



Regulación del receptor sensor de calcio. Influencia del hiperparatiroidismo secundario

J. L. Fernández Martín, I. González Suárez y J. B. Cannata Andía

Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral. Instituto Reina Sofía de Investigación. Hospital Universitario Central de Asturias. Universidad de Oviedo. Oviedo.

RESUMEN

Las glándulas paratiroides tienen una gran sensibilidad a pequeños cambios en el calcio iónico extracelular.

El receptor sensor de calcio (CaR) es un receptor acoplado a proteínas G que es capaz de responder a incrementos en el calcio extracelular activando una serie de señales intracelulares (fosfolipasas C, A2 y D) y cuyo resultado final es la inhibición de la secreción de PTH. Además del calcio, existen otros agonistas y moduladores del CaR como el Mg, espermina, péptidos amilodes β , ciertos aminoácidos, especialmente los aminoácidos aromáticos y la fuerza iónica.

En la uremia la sensibilidad de las glándulas paratiroides al calcio está alterada, necesitando concentraciones más altas del mismo para suprimir la PTH. En el hiperparatiroidismo secundario la expresión del CaR se encuentra reducida. En glándulas hiperplásicas se ha observado una correlación negativa entre la proliferación celular y la expresión del CaR.

A pesar de ser un receptor de calcio, la expresión del CaR no parece estar regulada por el calcio y existe una cierta discrepancia sobre si el calcitriol es capaz de regular su expresión. Por otro lado, el fósforo provoca una hiperplasia de la glándula paratiroides incrementando la proliferación celular y un descenso en la expresión del CaR.

Palabras clave: *Receptor sensor de calcio. Calcio. Fósforo. Calcitriol.*

REGULATION OF THE CALCIUM-SENSING RECEPTOR. INFLUENCE OF SECONDARY HYPERPARATHYROIDISM

SUMMARY

The parathyroid glands have a great sensitivity to small changes in the extracellular ionic calcium.

The calcium-sensing receptor (CaR) is a G protein-coupled receptor that responds to extracellular ionic calcium changes activating several intracellular signalling systems (phospholipases C, A2 and D) finally inhibiting the PTH secretion. In addition to calcium, there are some other agonists and modulators such as the

Correspondencia: Dr. Jorge Cannata Andía
Servicio de Metabolismo Óseo y Mineral
Instituto Reina Sofía de Investigación
Hospital Universitario Central de Asturias
Julián Clavería, s/n.
33006 Oviedo
E-mail: metoseo@hca.es

Mg²⁺, spermine, amyloid β -peptides, a variety of aminoacids, especially aromatic aminoacids and ionic strength.

In the uraemia, the sensitivity of the parathyroid glands to calcium is altered and higher values of calcium are necessary to suppress the PTH. In the secondary hyperparathyroidism the CaR expression is reduced. It has been found a negative correlation between cellular proliferation and the expression of the CaR in hyperplastic glands.

Despite it is a calcium receptor, the expression of the CaR does not seem to be regulated by calcium and there is some controversy about the role of calcitriol regulating its expression. On the other hand, the phosphorous induces hyperplasia of the parathyroid gland increasing the cellular proliferation and a decrease of the CaR expression.

Key words: Calcium-sensing receptor. Calcium. Phosphorous. Calcitriol.

INTRODUCCIÓN

Las alteraciones del metabolismo fosfo-cálcico y de la vitamina D en la insuficiencia renal crónica juegan un papel clave en el desarrollo del hiperparatiroidismo secundario. El calcio, el fósforo y el calcitriol son los principales reguladores de la PTH, siendo el calcio iónico en el fluido extracelular el factor principal involucrado en la regulación de PTH¹. Pequeños descensos en la concentración de calcio extracelular conducen no solo a grandes incrementos de la secreción de PTH, sino también a incrementos de la expresión de PTH y a la proliferación de las células de las glándulas paratiroides². El calcio plasmático modula la PTH mediante cambios en la estabilidad del mRNA de la PTH y modifica la cantidad de secreción de hormona y el grado de degradación de la misma en la glándula paratiroides³. Existen evidencias de que, en la uremia, las glándulas paratiroides presentan una anormal regulación de la PTH por el calcio. Ello hace que las glándulas paratiroides presenten una insensibilidad a los aumentos de calcio⁴ y que unos niveles normales del mismo se vean acompañados de niveles anormalmente altos de PTH. En la insuficiencia renal crónica, los niveles de calcio necesarios para reducir los niveles de PTH a la mitad (set-point) son más altos que en situaciones de normalidad, indicando una clara alteración de los mecanismos sensores de calcio. La respuesta secretora de las glándulas paratiroides a la hipocalcemia se produce en un período de tiempo muy corto (1-3 minutos), sugiriendo que el calcio actuaría sobre la membrana plasmática. Todas estas evidencias hicieron sospechar sobre la existencia de un receptor sensor de calcio (o receptor sensible a calcio⁵) en la membrana de las células paratiroides capaz de regular la secreción de PTH en función de los niveles de calcio extracelular. La identificación de dicho receptor

ha permitido un avance importante en el conocimiento de los mecanismos de regulación de la PTH, convirtiéndose incluso en una diana farmacológica importante para el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario de la insuficiencia renal crónica⁶.

DESCRIPCIÓN DEL RECEPTOR SENSOR DE CALCIO

En 1993 se clonó y caracterizó el receptor de calcio (CaR)⁷ en glándulas paratiroides bovinas, demostrándose que el calcio iónico actúa como un primer mensajero extracelular. El CaR es una proteína de membrana activada por el calcio iónico extracelular. Además del calcio, también existen otra serie de agonistas y moduladores⁸ como el Mg, espermina, péptidos amilodes β , ciertos aminoácidos (especialmente los aromáticos⁹), y la fuerza iónica. Dos años más tarde se clonó también el receptor a partir de glándulas paratiroides humanas y de riñón de rata^{10,11}, mostrando una gran homología con el descrito anteriormente en glándulas paratiroides bovinas.

El CaR es un receptor transmembrana acoplado a proteínas G que se expresa en multitud de tejidos y sistemas como células paratiroides, riñón, tracto gastrointestinal, osteoblastos, cerebro y monocitos/macrófagos. Este receptor posee una gran región extracelular amino terminal que es capaz de responder a elevaciones de calcio extracelular activando una serie de cascadas intracelulares cuyo resultado final a nivel de la glándula paratiroides es la inhibición de la secreción de PTH⁸.

La secuencia de aminoácidos del CaR humano consta de una cadena polipeptídica de 1.078 residuos en la que se diferencian claramente tres regiones estructurales^{7,10,11}: (a) un extremo amino terminal largo, formado por 612 residuos, que constituye el dominio

extracelular de la proteína y que contiene una serie de residuos ácidos implicados en la unión del Ca; (b) un dominio de anclaje a la membrana formado por siete hélices transmembrana, característico de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, y (c) un extremo carboxilo terminal citoplasmático largo formado por 200 aminoácidos.

El gen humano del CaR contiene 7 exones¹². Seis de ellos codifican la región extracelular y regiones no traducidas, mientras que un solo exón codifica los dominios transmembrana y el extremo carboxilo terminal. Las regiones reguladoras del gen no han sido aún descritas.

SEÑALES INTRACELULARES REGULADAS POR EL CaR

Los mecanismos intracelulares a través de los cuales el CaR inhibe la secreción de PTH continúan siendo un tema importante sin resolver. Los agonistas del CaR activan las fosfolipasas C, A2 y D tanto en células renales de embrión humano (HEK293) transfectadas con el CaR, como en células paratiroides bovinas en cultivo¹³. El aumento del Ca extracelular provoca la activación de la fosfolipasa C (PLC) a través de la subunidad G_q del receptor. La PLC metaboliza al fosfatidil inositol 4,5 difosfato (PIP₂) liberando inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃). Esto produce un aumento del Ca citosólico a través de la movilización de los depósitos celulares así como de la activación de canales de Ca voltaje-dependientes y de otros canales no específicos. Por otro lado, la subunidad G_i del CaR inhibe la adenilato ciclasa (AC), y con ello disminuyen los niveles de AMP cíclico (AMPc)¹⁴. El aumento del calcio iónico extracelular también produce incrementos en la liberación de ácido araquidónico en células HEK293 transfectadas con el CaR pero no en las mismas células no transfectadas, indicando que el CaR está implicado en la activación de la fosfolipasa A2¹³. Del mismo modo, el calcio iónico extracelular también es capaz de incrementar la formación de fosfatidilbutanol, un marcador de activación de la fosfolipasa D, demostrando que el CaR está implicado en la activación de dicha señal intracelular¹³. Todo ello tiene como resultado en último término la inhibición de la liberación de PTH.

EL CaR EN EL HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO DE LA INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA

En el hiperparatiroidismo secundario de la insuficiencia renal crónica la expresión del CaR en las

glándulas paratiroides se encuentra reducida tanto en pacientes^{15,16} como en modelos de experimentación animal¹⁷, lo que podría explicar, al menos en parte, la baja sensibilidad de la glándula paratiroides a la acción del calcio. La menor expresión del receptor en las glándulas paratiroides es más pronunciada en las zonas nodulares características del hiperparatiroidismo secundario severo y autónomo¹⁸. Esta expresión reducida del CaR persiste después de la normalización de la secreción de PTH tras un trasplante en algunos casos¹⁹. Al igual que ocurre con el receptor de la vitamina D⁴, parece existir una relación inversa entre la expresión del CaR y la proliferación celular de la glándula²⁰, hecho que explicaría los bajos niveles de este receptor encontrados en el hiperparatiroidismo secundario en donde el tamaño glandular se ve aumentado como consecuencia de una mayor proliferación.

Se cree que el CaR es capaz de regular la proliferación, diferenciación y la apoptosis celular tanto en situaciones de normalidad como en condiciones patológicas⁸. El CaR probablemente ejerce una acción supresora sobre la proliferación de las células paratiroides. Así se ha observado que, ratones knock-out homocigotos para el receptor y pacientes homocigotos con mutaciones inactivantes del CaR, desarrollaban una marcada hiperplasia de las glándulas paratiroides^{8,21}. Este posible papel del CaR en la supresión de la proliferación celular podría contribuir a la hiperplasia glandular en la insuficiencia renal crónica como consecuencia del descenso de los niveles de expresión del mismo en el hiperparatiroidismo secundario.

EFFECTO DE LOS FACTORES REGULADORES DE LA PTH SOBRE EL CaR

Como ya ha sido mencionado anteriormente, la expresión del CaR se encuentra reducida en el hiperparatiroidismo secundario. Dado que los principales reguladores de la función paratiroidea son el Ca, el P y el calcitriol, es de esperar que exista relación entre éstos y la expresión del CaR. La expresión y traducción del CaR puede variar en multitud de circunstancias; sin embargo, los mecanismos implicados en estas alteraciones de la expresión del gen están todavía poco claros.

Aunque se trate de un receptor de Ca, su expresión en glándulas paratiroides y en riñón no parece depender de los niveles de Ca. En un estudio realizado en ratas suplementadas con cloruro de calcio intravenoso durante 7 días, con lo que se obtuvieron niveles plasmáticos de calcio iónico en un amplio rango (0,7-1,9), no se observó correlación con los ni-

veles de expresión del mRNA del CaR ni en glándulas paratiroides ni en el riñón²². Estos resultados parecen confirmarse en un estudio posterior con idéntico resultado, con la única diferencia que el calcio se administró a través de la dieta en lugar de por vía intravenosa²³. En otro estudio en el que no se evaluó la expresión del CaR ni en paratiroides ni en riñón, se ha observado un incremento en el CaR detectado por inmunohistoquímica en la tibia de ratas nefrectomizadas suplementadas con Ca en la dieta²⁴.

La regulación del CaR por el calcitriol es contradictoria. En ratas a las que se les infundió calcitriol durante 10-12 días no se observó ninguna correlación entre los niveles de calcitriol y los niveles de mRNA de CaR ni en las glándulas paratiroides ni en el riñón²². Sin embargo, en un estudio posterior realizado por otros autores, sí se observó una elevación de los niveles de mRNA del CaR 16 horas después de administrar calcitriol a ratas que previamente habían estado con una dieta estándar de vitamina D²³. En este último trabajo también se encontraron niveles superiores de mRNA de CaR en ratas deficientes en vitamina D que recibieron calcitriol 48 y 12 horas antes del sacrificio.

En la posible regulación del CaR por el fósforo también se han encontrado resultados contradictorios. Dos estudios experimentales iniciales demostraron que la expresión del CaR en glándulas paratiroides no varió con dieta alta²⁵ o baja²⁶ en fósforo. Por el contrario, trabajos más recientes han observado que una dieta alta en fósforo fue capaz de reducir la expresión del CaR²⁷ observándose una expresión disminuida del receptor en aquellas zonas donde se observa una proliferación aumentada, reproduciendo así lo que se observa en el hiperparatiroidismo secundario²⁰.

Como ya se ha comentado, el CaR podría tener una acción supresora de la proliferación celular⁸, en ese caso, el incremento de proliferación provocado por el fósforo podría ser posterior y consecuencia de los descensos de los niveles de CaR. No obstante, el incremento de proliferación también podría ser anterior al descenso del CaR, como lo indica un estudio reciente²⁸. Independientemente de esta relación entre CaR, proliferación e incremento de fósforo, este último parece estimular la vía fosfolipasa A2-ácido araquidónico (señal intracelular activada por el CaR) y dicha estimulación podría ser evitada por el incremento del calcio intracelular²⁹.

AGRADECIMIENTOS

El Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 01/0294) y la Sociedad Española de Nefrología han

subvencionado parcialmente este trabajo. Ignacio González Suárez ha sido becario del Instituto Reina Sofía de Investigación, del Plan Regional I+D+I del Principado de Asturias (FICYT). Actualmente es becario del Fondo de Investigaciones Sanitarias (Beca BEFI 2002).

BIBLIOGRAFÍA

1. Slatopolsky E: The role of calcium, phosphorus and vitamin D metabolism in the development of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant* 13 (Supl. 3): 3-8, 1998.
2. Locatelli F, Cannata-Andía JB, Drueke TB, Horl WH, Fouque D, Heimbürger O, Ritz E: Management of disturbances of calcium and phosphate metabolism in chronic renal insufficiency, with emphasis on the control of hyperphosphataemia. *Nephrol Dial Transplant* 17: 723-731, 2002.
3. Silver J: Molecular mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant* 15 (Supl. 5): 2-7, 2000.
4. Slatopolsky E, Brown A, Dusso A: Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* (Supl. 73): S14-19, 1999.
5. Jódar Gimeno E, Martínez Díaz-Guerra G, Azriel Mira S, Hawkins Carranza F: Receptor sensible a calcio y parathormona. *REEMO* 11: 64-66, 2002.
6. Sherrard DJ: Manipulating the calcium receptor. *J Am Soc Nephrol* 13: 1124-1125, 2002.
7. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC: Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366: 575-580, 1993.
8. Brown EM, MacLeod RJ: Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev* 81: 239-297, 2001.
9. Conigrave AD, Quinn SJ, Brown EM: L-amino acid sensing by the extracellular Ca2+-sensing receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4814-4819, 2000.
10. Riccardi D, Park J, Lee WS, Gamba G, Brown EM, Hebert SC: Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 131-135, 1995.
11. Garrett JE, Capuano IV, Hammerland LG, Hung BC, Brown EM, Hebert SC, Nemeth EF, Fuller F: Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs. *J Biol Chem* 270: 12919-12925, 1995.
12. Pearce SH, Trump D, Wooding C, Besser GM, Chew SL, Grant DB, Heath DA, Hughes IA, Paterson CR, Whyte MP y cols.: Calcium-sensing receptor mutations in familial benign hypercalcemia and neonatal hyperparathyroidism. *J Clin Invest* 96: 2683-2692, 1995.
13. Kifor O, Díaz R, Butters R, Brown EM: The Ca2+-sensing receptor (CaR) activates phospholipases C, A2, and D in bovine parathyroid and CaR-transfected, human embryonic kidney (HEK293) cells. *J Bone Miner Res* 12: 715-725, 1997.
14. Bai M, Trivedi S, Brown EM: Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. *J Biol Chem* 273: 23605-23610, 1998.
15. Kifor O, Moore FD, Jr, Wang P, Goldstein M, Vassilev P, Kifor I, Hebert SC, Brown EM: Reduced immunostaining for the extracellular Ca2+-sensing receptor in primary and uremic secondary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1598-1606, 1996.
16. Gogusev J, Duchambon P, Hory B, Giovannini M, Goureau Y, Sarfati E, Drueke TB: Depressed expression of calcium re-

- ceptor in parathyroid gland tissue of patients with hyperparathyroidism. *Kidney Int* 51: 328-336, 1997.
17. Mathias RS, Nguyen HT, Zhang MY, Portale AA: Reduced expression of the renal calcium-sensing receptor in rats with experimental chronic renal insufficiency. *J Am Soc Nephrol* 9: 2067-2074, 1998.
 18. Valimaki S, Farnebo F, Forsberg L, Larsson C, Farnebo LO: Heterogeneous expression of receptor mRNAs in parathyroid glands of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 60: 1666-1675, 2001.
 19. Lewin E, Garfia B, Recio FL, Rodríguez M, Olgaard K: Persistent downregulation of calcium-sensing receptor mRNA in rat parathyroids when severe secondary hyperparathyroidism is reversed by an isogenic kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 13: 2110-2116, 2002.
 20. Yano S, Sugimoto T, Tsukamoto T, Chihara K, Kobayashi A, Kitazawa S, Maeda S, Kitazawa R: Association of decreased calcium-sensing receptor expression with proliferation of parathyroid cells in secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 58: 1980-1986, 2000.
 21. Brown EM, Pollak M, Hebert SC: The extracellular calcium-sensing receptor: its role in health and disease. *Annu Rev Med* 49: 15-29, 1998.
 22. Rogers KV, Dunn CK, Conklin RL, Hadfield S, Petty BA, Brown EM, Hebert SC, Nemeth EF, Fox J: Calcium receptor messenger ribonucleic acid levels in the parathyroid glands and kidney of vitamin D-deficient rats are not regulated by plasma calcium or 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* 136: 499-504, 1995.
 23. Brown AJ, Zhong M, Finch J, Ritter C, McCracken R, Morrissey J, Slatopolsky E: Rat calcium-sensing receptor is regulated by vitamin D but not by calcium. *Am J Physiol* 270: F454-460, 1996.
 24. Kuizon BD, Salusky IB, Shoback D, Cambia E, Jueppner H, Goodman WG: Increased calcium-sensing receptor expression in calcium-supplemented rats with renal failure, in [vol 28(5)], *Bone*, 2001. p. s134.
 25. Hernandez A, Torres A, Concepcion MT, Salido E: Parathyroid gland calcium receptor gene expression is not regulated by increased dietary phosphorus in normal and renal failure rats. *Nephrol Dial Transplant* 11 (Supl. 3): 11-14, 1996.
 26. Caride AJ, Chini EN, Homma S, Dousa TP, Penniston JT: mRNAs coding for the calcium-sensing receptor along the rat nephron: effect of a low-phosphate diet. *Kidney Blood Press Res* 21: 305-309, 1998.
 27. Brown AJ, Ritter CS, Finch JL, Slatopolsky EA: Decreased calcium-sensing receptor expression in hyperplastic parathyroid glands of uremic rats: role of dietary phosphate. *Kidney Int* 55: 1284-1292, 1999.
 28. Ritter CS, Finch JL, Slatopolsky EA, Brown AJ: Parathyroid hyperplasia in uremic rats precedes down-regulation of the calcium receptor. *Kidney Int* 60: 1737-1744, 2001.
 29. Almadén Y, Canalejo A, Ballesteros E, Anón G, Canadillas S, Rodríguez M: Regulation of arachidonic acid production by intracellular calcium in parathyroid cells: effect of extracellular phosphate. *J Am Soc Nephrol* 13: 693-698, 2002.