



Efecto diferencial de los análogos de la vitamina D en la proliferación de células de músculo liso vascular

A. Cardús², C. Gallego², S. Muray¹, M. P. Marco¹, E. Parisi², M. Aldea² y E. Fernández^{1,2}

¹Servicio de Nefrología. Hospital Universitari Arnau de Vilanova. ²Departamento de Medicina y Ciencias Médicas Básicas. Universitat de Lleida. Lleida.

RESUMEN

Existen datos experimentales contradictorios respecto al comportamiento de las células de músculo liso vascular (CMLV) expuestas al calcitriol. Determinar el efecto del calcitriol y de sus análogos a nivel vascular tiene una considerable trascendencia clínica ya que la proliferación de las CMLV está implicada en el mecanismo patogénico de la arteriosclerosis y de la resistencia tras angioplastia.

En este trabajo demostramos mediante incorporación de BrdU que el calcitriol estimula la proliferación en las CMLV. La proliferación es menor al añadir al medio de cultivo Paracalcitol o EB1089 a dosis equimolar. En concordancia con estos hechos, también observamos que el calcitriol induce la expresión del mRNA VDR mientras que no existe este efecto con ninguno de los análogos estudiados.

En conclusión, el calcitriol tiene un efecto directo estimulador de la proliferación de las CMLV que no se observa con el Paracalcitol y EB1089 a concentración equimolar.

Palabras clave: **Células músculo liso vascular. Proliferación. Calcitriol. Análogos.**

VASCULAR AND TISSUE CALCIFICATIONS IN HAEMODIALYSIS PATIENTS

SUMMARY

Atherosclerosis is the principal cause of myocardial infarction, stroke, and peripheral vascular disease, accounting for nearly half of all mortality in developed countries. The excessive growth of vascular smooth muscle cells is an important component in the development of atherosclerotic lesion. The direct effect of calcitriol and vitamin D analogs on the VSMCs proliferation is not clear.

In this study we have analysed if calcitriol, Paracalcitol (19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D₂) and EB1089 (experimental analog used as anticancerous) modify proliferation and the expression of vitamin D receptor (VDR) gene that is regulated at the transcriptional level by itself in the VSMCs.

Correspondencia: Elvira Fernández Giráldez
Servicio de Nefrología
Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida
Rovira Roure, 80
25198 Lleida
E-mail: efernandez@arnau.scs.es

VSMCs proliferation was analysed by BrdU incorporation and VDR gene expression using RT-PCR.

VSMCs proliferation was stimulated when calcitriol was added to the culture. VSMCs proliferation was significantly lower with analogs at the same dose. With regard to the functional study, the expression of VDR gene was upregulated by calcitriol at a concentration of 100 nM. There were no changes in this expression with the analogs. In conclusion, calcitriol, do not modify VSMCs proliferation. Therefore, Paracalcitol could have a minor proliferating effect on the wall of vessels that vitamin D.

Key words: Vascular smooth muscle cells. Proliferation. Calcitriol. Analogs.

INTRODUCCIÓN

Está demostrado que en la población de diálisis el riesgo de mortalidad CV es superior al de la población general debido a cambios patológicos de origen multifactorial en los vasos y en el corazón. Además, la arteriopatía urémica se caracteriza por un engrosamiento de la capa media e íntima de las arterias de todos los tamaños. Por otro lado, la enfermedad cardiovascular (CV) de origen arterioscleroso es una de las principales causas de mortalidad en los países desarrollados. La arteriosclerosis es un proceso complejo en cuya génesis se produce la proliferación y migración de las células de músculo liso vascular (CMLV) hacia la íntima¹.

Existen evidencias experimentales de que las células endoteliales y las CMLV expresan receptor de la vitamina D (VDR)² sugiriendo un papel de esta hormona a nivel vascular. Recientemente, Zehnder y cols.³ demostraron que la síntesis de calcitriol por las células endoteliales podría actuar a nivel local (acción paracrina/autocrina), modulando los efectos de las citoquinas inflamatorias en los vasos y promoviendo la adhesión leucocitaria.

Existen pocos estudios que analicen el efecto del calcitriol en la proliferación de la CMLV y además los resultados son controvertidos. Por ello, nos planteamos analizar el efecto del calcitriol sobre la proliferación de la CMLV. Por otro lado, en la actualidad se están utilizando análogos de la vitamina D menos hipercalcemiantes en el tratamiento de la osteodistrofia renal que tampoco han sido estudiados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

El cultivo primario de CMLV se obtiene a partir de explantes de arteria aorta de rata Sprague-Dawley descrito por Pickering y cols.⁴.

Las células obtenidas se identifican como CMLV según los siguientes criterios: 1) Las células crecen según el patrón característico de montaña y valle, y 2) Por inmunocitoquímica para el anticuerpo monoclonal anti- α -smooth muscle actin (Sigma). Para enriquecer la población de células en fase G0/G1, las células son mantenidas en DMEM suplementado con 0,2% FBS durante 2 días.

Síntesis de DNA

La proliferación celular se valoró a partir de la síntesis de DNA. Esta se cuantifica según los niveles de incorporación de 5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU Labeling and Detection Kit III, Roche). Las células son cultivadas en medio de cultivo de crecimiento (DMEM 10% FBS) durante 48 horas. Posteriormente son incubadas en DMEM 0,2% FBS durante 48 horas para sincronizar las células en estado quiescente (G₀) y estimuladas con FGF (Fibroblast Growth Factor). Para determinar el efecto del calcitriol y los análogos EB1089 y Paricalcitol en la proliferación celular, estos se añaden al mismo tiempo que la reestimulación con FGF a una concentración de 100 nM.

Análisis de RT-PCR

Para determinar la expresión del VDR usamos la técnica de RT-PCR, donde podemos cuantificar el mRNA del VDR de las células CMLV al ser tratadas con calcitriol o análogos.

Se extrae el RNA total de las células utilizando RNeasy Mini Kit (Qiagen). A partir de este RNA obtenido usamos 1st strand DNA synthesis Kit for RT-PCR (Roche) para la obtención del cDNA. Finalmente, diseñamos la PCR con los primers específicos para el gen del receptor de la vitamina D (VDR): oligonucleótido inicial : 5'CTTCCACTTCAATGCTATGAC3' y oligonucleótido final: 5'GTTGGAGCGTAACATGATCAC3'.

Paralelamente a la amplificación del gen de interés, usamos como referencia la amplificación del gen glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenasa (GAPDH) de rata (5). Las condiciones de la PCR son 94° C durante 15 segundos, 58° C durante 30 segundos, 72° C durante 1 minuto y un total de 35 ciclos.

RESULTADOS

Efecto del calcitriol y análogos en la proliferación de CMLV

El calcitriol a concentración de 100 nM aumenta el grado de incorporación de BrdU, es decir, estimula la proliferación en las CMLV en una proporción superior al doble del control. Los análogos EB1089 y Paricalcitol, a la misma concentración, no la modifican (fig. 1).

Expresión diferencial del receptor de la vitamina D₃ (VDR)

Como sabemos las principales acciones del calcitriol están mediadas por el receptor VDR modulando la transcripción de genes diana. Por ello, la diferencia en la inducción de la proliferación podría deberse a diferencias en la expresión del VDR.

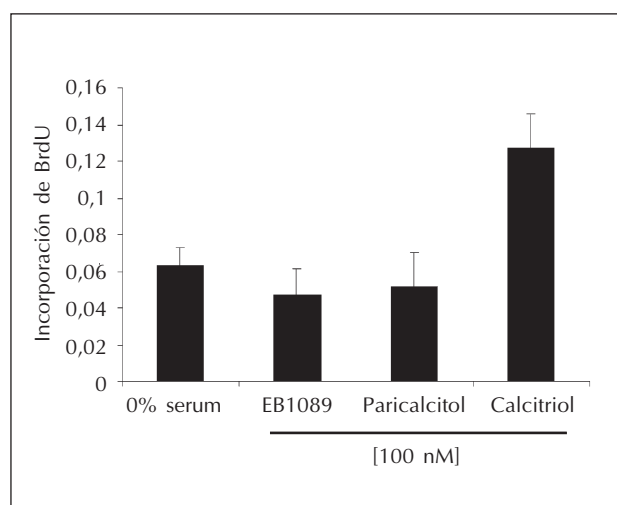


Fig. 1.—Efecto diferencial de los análogos del calcitriol en la proliferación de CMLV. Las células CMLV se mantienen en estado quiescente, luego son tratadas con 20 ng/ml de FGF y se añade calcitriol, EB1089 y Paricalcitol a la concentración 100 nM. La proliferación celular se valora según la incorporación de BrdU en el DNA.

Como muestra la figura 2, el mRNA del VDR aumenta al añadir al cultivo calcitriol a partir de las 12 h, en cambio no se modifica con ninguno de los análogos.

DISCUSIÓN

Los resultados del estudio muestran que el calcitriol, a diferencia de los análogos estudiados, induce la expresión del VDR y la proliferación de las CMLV.

Los estudios que analizan el efecto del calcitriol en la proliferación de las CMLV son escasos y con resultados controvertidos. Mientras que el primer estudio de MacCarthy y cols.⁶ muestra que el calcitriol suprime el crecimiento de CMLV, otros estudios, especialmente Mitsuhashi y cols.⁷ observan un efecto proliferador en CMLV quiescentes y no quiescentes. Además en células quiescentes observó que el calcitriol ejercía un efecto sinérgico con la mitogénesis inducida por trombina mientras que en las células no quiescentes se inhibía este efecto. Como resultado de todo ello, existe un concepto generalizado confuso del efecto del calcitriol sobre la proliferación de las CMLV.

Nuestros resultados muestran un claro efecto estimulador de la proliferación de las CMLV, que se refuerza al observarse que también induce la expresión del VDR.

Los análogos Paricalcitol y EB1089, por el contrario no estimulan la proliferación de las CMLV a similares concentraciones. Existen estudios que demuestran un efecto diferente de los análogos de la vitamina D en la proliferación de otras líneas celulares. Moe y cols.⁸, observan que el Paricalcitol ejerce mayor efecto en la incorporación de timidina comparado con el calcitriol, en linfocitos aislados de pacientes en diálisis y controles. Norman y cols.⁹ demuestran que la proliferación de queratinocitos puede estar inhibida en diferentes grados al aplicar calcitriol u otros análogos.

El efecto estimulador de la proliferación de las CMLV encontrado en este estudio se muestra en el rango de concentración de calcitriol similar a las que inducen respuesta biológica en otros tejidos y tipos celulares analizados *in vitro*^{7,10-13}. Esta concentración es aproximadamente 100 veces superior a la concentración plasmática necesaria para producir efecto, en humanos, sobre órganos diana clásicos (intestino y paratiroides). Estas diferencias pueden ser debidas a la unión de la hormona a las proteínas del medio de cultivo impidiendo la entrada a la célula, o bien a la inactivación de la vitamina D libre en el medio de cultivo. Por otro lado, en este estu-

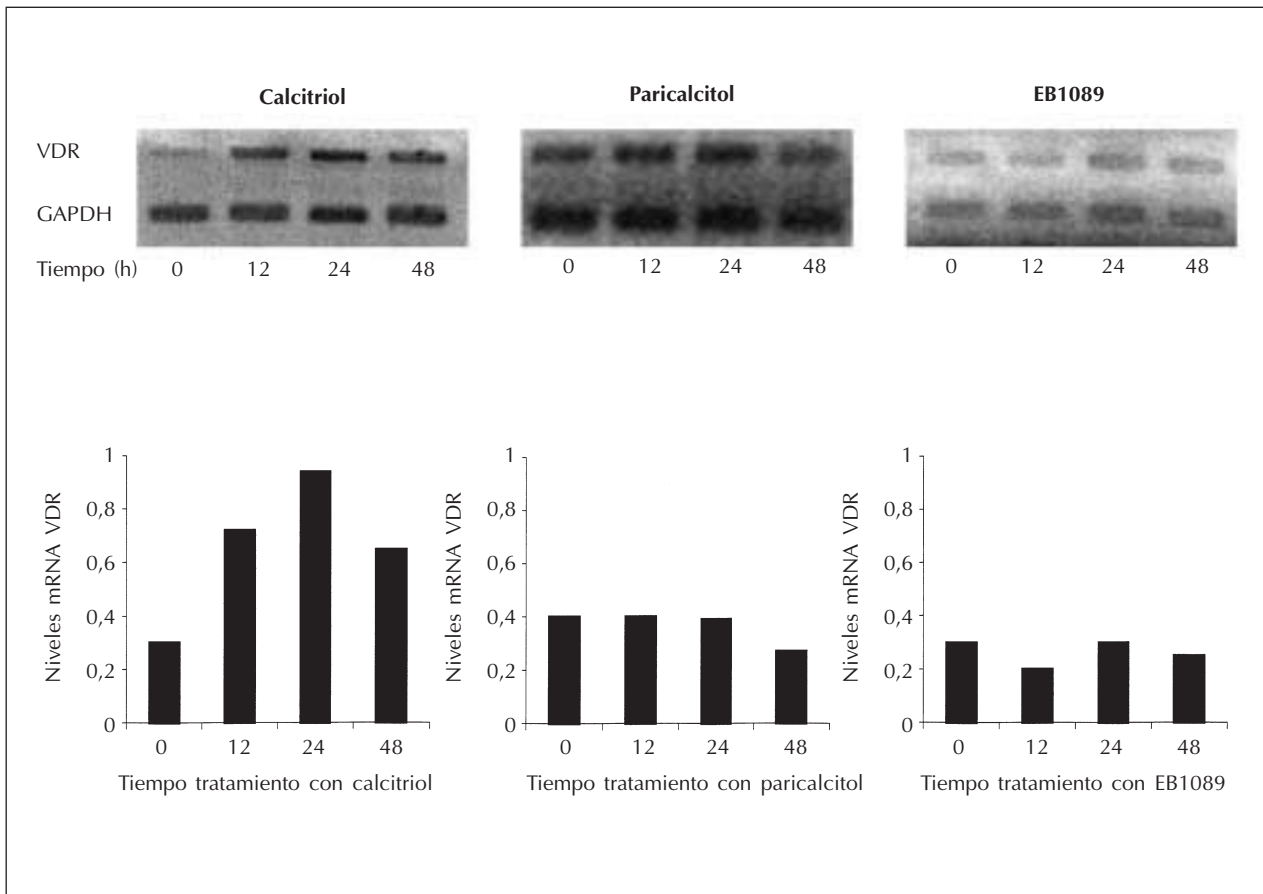


Fig. 2.—El calcitriol incrementa la expresión del gen del VDR, los análogos no la modifican. Las células CMLV son incubadas con 100 nM calcitriol o análogos. Mostramos la RT-PCR representativa de los productos amplificados y el gráfico de cuantificación normalizado según el gen GAPDH.

dio analizamos los efectos vasculares. Desconocemos cual es la concentración alcanzada localmente debida a la síntesis de calcitriol por las células endoteliales, que probablemente es la responsable de los efectos sobre las CMLV. Si como sugieren estas recientes evidencias existe un efecto paracrino del calcitriol sobre las CMLV, no podemos tomar como referencia las concentraciones plasmáticas. Mitsuhashi y cols.⁷ argumentan que quizá en las CMLV cultivadas *in vitro* exista menor número de VDR. Por último, la posibilidad de que a estas concentraciones el efecto observado sea debido a una reacción cruzada con otros receptores esteroideos es poco probable ya que se ha demostrado que la Dexametasona suprime la proliferación de las CMLV *in vitro*¹⁴.

En datos preliminares (no mostrados) hemos observado un efecto proliferador dosis-dependiente del calcitriol (en un rango de 10 a 100 nM) a diferen-

cia del Paricalcitol que no modifica la incorporación de Brdu a ninguna concentración analizada dentro del mismo rango.

Otro aspecto relevante de este estudio, es la demostración por primera vez en cultivos primarios de CMLV, del incremento inducido por el calcitriol en el mRNA del VDR. Recientemente, Rajasree y cols.¹⁵ han observado que aumenta la expresión del VDR en CMLV de conejos con hipervitaminosis D. Por el contrario, no observamos modificación de la expresión del VDR al añadir al cultivo Paricalcitol o EB1089. Este hecho puede ser un mecanismo que justifique, al menos en parte, las diferencias encontradas en el efecto proliferador. Desconocemos si existen diferencias en la expresión del VDR en la mucosa intestinal, donde se han encontrado también, diferencias en la absorción de calcio entre el calcitriol y el Paricalcitol. No se conoce con exactitud el mecanismo que explique estas diferencias.

Recientes estudios sugieren que los análogos de la vitamina D pueden inducir cambios en la conformación del VDR específicos del ligando que como consecuencia modificarían su vida media, la interacción con el receptor del ácido retinoico (RXR) y/o los coactivadores que intervienen en el complejo transcripcional¹⁶.

En conclusión, el calcitriol estimula la proliferación de las CMLV y la expresión del mRNA VDR en dichas células. En el futuro deberá demostrarse si este efecto también tiene lugar en animales de experimentación y humanos debido a su importante repercusión clínica, no sólo en la población de pacientes con IRC sino también en los pacientes con ateromatosis. También tiene especial trascendencia el hecho de que el Paricalcitol no muestre efecto proliferador sobre las CMLV ya que a su acción menos hipercalcemiante puede añadirse también un efecto beneficioso vascular.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la ayuda a la investigación de la Marató de TV3 (N.º de expediente 003310).

BIBLIOGRAFÍA

- Rivard A, Andrés V. Vascular smooth muscle cell proliferation in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular diseases. *Histol Histopathol* 15: 557-571, 2000.
- Merke J, Milde P, Lewicka S, Hugel U, Klaus G, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Rauterberg EW, Ritz E. Identification and regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor activity and biosynthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Clin Invest* 83: 1903-1915, 1989.
- Zehnder D, Bland R, Chana RS, Wheeler DC, Howie AJ, Williams MC, Stewart PM, Hewison M. Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by human endothelial cells in regulated by inflammatory cytokines: a novel autocrine determinant of vascular cell adhesion. *J Am Soc Nephrol* 13: 621-629, 2002.
- Pickering JG, Weir L, Rosenfield K, Stetz J, Jekanowski J, Isner JM. Smooth muscle cell outgrowth from human atherosclerotic plaque: implications for the assessment of lesion biology. *J Am Coll Cardiol* 20: 1430-1439, 1992.
- Takahashi N, Takeuchi K, Sugawara A, Taniyama Y, Kato T, Wilcox CS, Abe K, Ito S. Structure and transcriptional function of the 5'-flanking region of rat thromboxane receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 244: 489-493, 1998.
- Carthy EP, Yamashita W, Hsu A, Ooi BS. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and rat vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* 13: 954-959, 1989.
- Mitsuhashi T, Morris RC Jr, Ives HE. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ modulates growth of vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 87: 1889-1895, 1991.
- Moe SM, Zekonis M, Harezlak J, Ambrosius WT, Gassensmith CM, Murphy CL, Russell RR, Batiuk TD. A placebo-controlled trial to evaluate immunomodulatory effects of paricalcitol. *Am J Kidney Dis* 38: 792-802, 2001.
- Norman AW, Bouillon R, Farach-Carson MC, Bishop JE, Zhou LX, Nemere I, Zhao J, Muralidharan KR, Okamura WH. Demonstration that 1 beta,25(OH)2D₃ is an antagonist of nongenomic but not genomic biological responses and biological profile of the three A-ring diastereomers of 1 alpha,25(OH)2D₃. *J Biol Chem* 268: 20022-30, 1993.
- Canalejo A, Almadén Y, Torregrosa V, Gómez-Villamandos JC, Ramos B, Campistol JM, Felsenfeld AJ, Rodríguez M. The *in vitro* effect of calcitriol on parathyroid cell proliferation and apoptosis. *J Am Soc Nephrol* 11: 1865-1872, 2000.
- Finch JL, Dusso A, Pavlopoulos T, Slatopolsky E. Relative potencies of 1,25 (OH)2D₃ and 19-Nor-1,25 (OH)2D₂ on inducing differentiation and markers of bone formation in MG-63 cells. *J Am Soc Nephrol* 12: 1468-1474, 2001.
- Abe H, Iehara N, Utsunomiya K, Kita T, Doi T. A vitamin D analog regulates mesangial cell smooth muscle phenotypes in a transforming growth factor-B type II receptor-mediated manner. *J Biol Chem* 274: 20874-20878, 1999.
- Brown AJ, Ritter C, Slatopolsky E, Muralidharan KR, Okamura WH, Reddy GS. 1-alpha, 25 Dihydroxy-3-epi-vitamin D₃, a natural metabolite of 1 alpha, 25-Dihydroxyvitamin D₃, is a potent suppressor of parathyroid hormone secretion. *J Cell Biochem* 73: 106-113, 1999.
- Brown AJ. Therapeutic uses of vitamin D analogues. *Am J Kidney Dis* 2001 Nov; 38 (Supl. 5): S3-S19, 2001.
- Rajasree S, Umashankar PR, Lal AV, Sarma PS, Kartha CC. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptor is up-regulated in aortic smooth muscle cells during hypertensive atherosclerosis. *Life Sci* 70: 1777-1788, 2002.
- Reil TD, Sarkar R, Kashyap VS, Sarkar M, Gelabert HA. Dexamethasone suppresses vascular smooth muscle cell proliferation. *J Surg Res* 85: 109-114, 1999.