene Family. *Genomics* 1995; 25:740-742.
13. Toh H, Ichikawa A, and Narumiya S. Molecular Evolution of Receptors for Eicosanoids. *FEBS Lett* 1995; 361: 17-21.
14. Honda Z, Nakamura M, Miki I, Minami M, Watanabe T, Seyama Y, Okado H, Toh H, Ito K, Miyamoto T, and Shimizu T. Cloning by Functional Expression of Platelet-activating Factor Receptor from Guinea-pig lung. *Nature* 1991; 349: 342-346.
15. Nakamura M, Honda Z, Izumi T, Sakanaka C, Mutoh H, Minami M, Bito H, Seyama Y, Matsumoto T, Noma M, and Shimizu T. Molecular Cloning and Expression of Platelet-activating Factor Receptor from Human Leukocytes. *J Biol Chem* 1991; 266: 20400-20405.

16. Fiore S, Maddox J, Perez H, and Serhan C. Identification of a Human cDNA Encoding a Functional High Affinity Lipoxin A₄ Receptor. *J Exp Med* 1994; 180: 253-260.
17. Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takuwa T and Shimizu T. A G-protein-coupled Receptor for Leukotriene B₄ that Mediates Chemotaxis. *Nature* 1997; 387: 620-624.
18. Regan J, Bailey T, Pepperl K, Pierce A, Bogadurdus J, Bonello C, Faibain C, Kedzie K, Woodward D and Gil D. Cloning of a Novel Human Prostaglandin Receptor with Characteristics of Pharmacologically defined EP₂ subtype. *Mol Pharmacol* 1994; 46:213-220.
19. Kluger M. Fever: Role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev* 1991; 71: 93-127.
20. Saper C and Breder C. The Neurologic basis of fever. *N Engl J Med* 1994; 330: 1880-1886.
21. Oka T and Hori T. Ep₁-receptor mediation of prostaglandin E₂-induced hyperthermia. *Am J Physiol* 267 (Regulatory Integrative Comp Physiol 36): 1994; R289-R294.
22. Morimoto A, Murakami N, Nakamori T and Watanabe T. Multiple Control of Fever Production in the Central Nervous System of Rabbits. *J Physiol (Lond)* 1988; 397: 269-280.
23. Milton A and Wendlandt S. A Possible Role for Prostaglandin E₁ as a Modulator for Temperature Regulation in the Central Nervous System of the Cat (Abstract) *J Physiol (Lond)* 1970; 207: 76P-77P.

24. Sehic E, Szekely M, Ungar A, Oladehin A and Blatteis C. Hypothalamic Prostaglandin E₂ During Lopopolysaccharide-induced Fever in Guinea Pigs. *Brain Res Bull* 1996; 39: 391-399.
25. Sirko S, Bishai I and Coceani F. Prostaglandin Formation in the Hypothalamus *in vivo*: Effect of pyrogens. *Am J Physiol* 256 (Regulatory Integrative Comp Physiol 25): 1989; R616-R624.
26. Stitt J. Prostaglandin E as the Neural Mediator of the Febrile Response. *Yale J Biol Med* 1986; 59: 137-149.
27. Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, Kobayashi T, Hizaki H, Tuboi K, Katsuyama M, Ichikawa A, Tanaka T, Yoshida N and Naruyima S. Impaired Febrile Response in Mice Lacking the Prostaglandin E Receptor Subtype EP₃. *Nature* 1998; 395:281-284.
28. Morimoto A, Murakami N, Nakamori T, Sakata Y and Watanabe T. Possible Involvement of Prostaglandin E in Development of ACTH Response in Rats Induced by Human Recombinant Interleukin 1. *J Physiol (Lond)* 1989; 411: 245-256.
29. Hayaishi O. Molecular Mechanisms of Sleep-wake Regulation: Roles of prostaglandin D₂ and E₂. *FASEB J* 1991; 5: 2575-2581.
30. Urade Y, Kitahama K, Oshishi H, Kaneko T, Mizuno N and Hayaishi O. Dominant Expression of mRNA for Prostaglandin D Synthase in Leptomeninges, Choroid Plexus, and Oligodendrocytes of the Adult Rat Brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9070-9074.

31. Davies P, Bailey P, Goldenberg M and Fordhuchinson W. The Role of Arachidonic Acid Oxygenation Products in Pain and Inflammation. *Annu Rev Immunol* 1984; 2: 335-357.
32. Malmberg A and Yaksh T. Hyperalgesia Mediated by Spinal Glutamate or Substance P Receptor Blocked by Spinal Cyclooxygenase Inhibition. *Science* 1992; 257: 1276-1279.
33. Oka T, Aou S and Hori T. Intra Cerebral Ventricular Injection of Prostaglandin E₂ Induces Thermal Hyperalgesia in Rats: The possible involvement of EP₃ receptors. *Brain Res* 1994; 663: 287-292.
34. Ushikubi F, Aiba Y, Nakamura K, Namba T, Hirata M, Mazda O, Katsura Y and Narumiya S. Thromboxane A₂ Receptors is Highly Expressed in Mouse Immature Thymocytes and Mediates DNA Fragmentation and Apoptosis. *J Exp Med* 1993;178: 1825-1830.
35. Lewis R, Soter N, Diamond P, Austen K, Oates J and Roberts L. Prostaglandin D₂ Generation After Activation of Rat and Human Mast Cells With anti-IgE. *J Immunol* 1982; 129: 1627-1631.
36. Hirata T, Kakizuka A, Ushikubi F, Fuse I, Okuma M and Narumiya S. Arg⁶⁰ to Leu Mutation of the Human Thromboxane A₂ receptor in a Dominantly Inherited Bleeding Disorder. *J Clin Invest*. 1994; 94:1662-1667.
37. Thomas D, Mannon R, Mannon P, Latour A, Oliver J, Hoffman M, Smithies O, Koller B and Coffman T. Coagulation Defects and Altered Hemodynamic Responses in Mice Lacking Receptors for Thromboxane A₂. *J Clin Invest* 1998; 102: 1994-2001.

38. Coceani F and Olley P. The Control of Cardiovascular Shunts in the Fetal and Perinatal Period. *Can J Physiol Pharmacol* 1988; 66:1129-1134.
39. Smith G. The Pharmacology of the Ductus Arteriosus. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 35-58.
40. Ojeda S and Campbell W. An Increase in Hypothalamic Capacity to Synthesize Prostaglandin E₂ Produces the First Preovulatory Surge of Gonadotropins. *Endocrinology* 1982; 111: 1031-1037.
41. Horton E and Poyser N. Uterine Luteolytic Hormone: a Physiological Role for Prostaglandin F. *Physiol Rev* 1976; 56: 595-651.
42. McCracken J and Schramm W. Prostaglandins and Corpus Luteum Regression. In: *Prostaglandins: Biology and Chemistry of Prostaglandins and Related Eicosanoids*, edited by PB Curtis-Prior London: Churchill Livingstone 1988; 425-462.
43. Skinner K and Challis J. Changes in the Synthesis and Metabolism of Prostaglandins by Human Fetal Membranes and Deciduas at Labor. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 151: 519-523.
44. Raisz L and Martin T. Prostaglandins in Bone and Mineral Metabolism. In *Bone Miner Res Annual 2 excerpta médica Amsterdam* 1983; 286-310.
45. Bergmann P and Shoutens A. Prostaglandins and Bone. *Bone* 1995; 16(4):485-488.
46. Sato K, Kasono K, Fuji, kawakami M, Tsushima T, Shizume K. Tumor Necrosis Factor Type- α (cachectin) Stimulates Mouse Osteoblast-like Cells (MC3T3-E1) to Produce Macrophage-Colony Stimulating Activity and Prostaglandin E₂. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 145: 323-329.

47. Kimble R, Matayoshi A, Vannice J, Kung V, Williams C and Pacifici R
Simultaneous Block of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor is Required to Completely Prevent Bone Loss in the Early Postovariectomy Period
Endocrinol 1995; 126: 3054-3061.
48. Harrison J, Lorenzo J, Kawaguchi H, Raisz L and Pilbeam C. Stimulation of Prostaglandin E₂ Production by Interleukin-1 α and Transforming Growth Factor α in Osteoclastic MC3T3-E1 Cells. J Bone Miner Res 1994; 9(6): 817-823.
49. Klein-Nulend J, Fall P and Raisz L. Comparison of the Effects of Synthetic Human Parathyroid Hormone (PTH-(1-34))-Related Peptide of Malignancy and Bovine PTH-(1-34) on Bone Formation and Resorption in Organ Culture. Endocrinol 1990; 126: 7991-7994.
50. Klein-Nulend J, Pilbeam C, Harrison J, Fall P and Raisz L. Mechanism of Regulation of Prostaglandin Production by Parathyroid Hormone, Interleukin-1, and Cortisol in Cultured Mouse Parietal Bones. Endocrinol 1991a; 128: 2503-2510.
51. Lanyon L. Control of Bone Architecture by Functional Load Bearing. J Bone Miner Res 1992; 7: S369-S375.
52. Chow J, and Chambers T. Indomethacin has Distinct Early and Late Actions on Bone Formation Induced by Mechanical Stimulation. Am J Physiol 1994; 267:E287-E292.
53. Feyen J, and Raisz L. Prostaglandin Production from Sham Operated Oophorectomized Rats: Effect of 17 β -estradiol *in vivo*. Endocrinol 1987; 121: 819-821.

54. Miyaura C, Kusano K, Masuzawa T, Chaki O, Onoe Y, Aoyagi M, Saaki T, Tamura T, Koishihara Y, Ohugi Y and Suda T. Endogenous Bone-resorbing Factors in Estrogen Deficiency: Cooperative effects of IL-1 and IL-6. *J Bone Miner Res* 1995a; 10(9): 1365-1373.
55. Kawaguchi H, Pilbeam C, Vargas S, Morse E, Lorenzo J and Raisz L. Ovariectomy Enhances and Estrogen Replacement Inhibits the Activity of Marrow Factors which Stimulate Prostaglandin Production in Cultured Mouse Calvarie. *J Clin Invest* 1995 July; 96(1): 539–548.
56. Li X, Okada Y, Pilbeam C, Lorenzo J, Kennedy C, Breyer R and Raiz L. Knockout of the Murine Prostaglandin EP2 Receptor Impairs Osteoclastogenesis *In Vitro*. *Endocrinol* 2000;141: 2054-2061.
57. Zaman G, Suswillo R, Cheng M, Lanyon L. Effect of Strain and Strain-related Prostanoids on mRNA Expression of c-fos, IGF-I and IGF-II, and TGF- β . *J. Bone Miner Res* 1994; 9:S303.
58. Raisz L and Fall P. Biphasic Effects of Prostaglandin E₂ on Bone Formation in Cultured Fetal Rat Calvariae: Interaction with Cortisol. *Endocrinol* 1990;126: 1654-1659.
59. Baylink T, Mohan S, Fitzsimmons R and Baylink D. Evidence that the Mitogenic Effect of Prostaglandin E₂ on Human Bone Cells Involves Protein Kinase C and Calcium Pathways. *J Bone Miner Res* 9 (suppl 31) B23.
60. Tasaki Y, Takamore R and Koshihara Y. Prostaglandin D₂ Metabolite Stimulates Collagen Synthesis by Human Osteoblast During Calcification. *Prostaglandins* 1991; 41(4), 303-314.

61. Akatsu T, Takahashi N, Debari K, Morita I, Murota S, Nagata N, Takami O, Suda T. Prostaglandins Promote Osteoclastlike Cell Formation by a Mechanism Involving Cyclic Adenosine 3', 5' Monophosphate in Mouse Bone Marrow Cell Cultures. *J Bone Miner Res* 1989; 4(1):29-35.
62. Bichell D, Rotwein P and McCarthy T. Prostaglandin E₂ Rapidly Stimulates Insulin-Like Growth Factor-1 Gene Expression in Primary Rat Osteoblast Cultures-Evidence for Transcriptional Control. *Endocrinol* 1993;133: 1020-1028.
63. McCarthy T, Centrella M, Raisz L, and Canalis E. Prostaglandin E₂ Stimulates Insulin-like Growth Factor I Synthesis in Osteoblast-enriched Cultures from Fetal Rat Bone. *Endocrinol* 1991; 128: 2895-2900.
64. McCarthy T, Casinghino S, Centrella M and Canalis E. Complex Pattern of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein Expression in Primary Rat Osteoblast Enriched Cultures: Regulation by Prostaglandin E(2), Growth Hormone, and the Insulin-Like Growth Factors. *J Cell Physiol* 1994; 160(1): 163-175.
65. Pash J, Delaney A, Adamo M, Roberts C, Le Roith D and Canalis E. Regulation of Insulin-Like Growth Factor I Transcription by Prostaglandin E₂ in Osteoblastic Cells. *Endocrinol* 1995; 136(1):33-38.
66. Tomita M, Li X, Okada Y, Woodiel F, Young R, Pilbeam C and Raisz L. Effects of Selective Prostaglandin EP4 Receptor Antagonist on Osteoclast Formation and Bone Resorption *In Vitro*. *Bone* 2002; 30(1):159-163.

67. Suda M, Tanaka K, Natsui K, Usui T, Tanaka I, Fukushima, M, Shigeno C, Konishi J, Narumiya S, Ichikawa A and Nakao N. Prostaglandin E Receptor Subtypes in Mouse Osteoblastic Cell Line. *Endocrinol* 1996; 137: 1698-1705.
68. Woo K, Emery J and Peabody J. Cortical Hyperostosis: A Complication of Prolonged Prostaglandin Infusion in Infants Awaiting Cardiac Transplantation. *Pediatrics* 1994;93(3):417-420.
69. Li X, Jee W, Li Y, Buckendahl P. Transient Effects of Subcutaneously Administered Prostaglandin E₂ on Cancellous and Cortical Bone in Young Adult Dogs. *Bone* 1990;11:353-364.
70. Katz I, Jee W, Joffe I, Stein B, Takizawa M, Jacobs T, Setterberg R, Lin B, Tang L, Ke H, Zeng Q, Berlin J and Epstein S. Prostaglandin E₂ Alleviates Cyclosporin a-Induced Bone Loss in the Rat. *J Bone Miner Res* 1992;7(10): 1191-1200.
71. Jee W, Ueno K, Deng Y and Wooldbury D. The Effects of Prostaglandin E₂ in Growing Rats: Increased Metaphyseal Hard Tissue and Corticoendosteal Bone Formation. *Calcif Tissue* 1985; Int. 37: 148-156.
72. Nordin R, Jee W and High W. The Role of Prostaglandins in Bone *In Vivo*. Prostaglandins leukotrienne. *Essent Fatty Acids* 1990; 41: 139-149.
73. Takada M, Yamamoto I, Kigami Y, Ohnaka Y and Morita R. Chronic Intramedullary Infusion of Prostaglandin E₂ Stimulates Bone Formation both in the Bone Marrow and in the Periosteum. *Endocr J* 1995; 42:323-330.
74. Engesaeter L, Sudmann B and Sudmann E. Fracture Healing in Rats Inhibited by Locally Administered Indomethacin. *Acta Orthop Scand* 1992; 63: 330-333.

75. Scutt A and Bertram P. Bone Marrow Cells are Targets for the Anabolic Actions of Prostaglandin E₂ on Bone: Induction of a Transition from Nonadherent to Adherent Osteoblast Precursors. *J Bone Miner Res* 1995; 10(3):474-487.
76. Askew F, Bourdillon R, Bruce H, Jenkins R and Webster T. The Distillation of Vitamin D. *Proc Soc Lond B Biol Sci* 1931;107:76-90.
77. Windaus A, Schenck F and Von Wender F. Uber das Antirachitisch Wirksame Bestrahlungsprodukt Aus 7-Dehydro-Cholesterin. *Z. Physiol* 1936;241:100-103.
78. Blunt J, DeLuca H and Schones H. 25-Hydroxycholecalciferol a Biologically Active Metabolite of Vitamin D₃. *Biochemistry* 1968;7:3317-3322.
79. Fraser D and Kodicek E. Unique Biosynthesis by Kidney of a Biological Active Vitamin D Metabolite. *Nature* 1970;228:764-766.
80. Holic M, Schnoes H, DeLuca H, Sudda T, Cousins R. Isolation and Identification of 1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol. A Metabolite of Vitamin D Active Intestine. *Biochemistry* 1971; 10:2799-2804.
81. Lawson D, Fraser D, Kodicek E, Morris H and Williams D. Identification of 1,25-Dihydroxycholecalciferol, a new Kidney Hormone Controlling Calcium Metabolism. *Nature* 1971;230:228-230.
82. Demay M, Kierman M, DeLuca H. Sequences in the Human Parathyroid Hormone Gene that Bind the 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Receptor and Mediates Transcriptional Repression in Response to 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:8097-8101.

83. Navah-Many T, Marx R, Koshet E, Pike J, Silver J. Regulation of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Receptor Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in the Parathyroid *In Vivo*. *J Clin Invest* 1990; 86:1968-1975.
84. Merke J, Hugel U, Zlotkowski A, Szabo A, Bommer J, Mall G, Ritze E. Diminished Parathyroid 1,25-(OH)₂D₃ Receptors in Experimental Uremia. *Kid Int* 1987; 32: 350-353.
85. Brown A, Dusso A, Lopez-Hilkeer S, Lewis-Finch J, Grooms P, Slatopolsky E. 1,25(OH)₂D Receptors are Decreased in Parathyroid Glands from Chronically Uremic Dogs. *Kid Int* 1989; 35:19-23.
86. Denda M, Finch J, Brown AJ, Nishi Y, Kubodera N, Slatopolsky E. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and 22-Oxacalcitriol Prevent the Decrease in Vitamin D Receptor Content in the Parathyroid Glands Of Uremic Rats. *Kid Int* 1996;50: 34-39.
87. Fu G, Lin D, Zhang M, Bikle D, Shackleton C, Miller W and Portale A. Cloning of Human 25-Hydroxyvitamin D-1 α -Hydroxylase and Mutations Causing Vitamin D-Dependent Rickets Type I. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 1961-1970.
88. Pike J. Vitamin D₃ receptors. Structure and Function in Transcription. *Ann Rev Nutr* 1991; 11:189-216.
89. Minghetti P, Norman A. 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ Receptors: Gene Regulation and Genetic Circuitry. *FASEB J* 1988; 2: 3043-3053.
90. Glass C, Rose D and Rosenfeld M. Nuclear Receptor Coactivators. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 222-232.

91. Norman A, Song X, Zanello L, Bula C, Okamura W. Rapid and Genomic Biological Responses are Mediated by Different Shapes of the Agonist Steroid Hormone, $1\alpha,25(\text{OH})_2$ Vitamin D_3 . *Steroids* 1991; 64:120-128.
92. Brown A, Dusso A and Slatopolsky E. Vitamin D. *The American Physiological Society* 1999;F157-F175.
93. Baran D, Quail J, Ray R, Leszyk J and Honeyman T. Identification of the Membrane Protein that Binds $1\alpha,25$ dihydroxyvitamin D_3 and Is Involved in the Rapid Actions of the Hormone. *Bone* 1998;23, Suppl:S176.
94. Li Y, Meuse J, Guo J, Bringham F and Demay M. Analysis of Rapid Cellular Response to Vitamin D Treatment in Mouse Osteoblasts Lacking The Vitamin D Receptor. *Bone* 1998; 23 suppl:S263.
95. Nemere I, Dormanen M, Hammon M, Okamura W and Norman A. Identification of Specific Binding Protein for $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 in Basal-Lateral Membranes of Chick Intestinal Epithelium and Relationship to Transcaltachia. *J Biol Chem* 1994; 269:23750-23756.
96. Portale A, Miller W. Human 25-Hydroxyvitamin D- 1α -Hydroxylase: Cloning, Mutations and Gene Expression. *Pediatr Nephrol* 2000;14:620-625.
97. Reichel H, Koeffler H and Norman A. Production of $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 by Hematopoietic Cells. *Prog Clin Biol Res* 1990; 332: 81-97.
98. Halhali A, Díaz L, Sánchez I, Garabedian M, Bourges H and Larrea F. Effects of IGF-I On $1,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 Synthesis by Human Placenta in Culture. *Molecular Human Reproduction* 1999; 5(8):771-776.
99. Su P, Rennert H, Shayiq R. A cDNA Encoding a Rat Mitochondrial Cytochrome P450 Catalyzing Both The 26-Hydroxylation of Cholesterol and

- 25-Hydroxylation of Vitamin D₃: Gonadotropic Regulation of the Cognate mRNA in Ovaries, DNA. Cell Biol 1990;9:657-665.
- 100.** Ohyama Y, Noshiro M, Okuda K. Cloning and Expression of cDNA Encoding 25-Hydroxyvitamin D₃ 24-Hydroxylase. FEBS Lett 1991; 278: 195-198.
- 101.** Chen K, Prah J, DeLuca H. Isolation and Expression of Human 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ 24-Hydroxylase cDNA. Proc Natl Acad Sci USA 90:4543-4547.
- 102.** Chen K, DeLuca H. Cloning of The Human 1 Alpha,25-Dihydroxyvitamin D₃-24-Hydroxylase Gene Promoter and Identification of Two Vitamin D-Responsive Elements. Biochem Biophys Acta 1995;1263:1-9.
- 103.** Monkawa T, Yoshida Y, Wakino S. Molecular Cloning of cDNA and Genomic DNA for Human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase. Biochem Biophys Res Commun 1997; 239:527-533.
- 104.** Shinki T, Shimada H, Wakino S. Cloning and Expression of Rat 25-Hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase Cdna. Proc Natl Acad USA 1997;94: 12920-12925.
- 105.** St-Arnaud R, Messerlian S, Moir J, Omdahl J, Glorieux F. The 25-Hydroxyvitamin D 1-alpha-hydroxylase Gene Maps to the Pseudovitamin D-Deficiency Rickets (PDDR) Disease Locus. J Bone Miner Res 1997;12:1552-1559.
- 106.** Takeyama K, Kitanaka S, Sato T, Kobori M, Yanagisawa J, kato S. 25-Hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase and Vitamin D Synthesis. Science 1997; 277: 1827-1830.

- 107.**Langman C, Favus M, Bushinsky D and Coe F. Effects of Dietary Calcium Restriction on 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ net Synthesis by Rat Proximal Tubules. *J Lab Clin Med* 1985; 106(3):286-292.
- 108.**Wong M, Sriussadaporn S, Tembe V and Favus M. Insulin-Like Growth Factor I Increases Renal 1,25(OH)₂D₃ Biosynthesis During Low-P Diet in Adult Rats. *Am Physiol Soc* 1997; F698-F703.
- 109.**Christakos S, Friedlander E, Frandsen B and Norman A. Studies on the Mode of Action of Calciferol XIII. Development of a Radioimmunoassay for Vitamin D-Dependent Chick Intestinal Calcium-Binding Protein and Tissue Distribution. *Endocrinology* 1979;104:1495-1503.
- 110.**Schwarz U, Amann K, Orth S, Simonaviciene A, Wessels S, Ritz E. Effect of 1,25(OH)₂ Vitamin D₃ on Glomerulosclerosis in Subtotally Nephrectomized Rats. *Kid Int* 1998; 53:1696-1705.
- 111.**Hariharan S, Hong S, Hsu A, Gartside P. Ooi B. Effect of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ on Mesangial Cell Proliferation. *J Lab Clin Med* 1991; 117: 423-429.
- 112.**Konety B, Lavelle J, Pirtskalaishvili G, Dhir R, Meyers S, Nguyen T, Hershberger R. Effects of Vitamin D (Calcitriol) on Transitional Cell Carcinoma of the Bladder *In Vitro* and *In Vivo*. *J Urol* 2001; 165:253-258.
- 113.**Celli A, Treves C, Stio M. Vitamin D Receptor In Sh-Sy5y Human Neuroblastoma Cells And Effect of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ on Cellular Proliferation. *Neurochem Int* 1999; 34: 117-124.

- 114.** Treschel U, Taylor C, Bonjour J, Fleisch H. Influence of Prostaglandins and of Cyclic Nucleotides on the Metabolism Of 25-Hydroxyvitamin D₃ in Primary Chick Kidney Cell Culture. *Biochem Biophys Res Comm* 1980; 9: 1210-1216.
- 115.** Wark J, Larkins R, Eisman J, Wilson K. Regulation of 25-Hydroxy-Vitamin D-1 α -Hydroxylase in Chick Isolated Renal Tubules: Effects of prostaglandin E₂ furosemide and acetylsalicylic acid. *Clin Sci* 1981; 61: 53-59.
- 116.** Velásquez-Forero F, Morales M, Sierra C, Socias F, Ito J. the Prostaglandin E₁, Shortens the Mineralization Lag Time in Cat's Palatine Bone Disjunction, Histomorphometric Study. [abstract] *J Bone Miner Res* 1994;9:B484.
- 117.** Velásquez-Forero F, Urbina M, Isoard F, Valencia P, Exogenous Prostaglandin E₁ Shortens the Bone Mineralization Lag Time in the Rabbit Disjunction Palate. [abstract] *J Bone Miner Res* 2000;9:811.
- 118.** Aluja S, Cortés A, Pinzón E, Lomelí F, Frenk S. La Experimentación Científica. En: *Animales, Gac Med Méx.* 1987;123:247-259.
- 119.** Aluja S. Animales de Laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gac Méd Méx* 2002;138(3):295-298.
- 120.** Golub M, Zia P, Matsuno M, Horton R. Metabolism of Prostaglandins A₁ and E₁ in Man. *J Clin Invest* 1975 December; 56(6): 1404–1410.
- 121.** Hollis B. Assay of Circulating 1,25-Dihydroxyvitamin D Involving A Novel Single Cartridge Extraction and Purification Procedure. *Clin Chem* 1986;32:2060-2063.
- 122.** National Committee for Clinical Laboratory Standards. How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory 2nd ed. NCCLS document 2000;C28-A2, 20(13) approved guideline.

- 123.** National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices NCCLS document 1999;EP6-P, 6(18), proposed guideline.
- 124.** Trudeau D and Freir E. Determination of Calcium in Urine and Serum by Atomic Absorption Spectrofotometry (AAS). Clin Chem 1967;13, 101-114
- 125.** Willis J. Determination of Calcium and Magnesium in Urine by Atomic Absorption Spectroscopy. Anal Chem 1961;556.
- 126.** Henry R. Clinical Chemistry. Principles and Technics. Harper and Row. New York, NY 1974;656 and 679.
- 127.** Tietz N. Clinical Guide to Laboratory Tests, W.B. Saunders Company, Philadelphia 1983;5:384.
- 128.** Gutman A. Serum Alkaline Phosphatase Activity in Diseases of the Skeletal And Hepatobiliary Systems. Am J Med 1959;27:875-901.
- 129.** Calvo M, Eyre D and Gundberg C. Molecular Basis and Clinical Application of Biological Markers of Bone Turnover. Endocrine Rev 1996;17(4):333-368.
- 130.** Vinay P, Gougoux A, Lemieux G. Isolation of A Pure Suspension of Rat Proximal Tubules. Am Physiol Soc 1981;F403-F411.
- 131.** Langman C, Favus M, Bushinsky D, Coe F. Effects of Dietary Calcium Restriction on 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Net Synthesis by Rat Proximal Tubules. J Lab Clin Med 1985;106:286-292.
- 132.** Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-275.

- 133.** Woodward D, Pepperl D, Burkey T, Regan J. 6-isopropoxy-9-oxoxanthene-2-carboxylic acid (AH6809), A Human EP₂ Receptor Antagonist. *Bioch Pharmacol* 1995;50:1731-1733.
- 134.** Crider J, Griffin B, Sharif N. Prostaglandin DP Receptors Positively Coupled to Adenylyl Cyclase in Embryonic Bovine Tracheal (EBTr) Cells: Pharmacological Characterization Using Agonists and Antagonists. *Brit J Pharmacol* 1999; 127;204-210.
- 135.** Matthews D and Farewell V. *Using and Understanding Medical Statistics*. Edit Karger 1985;119-122.
- 136.** Segel I. Enzymes with Multiple Catalytic Sites. In *Science Scientific Classic Edition*. Academic Press, New York, NY, USA 1993;259-310
- 137.** Insogna K, Dreyer B, Mitnick M, Ellison A, Broadus A. Enhanced Production Rate of 1,25-dihydroxyvitamin D in Sarcoidosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;66:72-75.
- 138.** Bikle D, Nemanic M, Gee E, Elias P. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ production by human keratinocytes. *J Clin Invest* 1986;78:557-566.
- 139.** Weisman Y, Harrell A, Edelstein S and M David. 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D₃ and 24,25-dihydroxyvitamin D₃ *in vitro* synthesis by human decidua and placenta. *Nature* 1979;281:317-319.
- 140.** Rude R. Magnesium deficiency and hypermagnesemia. In: Favus JM (Ed.) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 2nd ed., chap 54. Raven Press New York, NY USA 1993;210-210.

- 141.** Restrepo R, Welch T, Hug G, Clark K, Bergstrom W. Hypercalciuria with Bartter's Syndrome: Evidence for an abnormality of vitamin D metabolism. *J Pediatr* 1989;397-404.
- 142.** Welch T. The Hyperprostaglandin E Syndrome: A hypercalciuric variant of Bartter's Syndrome. *J Bone Miner Res* 1997;2(10):1753-1754.
- 143.** Hasanoglu A, Ercan Z, Buyan N, Memioglu N, Hasanoglu E. Parathormone, 1,25 dihydroxyvitamin D and Prostaglandin E₂ Correlation in Children with Idiopathic Hypercalciuria. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* [abstract] 1997;56:235-237.
- 144.** Seyberth H, Rascher W, Scheweer H, Kuhl P, Mehls O, Sharer K. on Genital Hypokalemia with Hypercalciuria in Preterm Infants: A hyperprostaglandinuric tubular syndrome different from Bartter syndrome. *J Pediatr* 1985;107: 694-701.
- 145.** Seyberth J, Sergen D, Morgan J, Sweetman B, Potts J Jr, Oates J. Prostaglandins as Mediators of Hypercalcemia Associated with Certain Types of Cancer. *N Engl J Med* 1975;293:1278-1283.
- 146.** Houser M, Zimmerman B, Davidman M, Smith C, Sinaiko A, Fish A. Idiopathic Hypercalciuria Associated with Hyperreninemia and high Urinary Prostaglandin E. *Kid Int* 1984; 26: 176-182.
- 147.** Velásquez-Forero F. Síndrome de Exceso de Prostaglandina E, en Conejos. *Nefrología* 2005;25(4): 428-433.
- 148.** Woo K, Emery J, Peabody J. Cortical Hyperostosis: A Complication of Prolonged Prostaglandin Infusion in Infants Awaiting Cardiac Transplantation. *Pediatrics* 1994;93:417-420.

- 149.**Li X, Jee W, Li Y, Buckendahl P. Transient Effects of Subcutaneous Lv Administered Prostaglandin E₂ on Cancellous and Cortical Bone in Young Adult Dogs. *Bone* 1990;11:353-364.
- 150.**Katz I, Jee W, Joffe I, Stein B, Takizawa M, Jacobs T, Setterberg R, Lin B, Tang L, Ke H. Prostaglandin E₂ Alleviates Cyclosporine A-Induced Bone Loss in the Rat. *J Bone Min Res* 1992;7:1191-1200.
- 151.**Engesaeter L, Sudmann B, Sudmann E. Fracture Healing in Rats Inhibited by Locally Administered Indomethacin. *Acta Orthop Scand* 1992;63:330-333.
- 152.**Tanaka Y, Wu A, Ikekaya N, Iseki K, Kawai M, Kobayashi Y. Inhibition of HT-29 Human Colon Cancer Growth Under the Capsule of Severe Combined Immuno-Deficient Mice by an Analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, DD-003. *Cancer Res* 1994;54: 5148-5153.
- 153.** Lillevang S, Rosenkvist J, Andersen C, Larsen S, Kemp E, Kristen T. Single and Combined Effects of the Vitamin D Analogue KH1060 and Cyclosporin a on Mercuric-Chloride-Induced Autoimmune Disease In The BN Rat. *Clin Exp Immunol* 1992;88: 301-306.
- 154.**Lemire J. The Role of Vitamin D In Immunosuppression. Lesson from Autoimmunity and Transplantation, in Feldman D, Pike JW, Glorieux FH (eds): *Vitamin D*. San Diego, CA Academic 1997;1167-1181.
- 155.**Jordan S, Shibuka R, Mullen Y. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ prolongs Skin Survival in Mice, in Norman A.W.Schaefer K, Grigoleit HG, Von Herrath D (eds): *Vitamin D: Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology*. Berlin, Germany de Gruyter 1988;346-347.

- 156.** Veyron P, Pamphile R, Binderup L, Touraine J. Two Novel Vitamin D Analogues. KH 1060 CB 966, Prolongs Skin Allograft Survival in Mice. *Transplant Immunol* 1993;1:72-76.
- 157.** Veyron P, Pamphile R, Binderup L, Touraine J. New 20-epi-vitamin D₃ Analogues: Immunosuppressive Effects on Skin Allograft Survival. *Transplant Proc* 1995; 27(1):450.
- 158.** Lemire J, Archer D, Khulkarni A, Uskokovic M, Stepkowiak S. Prolongation of the Survival of Murine Cardiac Allografts by the Vitamin D₃ Analogue 1,25-dihydroxy-delta-16-cholecalciferol. *Transplantation* 1992;54: 762-763.
- 159.** Jordan S, Nigata M, Mullen Y. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Prolongs Rat Cardiac Allograft Survival, in Norman A, Schaefer K, Grigolcit H, Von Herrath D (eds): *Vitamin D: Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology*. Berlin, Germany de Gruyter 1988;334-335.
- 160.** Johnsson C, Tufveson G. A Vitamin D Analogue with Immunosuppressive Effects on Heart and Small Bowel Grafts. *Transplant Int* 1994;7: 392-397.
- 161.** Lewin E, Olgard K. The In Vivo Effect of a New, *In Vitro*, Extremely Potent Vitamin D₃ Analogue KH1060 on the Suppression of Renal Allograft Rejection in the Rat. *Calcif Tissue Int* 1994;54: 150-154.
- 162.** Johnsson C, Binderup L, Tufveson G. The Effects of Combined Treatment with the Novel Vitamin D Analogue MC 1288 and Cyclosporine a on Cardiac Allograft Survival *Transplant Immunol* 1995;3:245-250.
- 163.** Llach F, Velásquez-Forero F. Secondary Hyperparathyroidism in Chronic Renal Failure: Pathogenic and Clinical Aspects. *Am J Kid Dis* 2001;38(5): S20-S33.

- 164.** Llach F, Keshav G, Goldblat M, Lindberg J, Sdler R, Delmez J, Arruda J, Lau A, Slatopolsky E. Suppression of Parathyroid Hormone Secretion in Hemodialysis Patients by a Novel Vitamin D Analogue: 19-Nor1,25-dihydroxyvitamin D₂. *Am J Kidney Dis* 1998;32(2):S48-S54.
- 165.** Tan A, Levine B, Mazess R, Kylo D, Bishop C, Knutson J, Kleinman K, Coburn J. Effective Suppression of Parathyroid by 1 alpha-hydroxy-vitamin D₂ Hemodialysis Patients with Moderate to Severe Secondary Hyperparathyroidism. *Kidney Int* 1997;51:317-323.
- 166.** Binderup L and Kragballe K. Origin of the use of Calcipotriol in Psoriasis Treatment. *Rev Contemp Pharmacother* 1992;3:401-409.
- 167.** Slatopolsky E, Finch J, Ritter C, Brown A. A New Analog of Calcitriol, 19-nor-1,25(OH)₂D₂, Suppresses Parathyroid Gland Hormone Secretion in Uremic Rats in the Absence of Hypercalcemia. *Am J Kidney Dis* 1995;26:852-860.
- 168.** Slatopolsky E, Finch J, Ritter C, Takahashi F. Effects of 19-nor-1,25(OH)₂D₃, A New Analogue of Calcitriol, on Secondary Hyperparathyroidism in Uremic Rats. *Am J Kidney Dis* 1998;32(2):S40-S47.
- 169.** Frazao S, Bower J, Kelley B, Rodriguez H, Norris K, Robertson J, Levine B, Goodman W, Gontlie D, Mazess R, Kylo D, Douglas L, Bishop C, Coburn J. Intermittent Doxercalciferol (1 alpha-hydroxyvitamin D₃) Therapy for Secondary Hyperparathyroidism. *Am J Kidney Dis* 2000;36:550-661.
- 170.** Maung H, Elangovan L, Frazao J, Bower J, Kelley B, Acchiardo S, Rodriguez H, Norris K, Sigala J, Rutkowski M, Robertson J, Goodman W, Levine B, Chesney R, Mazess R, Kylo D, Douglass L, Bishop C, Couburn J. Efficacy and Side Effects of Intermittent Intravenous and Oral Doxercalciferol (1alpha-

hydroxyvitamin D₂) in Dialysis Patients with Secondary Hyperparathyroidism.

A sequential comparison. Am J Kidney Dis 2001;37: 532-543.

- 171.** Brown A, Ritter C, Finch J. The Noncalcemic Analogue of Vitamin D, 22-Oxacalcitriol, Suppresses Parathyroid Hormone Synthesis and Secretion. J Clin Invest 1989;84:728-732.

9. AGRADECIMIENTOS

Mi profundo agradecimiento a la Universidad Autónoma Metropolitana y al Hospital Infantil de México Federico Gómez, por haberme brindado la oportunidad de avanzar en mis conocimientos sobre el metabolismo mineral óseo, mismos que me permitieron obtener mi grado de doctorado como parte de mi superación académica.

Así mismo a la Dra. Marisa Cabeza Salinas, como directora de tesis, al Dr. Rubén Román Ramos y al Dr. James T. Triffitt como asesores, y a los Drs. Cristina Revilla Monsalve y Alfonso Efraín Campos Sepúlveda como sinodales, por su apoyo en la revisión y orientación en el presente trabajo.

También agradezco a Sandra Olivas su constante ayuda secretarial para este proyecto.

10. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

1. Velásquez-Forero F. Síndrome de Exceso de Prostaglandina E, en Conejos. Nefrología 2005; 25(4): 83-89.
2. Velásquez-Forero F, García P, Triffitt J and Llach F. Prostaglandin E₁ Increases *In Vivo* and *In Vitro* Calcitriol Biosynthesis in Rabbits. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 2006; 75:107-115.
3. Velásquez-Forero F, Cabeza M y Román-Ramos R. Síndrome de Exceso de prostaglandina E, en niños. Boletín del Hospital Infantil de México Federico Gómez 2006; 63(mayo-junio): 208-220.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la Tesis que

Presentó:

FRANCISCO H. VELÁSQUEZ FORERO

El día 12 de diciembre del año 2006

Sinodales:

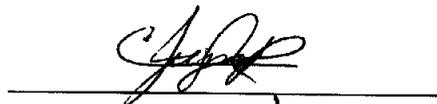
DRA. MARISA CABEZA SALINAS



DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS



DR. JAMES T. TRIFFITT



DRA. CRISTINA REVILLA MONSALVE



DR. ALFONSO EFRAÍN CAMPOS SEPÚLVEDA

