



## COMUNICACIÓN BREVE

# Síndrome de exceso de prostaglandina E, en conejos

F. Velásquez-Forero

Laboratorio de Metabolismo Mineral Óseo del Hospital Infantil de México Federico Gómez y División de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana. México, D. F. México.

### INTRODUCCIÓN

En 1997 Welch TR, identificó el síndrome de hiperprostaglandina E en un niño, caracterizado por polihidramnios, prematuridad, alcalosis y nefrocalcinosis. Bioquímicamente se caracteriza por PTH normal, elevación del calcitriol sérico, hipercalcemia e hiperexcreción de  $PGE_2$  en orina<sup>1</sup>. En este niño la terapia con inhibidores de las prostaglandinas (indometacina) corrigió las alteraciones electrolíticas en un seguimiento mayor de 10 años<sup>1</sup>. El consideró esta entidad como una variante del Síndrome de Bartter, ya que aproximadamente una década antes había detectado esta alteración en los niños con este síndrome (hipocalemia, alcalosis, hiperremenia y normotensión)<sup>2</sup>. Otra observación clínica semejante en otro niño fue reportada por Houser y cols.<sup>3</sup> Interesante reporte previo de 6 pacientes con neoplasias en los que se observó elevación de la  $PGE_2$  con hipercalcemias que desaparecieron con inhibidores de las prostaglandinas<sup>4</sup>. En 20 niños con hipercalcemia idiopática y una  $PTH_i$  normal se observó una correlación positiva entre el incremento de  $1,25(OH)_2D_3$  y  $PGE_2$ , sugiriendo que la hipercalcemia podría deberse a un aumento en la síntesis del calcitriol por la prostaglandina<sup>5</sup>.

Los prostanoides (PGs) son derivados de los ácidos grasos de las membranas celulares. La ciclooxigenasa (COX) y sus sintetasas (COX-1 y COX-2)<sup>6</sup> forman un anillo ciclopentano y dos cadenas alifáticas.

Las PGs se clasifican en tres series, las de la serie 1; tienen un doble enlace en el carbono 13-trans y se sintetizan a partir del ácido homo- $\gamma$ -linoleico, siendo este el origen de la prostaglandina  $E_1$  ( $PGE_1$ )<sup>7</sup>. Hoy se acepta que la actividad de las PGs se efectúa a través de receptores celulares específicos identificados y clonados<sup>8-15</sup> que se han correlacionado con la bio-actividad de los sistemas mensajeros secundarios (AC, cAMP, PKC y PKA)<sup>16-20</sup>. El calcitriol ( $1,25(OH)_2D_3$ ) es una de las hormonas que regulan el metabolismo del calcio (Ca) y fósforo (P) del organismo y su síntesis se debe a la hidroxilación de la vitamina D ( $25(OH)D_3$ ) a través de la hidroxivitamina D-1 $\alpha$ -hidroxilasa renal ( $1\alpha$ -OHasa)<sup>21</sup>. La actividad de la  $1\alpha$ -OHasa aumenta durante períodos de mayores requerimientos esqueléticos del Ca y P, tales como crecimiento, embarazo o lactancia, y cuando el aporte dietario de dichos elementos es deficiente<sup>22</sup>. Similarmente, la deficiente ingestión de fosfatos estimula la actividad de la  $1\alpha$ -OHasa, pero a través de un mecanismo independiente de la PTH<sup>23</sup>.

En el síndrome de hiperprostaglandina E, la causa de la hipercalcemia en estos niños, no ha sido bien explicada, pero se ha teorizado que la  $PGE_2$  podría estimular la hidroxilación de la  $25(OH)D_3$  al estimular la  $1\alpha$ -OHasa renal, incrementando los niveles de la  $1,25(OH)_2D_3$  y que esta ocasiona una hiperabsorción de Ca a nivel intestinal, lo que explicaría la causa de la hipercalcemia<sup>2</sup>. Hay estudios experimentales que apoyan lo anterior, al demostrar en cultivo de células renales de pollo que la  $PGE_2$  estimulaba la actividad de la  $1\alpha$ -OHasa con lo que aumentaba significativamente la producción de  $1,25(OH)_2D_3$ <sup>24,25</sup>. En nuestro laboratorio hemos observado que en conejos  $PGE_1$  aplicada por vía intravenosa (VIV) o *in vitro* (cultivo de células renales de conejo), se incrementa la síntesis del calcitriol en forma significativa y similar a como lo hace la  $PGE_2$ <sup>26,27</sup>. Basándonos en esto se hipoteti-

**Correspondencia:** F. Velásquez-Forero  
Laboratorio de Metabolismo Mineral Óseo  
Hospital Infantil de México Federico Gómez  
Dr. Márquez No. 162 col. Doctores  
Deleg. Cuauhtémoc  
06720 México, D. F. (México)  
E-mail: fvelforero@hotmail.com

zó que la PGE<sub>1</sub> podría reproducir experimentalmente el síndrome de hiperprostaglandina E. Nuestro objetivo general fue el de estudiar en conejos si la administración de PGE<sub>1</sub> incrementaba la concentración sérica de calcitriol, ocasionando hiper calciuria.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Los conejos usados en este estudio se obtuvieron de las camadas de raza Nueva Zelanda criadas en el bioterio propio del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Se usaron 20 conejos machos de aproximadamente 3 meses de edad, con peso medio de 3 kg, que se colocaron en jaulas para adaptación durante 15 días previos al estudio, bajo una dieta balanceada de Ca, P y vit-D (Ca: 1,2%, P: 0,8% y vit-D<sub>3</sub>: 1 UI/g) y agua desionizada *ad libitum*. Después del período de adaptación y durante el experimento, fueron revisados por médico veterinario quien diagnosticó que se encontraban sanos y dentro de pesos normales. Los animales se dividieron al azar en dos grupos de 10 cada uno. El primer grupo se identificó como «A» o control, recibió VIV en la oreja una dosis de 1 ml/día de solución salina con 10 µl de etanol y los conejos del grupo «B» como experimental, recibieron VIV de la oreja, una dosis estable de 50 µg de PGE<sub>1</sub> diluida en 1 mL de solución salina-etanol, diariamente durante 18 días en ambos grupos. Las PGs son químicamente inestables, inactivándose principalmente en los pulmones en el 95%, cuando se utilizan dosis de 5 ng/ml y solamente el 8%, cuando se utilizan dosis de 5 µg/ml<sup>28</sup>. En base a la farmacocinética de este estudio, se utilizó la dosis de PGE<sub>1</sub> mencionada.

## MATERIALES

La PGE<sub>1</sub> se compró a SIGMA Quemichal, Co (St Louis MO, USA). Se utilizaron kits humanos para estudio de hormonas calciotrópas (parathormona molécula íntegra [PTH<sub>i</sub>], calcitonina, 25-hidrocalciferol (25(OH)D<sub>3</sub>) y calcitriol [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]), por el método de radioinmunoanálisis (RIA) marcados con I<sup>125</sup>, se compraron a DIASORIN INC (Stillwater, Mn, USA). El kit humano para fosfatasa alcalina total con su fracción ósea comprado en SPINREACT, S. A. (Sant Esteve de Bas [Gi], España). El kit humano para los N-telopéptidos se compró en Ostex International, INC Seattle, Washington USA. El resto de insumos, para este estudio, fueron comprados a distribuidores locales.

## ESTUDIO BIOQUÍMICO

El día 18 bajo anestesia con dietileter en ambos grupos de conejos; se tomaron muestras de sangre de la aorta y de orina por punción vesical para estudios de niveles de PTH<sub>i</sub>, calcitonina, 25(OH)D<sub>3</sub> y 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, que se estudiaron por metodología de RIA. También se midieron Ca y Mg séricos totales y Ca urinario, por espectrofotometría de absorción atómica de flama. El P sérico y urinario se estudio por determinación cuantitativa con espectrofotometría del complejo de fosfomolibdato. Fosfatasa alcalina total (AKPH) y su fracción termolábil ósea (AKPHO) se estudiaron por determinación cuantitativa con espectrofotometría U/V, empleando el método de Gutman, modificado. Los Nx-telopéptidos se estudiaron en orina con la técnica de ELISA.

## ASPECTOS ÉTICOS

Se consideró el bienestar de los animales siguiendo los principios éticos para la investigación, propuesta por el Comité Canadiense y del Hospital Infantil de México Federico Gómez<sup>29</sup>.

## MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Se hizo una exploración de datos y se realizó la prueba de Shapiro-Wilk, obteniéndose un valor de «p» no significativo, por lo que se concluyó que los datos obtenidos de cada grupo (control y experimental), y de cada una de las variables, siguen una distribución normal. Esto nos permitió realizar una comparación de medias con la prueba de *t* de Student para muestras independientes, aceptando como significativo cualquier valor de  $p < 0,05$ , utilizando el programa SPSS, versión 10.

## RESULTADOS

### Bioquímica de electrolitos séricos y urinarios en grupo control y experimental

Al compararse los niveles séricos de Ca, Mg y P del grupo control con el grupo experimental, estos se observaron elevados en el grupo experimental, pero solamente el Ca y Mg exhibieron un incremento significativo (fig. 1). Cuando se comparan en orina el Ca y el P del grupo control con el experi-

mental, se observó hiper calciuria e hiperfosfaturia en el grupo experimental pero solo la hiper calciuria fue significativa (fig. 2).

**Bioquímica de hormonas calciotrópas en los grupos control y experimental**

En el estudio por RIA, cuando se comparan los resultados de niveles hormonales del grupo control con el grupo experimental, los niveles séricos de 25(OH)D<sub>3</sub>, PTH<sub>i</sub> y calcitonina no exhibieron diferencias significa-

tivas (figs. 3 y 4). Sin embargo hubo un incremento altamente significativo en los niveles de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en el grupo de animales que recibió PGE<sub>1</sub>. (fig. 4).

**Marcadores bioquímicos de formación y resorción ósea**

Cuando se comparan entre sí, los resultados espectrofotométricos de ambos grupos, la AKPH y su fracción AKPHO, como marcadores de formación ósea y los Nx-telopéptidos como marcadores de re-

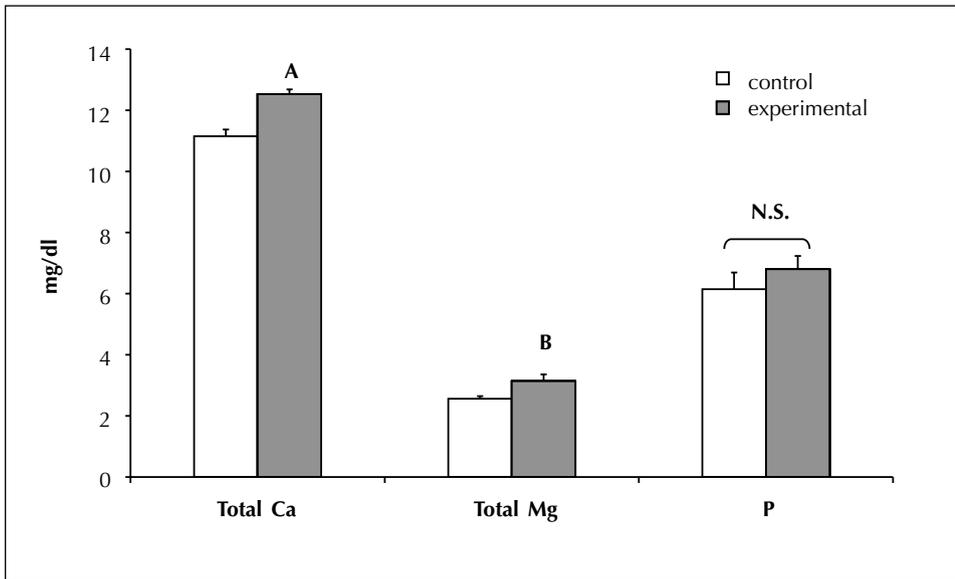


Fig. 1.—Niveles séricos de minerales en los conejos, después de 18 días de administrar solución salina con etanol por VIV al grupo control y PGE<sub>1</sub> al grupo experimental. Se muestran los niveles séricos de Ca, Mg y P encontrados. Los resultados están expresados en mg/dl (medias ± ES) para una n = 10 por grupo. <sup>A</sup> Diferencia significativa (p < 0,01) al comparar con el grupo control. <sup>B</sup> Diferencia significativa (p < 0,05) al comparar con el grupo control. <sup>N.S.</sup> No significativo.

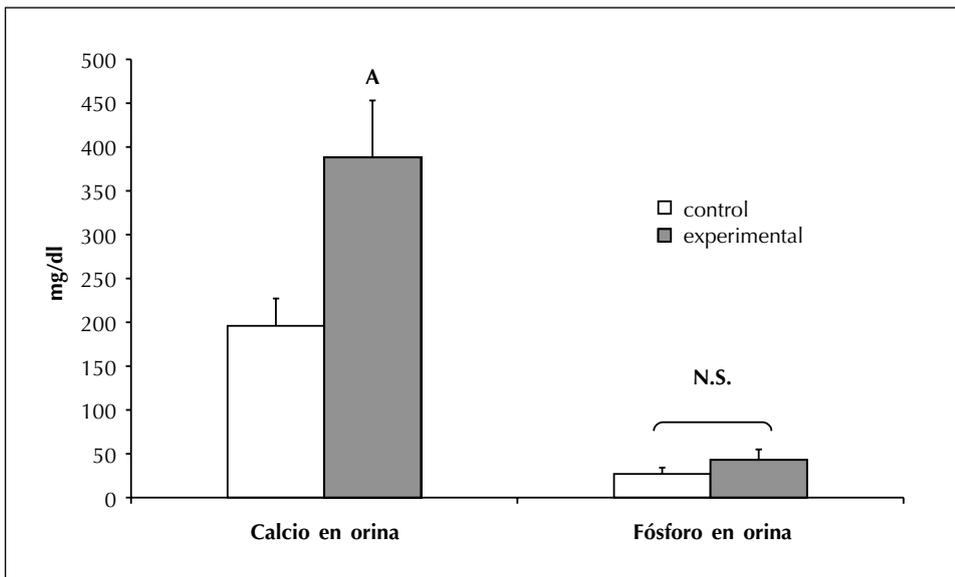


Fig. 2.—Calciuria y fosfaturia en los conejos, después de 18 días de administrar solución salina con etanol por VIV al grupo control y PGE<sub>1</sub> al grupo experimental. Se muestran los niveles en orina de Ca y P encontrados. Los resultados están expresados en mg/dl (medias ± ES) para una n = 10 por grupo. <sup>A</sup> Diferencia significativa (p < 0,05) al comparar con el grupo control. <sup>N.S.</sup> No significativo.

sorción ósea, no exhibieron diferencias significativas (no mostrados).

## DISCUSIÓN

Estamos acostumbrados a observar incremento sérico del calcitriol cuando hay hipocalcemia, hipofosfatemia, hiperparatiroidismo, intoxicación

exógena de vit-D y en terapia con furosemide. Recientemente se ha demostrado a nivel de macrófagos una actividad en la producción de la  $1\alpha$ -OHasa, confiriéndoles a estas células la propiedad de producir limitadas cantidades de calcitriol<sup>30</sup>. No parece que alguno de estos mecanismos pudiera explicar el incremento significativo del calcitriol observado en los animales del grupo B. Los resultados confirman la hipótesis del presente trabajo, al corroborar que la  $PGE_1$  exógena incrementa significativamente la síntesis del calcitriol ( $p < 0,001$ ), ocasionándoles hipercalcemia significativa ( $p < 0,05$ ) en conejos del grupo B (figs. 2 y 4), reproduciendo el síndrome de exceso de prostaglandina E. El incremento del calcitriol, observado en el grupo experimental produjo una hiperabsorción de Ca, Mg, y P a nivel intestinal, lo que se ve reflejado en el incremento sérico de estos tres elementos (fig. 1); acompañados de una hipercalcemia e hiperfosfatemia concomitantes de probable origen renal compensatorio (fig. 2). Llama la atención que a pesar del incremento del calcitriol y de la calcemia en el grupo «B», los niveles de  $PTH_i$ , no disminuyen. No encuentro explicación para este hallazgo, pero ahora los nuevos ensayos que identifican fragmentos de la PTH (1-84 y 7-84) con fusiones aparentemente antagónicas, podrían darnos luces sobre esta duda<sup>31,32</sup>. La interpretación de los hallazgos experimentales, se ven apoyados por algunas observaciones previas en cultivo de células tubulares renales de pollos o de conejos, en donde la  $PGE_2$  y la  $PGE_1$  estimulaba la actividad de la  $1\alpha$ -OHasa incrementando significativamente los niveles de calcitriol<sup>24-27</sup>. También por algunas observacio-

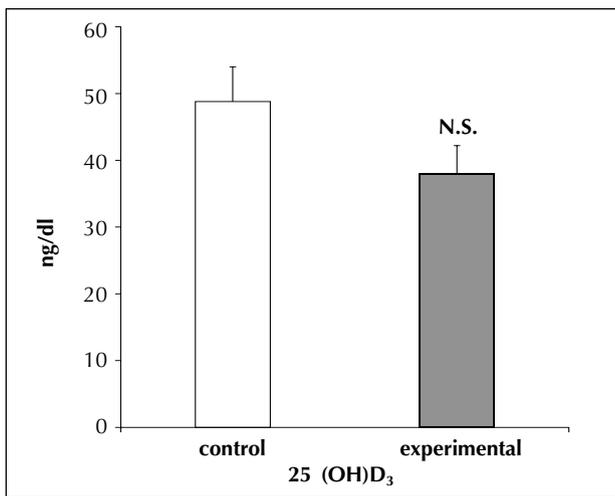


Fig. 3.—Vitamina D (25[OH]D<sub>3</sub>) en suero de conejos, después de 18 días de administrar solución salina con etanol por VIV al grupo control y  $PGE_1$  al grupo experimental. Se muestran los niveles séricos de la vitamina, encontrados. Los resultados están expresados en ng/ml (medias  $\pm$  ES) para una  $n = 10$  por grupo. <sup>N.S.</sup> No significativo. Al comparar con el grupo control.

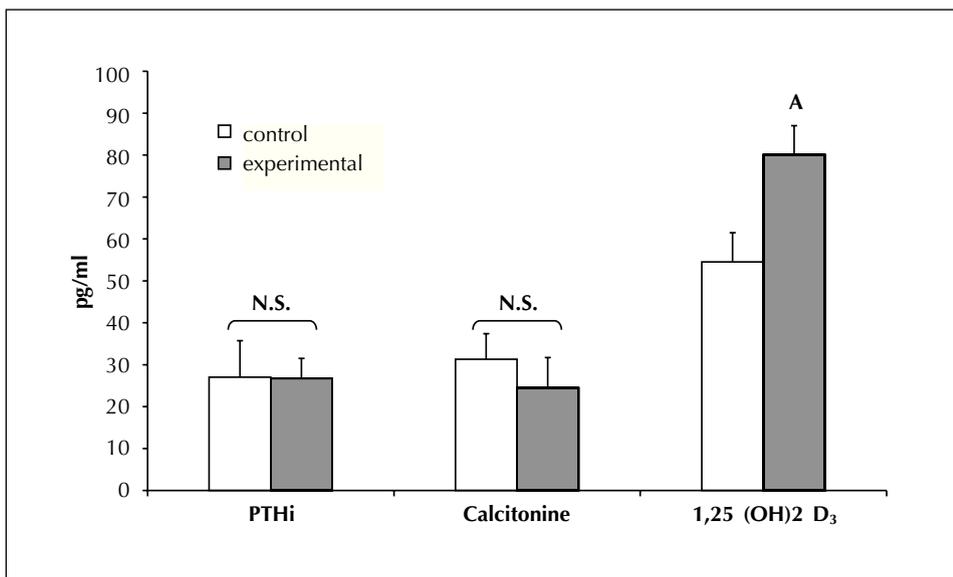


Fig. 4.—Hormonas calciotrópicas en suero de los conejos. Después de 18 días de administrar solución salina con etanol por VIV al grupo control y  $PGE_1$  al grupo experimental. Se muestran los niveles séricos de PTH<sub>i</sub>, calcitonina y calcitriol, encontrados. Los resultados están expresados en pg/ml (medias  $\pm$  ES) para una  $n=10$  por grupo. <sup>A</sup> Diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) al comparar con el grupo control. <sup>N.S.</sup> No significativo.

nes clínicas en niños con hipercalciurias (S. de Bartter con hipercalciuria y S. de hipercalciuria idiopática en niños) en las que se encontraron altas concentraciones de PGE<sub>2</sub>, calcitriol e hipercalciuria<sup>2-5</sup>; sugiriendo que las PGs estimulan la síntesis del calcitriol y este ocasionaba una hiperabsorción de Ca. Esta hipótesis se refuerza al observar clínicamente que al inhibir la PGE<sub>2</sub> con indometacina en estos niños, desapareció el exceso de prostaglandina, disminuyendo los niveles de calcitriol y la hipercalciuria<sup>1-4</sup>.

En la literatura médica, hay pocos reportes sobre el incremento de la síntesis del calcitriol por la PGE<sub>1</sub>, es posible que el incremento de la biosíntesis del calcitriol observado en los animales del grupo B, con niveles normales de PTH y de 25(OH)D<sub>3</sub>, se deba a un estímulo de la PGE<sub>1</sub> sobre la actividad de la 1 $\alpha$ -OHasa incrementando la hidroxilación de la 25(OH)D<sub>3</sub> y esta a su vez incrementando la síntesis del calcitriol<sup>24,25</sup>. Estos datos experimentales podría también extrapolarse en los niños que cursan con hipercalciurias idiopáticas a los que se les debe determinar si su hipercalciuria es de tipo hiperabsortivo intestinal (hipercalciuria después de carga de Ca oral) y quizá ampliar los estudios investigando los niveles de PGs y calcitriol y establecer criterios diagnósticos del síndrome de exceso de prostaglandina E y quizá, encontrar la causa de algunas hipercalciurias llamadas idopáticas<sup>5</sup>. En conclusión, en este modelo experimental se demuestra que la infusión de PGE<sub>1</sub> en conejos, produce un incremento sérico del calcitriol, de la calcemia y de la calciuria, contribuyendo al conocimiento de que la prostaglandina E<sub>1</sub>, estimula significativamente la síntesis del calcitriol y como un hallazgo adicional al conocimiento fisiopatológico del síndrome de exceso de prostaglandinas E, en niños.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Welch TR: The hyperprostaglandin E syndrome: a hypercalciuric variant of Bartter's syndrome. *J Bone Miner Res* 12 (10): 1753, 1997.
2. Restrepo de R, Welch TR, Hug G, Clark KE, Bergstrom W: Hypercalciuria with Bartter syndrome: evidence for an abnormality of vitamin D metabolism. *Jour Pediatr* 115: (3): 397-404, 1989.
3. Houser M, Zimmerman B, Davidman M, Smith C, Sinaiko A, Fish A: Idiopathic hypercalciuria associated with hyperreninemia and high urinary prostaglandin E. *Kidney Int* 26: 176-82, 1984.
4. Seyberth HW, Serge GV, Morgan JL, Sweetman BJ, Potts JT Jr, Oates JA: Prostaglandins as mediators of hypercalcemia associated with certain types of cancer. *N Engl J Med* 293: 1278-83, 1975.
5. Hasanoglu A, Ercan ZS, Buyan N, Memioglu N, Hasanoglu E: Parathormone, 1,25 dihydroxyvitamin D and prostaglandin E<sub>2</sub> correlation in children with idiopathic hypercalciuria. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 56: 235-237, 1997.
6. Kraemer SA, Meade EA, De Witt DL: Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch Biochem Biophys* 293: 391-400, 1992.
7. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi: Prostanoid receptors: structures, properties and functions. *Physiological Reviews* 79: 1193-1226, 1999.
8. Coleman RA, Kennedy I, Humphrey PPA, Bunce K, Lumpley P: Prostanoids and their receptors. En: Emmett JC (ed.) *Comprehensive Medicinal Chemistry. Membranes and Receptors*, vol. 3. Pergamon Press, Oxford, UK 643-714, 1990.
9. Coleman RA, Grix SP, Head SA, Louttit JB, Mallett A, Sheldrick: A Novel inhibitory receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins* 47: 151-168, 1994.
10. Hirata M, Hayashi Y, Ushikubi F, Yokota Y, Kageyama R, Nakanishi S, Narumiya S: Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A<sub>2</sub> receptor. *Nature* 349: 617-620, 1991.
11. Funk CD, Furci L, Fitzgerald GA, Grygorczyk R, Rochette C, Bayne MA, Bramovits MA, Adam M, Metters KM: Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP<sub>1</sub> subtype. *J Biol Chem* 268: 26767-26772, 1993.
12. Katsuyama M, Nishigaki N, Sugimoto Y, Morimoto K, Negishi M, Narumiya S, Ichikawa A: The mouse prostaglandin E receptor EP<sub>2</sub> subtype: cloning, expression, and Northern blot analysis. *FEBS Letters* 372: 151-156, 1995.
13. Regan JW, Bailey TJ, Donello JE, Pierce KL, Peppel DJ, Zhang D, Kedzie KM, Fairbairn CE, Bogardus AM, Woodward DF, Gil DW: Molecular cloning and expression of human EP<sub>3</sub> receptors: evidence of three variants with differing carboxyl termini. *Brit J Pharmacol* 112: 377-385, 1994.
14. Foord SM, Marks B, Stolz M, Bufflier E, Fraser NJ, Lee MG: The structure of the prostaglandin EP<sub>4</sub> receptor gene and related pseudogenes. *Genomics* 35: 182-188, 1996.
15. Shanir D, Keila S, Weinreb M: A selective EP<sub>4</sub> receptor antagonist abrogates the stimulation of osteoblast recruitment from bone marrow stromal cells by prostaglandin E<sub>2</sub> *in vivo* and *in vitro*. *Bone* 34: 157-162, 2004.
16. Bastien L, Sawyer N, Grygorczyk R, Metters KM, Adam M: Cloning functional expression and characterization of the human prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP<sub>2</sub> subtype. *J Biol Chem* 269: 11873-11877, 1994.
17. Rich TC, Fagan KA, Tse TE, Schaack J, Cooper DMF, Karpen JW: A uniform extra cellular stimulus triggers distinct camp signals in different compartments of a simple cell. *PNAS, USA* 98: 13049-13054, 2001.
18. Tomita M, Li X, Okada Y, Woodiel FN, Young RN, Pilbeam CC, Raisz LG: Effects of selective prostaglandin EP<sub>4</sub> receptor antagonist on osteoclast formation and bone resorption *in vitro*. *Bone* 30: 159-163, 2002.
19. Sakuma Y, Li Z, Pilbeam CC, Alander CB, Chikazu D, Kawaguchi H, Raisz LG: Bone stimulation of camp production and cyclooxygenase-2 by prostaglandin E<sub>2</sub> and selective prostaglandin receptor agonists in murine osteoblastic cells. *Bone* 34: 827-834, 2004.
20. Raisz LG, Martin TJ: Prostaglandins in the bone and mineral metabolism. En: «Bone and Mineral Research, annual 2», Excerpta Medica, Amsterdam 286-310, 1983.
21. Portale AA, Miller WL: Human 25-hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -hydroxylase: cloning, mutations and gene expression. *Pediatr Nephrol* 14: 620-625, 2000.

22. Heaney RP, Recker RR, Saville PD: Calcium balance and calcium requirements in middle-aged women. *Am J Clin Nutr* 30: 1603-1611, 1977.
23. Halloran BP, Spencer EM: Dietary phosphorus and 1,25 dihydroxyvitamin D metabolism: influence of insulin-like growth factor I. *Endocrinol* 123: 1225-1229, 1988.
24. Trechsel U, Taylor CM, Bonjour JP, Fleisch H: Influence of prostaglandins and of cyclic nucleotides on the metabolism of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in primary chick kidney cell culture. *Biochem Biophys Res Comm* 9: 1210-1216, 1980.
25. Wark JD, Larkins RG, Eisman JA, Wilson KR: Regulation of 25-hydroxy-vitamin D-1 $\alpha$ -hydroxylase in chick isolated renal tubules: effects of prostaglandin E<sub>2</sub>, furosemide and acetylsalicylic acid. *Clin Sci* 61: 53-59, 1981.
26. Velásquez-Forero F, Valencia P, De León G, Llach F: Prostaglandin E<sub>1</sub> increases the biosynthesis of calcitriol in rabbits. *Journal of the The American Society of Nephrology abstracts*; vol. 15; pp. 737A; SU-PO949, 2004.
27. Velásquez-Forero F, Valencia P, De León G and Llach F: Prostaglandin E<sub>1</sub> increases *in vitro* synthesis of calcitriol in renal tubular cell cultures in the rabbits. *Journal of the The American Society of Nephrology, abstracts* vol. 15; pp 737A; SU-PO948, 2004.
28. Golub M, Zia P, Matsuno M, Horton R. Metabolism of prostaglandins A<sub>1</sub> and E<sub>1</sub> in man. *J Clin Invest* 56: 1404, 1975.
29. Aluja S de A, Cortés AA, Pinzón EE, Lomelí FC, Frenk S: La experimentación científica en animales. *Gac de Méx* 123: 247-259, 1987.
30. Insogna KL, Dreyer BE, Mitnick M, Ellison AF, Broadus AE: Enhanced production rate of 1,25-dihydroxyvitamin D in sarcoidosis. *J Clin Endocrinol Metab* 66: 72-75, 1988.
31. Slatopolsky E, Finch J, Clay P, Martin D, Sicard G, Singer G, Gao P, Cantor T, Dusso A: A novel mechanism for skeletal resistance in uremia. *Kid Int* vol 58; pp. 753-761, 2000.
32. Friedman P: PTH revisited. *Kid Int* vol. 66 (Supl. 91): pp. S13-S19, 2004.