

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



* 5 3 0 9 5 4 9 7 3 4 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**PAPEL DEL RIÑÓN
Y DE LA PROTEÍNA RELACIONADA
CON LA PARATHORMONA
EN LA HIPERCALCEMIA ASOCIADA
AL TUMOR WALKER 256 EN LA RATA**

TESIS DOCTORAL

[Handwritten signature]
FERNANDO DE MIGUEL PEDRERO

DIRECTOR: PEDRO ESBRIT ARGÜELLES

JUNIO 1994

*A todos los que me han enseñado
y de los que he aprendido*

*En Ciencia no hay que desalentarse
(Severo Ochoa)*



Fundación Jiménez Díaz

CLINICA DE NUESTRA SEÑORA DE LA CONCEPCION

Avda. de los Reyes Católicos, 2 (Ciudad Universitaria)
28040 - MADRID

TELEFONOS:
544 16 00 - 544 01 00
549 10 07 - 549 11 00

D. PEDRO ESBRIT ARGÜELLES, Doctor en Ciencias Químicas y Jefe Asociado del Laboratorio de la Unidad Metabólica de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid

CERTIFICO: Que D. FERNANDO DE MIGUEL PEDRERO, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección los experimentos necesarios para la realización de su Tesis Doctoral, que lleva por título "Papel del riñón y de la proteína relacionada con la parathormona en la hipercalcemia asociada al tumor Walker 256 en la rata", y considero que reúne las condiciones para su presentación ante el tribunal correspondiente con el fin de acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, a 13 de junio de 1994

Fdo.: Dr. D. Pedro Esbrit Argüelles

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de la Unidad Metabólica de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid, bajo la dirección del Dr. Pedro Esbrit Argüelles, a quien agradezco sinceramente su apoyo y estímulo constante durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Agradezco también al Dr. Aurelio Rapado, Director de la Unidad Metabólica, el haberme permitido formar parte del grupo de investigación del laboratorio.

Al Dr. Andrew F. Stewart, y a todos sus colaboradores, por su generosidad al aceptarme como uno más en su laboratorio del Departamento de Endocrinología del Veterans Administration Medical Center/Yale University (West Haven, CT, EEUU).

Al Dr. Sergio Serrano, del Hospital Nuestra Señora del Mar de Barcelona, por la colaboración en los análisis histológicos.

A la Dra. Jorgina Satrústegui, del Centro de Biología Molecular-UAM, y al Dr. Rafael García Cañero, de la Clínica Puerta de Hierro de Madrid, por su asesoramiento en algunos aspectos metodológicos de los trabajos aquí recopilados.

A la Dra. M^a Pilar Castellón, por su eficaz labor como tutora.

Finalmente, y no por ello se lo agradezco con menor intensidad, a todos mis compañeros del laboratorio, por la ayuda prestada en todo momento y por el tiempo compartido, que han hecho que el trabajo no sea considerado como tal.

Estos trabajos han sido financiados en parte por el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (Ayudas 88/749 y 90/226), y por una beca del Plan Nacional de Formación del Personal Investigador.

ABREVIATURAS

ACSA	Actividad estimuladora de la adenilato ciclasa
AMPc	AMP cíclico
BBM	Membrana luminal ("brush border")
BLM	Membrana basolateral
BSA	Albúmina sérica bovina
Bt ₂ AMPc	N ⁶ ,2'-O-dibutiril AMP cíclico
C-	Carboxi-
CaBP	Proteína ligadora de calcio
Cr	Creatinina
CT	Calcitonina
GPP	5'-guanililimidodifosfato
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HTH	Hipercalcemia tumoral de origen humoral
IL-1	Interleucina-1
N-	Amino-
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PGE ₂	Prostaglandina de tipo E ₂
PTH	Parathormona, hormona paratiroidea
PTHrP	Proteína relacionada con la parathormona
RIA	Radioinmunoensayo
TFA	Acido trifluoroacético
TGF	Factor transformante del crecimiento
TNF	Factor de necrosis tumoral
W256	Carcinosarcoma de Walker 256
1,25-(OH) ₂ -D	1,25-dihidroxicolecalciferol

INDICE

1.	Introducción	1
1.1	Homeostasis del calcio	2
1.1.1	Introducción	2
1.1.2	Componentes del mecanismo de la homeostasis del calcio	4
1.1.2.1	Intestino	4
1.1.2.2	Hueso	5
1.1.2.3	Riñón	6
1.1.2.3.1	Filtración glomerular	6
1.1.2.3.2	Transporte tubular	7
1.1.3	Mecanismos celulares de transporte de calcio	9
1.1.4	Regulación de la homeostasis del calcio	13
1.1.4.1	Parathormona	14
1.1.4.2	Vitamina D	16
1.1.4.3	Calcitonina	17
1.1.4.4	Otros factores reguladores de la homeostasis del calcio	17
1.2	Hipercalcemia	18
1.2.1	Fisiopatología	19
1.2.1.1	Hipercalcemia por osteolisis local	19
1.2.1.2	<i>Hipercalcemia tumoral de origen humoral</i>	20
1.2.2	Factores implicados en la fisiopatología de la hipercalcemia tumoral de origen humoral	21
1.2.2.1	Proteína relacionada con la parathormona	21
1.2.2.2	Factor transformante del crecimiento tipo α	25
1.2.2.3	Factor de necrosis tumoral	26
1.2.2.4	Interleucina-1	26
1.2.2.5	Otros factores	27
1.2.3	Modelos animales de hipercalcemia tumoral de origen humoral	28
1.2.3.1	Fibrosarcoma HSDM de ratón	28
1.2.3.2	Carcinosarcoma VX-2 de conejo	28

1.2.3.3	Tumor de células de Leydig de rata . . .	29
1.2.3.4	Carcinosarcoma de Walker 256 de rata . .	29
1.2.3.5	Otros modelos animales de hipercalcemia tumoral de origen humoral	29
2.	Objetivos	31
3.	Materiales y Métodos	33
3.1	Trasplante del tumor	34
3.2	Estudios de balance metabólico	34
3.3	Análisis de parámetros bioquímicos	34
3.4	Análisis histológico	35
3.5	Aislamiento de la PTHRP del tumor de Walker 256	35
3.5.1	Extracto urea-HCl	35
3.5.2	Extracto NaCl-etanol	36
3.5.3	Purificación de los extractos NaCl-etanol	36
3.5.4	Electroforesis y análisis por transferencia western	38
3.5.5	HPLC de exclusión molecular	39
3.6	Ensayo de estimulación de la adenilato ciclasa renal	39
3.6.1	Obtención de membranas corticales de riñón de perro	39
3.6.2	Ensayo de la adenilato ciclasa	40
3.7	Obtención de membranas de corteza renal de rata	41
3.7.1	Membranas lumbales	41
3.7.2	Membranas basolaterales	42
3.8	Caracterización de las preparaciones de membrana luminal y basolateral de corteza renal de rata	43
3.8.1	Marcadores enzimáticos	43
3.8.2	Orientación de las vesículas de membrana basolateral	43
3.8.3	Volumen de las vesículas de membrana basolateral	45
3.8.4	Microscopía electrónica	46
3.9	Transporte de calcio en membranas corticales de riñón de rata	46
3.9.1	Transporte de calcio en la membrana luminal	46
3.9.2	Transporte de calcio en la membrana basolateral	47

3.10	Preparación de túbulos de corteza renal de rata	47
3.11	Valoración de proteínas	48
3.12	Estadística	48
4.	Resultados	50
4.1	Características del síndrome de hipercalcemia tumoral de origen humoral en la rata portadora del tumor W256	51
4.2	Estudio del papel del riñón en la génesis de la hipercalcemia en ratas portadoras del tumor W256	56
4.3	Purificación de la PTHRP de extractos del tumor W256	60
4.4	Estudio del mecanismo del aumento de la reabsorción renal de calcio en ratas portadoras del tumor W256	65
4.4.1	Caracterización de las preparaciones de BBM y de BLM	65
4.4.2	Transporte de calcio en las BBM	70
4.4.3	Transporte de calcio en las BLM	71
4.5	Efecto de la PTHRP(1-34) y del Bt_2 AMPc sobre el transporte de calcio en el riñón de rata	75
5.	Discusión	77
6.	Conclusiones	86
7.	Bibliografía	88
8.	Anexo	106

1. INTRODUCCION

1.1 Homeostasis del calcio

1.1.1 Introducción

El calcio es no sólo el catión más abundante del organismo sino también el principal mensajero citosólico iónico para una gran variedad de procesos bioquímicos y fisiológicos. Un hombre de unos 70 kg de peso contiene aproximadamente 1 kg de calcio, del que casi el 99% se encuentra en el esqueleto. Sólo el 0.1% se encuentra en el espacio extracelular, y cerca de un tercio de éste lo está en el plasma. La concentración normal de calcio plasmático oscila de 8.8 a 10.4 mg/dl (2.2-2.6 mmol/l), y existe en tres formas químicas diferentes: aproximadamente el 45% está en forma ionizada (Ca^{2+}), la única biológicamente activa; el 15% acompañado con aniones como el citrato o el fosfato; y el 40% unido reversiblemente a proteínas plasmáticas, principalmente albúmina.

En condiciones normales, la ingesta diaria de calcio en la dieta oscila de 800 a 1000 mg, y sólo el 30-35% es absorbido a lo largo del intestino. Como además hay secreción intestinal, la captación neta de calcio en el tracto intestinal es aproximadamente 150 mg/día.

El hueso de los adultos está en un continuo proceso de formación y destrucción conocido como remodelado, que normalmente se encuentra en equilibrio —se forma tanto hueso como se destruye—. Por lo tanto, un adulto sano debe excretar cada día aproximadamente 150 mg de calcio por la orina para equilibrar la entrada de calcio por el intestino (figura 1).

El calcio forma sales con el fosfato y el oxalato que son muy poco solubles. Para prevenir la mineralización de los tejidos blandos, y por otra parte, la desmineralización del hueso, la concentración de calcio tiene que estar regulada de manera precisa. Bajo condiciones normales, la homeostasis

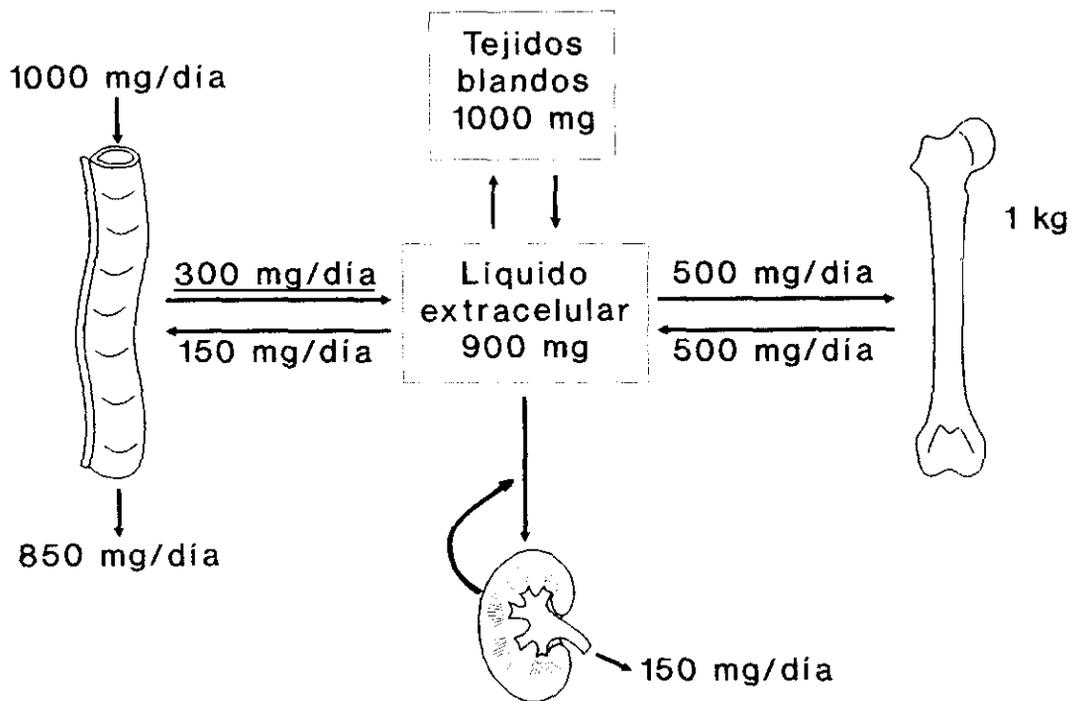


Figura 1: Balance de calcio en un adulto normal. Las cifras se refieren a la cantidad de calcio que se intercambia entre el líquido extracelular y el intestino, hueso y riñón.

cálcica se realiza por la acción coordinada de la parathormona (PTH), la calcitonina (CT) y el metabolito activo de la vitamina D, el 1,25-dihidroxicolecalciferol ($1,25-(OH)_2-D$), sobre el intestino, el hueso y el riñón [1-5].

1.1.2 Componentes del mecanismo de la homeostasis del calcio

1.1.2.1 Intestino

Como ya se ha mencionado, la absorción neta de calcio desde el intestino al fluido extracelular en el individuo adulto es aproximadamente 150-200 mg/día, aunque varía considerablemente incluso en sujetos normales, dependiendo principalmente de la cantidad de calcio de la dieta y de los niveles circulantes de $1,25-(OH)_2-D$ [6].

El transporte de calcio es más eficaz en la primera porción del intestino delgado, especialmente en el duodeno. Sin embargo, la mayoría del calcio es absorbido en las porciones distales, un 65% en el íleon y un 17% en el yeyuno. El calcio también es secretado al lumen intestinal via jugos pancreáticos y bilis, aunque no se conoce si esta secreción está regulada por hormonas [7,8].

En el epitelio intestinal existen dos rutas para que el calcio pase desde la luz del intestino a la circulación: una ruta paracelular pasiva y una ruta transcelular activa.

Los movimientos pasivos de calcio pueden ocurrir en ambas direcciones, hacia la circulación o hacia el lumen, y se producen por gradientes electroquímicos favorables. Esta ruta paracelular no presenta evidencias de saturación y parece ser independiente del $1,25-(OH)_2-D$ y de la edad [9,10].

La absorción activa de calcio en el epitelio intestinal es un proceso saturable dependiente del calcio luminal, alcanzando la mitad de la absorción máxima a 1-1.5 mmol/l [11-13]. Está correlacionada positivamente con los niveles circulantes de $1,25-(OH)_2-D$ y con el contenido celular de una proteína ligadora de calcio dependiente de vitamina D (CaBP) [14]. Se han

encontrado proteínas ligadoras de calcio similares en otros órganos, incluyendo el riñón, el páncreas, las glándulas paratiroideas, la placenta y el cerebro, aunque no se conoce su función en la mayoría de ellos [15].

1.1.2.2 Hueso

El hueso es el principal reservorio del calcio corporal. Como ya se ha dicho, más del 99% del total del calcio del organismo está presente en este órgano, aunque sólo cantidades pequeñas del calcio esquelético se intercambian diariamente con el fluido extracelular. En la mayor parte de los casos, la entrada y salida de calcio del esqueleto están en equilibrio [16,17].

Hay dos mecanismos para el transporte de calcio desde el hueso al fluido extracelular: uno es el sistema de remodelado óseo y el otro es el intercambio de calcio entre el fluido extracelular y la superficie cristalina del hueso, vía el fluido óseo, a través de la capa de células en reposo que recubren el hueso.

El volumen óseo está regulado por las acciones coordinadas de células destructoras de hueso y de células formadoras, osteoclastos y osteoblastos, respectivamente. La resorción y la formación óseas están acopladas, y el hueso está siendo remodelado continuamente por la actividad celular. El remodelado óseo se inicia con un aumento de la actividad osteoclástica. Los factores o mecanismos por los que se activan los osteoclastos no son del todo conocidos. Esta fase de resorción dura unos 10 días, y es seguida por una fase de reversión en la que los osteoclastos dejan paso a los osteoblastos que ocupan la laguna de resorción. Comienza entonces la fase de formación ósea, en la que los osteoblastos acumulados en el foco

resortivo se replican y producen hueso nuevo, fase que dura normalmente varios meses [18,19].

Este mecanismo, aunque de especial relevancia en la fisiología ósea, no desempeña un papel importante en la homeostasis cálcica en condiciones fisiológicas.

El otro mecanismo de intercambio de calcio entre el hueso y el fluido extracelular, es probablemente más importante para la regulación de la homeostasis cálcica, pero es un mecanismo menos conocido que el del remodelado. El hecho de que la concentración de calcio en el fluido óseo (0.5 mmol/l) sea menor que la del plasma sugiere que hay un flujo constante de iones de calcio hacia fuera del hueso [17].

1.1.2.3 Riñón

En un adulto sano medio, aproximadamente 10 g de calcio atraviesan los glomérulos cada día, reabsorbiéndose el 97-98% de esta carga filtrada, a lo largo de las diferentes porciones del túbulo renal [8,20-23]. El control renal del calcio extracelular tiene lugar a dos niveles: glomerular y tubular.

1.1.2.3.1 Filtración glomerular

Como ya se ha mencionado, en el glomérulo se filtra cada día aproximadamente el 1% del total del calcio corporal, lo que equivale a todo el calcio que se encuentra fuera del esqueleto. Este proceso no está probablemente regulado por hormonas, aunque puede alterarse en algún grado por variaciones del flujo sanguíneo renal, y éste a su vez parece estar influido por la PTH [24,25].

1.1.2.3.2 Transporte tubular

Como ya se ha citado, del total del calcio filtrado en el glomérulo, el 97-98% es reabsorbido a lo largo de los diferentes segmentos del túbulo renal. Así, se ha comprobado que el 60-65% del calcio filtrado se reabsorbe en el túbulo proximal, el 20-25% en la rama ascendente del asa de Henle, el 10% en el túbulo distal y el resto en el túbulo colector (figura 2) [26,27].

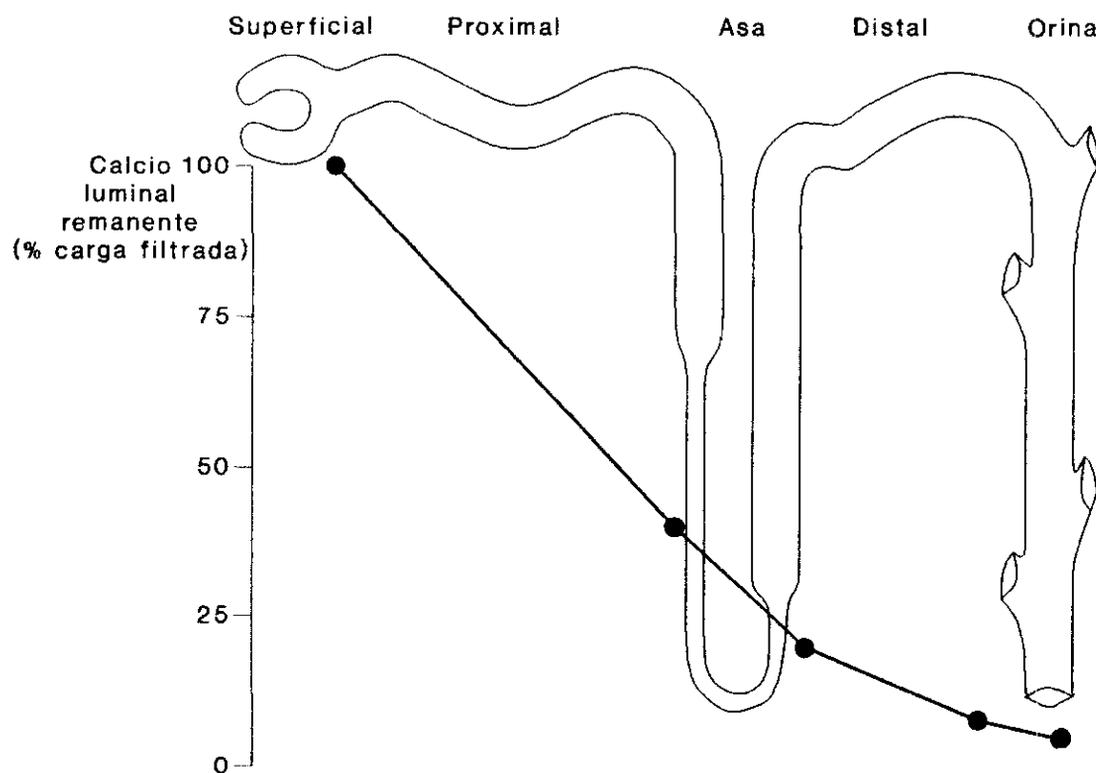


Figura 2: Reabsorción de calcio, representada como porcentaje de la carga filtrada, a lo largo de la nefrona.

En el túbulo proximal, la permeabilidad paracelular para el calcio es muy elevada, y es similar a la del sodio. La reabsorción de sodio y de agua mediante una ruta paracelular genera energía suficiente para arrastrar cierta cantidad de calcio. En estudios con túbulo contorneado proximal de conejo aislado y perfundido, no se ha podido detectar ningún transporte neto de calcio en condiciones en las que se habían reducido al mínimo los gradientes electroquímicos y la carga de solutos [28]. También se ha encontrado un transporte activo de calcio en el túbulo proximal, inhibible por ouabaína y en ausencia de sodio, lo que implica la existencia de un intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en este segmento de la nefrona [29]. Se ha descrito actividad ATPasa dependiente de calcio localizada en la membrana basolateral del túbulo proximal, así como la posible influencia de la PTH o de otros factores sobre este proceso de transporte activo de calcio en esta porción del túbulo renal [30-32].

No se ha encontrado un transporte neto de calcio significativo en las ramas descendente y ascendente delgada del asa de Henle [33,34]. En la rama ascendente gruesa del asa de Henle, el mecanismo de reabsorción del calcio no está totalmente aclarado, pero parece que el componente principal es un flujo pasivo impulsado por la diferencia de potencial transepitelial (lumen-positivo) generado por la reabsorción activa de ión cloruro en este segmento de la nefrona [35]. Este mecanismo se inhibe por acción de la furosemida.

En el túbulo distal el calcio se reabsorbe mediante un mecanismo activo en contra de un gradiente electroquímico. Este transporte de calcio está regulado por la PTH y probablemente también por el $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}$, y es independiente del sodio [36-38].

El túbulo contorneado distal no es una estructura homogénea, ya que se compone de cuatro segmentos, que pueden variar entre las diferentes especies. El más importante de ellos, en lo que a la modulación del transporte de calcio se refiere, es el llamado granular, donde se han detectado receptores para PTH acoplados a adenilato ciclasa, aunque no está claro si los efectos renales de esta hormona están mediados únicamente por la acción del AMP cíclico (AMPC) [39].

Por último, el túbulo colector ejerce un papel secundario en la regulación de la excreción de calcio en comparación con el túbulo distal. La porción más proximal tiene un epitelio granular similar al del túbulo distal, que transporta calcio y responde a la PTH y al $1,25-(OH)_2-D$. La parte más distal, por el contrario, es impermeable al calcio [40,41].

1.1.3 Mecanismos celulares de transporte de calcio

El transporte transcelular de calcio en el túbulo renal supone tres pasos: entrada en la célula a través de la membrana luminal, difusión a través de la célula hasta la zona basolateral y salida a través de la membrana basolateral hacia el espacio extracelular (figura 3).

Se asume que la concentración de calcio iónico en el fluido tubular es 0.5-1 mmol/l, y la citosólica en la célula epitelial, es 0.1-0.3 $\mu\text{mol/l}$; aunque la concentración de calcio intracelular total es aproximadamente 0.5 mmol/l, estando secuestrado la mayoría en varios orgánulos intracelulares, o ligado a proteínas citosólicas y a otros iones. Esta gran diferencia en las concentraciones de calcio iónico entre ambos compartimentos, determina la existencia de un gradiente químico favorable a la entrada de calcio al interior de la célula desde la luz del túbulo renal; movimiento

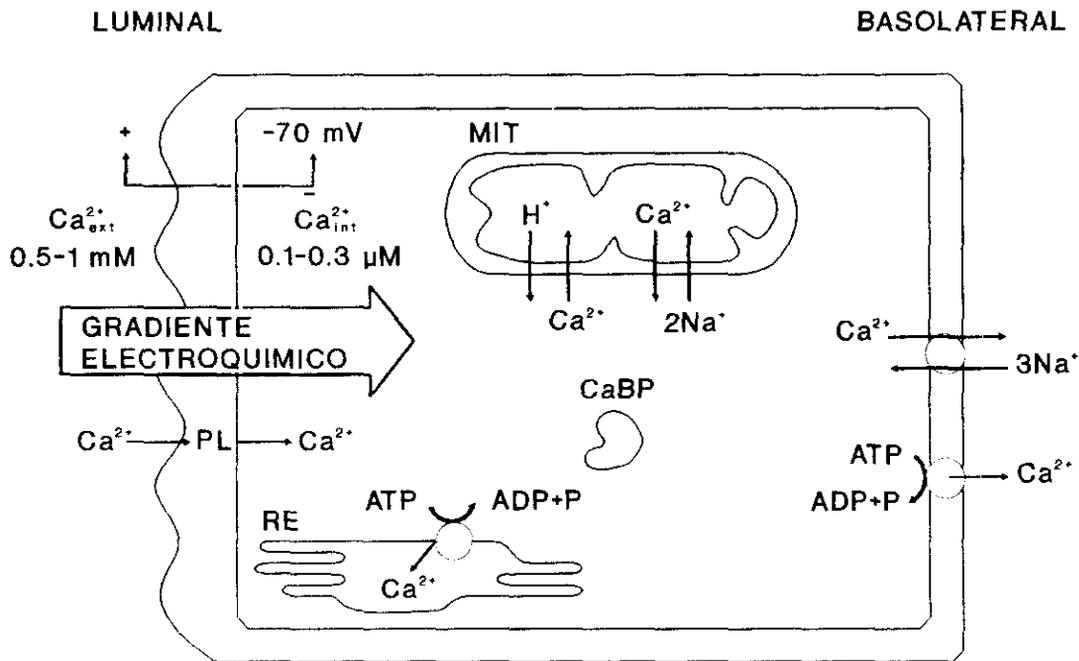


Figura 3: Transporte de calcio en la célula epitelial intestinal y renal. CaBP: proteína ligadora de calcio. MIT: mitocondria. PL: fosfolípidos de membrana. RE: retículo endoplásmico.

facilitado por la electronegatividad del interior celular frente al lumen (-40 a -70 mV) y potenciado por un transporte de sodio de forma similar al transporte de azúcares y aminoácidos [42]. Este paso de entrada de calcio en la célula renal se produce por la unión del catión a la cara externa de la membrana celular, mediante fosfolípidos ácidos, y posterior translocación a la cara citosólica de la membrana plasmática [43,44]. Se han sugerido otros mecanismos para la entrada de calcio en la célula del túbulo renal a través de la membrana luminal; entre ellos, diferentes tipos de canales dependientes o no de voltaje, y sensibles o no a PTH o a nitrendipina y diltiazem [45,46].

Una vez que el calcio ha entrado en la célula, y para mantener su concentración citosólica de 0.1-0.3 $\mu\text{mol/l}$, debe difundir a través del citosol antes de ser exportado hacia el torrente circulatorio a través de la membrana basolateral y/o debe ser captado por orgánulos intracelulares (mitocondria, retículo endoplásmico, etc).

Un papel importante en este proceso de difusión del calcio a través de la célula epitelial lo desempeña una CaBP, detectada tanto en intestino como en riñón [15,47]. Bronner y cols. [13] han observado que el transporte activo de calcio en el duodeno varía de manera lineal al variar el contenido de CaBP. Algo similar podría ocurrir en la célula epitelial del túbulo renal con la CaBP renal (CaBPr). Se ha calculado que el calcio podría difundir en el espacio citosólico en presencia de la CaBPr a una velocidad 30 veces superior que en ausencia de esta proteína [48].

La CaBPr es una proteína similar a la calmodulina capaz de unir cuatro moles de calcio por cada mol de CaBPr y cuya expresión depende del $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}$ [49]. En el riñón de rata, se ha localizado únicamente en el túbulo contorneado distal [50].

Dos orgánulos intracelulares también participan en el control del calcio citosólico: la mitocondria y el retículo endoplásmico. La mitocondria tiene la capacidad de tamponar grandes cantidades del catión al acomplejarlo con otros iones (fosfato, carbonato, etc) en el interior del orgánulo. La captación de calcio por la mitocondria está facilitada por un gradiente eléctrico producido por la salida de protones del orgánulo [51]. Por otra parte, en el retículo endoplásmico se ha localizado una ATPasa dependiente de calcio y magnesio, de alta afinidad y baja capacidad [52].

Una vez que el calcio ha difundido a través del citosol, debe ser exportado a través de la membrana basolateral en contra de un gradiente electroquímico. A este nivel actúan dos mecanismos: una ATPasa dependiente de calcio y magnesio y un antiportador que intercambia sodio por calcio.

En membranas basolaterales de corteza renal de rata y en túbulos renales de conejo, se ha identificado una $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPasa, con alta afinidad para el calcio aunque con baja capacidad [30,53-55]. En túbulos de conejo, la mayor actividad enzimática se encontró en el túbulo contorneado distal y en el túbulo colector cortical; intermedia en el túbulo contorneado proximal y en la rama ascendente gruesa medular del asa de Henle; y la mínima actividad en el túbulo proximal recto, en la rama ascendente gruesa cortical del asa de Henle y en el túbulo colector medular [30]. Empleando anticuerpos monoclonales para la $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPasa de eritrocito humano, Borke y cols. [50,56] han encontrado cantidades significativas de esta enzima sólo en la membrana basolateral del túbulo contorneado distal de varias especies animales. Estos resultados sugieren que esta actividad en otros segmentos de la nefrona es muy baja o no existe, o que no está localizada en la membrana basolateral, o bien que la enzima de estos segmentos es inmunológicamente diferente de la de eritrocito humano. De hecho, se han caracterizado dos Ca^{2+} -ATPasas insensibles a vanadato e independientes de magnesio en preparaciones de membrana basolateral de corteza renal de rata [57]. Una es una forma de baja afinidad y alta capacidad, y la otra es una forma de alta afinidad y baja capacidad. Esta última es más probable que actúe a concentraciones fisiológicas de calcio citosólico.

La capacidad de transporte de la $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática renal parece suficiente para efectuar el transporte de calcio

medido en el túbulo distal [58]. Así, Doucet y Katz [30] han encontrado en túbulo contorneado distal de conejo una actividad enzimática de aproximadamente 8 pmol calcio/min/mm de túbulo, valor que concuerda con el flujo unidireccional del catión determinado por Imai en conejo [59], o por Costanzo y Windhager en rata [36].

En el túbulo proximal, parece que existe una relación inversa entre la reabsorción de sodio y el calcio intracelular, de tal modo que cuando aumenta este último, se reduce la primera [60]. Aunque no cabe la menor duda de la existencia de un proceso de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en la membrana basolateral del túbulo proximal y distal, su papel en la regulación del transporte de calcio no está claro [54,61-63].

La naturaleza del movimiento paracelular de calcio en la nefrona no se conoce totalmente. La proporción de la reabsorción de calcio que se realiza por vía paracelular es casi el 70% del total del movimiento transepitelial de calcio, y se localiza en porciones proximales de la nefrona, a través de las uniones intercelulares con sus complejos lipoproteicos [21].

1.1.4 Regulación de la homeostasis del calcio

Como ya hemos mencionado, la homeostasis del calcio está regulada por una serie de hormonas sistémicas, PTH, $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}$ y CT, cuya secreción está a su vez influenciada por la concentración de calcio plasmático. Además de estas hormonas, hay una serie de factores que pueden afectar a la homeostasis cálcica pero cuyos niveles circulantes, por el contrario, no se ha demostrado que estén influenciados directamente por la concentración de este catión [64].

1.1.4.1 Parathormona

La PTH es una hormona polipeptídica, de 84 aminoácidos en su forma madura, sintetizada y secretada por las células principales de las glándulas paratiroides [65].

La actividad biológica de la PTH está contenida en los primeros 34 aminoácidos de la región amino- (N-) terminal [66]. Sin embargo, recientemente, se ha sugerido que un fragmento carboxi- (C-) terminal estimula la fosfatasa alcalina en células osteoblásticas a través de un receptor diferente al del extremo N-terminal [67].

La señal principal para la secreción de la PTH es la concentración del calcio en el fluido extracelular. La disminución de dicha concentración provoca la síntesis y secreción de la hormona, mientras que el aumento del calcio extracelular es responsable de una menor secreción de PTH. Otros factores que afectan también a la secreción de esta hormona son los agonistas adrenérgicos, las prostaglandinas de la serie E, el magnesio y los metabolitos de la vitamina D. La secreción de PTH se inhibe por la hipomagnesemia severa crónica y el 1,25-(OH)₂-D [68].

El papel fundamental de la PTH es la elevación del calcio extracelular, que se consigue mediante su acción sobre el riñón, el hueso, y de manera indirecta sobre el intestino, a través del estímulo de la síntesis renal de 1,25-(OH)₂-D (figura 4) [64].

Sobre el riñón, el efecto de la PTH consiste en aumentar la reabsorción tubular de calcio en el túbulo distal. Al mismo tiempo, esta hormona inhibe la reabsorción tubular de fosfato y de bicarbonato en el túbulo proximal. Por último, la PTH estimula la actividad de la 1 α -hidroxilasa renal, aumentando la síntesis del 1,25-(OH)₂-D [24].

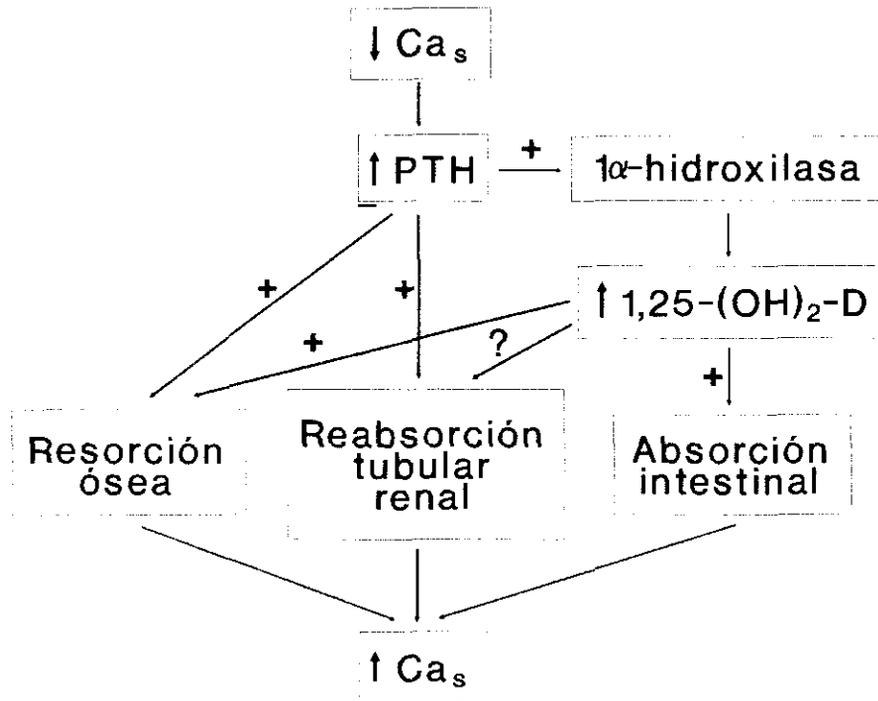


Figura 4: Sistema hormonal regulador de la homeostasis cálcica. Ca_s : calcio sérico. PTH: parathormona. 1,25-(OH) $_2$ -D: 1,25-dihidroxicolecalciferol.

El efecto de la PTH sobre el hueso es complejo y aún no está totalmente aclarado. La administración crónica de la hormona produce un aumento del número de osteoclastos y de su actividad; sin embargo, cuando se administra una única dosis diaria, se produce un aumento de la formación del hueso. Además, el aumento de la resorción ósea parece producirse por la mediación de células de estirpe osteoblástica [69].

1.1.4.2 Vitamina D

Los metabolitos de la vitamina D son compuestos esteroideos derivados del ergosterol de los vegetales que se ingiere en la dieta, o sintetizados en la piel a partir del colesterol por exposición de las células epidérmicas a la luz ultravioleta [14]. El colecalciferol así producido sufre una primera hidroxilación en posición 25 en el hígado, y posteriormente una segunda hidroxilación en posición 1, principalmente en el riñón, originando el metabolito activo, el 1,25-(OH)₂-D mediante la enzima 1 α -hidroxilasa, que se localiza mayoritariamente en la mitocondria del túbulo proximal [70]. Diversos trabajos apoyan la existencia de síntesis extrarrenal de 1,25-(OH)₂-D, por parte de células del sistema inmune, que puede ser la causa de la hipercalcemia asociada a ciertas patologías [71].

Los principales estimuladores de la actividad 1 α -hidroxilasa son los niveles altos de PTH y la hipofosfatemia. Otros estímulos son los niveles bajos de calcio sérico, la deficiencia de vitamina D, la CT, la hormona del crecimiento, la prolactina y los estrógenos. La actividad de la 1 α -hidroxilasa se inhibe por el 1,25-(OH)₂-D, la hipercalcemia y la paratiroidectomía [72].

El efecto principal del 1,25-(OH)₂-D es regular la homeostasis fosfo-cálcica a nivel intestinal, donde aumenta la absorción de calcio y de fosfato por un mecanismo activo, y sobre el hueso, donde aumenta la resorción mediante diferenciación de células progenitoras en osteoclastos multinucleados maduros [14]. El efecto global parece ir encaminado a proporcionar una cantidad de calcio y fósforo suficiente en el lugar de remodelado, para la adecuada mineralización del hueso recién formado [73].

Por otra parte, el 1,25-(OH)₂-D parece tener acciones directas sobre el riñón regulando su propia síntesis, aumentando la del 24,25-(OH)₂-D,

metabolito de la ruta de degradación de la vitamina D, y colaborando con la PTH en aumentar la reabsorción tubular de calcio mediante el estímulo de la síntesis de la CaBPr [70].

1.1.4.3 Calcitonina

La CT es una hormona peptídica sintetizada en las células parafoliculares de la glándula tiroides, y cuya síntesis y secreción está regulada por la concentración de calcio del líquido extracelular. Además, la CT es liberada en respuesta a hormonas gastrointestinales, como la gastrina, la secretina, el glucagón y la colecistoquinina-pancreozimina [74].

El papel biológico de la CT no se ha precisado completamente. Inhibe la resorción ósea de manera aguda, rápida y eficaz [75]. Actúa sobre los osteoclastos produciendo un aumento de la generación de AMPc y la contracción de su membrana celular [76,77]. Sin embargo, estos efectos no parecen tener un papel importante en la regulación de la homeostasis crónica del calcio, ya que pacientes sin tiroides o con tumores secretores de CT (carcinoma medular de tiroides) no presentan anomalías ni en los niveles de calcio sérico ni en estudios de histomorfometría ósea. Se ha sugerido que la acción de la CT podría estar relacionada con la protección del organismo frente a la hipercalcemia postprandial.

1.1.4.4 Otros factores reguladores de la homeostasis del calcio

Existen una serie de factores que afectan a la homeostasis del calcio pero que no están bajo el control de su concentración extracelular y no parecen ser determinantes de la misma. Entre ellos podemos señalar varias

hormonas sistémicas como las hormonas tiroideas, los glucocorticoides y los esteroides sexuales. Además, ciertos factores liberados por células del sistema inmune se han relacionado con la homeostasis cálcica, sobre todo por su acción sobre el remodelado óseo e incluso se han implicado en ciertas situaciones de hipercalcemia. Es el caso de la interleucina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF), ciertas prostaglandinas y factores transformantes del crecimiento (TGF), de los que se hablará más adelante.

1.2 Hipercalcemia

Los primeros métodos para determinar los niveles de calcio sérico aparecieron en los años 20, reconociéndose casi inmediatamente que la hipercalcemia solía asociarse a pacientes con cáncer [78]. Con la introducción de los autoanalizadores en los años 70, la medida del calcio sérico se hizo rutinaria, surgiendo la hipercalcemia como una anomalía relativamente común. Las neoplasias constituyen la segunda causa de hipercalcemia después del hiperparatiroidismo primario en la población general y la primera en pacientes hospitalizados [79]. Otras causas de hipercalcemia, como el hipertiroidismo, la inmovilización o la intoxicación por vitamina D, son mucho menos comunes y afectan aproximadamente al 10% de todos los pacientes con hipercalcemia [80].

La hipercalcemia ocurre en el 5-10% de los pacientes con cáncer, en el estadio tardío del desarrollo tumoral. El carcinoma de pulmón es el tumor más comúnmente asociado con hipercalcemia, aunque no todos los carcinomas de pulmón cursan con esta anomalía. El carcinoma de mama, los tumores hematológicos y los del tracto genitourinario también se asocian frecuentemente con hipercalcemia. Por el contrario, algunos tumores

frecuentes, como el carcinoma de colon, casi nunca se asocian con hipercalcemia, y existen otros muy poco frecuentes asociados casi siempre a hipercalcemia, como el colangiocarcinoma (tumor de vesícula biliar) y el VIPoma (tumor pancreático secretor de polipéptido vasoactivo intestinal) [81].

1.2.1 Fisiopatología

En la enfermedad maligna, la hipercalcemia se produce por un aumento relativo de la resorción ósea sobre la formación y/o un aumento de la reabsorción tubular de calcio. La absorción de calcio por el intestino está disminuida en la mayoría de los casos.

Desde un punto de vista fisiopatológico, la hipercalcemia tumoral se puede dividir en dos grandes grupos: uno con afectación ósea, distinguiéndose los tumores sólidos con numerosas metástasis esqueléticas y los tumores de tipo hematológico que se localizan en la médula ósea; y otro grupo que incluye los tumores sólidos sin metástasis esqueléticas asociadas o con muy escaso número de ellas.

1.2.1.1 Hipercalcemia por osteolisis local

El primer tipo de hipercalcemia tumoral descrito fue la hipercalcemia por osteolisis local [82]. Los tumores más comúnmente asociados a este mecanismo son el cáncer de mama, el mieloma múltiple o el linfoma. Se cree que la hipercalcemia en estos casos es el resultado del aumento de resorción ósea por los osteoclastos, mediado por factores secretados por las células malignas en el hueso. Así, en el mieloma múltiple hay evidencia de que las células plasmáticas malignas que se encuentran en la médula ósea secretan linfotoxina (TNFB), y esta linfotoxina activa los osteoclastos adyacentes

[83]. De forma similar en el linfoma, la IL-1 parece estar implicada en la estimulación de la resorción ósea por los osteoclastos [84]. En el caso del cáncer de mama, el mediador osteolítico puede estar entre las citocinas mencionadas anteriormente, además de la prostaglandina E_2 , y/o de otros factores no del todo conocidos [85]. Finalmente, también hay evidencias de resorción ósea directa por células mononucleares y por células tumorales de mama [85,86].

1.2.1.2 Hipercalcemia tumoral de origen humoral

En 1941, Albright describió el caso de un paciente con carcinoma renal y una única metástasis ósea detectable, que presentaba hipercalcemia e hipofosfatemia, sugiriendo que el factor causante de estas anomalías podría ser la PTH o una molécula relacionada producida por el tumor [87]. La naturaleza humoral del síndrome se confirmó posteriormente en series amplias de pacientes en los que la hipercalcemia revertía al extirpar el tumor [88-90].

Los tumores que se asocian más frecuentemente a este tipo de hipercalcemia tumoral de origen humoral (HTH) son carcinomas epidermoides (de pulmón, de cabeza y cuello, de ovario, etc) y carcinomas renales y uroteliales. En el cáncer de mama, el 50% de los casos se asocia con HTH y en la otra mitad el mecanismo es por osteolisis local debido a las numerosas metástasis esqueléticas [81,88-90].

Los pacientes con HTH presentan, además de la hipercalcemia, hipofosfatemia, aumento de la eliminación renal de fosfato y de AMPc nefrogénico, concentraciones normales o disminuidas de PTH inmunorreactiva y de $1,25-(OH)_2-D$ y valores relativamente altos de excreción renal de calcio [90].

Los exámenes óseos generalmente revelan la ausencia casi total de metástasis esqueléticas en los pacientes con HTH [90]. Por histomorfometría cuantitativa, se observa un aumento del número de osteoclastos y una disminución del número de osteoblastos y de otros parámetros de formación ósea, desacoplamiento que no se detecta en el hiperparatiroidismo primario [91].

1.2.2 Factores implicados en la fisiopatología de la hipercalcemia tumoral de origen humoral

1.2.2.1 Proteína relacionada con la parathormona

La observación de que la excreción urinaria de AMPc nefrogénico está elevada en pacientes con HTH, sugería que el posible factor tumoral hipercalcemiante interaccionaba con el receptor para la PTH acoplado a la adenilato ciclasa en el túbulo renal [90]. Además, este hecho predecía que los ensayos de adenilato ciclasa sensible a PTH en células renales y óseas o en membranas de estas células, podrían ser útiles en la detección y purificación de dicho posible factor hipercalcemiante.

En 1983, tres grupos demostraron que extractos de tumores asociados con HTH contenían una actividad estimuladora de la adenilato ciclasa (ACSA) similar a la PTH [92-94]. El factor responsable de la ACSA derivada de tumores asociados con HTH era inmunológica, funcional y químicamente distinto de la PTH o de sus precursores biosintéticos [92,95].

En 1987, se completó la purificación a homogeneidad del factor responsable de la ACSA asociada a la HTH, una proteína de peso molecular 16000-18000 dalton [96-99]. Los tumores de los que se purificó tal factor incluían uno de mama, uno renal y dos epidermoides de pulmón asociados con HTH.

La secuencia aminoacídica completa de esta proteína relacionada con la PTH (PTHRP) se ha deducido de su cDNA (figura 5) [100-102]. Así, se ha encontrado que la PTHRP y la PTH presentan homología sólo en la región N-terminal, donde ocho de los trece primeros residuos son idénticos. Este dominio homólogo incluye una región de la molécula que es necesaria para la activación del receptor de la PTH [103]. Más allá de esta zona, las secuencias de PTHRP y de PTH difieren completamente.

Comparada con la PTH, de 84 aminoácidos, la PTHRP es considerablemente mayor. En el humano existen tres isoformas, de 139, 141 y 173 aminoácidos, cuyas secuencias son idénticas hasta el residuo 139. Estas isoformas surgen por procesamiento alternativo de tres diferentes mRNAs, cuya expresión depende del tejido de que se trate [104]. La proporción en que se secreta cada una de ellas y su importancia relativa en la fisiología normal o en la fisiopatología de la HTH, son desconocidas.

La PTHRP humana está codificada por un gen con una única copia localizado en el brazo corto del cromosoma 12. Incluye dos promotores, ocho exones y presenta varias posibilidades alternativas de procesamiento [105-107]. Además del humano, se han obtenido cDNAs para PTHRP de rata, ratón y pollo [108-110]. Contrariamente al gen de la PTHRP humana, los productos de estas otras especies no presentan procesamientos alternativos, sino que en cada una de ellas hay un mRNA predominante que codifica moléculas de 141 residuos para la rata, y de 139 para el ratón y el pollo. Las secuencias deducidas de los cDNA de estas especies presentan gran homología con la humana en la mayor parte de la molécula, lo que sugiere que la PTHRP tiene una funcionalidad importante, conservada a lo largo de la evolución (figura 5).

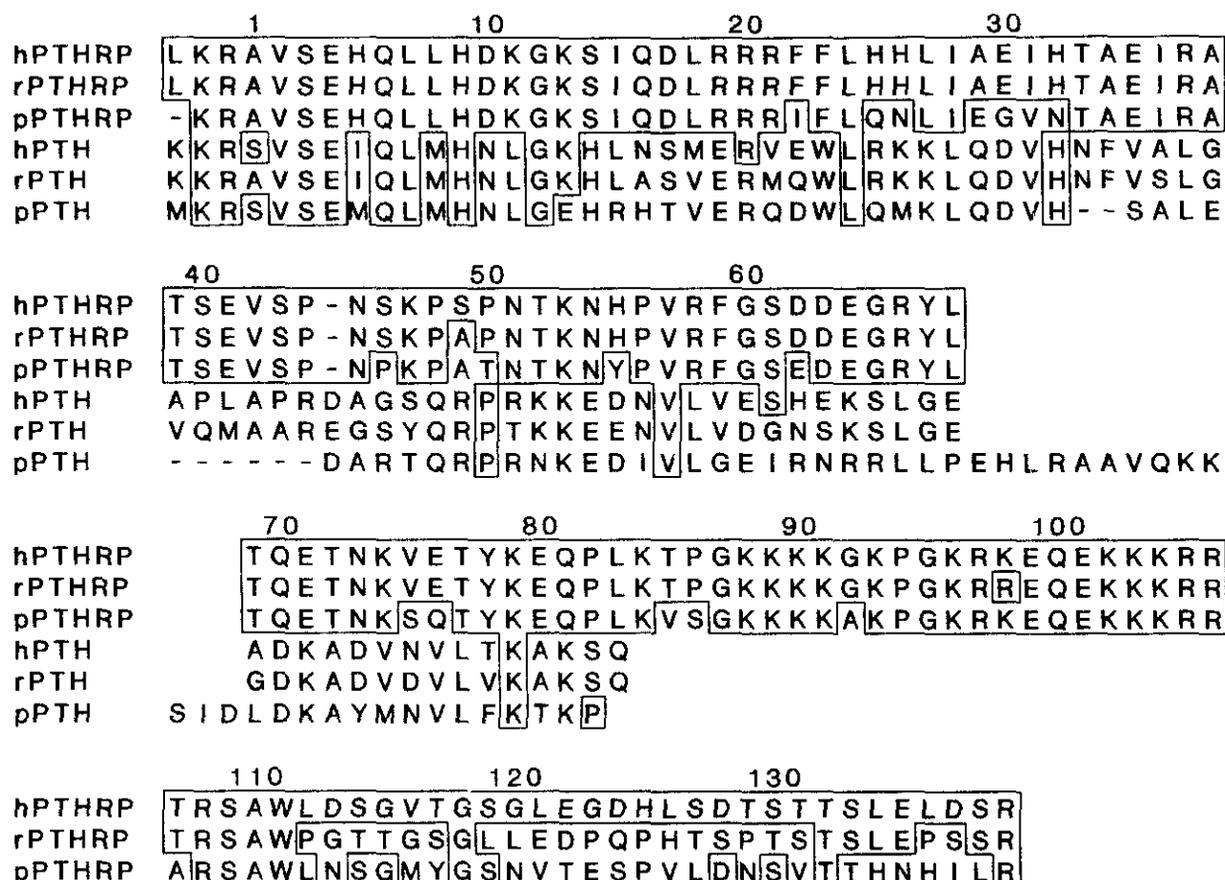


Figura 5: Comparación de las secuencias aminoacídicas de PThRP y PTh de humano (h), rata (r) y pollo (p), deducidas de sus respectivos cDNA.

El gen de la PThRP se expresa en una amplia variedad de tejidos normales, endocrinos y no endocrinos, en el embrión y en el individuo adulto. Entre ellos se incluyen tejidos tan diversos como la glándula paratiroides, la pituitaria, la glándula mamaria, el sistema nervioso central y la piel [104,111-114]. Aunque el papel de la PThRP en estos tejidos no se ha establecido aún, una posibilidad es que regule los flujos de calcio celular. Por ejemplo, se ha sugerido que la PThRP podría controlar la transferencia de

calcio a la leche durante la lactancia [111]. También se ha descrito un efecto de la PTHRP en el transporte de calcio en la placenta [112]. En el cerebro, la PTHRP se localiza en neuronas que contienen gran cantidad de canales de calcio y que también presentan niveles altos de proteína kinasa C sensible a calcio [113]. En queratinocitos epidérmicos (células normales emparentadas con los carcinomas epidermoides productores de PTHRP y asociados frecuentemente a HTH), la PTHRP parece estar implicada en su diferenciación [114].

La síntesis química y recombinante de péptidos con diferentes secuencias de la molécula de PTHRP ha permitido el estudio de su bioactividad. Como era de esperar por la homología con la secuencia de la PTH en la región N-terminal, los péptidos de la PTHRP que incluían esta zona reproducían la bioactividad de la PTH, incluyendo: la estimulación de la adenilato ciclasa en membranas renales y en osteoblastos, la producción de hipercalcemia "in vivo", la estimulación de la resorción ósea "in vitro" y la estimulación de la actividad 1α -hidroxilasa renal [115-119]. Además, la PTHRP parece unirse a receptores renales y óseos indistinguibles de los de la PTH [120,121]. Sin embargo, la proteína nativa de 141 aminoácidos de la PTHRP humana presenta actividades únicas no compartidas por la PTH, como la transformación de células normales de riñón y la síntesis de fibronectina por fibroblastos humanos [122]. Recientemente, se ha encontrado que la secuencia 107-111 de la región C-terminal de la PTHRP es un inhibidor potente de la resorción ósea mediada por los osteoclastos [123].

Hasta ahora, se conoce poco sobre la forma o formas en que se secreta y circula la PTHRP [124-126]. Dada la diversidad de tejidos que la producen, la evidencia de un patrón de expresión específico de tejido y el número de sitios potenciales de procesamiento a lo largo de la molécula, se

puede pensar en la existencia más que probable de una familia de PTHRPs.

En los últimos años se han desarrollado varios inmunoensayos capaces de medir los niveles de PTHRP en plasma, suero y orina. Los ensayos detectan diversas regiones de la molécula, obteniéndose concentraciones diferentes dependiendo de la especificidad de los anticuerpos empelados [127-132]. Independientemente del método utilizado, los niveles circulantes de PTHRP están elevados en pacientes con HTH, siendo indetectables o cercanos a los límites de detección en sujetos normales. Además, hay evidencias de que los fragmentos N- y C-terminales de la PTHRP circulan separadamente en pacientes con HTH, y de que estos últimos se acumulan en pacientes con insuficiencia renal [125,132,133].

1.2.2.2 Factor transformante del crecimiento tipo α

Los tumores sólidos producen polipéptidos responsables del mantenimiento del fenotipo transformado. Uno de éstos, el TGF α , es similar al factor de crecimiento epidérmico y se une a su receptor, activándole [134]. El TGF α es un potente estimulador de la resorción ósea "in vitro", con efectos que son incluso más potentes que los de la PTH. También se ha visto que estimula la resorción ósea y produce hipercalcemia en ratones "in vivo" [135,136].

Existen evidencias de la producción simultánea de TGF α y PTHRP por algunos tumores [137]. Debido a que el TGF α puede ser producido por los mismos tumores que producen PTHRP, probablemente también afecta a la homeostasis cálcica y esquelética en pacientes con estos tumores. El TGF α actúa sobre células osteoblásticas inhibiendo la respuesta de la adenilato ciclasa a la PTH y a la PTHRP [138].

1.2.2.3 Factor de necrosis tumoral

El TNF es una citocina potente resorbedora de hueso, sintetizada por macrófagos activados, que estimula la formación de osteoclastos y activa los ya maduros. Sus efectos sobre el metabolismo óseo son similares a los del TGF α , y se ha comprobado que produce hipercalcemia "in vivo" [139,140].

Cierto número de tumores sólidos tienen la capacidad de producir o estimular la producción de TNF por las células normales del huésped [141]. Células tumorales que se han hecho productoras de TNF por transfección de cDNA, al ser inoculadas en ratones producen un síndrome hipercalcémico asociado a resorción ósea elevada y a altas concentraciones circulantes de TNF [142].

La interacción entre factores tumorales osteolíticos, como la PTHRP, con el TNF producido por las mismas células tumorales o por las células del huésped en respuesta a la presencia del tumor, podría coadyuvar a la hipercalcemia tumoral [143].

1.2.2.4 Interleucina-1

La IL-1 es otro potente factor estimulador de la resorción ósea, con otras muchas acciones biológicas sobre una gran variedad de tejidos [144-146].

Cuando se infunde en ratones normales, la IL-1 causa hipercalcemia y aumento de la resorción ósea, asociada a un incremento del número de osteoclastos y de sus precursores [147,148].

En tumores sólidos asociados con HTH también se ha observado producción de IL-1 [149]. La IL-1 parece ejercer un efecto sinérgico junto a PTH y PTHRP sobre la resorción ósea [150,151]. En el riñón, la IL-1 estimula

la reabsorción tubular de calcio, causando hipercalcemia en ratas tiroparatiroidectomizadas [152]. Por el contrario, también se ha encontrado una acción inhibitoria de la IL-1 sobre el incremento de la reabsorción tubular de calcio inducido por la PTHRP en la rata [153].

1.2.2.5 Otros factores

Además de los factores descritos anteriormente, hay otros productos tumorales que pueden causar hipercalcemia. Bringhurst y cols. [154] identificaron un factor distinto de la PTHRP o del TGF α producido por células de melanoma humano en cultivo, que causaba un aumento de la resorción ósea "in vitro". Este tumor implantado en ratones atímicos causaba hipercalcemia.

Recientemente, un análogo de la 1,25-(OH)₂-D, al parecer el 1,24(R)-(OH)₂-D, que causa resorción ósea en cultivos de hueso, se ha encontrado en suero de un paciente con un carcinoma microcítico de pulmón [155].

Inicialmente, las prostaglandinas se propusieron como posibles mediadores de la HTH [156]. Sin embargo, ahora parece improbable que desempeñen un papel importante en la HTH. Así, aunque la producción de prostaglandinas ha sido demostrada en varios modelos animales de HTH, estas sustancias deben ser infundidas o inyectadas en grandes cantidades para producir hipercalcemia "in vivo" [157]. Además, el tratamiento con inhibidores de la síntesis de prostaglandinas no ha sido útil en el tratamiento de ningún tipo de hipercalcemia tumoral [158].

1.2.3 Modelos animales de hipercalcemia tumoral de origen humoral

Los modelos animales de hipercalcemia tumoral son de gran utilidad

para la caracterización de los mecanismos patogénicos responsables de la hipercalcemia y para el ensayo de nuevas pautas terapéuticas de este síndrome. La mayoría de estos modelos corresponden a HTH [159].

En todos los modelos animales de HTH se ha podido demostrar un aumento de la resorción ósea mediada por los osteoclastos. Sin embargo, no se sabe con certeza el papel que desempeñan los compartimentos intestinal y renal en el desarrollo de la hipercalcemia asociada a estos tumores.

La mayoría de los modelos animales de HTH tienen características similares a la HTH humana, como hipercalcemia, hipofosfatemia, disminución de la reabsorción tubular de fosfato, aumento de la eliminación renal de AMPc y supresión de la secreción de PTH.

1.2.3.1 Fibrosarcoma HSDM de ratón

Este tumor produce hipercalcemia paralelamente a un aumento de las concentraciones séricas de prostaglandina E₂ (PGE₂) [160]. En el medio de cultivo de células de este tumor se ha demostrado la existencia de actividad estimuladora de la resorción ósea junto con concentraciones elevadas de PGE₂. Tanto la actividad de resorción ósea como los niveles de PGE₂ y la hipercalcemia disminuyen con el tratamiento con indometacina. Parece por tanto, que en este modelo la hipercalcemia se debe a la producción de PGE₂ o de algún metabolito relacionado.

1.2.3.2 Carcinosarcoma VX-2 de conejo

El tumor VX-2 también se asocia con hipercalcemia y síntesis de PGE₂, tanto "in vivo" como "in vitro", aunque no parece ser ésta la causa de la hipercalcemia sino un aumento en la absorción intestinal de calcio [161].

1.2.3.3 Tumor de células de Leydig de rata

El tumor testicular de células de Leydig es un tumor espontáneo y transplantable que produce un síndrome de HTH en la rata portadora [162,163]. En este modelo tumoral existe un aumento de la resorción ósea y un componente renal coadyuvante de la hipercalcemia [164,165]. Las células del tumor de Leydig producen factores con actividad de TGFs, estimuladores de la resorción ósea y de la adenilato ciclasa renal y ósea [137,166].

1.2.3.4 Carcinosarcoma de Walker 256 de rata

Este tumor mamario desarrollado espontáneamente en la rata, tiene una variante normocalcémica y otra hipercalcémica. Esta última se asocia con características de HTH [167,168]. La variante hipercalcémica del tumor de Walker 256 (W256) produce un factor activador de la resorción ósea [169]. Además, este tumor sintetiza también un factor que estimula la adenilato ciclasa renal y osteoblástica, inhibible por antagonistas de la PTH [93].

Estudios con inhibidores de la resorción ósea sobre la hipercalcemia y la hipercalciuria de ratas portadoras del tumor W256, sugieren la existencia de un componente renal coadyuvante de la hipercalcemia en este modelo tumoral [170,171].

1.2.3.5 Otros modelos animales de hipercalcemia tumoral de origen humoral

Además de los descritos, existen otros modelos animales de HTH que también son objeto de atención.

En el perro se ha estudiado un linfosarcoma y el adenocarcinoma de glándula apocrina de saco anal. Ambos tienen características de HTH. En el

caso del adenocarcinoma, el síndrome hipercalcemiante parece estar mediado por la PTHRP [172,173].

El carcicoma de mama CE es un tumor humano transplantable que produce hipercalcemia, aumento de la resorción ósea y neutrofilia en el ratón portador [174]. La hipercalcemia se asocia con un aumento de la excreción urinaria de hidroxiprolina y de AMPc.

El carcinoma epidermoide inducido por dimetilbenzantraceno en piel de ratón produce un factor que interacciona con los receptores renales de la PTH. Los animales portadores del tumor presentan hipercalcemia con aumento de la resorción ósea [175].

Varios tumores humanos que se asocian con HTH se han implantado y desarrollado en ratones atómicos reproduciendo el síndrome de HTH [176,177]. Sin embargo, se han encontrado diferencias en cuanto a los niveles de $1,25-(OH)_2-D$, que estando disminuidos en el paciente humano del que procede el tumor, son elevados en el animal portador. Las causas de esta discrepancia se atribuyen a factores reguladores de la síntesis renal del $1,25-(OH)_2-D$ dependientes de la especie animal, aún por determinar.

2. OBJETIVOS

1. Estudiar "in vivo" el papel del riñón en la génesis de la hipercalcemia en ratas portadoras del carcinosarcoma de Walker 256.
2. Estudiar la existencia de la PTHRP en extractos del carcinosarcoma de Walker 256.
3. Estudiar "in vitro" el mecanismo del transporte de calcio en el riñón de ratas portadoras del carcinosarcoma de Walker 256.
4. Estudiar "in vitro" el efecto de la PTHRP sobre el transporte de calcio en el riñón de rata.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Trasplante del tumor

Se utilizaron ratas Wistar hembras de 200-250 g de peso, alimentadas con una dieta comercial estándar. Para los implantes, se inocularon por vía subcutánea en el lateral derecho de los animales, anestesiados previamente con éter, 0.2 ml ($8-10 \times 10^6$ células) de una suspensión resultante de homogeneizar tejido tumoral en suero salino (0.3 g/ml). El máximo desarrollo del tumor en estas condiciones se alcanza en un periodo de 14-16 días después del implante.

3.2 Estudios de balance metabólico

Para los estudios de balance metabólico, las ratas portadoras del tumor W256 en diferentes estadios de crecimiento, o controles normales sin implante, de la misma edad y sexo, se colocaron en jaulas metabólicas, privándolas de alimento pero no de agua durante 18-24 horas. Tras este intervalo, se extrajo sangre por punción intracardiaca bajo anestesia con éter y se recogió la orina excretada durante este tiempo.

En algunos animales se extirpó el tumor, también bajo anestesia con éter, recogándose sangre antes y a las 24 horas de la cirugía, y la orina excretada durante este tiempo. Dos días antes de la operación, las ratas fueron rehidratadas mediante la administración diaria de 5 ml de suero salino por inyección intraperitoneal.

3.3 Análisis de parámetros bioquímicos

El calcio y el magnesio en suero y en orina se analizaron por espectrofotometría de absorción atómica, en un espectrofotómetro Perkin Elmer 305B. La creatinina en suero y en orina se valoró por colorimetría, usando

ácido pícrico como agente precipitante [178]. La hidroxiprolina en orina se midió por el método de Kivirikko [179]. El AMPc en orina se determinó mediante análisis de competición proteica (Amersham International, Buckinghamshire, GB). Los diferentes parámetros en orina se expresaron como cociente frente a creatinina.

3.4 Análisis histológico

Para el estudio histomorfométrico se emplearon fémures de ratas portadoras del tumor W256 y de ratas controles. Los fémures se fijaron en alcohol 70%, se deshidrataron con concentraciones crecientes de acetona y se incluyeron en metilmetacrilato de bajo peso molecular. Se realizaron cortes de 5 μm de espesor mediante un microtomo tipo K de Jung, provisto de cuchilla con filo de carburo de tungsteno (perfil HK2), que fueron teñidos con hematoxilina-eosina y tricrómico de Goldner. Las medidas morfométricas se realizaron mediante un sistema semiautomático integrado por un microscopio con cámara clara y un tablero digitalizador conectado a un ordenador (Morphomat 30, Zeiss).

3.5 Aislamiento de la PTHRP del tumor de Walker 256

Para obtener los extractos se emplearon tumores de unos 12-14 días de crecimiento. Todas las manipulaciones se realizaron en frío.

3.5.1 Extracto urea-HCl

El tejido tumoral se homogeneizó en Tris-HCl 0.1 mol/l, pH 7.4 (3 ml/g tejido), en un Potter de vidrio con pistón de teflón mediante 10 golpes de 30 segundos a 2000 rpm, tras lo cual se centrifugó 15 minutos a 27000 x g

en una centrífuga J2-21 (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, EEUU), con rotor JA-20. El precipitado se extrajo durante una hora en agitación continua con urea 8 mol/l, HCl 0.2 mol/l, cisteína 0.1 mol/l (2 ml/g tejido). A continuación, el extracto se centrifugó de nuevo 15 minutos a 27000 x g. El sobrenadante resultante se dializó durante una noche frente a 10 litros de agua destilada, usando una membrana de 3500 dalton de corte molecular (Spectra/Por 3, Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA, EEUU) y posteriormente se liofilizó [92].

3.5.2 Extracto NaCl-etanol

El extracto urea-HCl liofilizado se resuspendió en ácido acético 10 mmol/l (1.8 ml/ml del extracto previo antes de liofilizar) y NaCl 0.1 mol/l. Manteniendo la suspensión en agitación continua, se añadió etanol absoluto frío lentamente hasta una concentración final del 20%, agitando 15 minutos más. Transcurrido este tiempo, se centrifugó 15 minutos a 16000 x g. El sobrenadante se liofilizó, almacenándolo a -20°C hasta su utilización posterior [180].

3.5.3 Purificación de los extractos NaCl-etanol

El criterio de purificación de la PTHRP del tumor W256 fue la ACSA renal (ver más adelante). El método de purificación empleado incluía un paso de cromatografía de inmunoafinidad y otro de HPLC de fase reversa. Este método ha demostrado ser rápido y eficaz cuando se ha empleado para purificar medios biológicos que contenían cantidades bajas de PTHRP [181].

Se empleó una columna de inmunoafinidad, cedida amablemente por el Dr. A.F. Stewart (Veterans Administration Medical Center, West Haven, CT,

EEUU), preparada con anticuerpos de conejo contra PTHRP(1-36), ligados covalentemente a proteína A-Sepharosa CL-4B (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia) [181].

La capacidad de unión de la columna se caracterizó añadiendo 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS: NaCl 150 mmol/l, Na₂HPO₄ 10 mmol/l, pH 7.4) que contenía aproximadamente 10000 cpm de ¹²⁵I-[Tyr³⁶]-PTHRP(1-36) amida, en presencia o ausencia del mismo péptido frío. La columna se lavó con PBS conteniendo albúmina bovina (BSA) 0.1% y Triton X-100 0.1% (PBT), y posteriormente se eluyó con varias alícuotas de glicocola-HCl 200 mmol/l, pH 2.5 (glicocola-HCl). En ausencia de la PTHRP(1-36) fría, no apareció radiactividad en los lavados con PBT; sin embargo, el 95% de las cpm se recuperaban en los primeros 2 ml eluidos con glicocola-HCl.

La presencia de cantidades crecientes de péptido frío en el volumen de carga de la columna resultó en proporciones cada vez menores de radiactividad adsorbida inicialmente en la columna, de tal manera que el trazador eluible con glicocola-HCl disminuyó del 95% en ausencia del péptido frío, al 92, 48 y 36% en presencia de 1, 3 y 5 µg de [Tyr³⁶]-PTHRP(1-36) amida, respectivamente.

El extracto NaCl-etanol se resuspendió en PBS y se aplicó a la columna de inmunoafinidad; ésta se lavó secuencialmente (5 ml cada vez) con: PBT, PBS; NaCl 150 mmol/l y, finalmente, glicocola-HCl. A las fracciones eluidas con glicocola-HCl se les añadió ácido trifluoroacético (TFA) hasta una concentración final del 0.1%, almacenándolas posteriormente a -20°C.

Estas fracciones se repurificaron por HPLC, con una columna de fase reversa Vydac (C18, 4 x 250 mm), eluida con un gradiente lineal de acetonitrilo del 30 al 40% conteniendo TFA al 0.1%, a un flujo de 1 ml/min

durante 40 minutos. Se recogieron fracciones de 1 ml en las que se probó la ACSA.

3.5.4 Electroforesis y análisis por transferencia western

Estas fracciones de HPLC que contenían la ACSA se agruparon, se liofilizaron y una parte se aplicó a un gel de poliacrilamida-SDS (18 x 13 cm, 1.5 mm grosor), con un gradiente de concentración de acrilamida del 10 al 18%, desarrollando la electroforesis bajo una corriente eléctrica constante de 40 voltios durante una noche a temperatura ambiente [182]. Las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Richmond, CA, EEUU) mediante una corriente eléctrica constante de 80 voltios durante 30 minutos a 4°C. Para el análisis por transferencia western, se empleó BSA al 5% como bloqueante de los sitios de unión inespecífica, un antisuero de conejo contra PTHRP(1-74) [129] diluído 100 veces con PBS, como primer anticuerpo, y un antisuero de burro anti-IgG de conejo con partículas de oro coloidal como segundo anticuerpo (E.Y Labs, Inc, San Mateo, CA, EEUU) y un método de detección que incluye un revelador y un intensificador (Janssen Products, Olen, Bélgica) [181].

3.5.5 HPLC de exclusión molecular

Otra parte de las fracciones con ACSA tras la purificación por HPLC de fase reversa, se analizó por HPLC de exclusión molecular. Para ello se emplearon dos columnas conectadas en serie (Protein Pak I125 y SW300, Waters), utilizando como eluyente acetonitrilo 30% en agua, TFA 0.1%, a un flujo de 1 ml/min. Se recogieron fracciones de 0.5 ml en las que se determinó la ACSA y la inmunoreactividad de PTHRP con un radioinmunoensayo (RIA)

específico para PTHRP(1-36). En este RIA se emplea un antisuero de oveja diluído 1500 veces con PBS conteniendo BSA 10% y Triton X-100 0.1%, [Tyr³⁶]-PTHRP(1-36) amida como estándar y ¹²⁵I-[Tyr³⁶]-PTHRP(1-36) amida como trazador. La sensibilidad del ensayo fue 50-100 pmol/l [129].

3.6 Ensayo de estimulación de la adenilato ciclasa renal

La ACSA renal se midió en membranas aisladas a partir de corteza renal canina, en presencia de un análogo no hidrolizable del GTP, 5'-guanililimidodifosfato (GPP), como activador del sistema enzimático. En este ensayo se mide la conversión de [α -³²P]ATP en [³²P]AMPc [92].

3.6.1 Obtención de membranas corticales de riñón de perro

Para cada preparación de membranas se emplearon los dos riñones de un perro cimarrón procedente del animalario de la Fundación Jiménez Díaz. Una vez extraídos, los riñones se perfundieron con suero salino (NaCl 0.9%) con jeringa. Después se eliminó la médula, homogeneizando la corteza en sacarosa 0.25 mol/l, EDTA 1 mmol/l, Tris-HCl 5 mmol/l, pH 7.4 (tampón SET), 3 ml/g tejido, en un Potter de vidrio con pistón de teflón, mediante 10 golpes de 30 segundos a 2000 rpm, centrifugando a continuación 10 minutos a 1500 x g. El precipitado se resuspendió en sacarosa 2 mol/l, EDTA 1 mmol/l, Tris 5 mmol/l, pH 7.4, 1 ml/g tejido, y se centrifugó 10 minutos a 13000 x g. El sobrenadante obtenido se diluyó ocho veces con EDTA 1 mmol/l, Tris 5 mmol/l, pH 7.4, centrifugando a continuación 15 minutos a 20000 x g. El precipitado se lavó tres veces con tampón SET, resuspendiendo el precipitado final de membranas en el mismo tampón (0.4 ml/g corteza), almacenando las alícuotas a -70°C hasta su utilización. En todos los tampones para la preparación de

membranas se añadió un cóctel de inhibidores de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0.1 mmol/l, aprotinina 2.5 unidades inhibidoras de tripsina/ml, bacitracina 50 µg/ml). No se observó pérdida de actividad en las membranas congeladas, en un periodo de hasta 12 meses.

3.6.2 Ensayo de la adenilato ciclasa

Se emplearon como estándares el fragmento 1-34 de la PTH bovina (Peninsula Laboratories Europe, Ltd. Merseyside, GB) y de la PTHRP humana (Bachem Feinchemikalien AG, Bubendorf, Suiza). El medio de incubación contenía: Tris-HCl 50 mmol/l, pH 7.4; MgCl₂ 5 mmol/l; KCl 10 mmol/l; EGTA 1 mmol/l; BSA 1 mg/ml; un sistema regenerador de ATP consistente en fosfocreatina quinasa 40 U/ml y fosfocreatina 9 mmol/l; ATP-Na₂ 0.125 mmol/l; 1.85 kBq [α -³²P]ATP (1.1 TBq/mmol; Amersham); AMPc 1 mmol/l; ditiotritol 2 mmol/l; GPP 0.1 mmol/l y las membranas corticales. Las distintas muestras a probar (extractos tumorales, fracciones cromatográficas y diluciones de la PTH o de la PTHRP) se añadieron en volúmenes de 10 µl de ácido acético 10 mmol/l, BSA 1 mg/ml, resultando un volumen final por tubo de 70 µl. La reacción comenzó con la adición de la preparación de membranas (60 µg de proteína por tubo) y se mantuvo durante 30 minutos a 30°C. La reacción se terminó al añadir a cada tubo 100 µl de una solución de paro consistente en: Tris-HCl 50 mmol/l, pH 7.4; ATP-Na₂ 2 mmol/l; AMPc 0.5 mmol/l y 1.11 kBq [³H]AMPc (1.1 TBq/mmol; Amersham), para calcular las recuperaciones del ensayo, calentando a continuación la mezcla durante tres minutos en agua hirviendo. Después se añadieron 800 µl de agua destilada fría a cada tubo y se centrifugó 10 minutos a 3500 x g. Posteriormente, los sobrenadantes se aplicaron a columnas de Dowex AG 50W-X4 lavando con 2 ml de agua para eliminar el [³²P]ATP no utilizado. A

continuación se colocan las columnas de Dowex encima de otras con Alúmina neutra (Sigma, St. Louis, MO, EEUU), eluyendo el AMPc ($[^{32}\text{P}]\text{AMPc}$ y $[^3\text{H}]\text{AMPc}$) con 1 ml de agua y finalmente con 5 ml de imidazol 0.1 mmol/l [183]. La ACSA se expresa como porcentaje sobre la actividad basal (100%). Las recuperaciones del $[^3\text{H}]\text{AMPc}$ siempre fueron superiores al 70%.

3.7 Obtención de membranas de corteza renal de rata

Para la preparación de membranas lumbales (BBM) o basolaterales (BLM) de corteza renal de rata, se extirparon los riñones de al menos tres ratas controles o portadoras del tumor W256, tras un ayuno de 18 horas, en cada experimento. Después de decapsularlos, se cortaron en rodajas de unos 0.5 mm de grosor con microtomo Stadie-Riggs (Arthur Thomas Co, Philadelphia, PA, EEUU), separando la médula de la corteza con una hoja de bisturí.

3.7.1 Membranas lumbales

Las BBM de corteza renal de rata se obtuvieron según la técnica de Hammerman y Hruska [184]. Tras separar la médula de la corteza renal como se ha indicado anteriormente, esta última se homogeneizó en manitol 0.24 mol/l, MgCl_2 10 mmol/l, KF 10 mmol/l, Tris-Hepes 5 mmol/l, pH 6.5, 20 ml/g tejido, mediante 10 golpes de 30 segundos a 2000 rpm en Potter de vidrio con pistón de teflón, seguido de 3 pulsos de 20 segundos a velocidad máxima con Politron X1020 (Ystral GmbH, Dottingen, Alemania). El homogeneizado así obtenido se agitó durante 20 minutos a 4°C, centrifugando posteriormente 15 minutos a 3000 x g. El sobrenadante se centrifugó a su vez durante 20 minutos a 35000 x g, obteniendo un precipitado constituido mayoritariamente por vesículas de BBM que se lavó tres veces con el tampón de homogeneización

anterior. El precipitado final obtenido se resuspendió en 1 ml del mismo tampón, empleándose a continuación en los experimentos de transporte de calcio.

3.7.2 Membranas basolaterales

Las BLM de corteza renal de rata se obtuvieron por centrifugación en gradiente de Percoll, según la técnica de Scalera y cols. [185]. Tras separar la médula de la corteza renal como se ha descrito, esta última se diluyó en tampón SET (20 ml/g tejido), homogeneizándose a continuación como se ha descrito para las BBM. El homogeneizado de corteza resultante se centrifugó 15 minutos a 4500 x g. El sobrenadante se centrifugó 20 minutos a 20000 x g, obteniéndose un precipitado oscuro y sólido rodeado de otro claro y blando. Este último se resuspendió en 32.2 ml de tampón SET y se homogeneizó mediante cinco golpes de 30 segundos a 2000 rpm en Potter de vidrio con pistón de teflón, tras lo cual se añadieron 2.8 ml de Percoll (Pharmacia) para obtener una concentración final de Percoll del 8 %, centrifugando 30 minutos a 48000 x g.

Las fracciones en las que se dividió el gradiente de Percoll se diluyeron cinco veces con KCl 150 mmol/l, Tris-Hepes 10 mmol/l, pH 7.4 (tampón KCl-Tris-Hepes), y se centrifugaron 30 minutos a 48000 x g. Se valoraron las actividades enzimáticas correspondientes (ver más adelante) en los precipitados obtenidos resuspendidos en KCl-Tris-Hepes, fácilmente separables del Percoll, que queda como una lenteja cristalina en el fondo del tubo. Las BLM aparecían entre los mililitros 7 y 12 del gradiente (desde el menisco). Esta fracción que contenía mayoritariamente las BLM, se resuspendió en 1-2 ml de KCl-Tris-Hepes, utilizándose inmediatamente en los diferentes experimentos.

3.8 Caracterización de las preparaciones de membrana luminal y basolateral de corteza renal de rata

3.8.1 Marcadores enzimáticos

Para caracterizar las preparaciones de BBM y BLM se emplearon las actividades de la fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1), como marcador de BBM, y de la Na⁺/K⁺-ATPasa (EC 3.6.1.4), como marcador de BLM.

La fosfatasa alcalina se determinó según el método de Lowry y cols. [186], valorando colorimétricamente (a 405 nm) la transformación de p-nitrofenilfosfato 10 mmol/l en p-nitrofenol, durante 15 minutos a 37°C.

La actividad Na⁺/K⁺-ATPasa se determinó a 37°C en un tampón de reacción que contenía: ATP-Na₂ 4 mmol/l, NaCl 0.1 mol/l, KCl 15 mmol/l, NaN₃ 5 mmol/l, EGTA 0.5 mmol/l, MgCl₂ 4 mmol/l, imidazol 30 mmol/l, pH 7.4. La actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa se calculó como la diferencia entre la ATPasa total y la actividad obtenida en presencia de ouabaina 0.1 mmol/l, tras 15 minutos de incubación.

3.8.2 Orientación de las vesículas de membrana basolateral

Al no haber ningún marcador enzimático conocido con asimetría en la BBM del túbulo renal, no se puede valorar la orientación de las vesículas de este tipo de membrana. Además, el transporte de calcio en la membrana luminal de la célula renal es dependiente del gradiente electroquímico; por tanto puede ocurrir en cualquier sentido según las condiciones experimentales.

La orientación de las BLM se analizó de manera similar a Windus y cols. [187]. La orientación se dedujo debido a la asimetría de la Na⁺/K⁺-ATPasa, de modo que en membranas orientadas naturalmente ("right side out"), la ouabaina actúa sobre la enzima desde el exterior de la vesícula, mientras

que el ATP sólo puede actuar desde el interior; esto determina que en estas vesículas no haya actividad Na^+/K^+ -ATPasa detectable al no ser accesible el sitio de unión del ATP. En cambio, esta actividad enzimática sí es detectable en las vesículas con orientación antinatural ("inside out"), al estar el sitio de unión del ATP expuesto hacia el exterior de la vesícula, en contacto con el medio de incubación (figura 6).

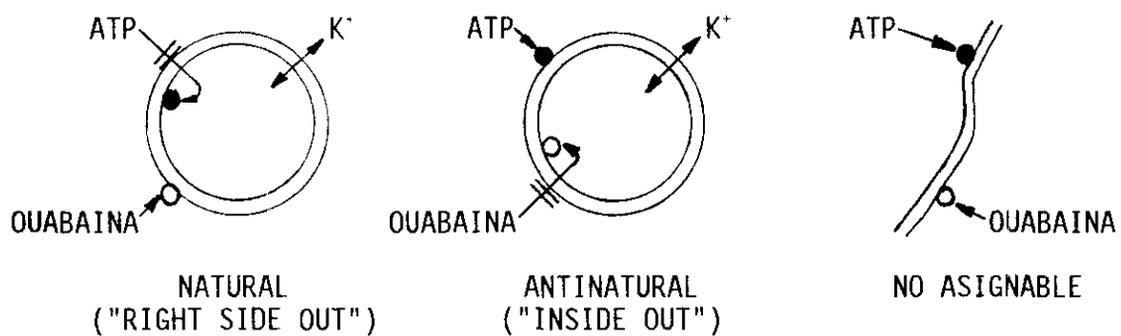


Figura 6: Posibles orientaciones de la membrana basolateral. Ver el texto para la explicación.

Las BLM resuspendidas en tampón KCl-Tris-Hepes, se rompieron tras una incubación de 15 minutos a 37°C con deoxicolato sódico 0.4 mg/ml, y posterior congelación a -70°C y descongelación inmediata. La ATPasa total y la actividad ATPasa sensible a ouabaina (Diferencia = Na^+/K^+ -ATPasa), se midieron antes y después del tratamiento.

El porcentaje de vesículas en las que la orientación no se pudo asignar (por rotura o fallo en la formación de la vesícula) se determinó por el cociente:

$$100 \times \frac{\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPasa antes del tratamiento}}{\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPasa después del tratamiento}}$$

El porcentaje de vesículas antinaturales se determinó por el cociente:

$$100 \times \frac{\text{ATPasa total antes del tratamiento}}{\text{ATPasa total después del tratamiento}} - \% \text{ no asignable}$$

El porcentaje de vesículas cerradas naturalmente se determinó por la diferencia:

$$100 - \% \text{ antinatural} - \% \text{ no asignable}$$

Para emplear esta técnica hay que asumir: 1) que el ATP y la ouabaina no son permeables en las vesículas cerradas correctamente; 2) que el tratamiento con deoxicolato y un ciclo de congelación y descongelación abre completamente las vesículas, y 3) que el deoxicolato no inhibe la actividad ATPasa [187].

3.8.3 Volumen de las vesículas de membrana basolateral

Para estimar el volumen de las vesículas de BLM, se determinó la captación de D-glucosa 0.1 mmol/l (74 kBq D-(6-¹⁴C)-glucosa; 1.85 TBq/mol; New England Nuclear, Boston, MA, EEUU) en la solución empleada para la captación de calcio (ver más adelante), pero sin calcio y sin ATP, tras 45 minutos a

25°C. La captación de glucosa se detuvo por dilución en la misma solución a 4°C, filtrando posteriormente la mezcla de incubación a través de filtros de acetato de celulosa de 0.45 µm de diámetro de poro.

3.8.4 Microscopía electrónica

Las muestras de BBM o de BLM se fijaron con glutaraldehído 2.5% y tetróxido de osmio 2%. Posteriormente, se deshidrataron con concentraciones crecientes de acetona y se incluyeron en Vestopal W (Embedding Material, Ginebra, Suiza). Se realizaron cortes de 300-400 Å de espesor mediante un ultratomo que fueron teñidos posteriormente con citrato de plomo y acetato de uranilo, y finalmente, se examinaron con un microscopio electrónico Hitachi HU 12A.

3.9 Transporte de calcio en membranas corticales de riñón de rata

3.9.1 Transporte de calcio en la membrana luminal

La captación de calcio por las vesículas de BBM se realizó a 25°C en un volumen final de 0.5 ml de manitol 0.24 mol/l, MgCl₂ 1 mmol/l, KF 1 mmol/l, Tris-Hepes 20 mmol/l, pH 7.4, CaCl₂ 50 µmol/l (37 kBq ⁴⁵CaCl₂, 0.66-1.28 TBq/g, New England Nuclear) [44]. La reacción comenzó con la adición de la preparación de membranas (300-600 µg proteína). A diferentes tiempos, una alícuota de la mezcla de reacción se diluyó 20 veces con solución de paro a 4°C, consistente en: LaCl₃ 0.5 mmol/l, manitol 0.24 mol/l, Tris-Hepes 20 mmol/l, pH 7.4, filtrándose inmediatamente a través de filtros de acetato de celulosa de 0.45 µm de diámetro de poro, y lavando a continuación con otros 3 ml de solución de paro. Tras dejar secar al aire los filtros, las membranas se solubilizaron con 5 ml de líquido de centelleo, contándose la radiactividad

en un contador de radiación β . Para todos los cálculos, se descontó la radiactividad acumulada inespecíficamente en los filtros.

3.9.2 Transporte de calcio en la membrana basolateral

La captación de calcio por vesículas de BLM se realizó a 25°C en un volumen final de 0.5 ml de KCl 0.15 mol/l, MgCl₂ 2 mmol/l, Tris-Hepes 10 mmol/l, pH 7.4, CaCl₂ 50 μ mol/l (37 kBq ⁴⁵CaCl₂) en presencia o no de ATP-Mg 2 mmol/l [188]. La reacción comenzó con la adición de la preparación de membranas (40-80 μ g proteína). La reacción se detuvo a diferentes tiempos como se ha descrito en el apartado anterior, aunque en este caso la solución de paro a 4°C consistía en tampón KCl-Tris-Hepes conteniendo LaCl₃ 0.5 mmol/l.

Para estudiar la cinética de captación de calcio dependiente de ATP por las vesículas de BLM, las diferentes concentraciones de Ca²⁺ del medio de incubación se ajustaron experimentalmente añadiendo EGTA 0.1 mmol/l, y se comprobaron mediante espectrofluorometría con fura-2 [189], .

En algunos experimentos, se sustituyó el KCl del medio de incubación por la misma concentración de NaCl, para estudiar el efecto del sodio sobre la captación de calcio dependiente de ATP por las vesículas de BLM.

3.10 Preparación de túbulos de corteza renal de rata

En algunos casos se prepararon túbulos renales a partir de ratas controles (5 al menos) por digestión de la corteza renal con colagenasa tipo I (2 mg/ml en solución de Krebs-Henseleit, 1.2 mmol/l CaCl₂) durante 30-45 minutos a 37°C [190]. Los túbulos aislados se resuspendieron en solución de Krebs-Henseleit y se incubaron 30 minutos a 37°C en presencia o no de N⁶,2'-0-

dibutiril AMPc (Bt₂ AMPc) 0.1 mmol/l o PTHRP(1-34) 0.1 μmol/l. Tras la incubación, se prepararon las BLM y se midió el transporte de calcio como se ha descrito anteriormente.

En algunos experimentos, se determinó la actividad de la adenilato ciclasa en las membranas procedentes de los túbulos corticales que habían sido o no preestimulados con PTHRP(1-34) como se describe más arriba. Las BLM (15-30 μg de proteína) se incubaron con diversos agonistas durante 30 minutos a 30°C en el mismo medio citado en el ensayo de adenilato ciclasa de membranas corticales de perro, aunque en este caso no contenía [³²P]ATP ni AMPc, en un volumen total de 0.1 ml. La reacción se detuvo por dilución al añadir 0.9 ml de suero salino frío y posterior incubación durante tres minutos en agua hirviendo. Tras centrifugar durante 15 minutos a 3500 x g, el AMPc del sobrenadante se midió con un enzoinmunoensayo específico (Biotrak, Amersham).

3.11 Valoración de proteínas

Las proteínas de los extractos tumorales, fracciones cromatográficas y preparaciones de túbulos y membranas se determinaron por el método de Bradford [191], con BSA como estándar.

3.12 Estadística

Los valores de los experimentos "in vivo" se expresan como media ± E.E.M.

Los valores de los experimentos "in vitro" se expresan como media ± D.E.

Las diferencias estadísticas se valoraron por análisis de la

varianza seguido de la comparación múltiple de medias por la prueba de Scheffé, o por la prueba de la "t" de Student, considerando en cada caso como nivel mínimo de significación $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 Características del síndrome de hipercalcemia tumoral de origen humoral en la rata portadora del tumor W256

La figura 7 muestra el crecimiento del tumor W256 a lo largo de los días tras su implante en la rata. El tumor comenzaba a apreciarse a los siete días, describiendo una curva de crecimiento exponencial, hasta llegar a un máximo a los 14-16 días después del implante.

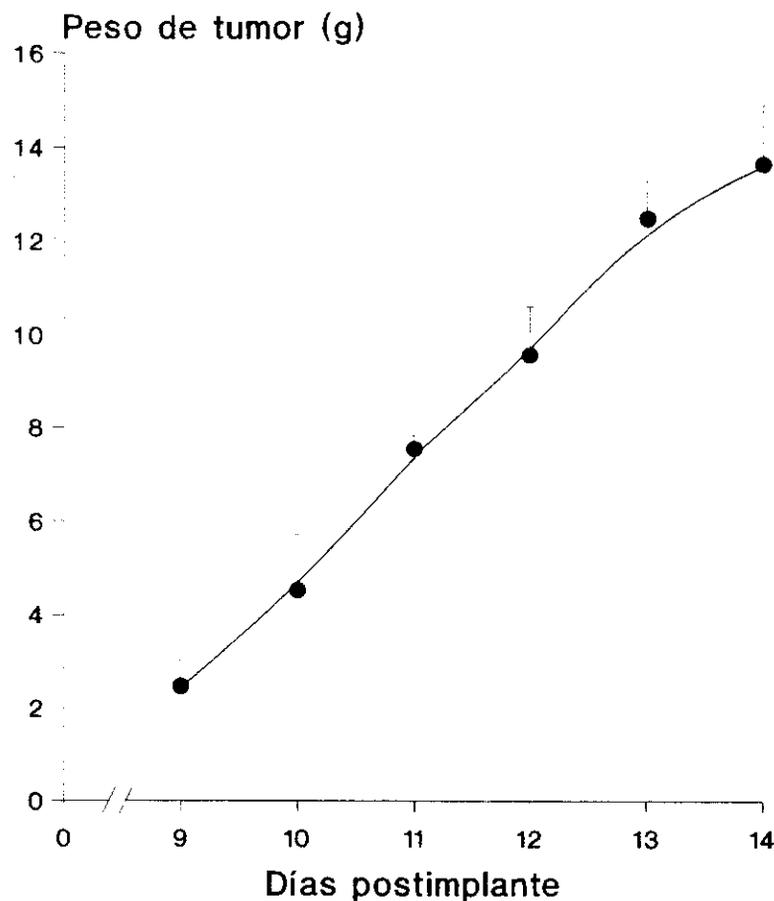


Figura 7: Crecimiento del tumor de Walker 256 tras su implante subcutáneo en la rata. Cada punto representa media \pm E.E.M. de al menos seis determinaciones.

La figura 8 ilustra los cambios inducidos por el tumor W256 en el calcio y en el fosfato en suero y en orina de las ratas huésped, en función de los días tras el implante.

A los nueve días, el calcio en suero ya era significativamente mayor que el del grupo control, aunque sin sobrepasar el límite de normalidad (2.6 mmol/l). A los 11 días, las ratas ya eran francamente hipercalcémicas, aumentando aún más los niveles de calcio en suero al seguir creciendo el tumor. Este incremento en el calcio sérico se traducía en un aumento de la excreción urinaria de este catión, siendo significativamente mayor que la del grupo control ya desde el noveno día después del implante, aumentando a medida que se incrementaba la calcemia.

El tumor W256 provoca una disminución en la reabsorción tubular de fosfato en la rata portadora, observándose hiperfosfaturia significativa frente al grupo control desde el día 11 tras el implante. Esta excesiva eliminación de fosfato induce un descenso en los niveles séricos de este anión, significativo frente al grupo control también desde el día 11 tras el implante.

En la tabla I se muestran otras características bioquímicas de las ratas portadoras del tumor W256 a los 11-12 días tras el implante. Con un tumor de unos 10 g de peso medio, las ratas tienen una función renal normal, según el aclaramiento de creatinina. Además, presentan un aumento significativo frente al grupo control en la excreción de hidroxiprolina y un aumento, también significativo frente al grupo control, en la excreción urinaria de AMPc.

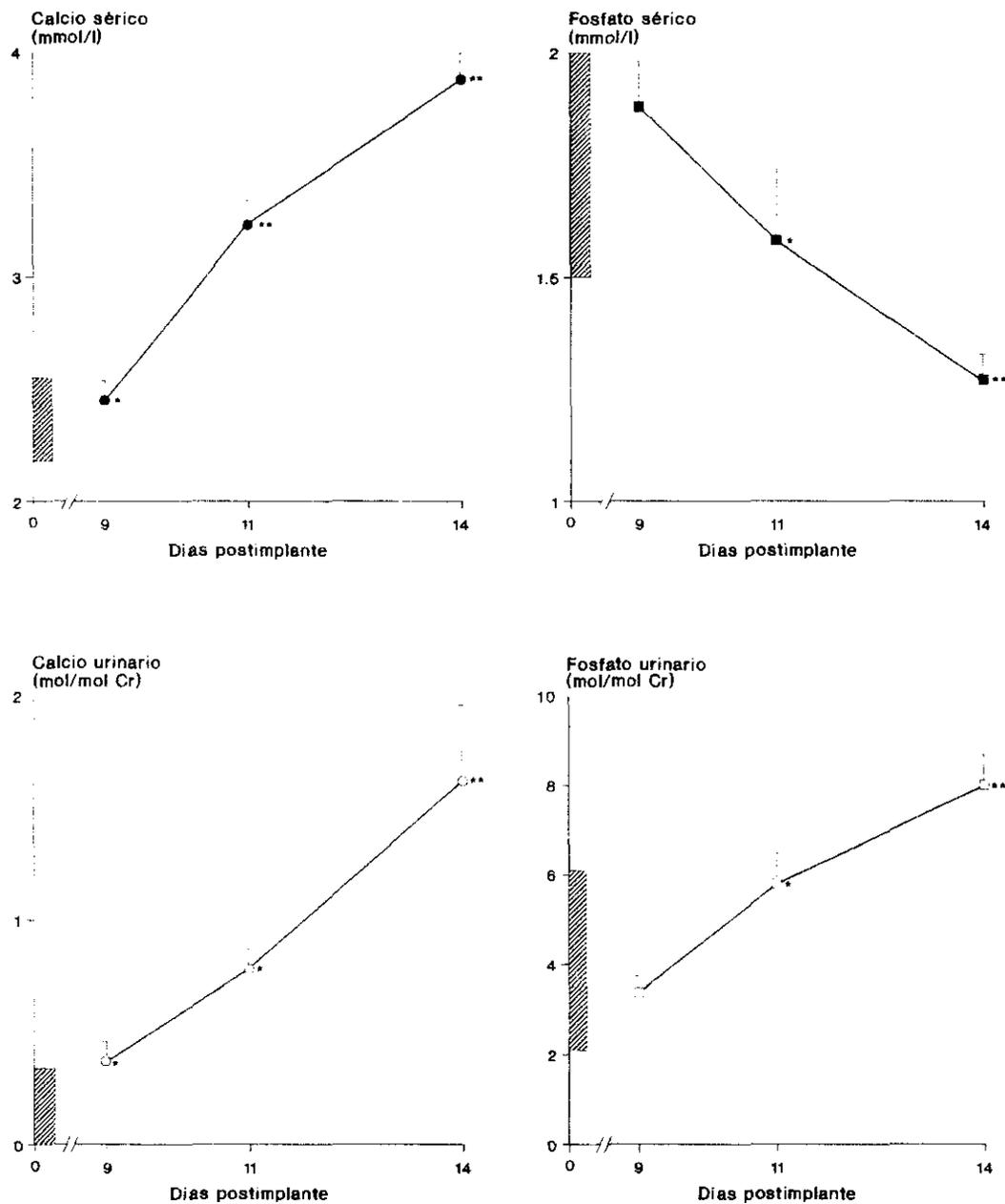


Figura 8: Cambios en el calcio y en el fosfato en suero y en orina de ratas portadoras del tumor de Walker 256 tras su implante subcutáneo. Las áreas rayadas representan los rangos de normalidad. Cada punto representa media \pm E.E.M. de al menos diez determinaciones. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, comparado con el grupo control.

Tabla I: Otras características bioquímicas de las ratas portadoras del tumor de Walker 256 a los 11-12 días tras el implante subcutáneo.

	CCr (ml/min)	HO-Pro/Cr (mmol/mol)	AMPc/Cr (mol/mol)	Peso tumor (g)
Control	0.70 ± 0.03	40 ± 3	1.1 ± 0.1	—
Walker 256	0.75 ± 0.22	64 ± 7**	2.0 ± 0.3*	10.2 ± 2.0

Los valores representan media ± E.E.M. de al menos seis determinaciones. *p<0.05; **p<0.01, comparado con el grupo control.

Los fémures de rata portadora del tumor W256 en el mismo período de tiempo después del implante, no mostraron signos de metástasis tumoral, por criterios radiológicos y anatomopatológicos. En cambio, presentaron un marcado aumento del número de osteoclastos y de las superficies de resorción, especialmente en la zona cortical (10 y 5 veces mayor que en el hueso normal, respectivamente) (figura 9). Al mismo tiempo, en el hueso de rata con tumor W256, el volumen trabecular era una o dos veces inferior al del hueso normal.

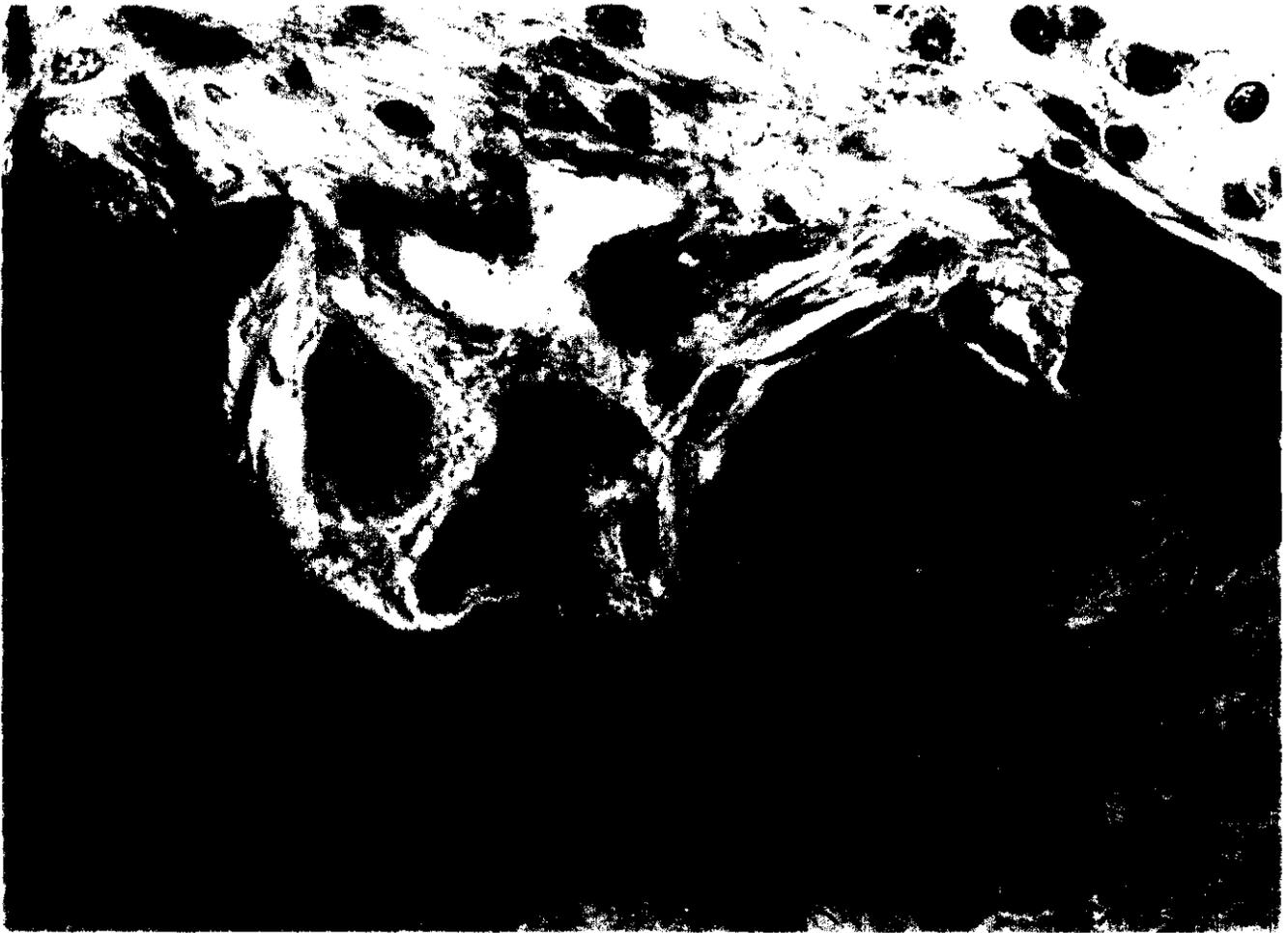


Figura 9: Superficie cortical interna del fémur de una rata portadora del tumor de Walker 256 a los 12 días tras el implante subcutáneo. Se observan numerosos osteoclastos en una laguna de Howship (tricromico de Goldner, 400x)

4.2 Estudio del papel del riñón en la génesis de la hipercalcemia en ratas portadoras del tumor W256

En la tabla II aparecen los parámetros bioquímicos en suero y en orina de ratas portadoras del tumor W256 en diferentes estadios de crecimiento del tumor. En el período inicial, cuando el tumor tenía un peso medio de unos 4 g (grupo I), el calcio sérico era aún normal y la excreción urinaria de calcio era elevada, aunque no significativamente al compararla con la del grupo control. La excreción urinaria de magnesio era tres veces mayor que la del grupo control, aunque los niveles de este catión en suero eran normales. La excreción urinaria de hidroxiprolina también estaba elevada en este grupo frente al control, aunque no de forma significativa.

En el siguiente período estudiado, cuando el tumor había alcanzado un peso medio de unos 5 g (grupo II), las ratas portadoras presentaban una hipercalcemia leve mientras que la excreción urinaria de calcio había descendido casi hasta el valor del grupo control. Los demás parámetros bioquímicos estudiados permanecían como los del grupo I.

Cuando el tumor alcanzaba un peso medio de unos 9 g (grupo III), observamos hipercalcemia e hipercalciuria en las ratas portadoras. Además, éstas presentaban hipofosfatemia (1.51 ± 0.1 mmol/l frente a 1.98 ± 0.06 mmol/l en el grupo control, media \pm E.E.M., $p < 0.01$) e hiperfosfaturia (6.77 ± 0.43 mol/mol Cr frente a 4.09 ± 0.29 mol/mol Cr en el grupo control, media \pm E.E.M., $p < 0.01$). El magnesio sérico y el urinario permanecían igual que en los otros grupos estudiados, mientras que la excreción urinaria de hidroxiprolina era significativamente mayor que la del grupo control.

Tabla II: Cambios en parámetros bioquímicos en suero y en orina de ratas normales y portadoras del tumor de Walker 256 en diferentes estadios de crecimiento.

	Suero		Orina			
	Ca (mmol/l)	Mg (mmol/l)	Ca/Cr (mol/mol)	Mg/Cr (mol/mol)	HO-Pro/Cr (mmol/mol)	CCr (ml/min)
Control	2.37 ± 0.02	0.93 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.43 ± 0.04	42.0 ± 2.8	0.70 ± 0.30
Grupo I	2.45 ± 0.02#	0.92 ± 0.03	0.53 ± 0.07#	1.22 ± 0.18**	58.0 ± 7.3	0.57 ± 0.07
Grupo II	2.78 ± 0.03*#	0.95 ± 0.02	0.12 ± 0.01#	1.04 ± 0.13*	43.4 ± 3.6	0.81 ± 0.12
Grupo III	3.39 ± 0.08**	0.95 ± 0.03	1.16 ± 0.16**	1.36 ± 0.08**	69.8 ± 6.8*	0.75 ± 0.08

Los valores representan media ± E.E.M. de al menos cinco determinaciones. *p<0.05; **p<0.01, comparado con el grupo control. #p<0.01, comparado con el grupo III.

Tras la eliminación del tumor (tabla III), la excreción urinaria de calcio disminuyó significativamente frente al valor preoperatorio en el grupo I, mientras que aumentó, también significativamente, en los grupos II y III. Los cambios en el calcio sérico tras extirpar el tumor tendieron a la normalización de la calcemia en los tres grupos estudiados. La excreción urinaria de magnesio disminuyó en los tres grupos, aunque no llegó a los niveles del grupo control, y en los grupos II y III apareció hipomagnesemia tras la extirpación del tumor. La eliminación de fosfato elevada del grupo III descendió a una cifra media en el rango inferior de la normalidad tras extirpar el tumor (de 8.00 ± 0.65 mol/mol Cr a 2.35 ± 0.70 mol/mol Cr, valores pre y postoperatorio, respectivamente, media \pm E.E.M., $p < 0.01$).

En este grupo III, la excreción urinaria de AMPc descendió de 1.7 ± 0.3 mol/mol Cr a 0.8 ± 0.1 mol/mol Cr (media \pm E.E.M., $p < 0.05$) tras la eliminación del tumor. En ninguno de los tres grupos se observaron cambios en la excreción urinaria de hidroxiprolina tras la cirugía.

Tabla III: Cambios en los parámetros bioquímicos en suero y en orina de ratas portadoras del tumor de Walker 256 tras extirpar el tumor.

		Suero		Orina	
		Ca (mmol/l)	Mg (mmol/l)	Ca/Cr (mol/mol)	Mg/Cr (mol/mol)
Grupo I	Pre	2.47 ± 0.04	0.99 ± 0.02	0.59 ± 0.11	1.21 ± 0.28
	Post	2.45 ± 0.03	0.95 ± 0.04	0.23 ± 0.07**	0.60 ± 0.09*
Grupo II	Pre	2.67 ± 0.07	0.95 ± 0.04	0.11 ± 0.03	0.83 ± 0.04
	Post	2.45 ± 0.04	0.84 ± 0.02*	0.51 ± 0.12**	0.74 ± 0.02
Grupo III	Pre	3.50 ± 0.39	0.99 ± 0.07	0.76 ± 0.23	1.76 ± 0.25
	Post	2.55 ± 0.06*	0.83 ± 0.04*	1.67 ± 0.44*	0.97 ± 0.25*

Cada valor representa media ± E.E.M. de al menos cinco determinaciones.
*p<0.05; **p<0.01, comparado con el periodo preoperatorio.

4.3 Purificación de la PTHRP de extractos del tumor W256

En los primeros trabajos sobre el aislamiento del factor (o factores) responsable de la hipercalcemia en el síndrome de HTH, se empleaba como criterio de purificación la ACSA renal, ya que los pacientes con este síndrome presentan una elevada excreción urinaria de AMPc nefrogénico.

Diluciones seriadas de los extractos tumorales en diferentes estadios del procedimiento de purificación, mostraban curvas dosis-respuesta de ACSA paralelas a las de PTH(1-34) y PTHRP(1-34) (figura 10).

Como se ha mencionado en el apartado de Materiales y Métodos, para la purificación de la PTHRP del tumor W256 empleamos un método de purificación por inmunoafinidad, a partir del extracto NaCl-etanol del tumor W256. Como se muestra en la figura 11, la ACSA en las fracciones eluidas de la columna de inmunoafinidad con glicocola-HCl aparecía entre el 34% y el 36% de acetonitrilo, al ser purificadas por HPLC de fase reversa.

Las fracciones de HPLC con actividad fueron agrupadas y analizadas por transferencia western, apareciendo una única banda con un peso molecular aparente (M_r) de 18000 (figura 12). Cuando parte de la actividad eluida con glicocola-HCl de la columna de inmunoafinidad se procesaba por HPLC de exclusión molecular, se obtenía un M_r similar, detectando la actividad de PTHRP por el ensayo de ACSA y por un radioinmunoensayo específico para PTHRP(1-36) (figura 13). La recuperación de la bioactividad de PTHRP tras el último paso por HPLC de fase reversa fue del 5%.

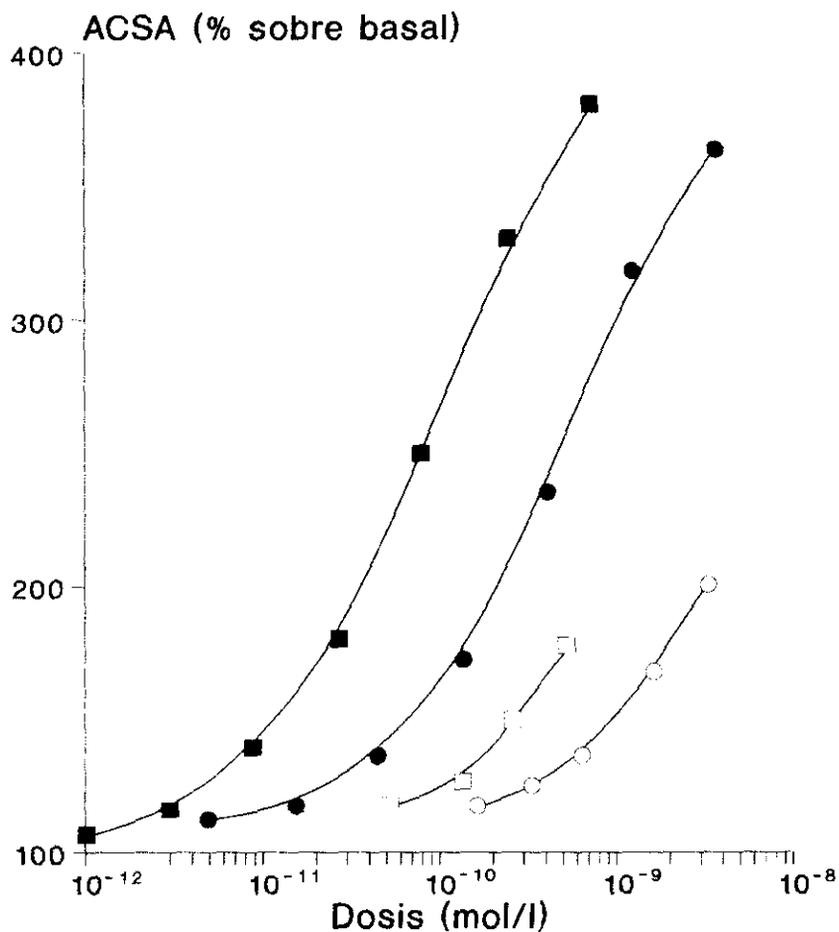


Figura 10: Actividad estimuladora de la adenilato ciclasa de bPTH(1-34) (■), hPTH(1-34) (●), extracto urea-HCl (○) y extracto NaCl-etanol (□). Las curvas de las muestras procedentes del tumor W256 están situadas en la gráfica en posiciones arbitrarias, y las veces que se diluyeron oscilaron en los rangos 16-300 (○) y 8-80 (□). Los valores son medias de 2-3 determinaciones por duplicado. La desviación estándar de cada valor fue siempre menor del tamaño del símbolo.

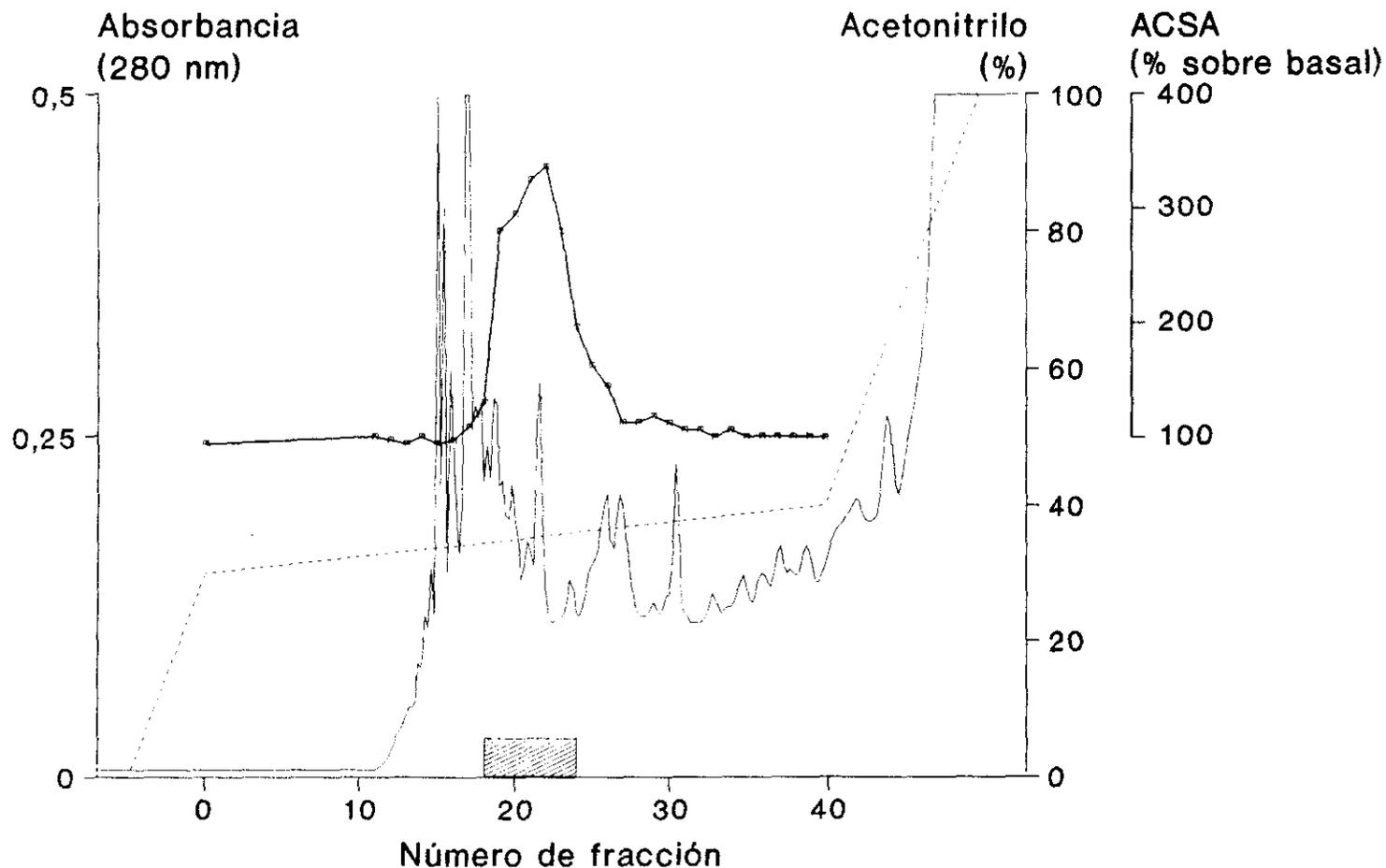


Figura 11: Actividad estimuladora de la adenilato ciclasa (ACSA) tras la purificación por HPLC de fase reversa de las fracciones eluidas con glicocola-HCl de la columna de inmunoafinidad. La muestra se eluyó con un gradiente lineal del 30% al 40% de acetonitrilo en agua conteniendo ácido trifluoroacético al 0.1%. La zona rayada representa el conjunto de fracciones con ACSA.

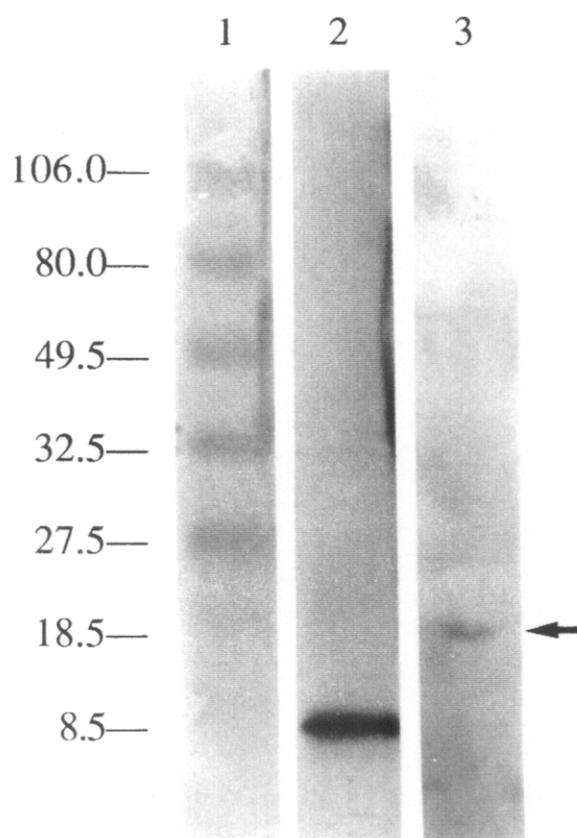


Figura 12: *Trasferencia western del conjunto de fracciones con ACSA tras HPLC de fase reversa del eluido con glicocola-HCl procedente de la columna de inmunoafinidad. Se observa una única banda correspondiente a unos 18 kDa (calle 3). En la calle 2, 100 ng de PTHRP(1-74) sintético (8.5 kDa) [118]. En la calle 1, estándares de peso molecular preteñidos (Bio-Rad): fosforilasa B (106 kDa), BSA (80 kDa), ovoalbúmina (49.5 kDa), anhidrasa carbónica (32.5 kDa), inhibidor de tripsina de soja (27.5 kDa) y lisozima (18.5 kDa).*

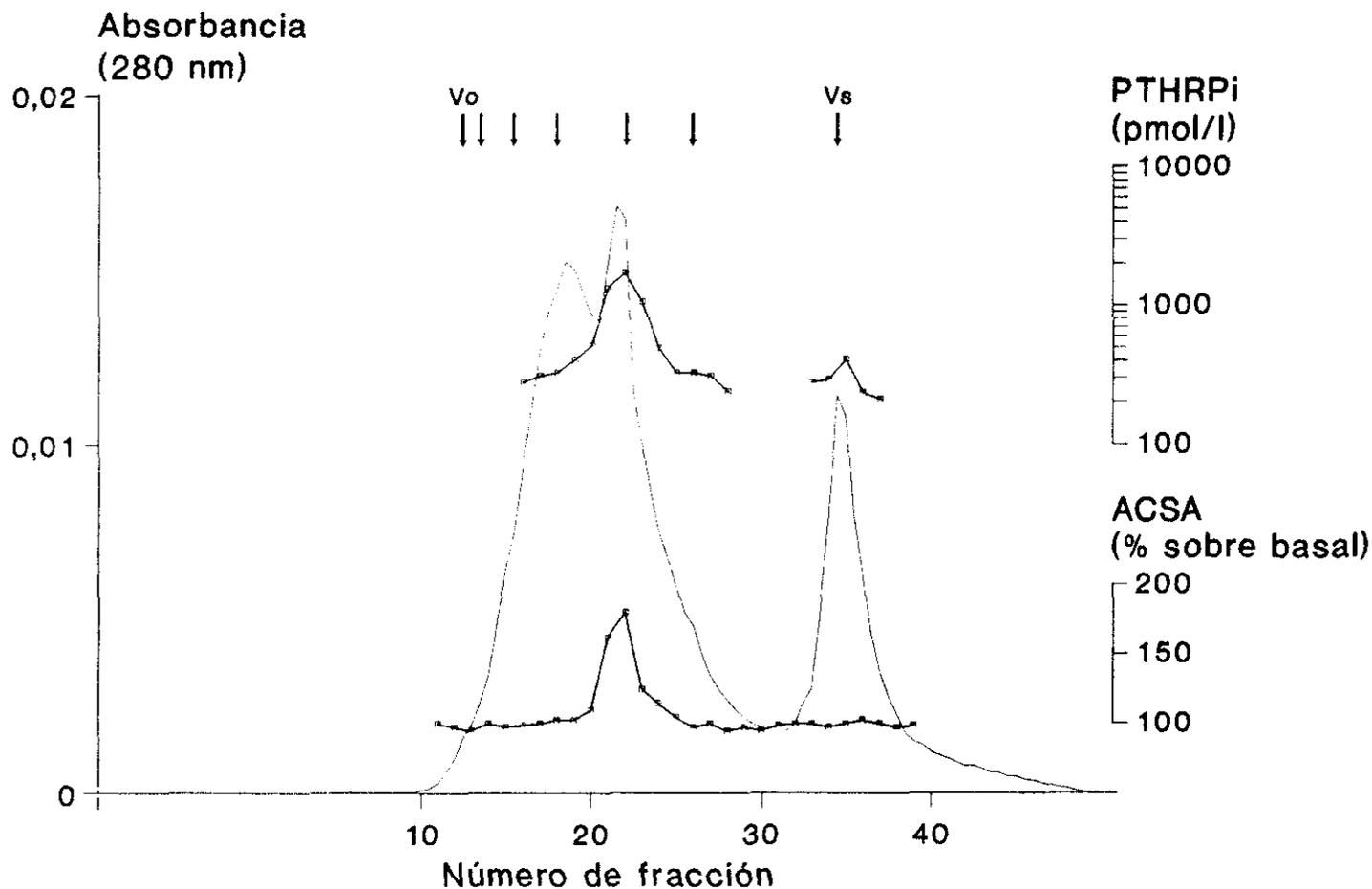


Figura 13: Actividad estimuladora de la adenilato ciclasa (ACSA) e inmunoreactividad de PTHRP (PTHRPi) tras HPLC de exclusión molecular de parte de las fracciones eluidas con glicocola-HCl de la columna de inmunoafinidad. La muestra se eluyó con acetonitrilo al 30% en agua conteniendo ácido trifluoroacético al 0.1%. Como estándares de peso molecular se emplearon: ferritina (Vo), BSA (66 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina de soja (21.5 kDa), lisozima (14.4 kDa), insulina (5.6 kDa) y guanosina (Vs).

4.4 Estudio del mecanismo del aumento de la reabsorción renal de calcio en ratas portadoras del tumor W256

4.4.1 Caracterización de las preparaciones de BBM y de BLM

La figura 14 representa la distribución de los marcadores enzimáticos de BBM (fosfatasa alcalina) y de BLM (Na^+/K^+ -ATPasa) a lo largo del gradiente de Percoll. La mayor actividad del marcador de BLM se encontraba entre los mililitros 4 y 12 desde el menisco.

En la tabla IV aparecen los marcadores enzimáticos de las preparaciones de BBM y de BLM. La preparación obtenida después de precipitar con MgCl_2 (ver Materiales y Métodos), presentaba un enriquecimiento de unas 11 veces en la actividad de fosfatasa alcalina frente a la actividad en el homogeneizado de corteza, mientras que había una notable pérdida en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa. En las membranas obtenidas por centrifugación en gradiente de Percoll (ver Materiales y Métodos), se observaba un enriquecimiento (unas 15 veces) en la actividad Na^+/K^+ -ATPasa, aunque en este caso existía una contaminación apreciable ($\leq 20\%$) de membrana luminal.

La tabla V muestra los cambios en el contenido de proteínas en el riñón de ratas portadoras del tumor W256 comparado con el de ratas controles. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de proteínas de la corteza renal entre el grupo experimental y el control. Sin embargo, el contenido proteico de las BBM se encontró significativamente disminuido en las preparaciones de ratas portadoras del tumor W256 comparado con las preparaciones correspondientes a ratas controles. No encontramos diferencias significativas en el contenido de proteína entre las preparaciones de BLM de ratas portadoras del tumor W256 y ratas controles.

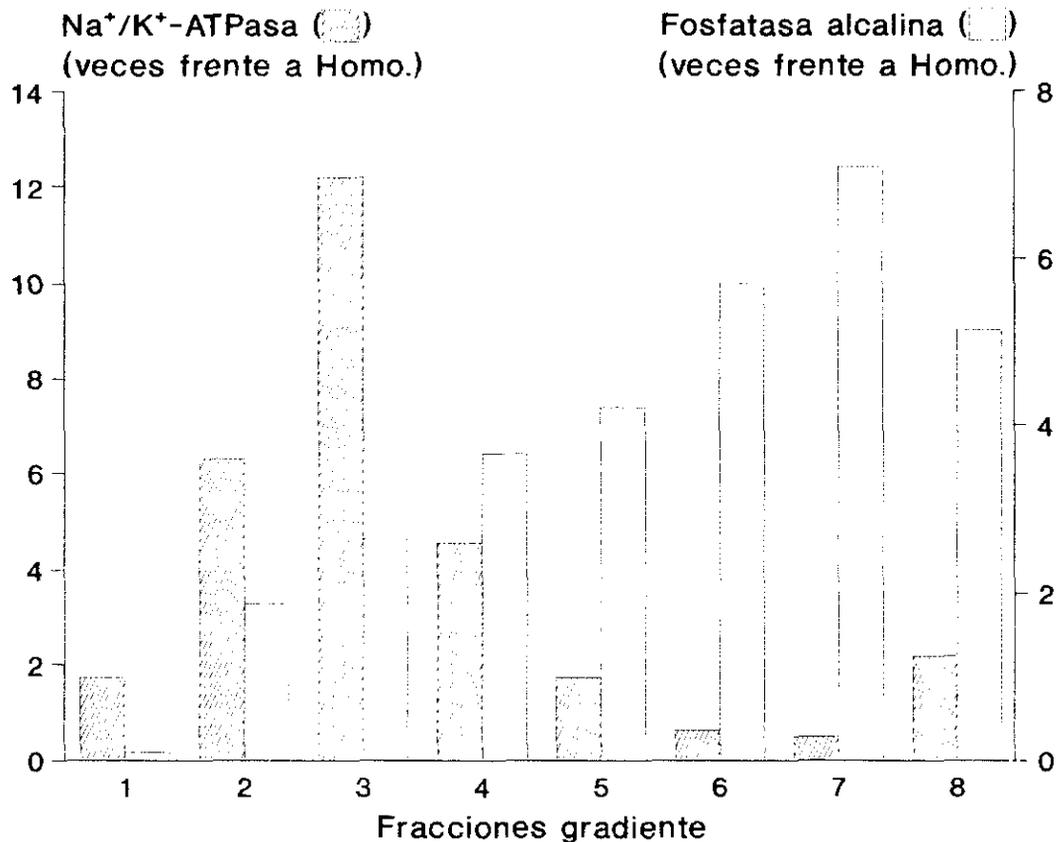


Figura 14: Distribución de marcadores enzimáticos de BBM y de BLM en el gradiente de Percoll. El gradiente (35 ml) se dividió en fracciones de 4 ml. Las actividades de cada fracción se expresan como veces de purificación frente a la actividad enzimática en el homogeneizado de corteza ($0.35 \pm 0.16 \mu\text{mol}/\text{mg prote\u00edna} \times \text{min}$ para la fosfatasa alcalina y $5.41 \pm 1.40 \mu\text{mol}/\text{mg prote\u00edna} \times \text{h}$ para la Na⁺/K⁺-ATPasa). Para las preparaciones de BLM de los diferentes experimentos, se eligieron del mililitro 7 al 12 desde el menisco.

Tabla IV: Análisis de los marcadores enzimáticos de BBM y de BLM de corteza renal de rata.

	Homogeneizado de corteza renal	BBM	BLM
Fosfatasa Alcalina ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína x min)	0.35 ± 0.16	3.97 ± 0.21 (11.3)	1.07 ± 0.35 (3.1)
Na^+/K^+ -ATPasa ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína x h)	5.41 ± 1.40	0.92 ± 0.27 (0.2)	80.83 ± 25.16 (15.0)

Los números entre paréntesis reflejan las veces de purificación, definida como la actividad específica en la membrana correspondiente respecto a la del homogeneizado de corteza. Los valores representan media \pm D.E. de cuatro preparaciones de BBM y 23 de BLM. Estos valores eran similares en membranas procedentes de ratas portadoras del tumor de Walker 256.

Tabla V: Cambios en el contenido de proteínas en el riñón de ratas portadoras del tumor W256 comparado con el de animales controles.

	Corteza renal (mg/g corteza)	BBM (mg/g corteza)	BLM (mg/g corteza)
Control	141.7 ± 17.4 (27)	4.4 ± 0.8 (4)	1.3 ± 0.2 (23)
W256	141.2 ± 26.9 (22)	2.9 ± 0.5* (4)	1.1 ± 0.4 (18)

Los valores representan media ± D.E.; entre paréntesis aparece el número de determinaciones para cada caso. *p < 0.05 frente al grupo control.

El análisis de las preparaciones de membranas por microscopía electrónica reveló la ausencia de mitocondrias y de otros orgánulos subcelulares, y la presencia predominante de formas vesiculares con un diámetro de 0.1-0.3 μm para las BBM y de 0.3-1.0 μm para las BLM (figura 15a y b, respectivamente).

En cuanto a la orientación de las vesículas de BLM, el 60% del total tenía orientación asignable. De éstas, el 70% estaban orientadas de manera natural. No se encontró ningún efecto del tumor W256 sobre la orientación de las vesículas de BLM.

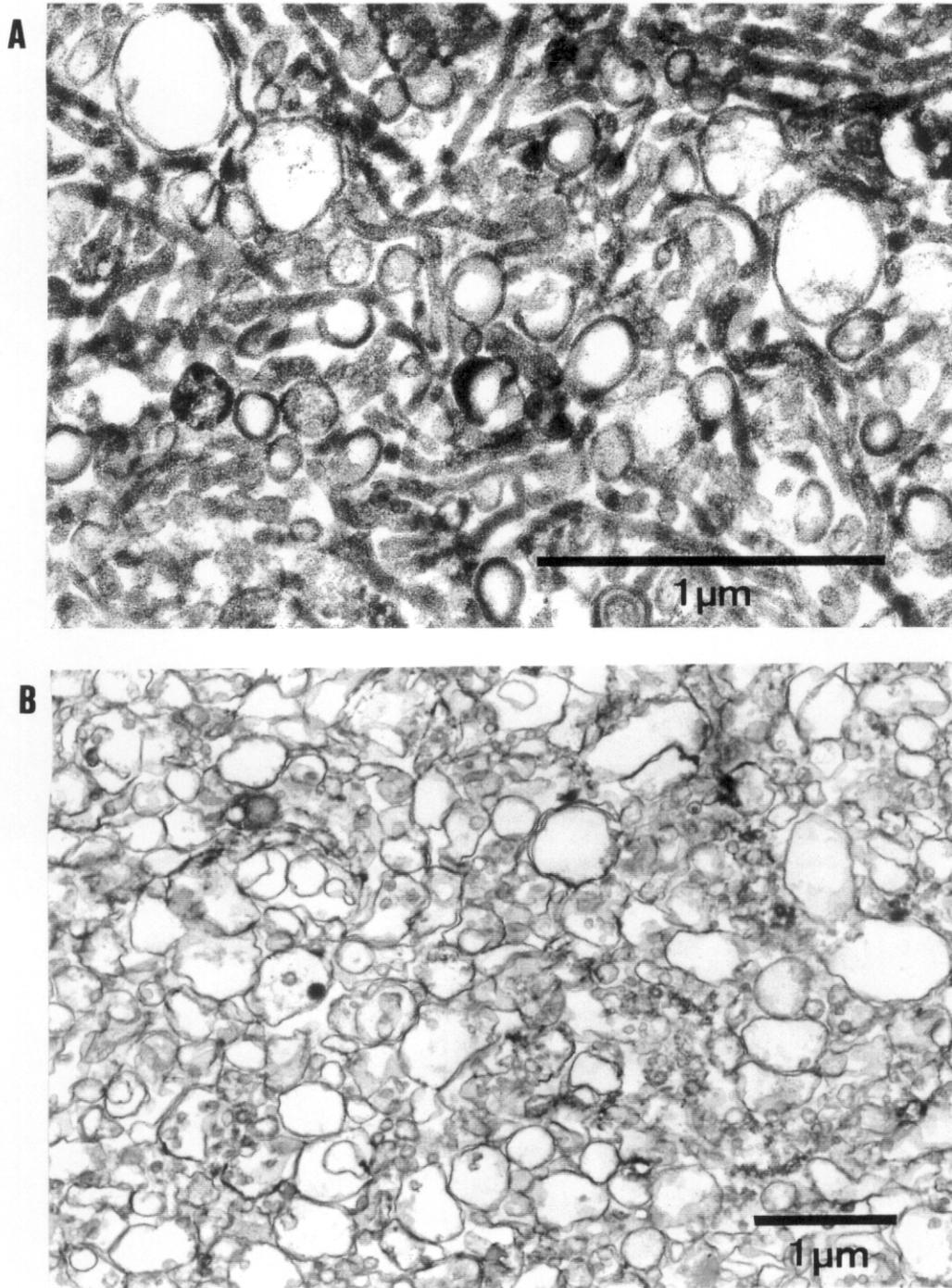


Figura 15: Micrografías electrónicas de preparaciones de BBM (a) y BLM (b) de corteza renal de rata.

4.4.2 Transporte de calcio en las BBM

La captación de calcio en las vesículas de BBM obtenidas de ratas controles y ratas portadoras del tumor W256 se refleja en la figura 16. Como se puede observar, esta actividad por miligramo de proteína mostraba cerca del equilibrio una tendencia, aunque no estadísticamente significativa, a ser mayor en las vesículas de BBM procedentes de ratas portadoras del tumor W256 comparada con las membranas de animales controles. Esta tendencia hacia el incremento de la captación de calcio era del mismo orden de magnitud que la disminución del contenido de proteínas en las BBM de ratas portadoras del tumor W256.

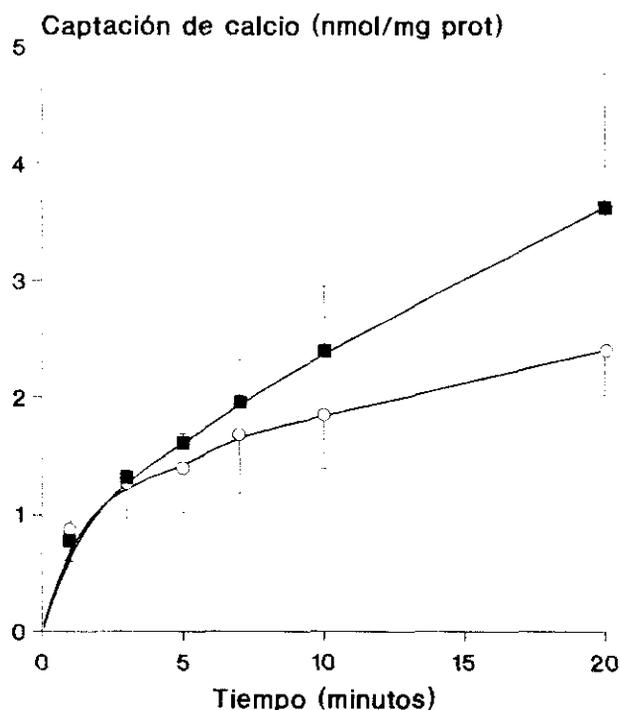


Figura 16: Captación de calcio en vesículas de BBM procedentes de ratas controles (O) o portadoras del tumor W256 (■). Los puntos representan media \pm D.E. de 3-5 experimentos por duplicado.

4.4.3 Transporte de calcio en las BLM

La captación de calcio en las vesículas de BLM en ausencia y presencia de ATP se muestra en la figura 17. En ausencia de ATP, la entrada de calcio era mucho menor que en presencia del nucleótido, y no se encontraron diferencias significativas en esta captación pasiva de calcio entre las vesículas de BLM de ratas portadoras del tumor W256 y las de ratas control.

Como se puede observar también en la figura 17, al añadir ATP al medio de incubación de las BLM, se estimulaba rápidamente la entrada de calcio en estas vesículas. Esta entrada de calcio no se afectaba ni por ouabaina 2 mmol/l, inhibidor de la Na⁺/K⁺-ATPasa, ni por el rojo de rutenio 1 μmol/l, inhibidor del transporte de calcio dependiente de ATP en la mitocondria (tabla VI). Sin embargo, la captación de calcio dependiente de ATP en las vesículas de BLM era sensible a vanadato 1 μmol/l, inhibidor de ATPasas tipo P (tabla VI). La adición del ionóforo para el calcio, A23187 5 μmol/l, a los 30 minutos de incubación en presencia de ATP, originaba una liberación rápida (en dos minutos) del calcio acumulado en el interior de las vesículas hasta el nivel correspondiente al calcio captado de manera pasiva (figura 17).

La captación de calcio dependiente de ATP estaba aumentada significativamente en vesículas de BLM procedentes de ratas portadoras del tumor W256 en comparación con la de las membranas de animales controles (figura 17). Además, este efecto era independiente de cambios que pudieran estar inducidos por el tumor W256 en el volumen de las vesículas. Este último, determinado por la captación de glucosa en el equilibrio (ver Materiales y Métodos) fue: $8.5 \pm 2.5 \mu\text{l/mg proteína}$ y $8.4 \pm 2.0 \mu\text{l/mg proteína}$ (media \pm D.E.; n=3), en vesículas de BLM de animales controles y portadores del tumor W256, respectivamente.

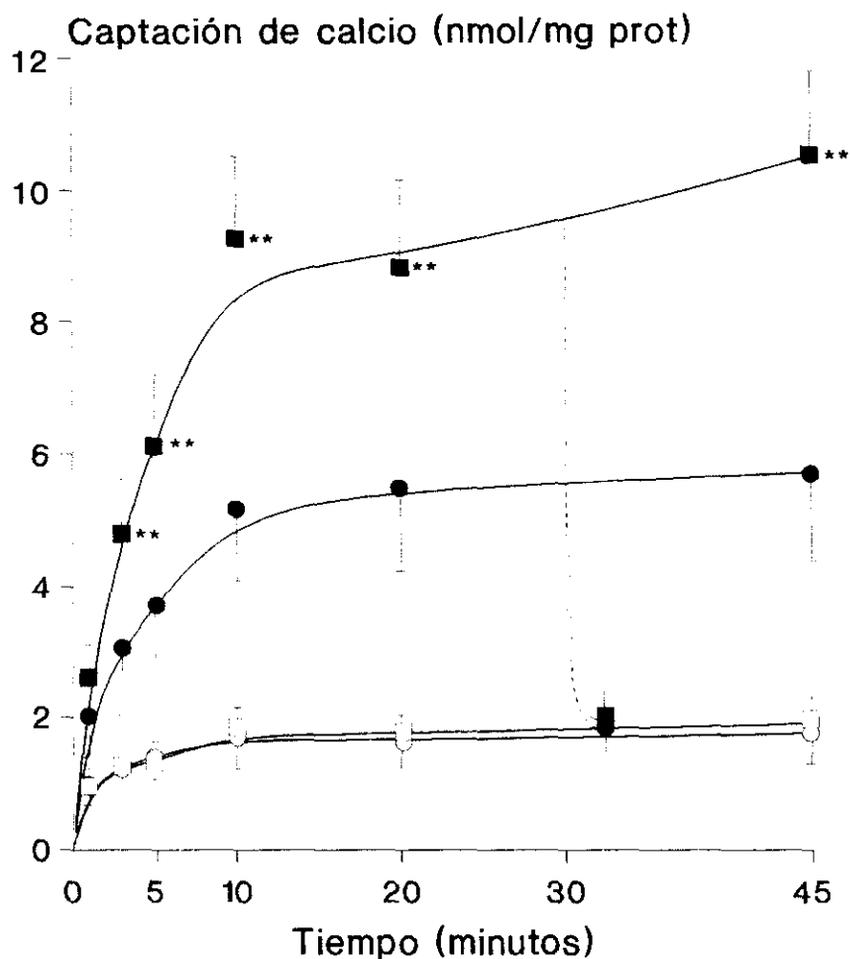


Figura 17: Captación de calcio en vesículas de BLM aisladas de ratas control (círculos) o portadoras del tumor W256 (cuadrados). La captación de calcio se desarrolló en ausencia (símbolos claros) o en presencia (símbolos oscuros) de ATP 2 mmol/l. La línea discontinua representa la liberación del calcio acumulado en el interior de las vesículas a los dos minutos de añadir al medio de incubación el ionóforo para el calcio A23187 5 μ mol/l. Los puntos representan media \pm D.E. de 5-7 experimentos por triplicado. ** $p < 0.01$, comparado con el valor correspondiente de la curva control.

Tabla VI: Efecto de diferentes inhibidores de ATPasas sobre la captación de calcio dependiente de ATP en vesículas de BLM procedente de corteza renal de rata.

Adición	Captación de calcio (nmol/mg proteína)	%
Vehículo	5.02 ± 0.19	100.0
Ouabaína (2 mmol/l)	4.86 ± 0.49	96.8
Rojo de rutenio (1 μmol/l)	4.92 ± 0.32	97.9
Vanadato (1 μmol/l)	3.24 ± 0.20	64.5

Las BLM se pretrataron con los inhibidores durante 30 minutos a 25°C, y estuvieron también presentes en el medio de incubación durante la captación de calcio (3 minutos). Los valores son medias ± D.E. de triplicados.

La cinética del transporte de calcio dependiente de ATP en vesículas de BLM se muestra en la figura 18. La Km para el calcio fue 0.45 ± 0.06 μmol/l en BLM de ratas controles, y 0.32 ± 0.07 μmol/l en BLM de ratas portadoras del tumor W256 (media ± D.E., n=3; p<0.05). La Vmáx fue similar en ambos casos (3.00 ± 0.84 nmol/mg proteína x min y 3.12 ± 0.50 nmol/mg proteína x min; media ± D.E., n=3, respectivamente).

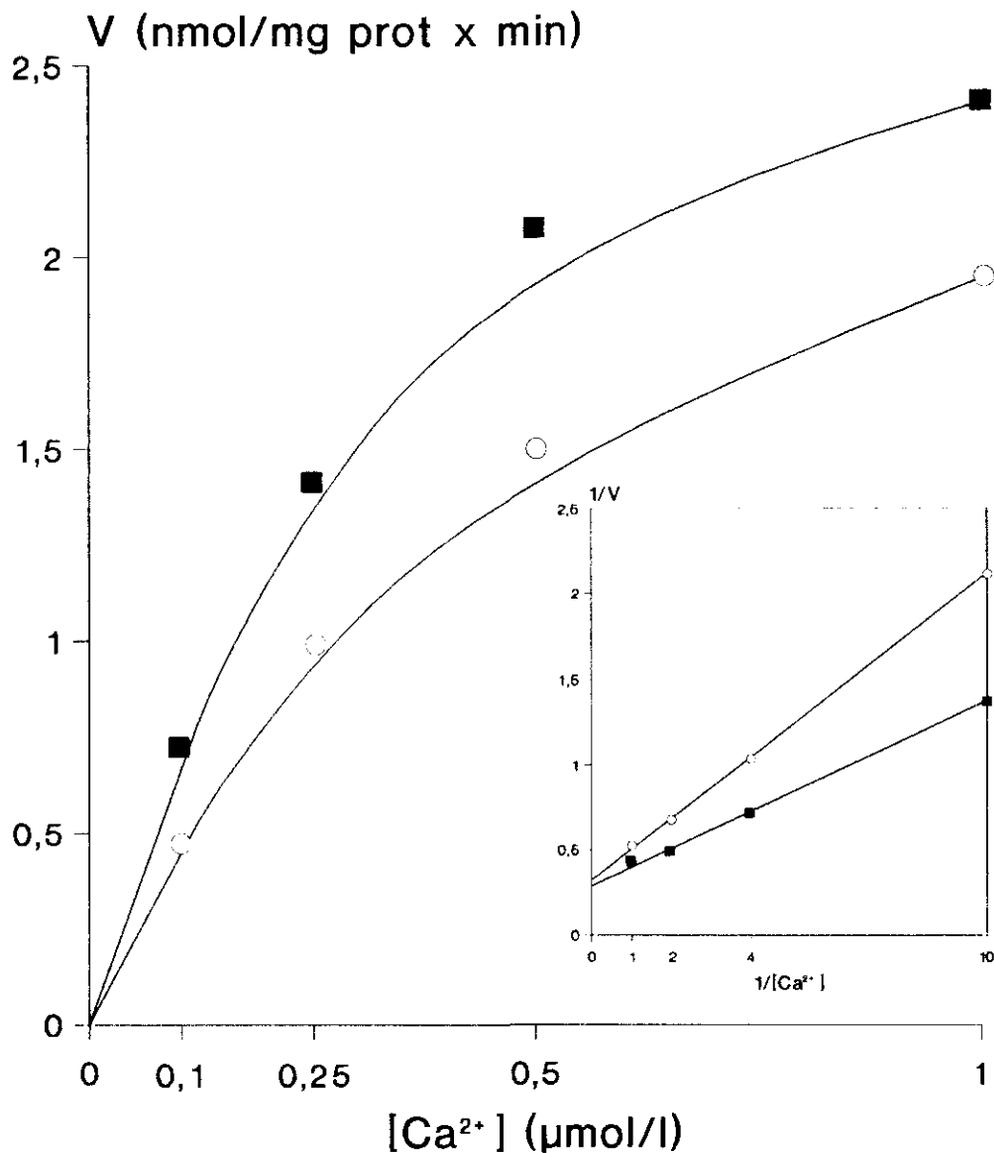


Figura 18: Cinética de la captación de calcio dependiente de ATP en vesículas de BLM procedentes de ratas controles (○) o portadoras del tumor W256 (■) en un experimento representativo. La captación de calcio en ausencia del nucleótido fue sustraída de la correspondiente en su presencia. En el recuadro se representa la linearización de Lineweaver-Burk correspondiente.

La presencia de un gradiente de sodio orientado hacia el interior de las vesículas produjo una disminución de la captación de calcio dependiente de ATP tras 10 minutos de incubación del $51 \pm 12\%$ y del $50 \pm 6\%$ (media \pm D.E., $n= 3$) en BLM de ratas controles y de ratas portadoras del tumor W256, respectivamente.

4.5 Efecto de la PTHRP(1-34) y del Bt_2 AMPc sobre el transporte de calcio en el riñón de rata

La preincubación durante 30 minutos de túbulos corticales obtenidos de ratas controles con PTHRP(1-34) $0.1 \mu\text{mol/l}$ o Bt_2 AMPc 0.1 mmol/l , no afectaba la captación de calcio dependiente de ATP en las vesículas de BLM preparadas a partir de esos túbulos. Así, a los 10 minutos de incubación, los valores de captación expresados como porcentaje sobre el obtenido en BLM de los túbulos tratados con solución salina ($4.09 \pm 0.64 \text{ nmol/mg proteína}$, media \pm D.E.; 100%) fueron: $102 \pm 9\%$ y $100 \pm 1\%$, para túbulos tratados con PTHRP o con Bt_2 AMPc, respectivamente.

Esta ausencia de efecto de la PTHRP(1-34) no es probable que se deba a alteraciones en sus receptores durante el proceso de aislamiento de los túbulos y posteriormente de las BLM. De hecho, la actividad basal de la adenilato ciclasa en las BLM de los túbulos preestimulados con PTHRP era unas dos veces superior a la de las membranas procedentes de los túbulos tratados con solución salina (tabla VII). Además, las BLM obtenidas de ambas preparaciones de túbulos respondían a diferentes agonistas (tabla VII).

Tabla VII: Actividad de la adenilato ciclasa en BLM aisladas de túbulo corticales de ratas controles.

Agonista min)	Túbulo + solución salina (nmol/mg proteína x 30 min)	Túbulo + PTHRP (nmol/mg proteína x 30 min)
Basal	2.26 ± 0.43	3.86 ± 0.82 ^a
bPTH(1-34) 0.1 μmol/l	13.35 ± 2.38 ^a	—
[Tyr ³⁶]PTH(1-36) 0.1 μmol/l	11.78 ± 3.85 ^a	9.30 ± 1.48 ^b
Forskolina 10 μmol/l	37.96 ± 9.35 ^a	30.69 ± 3.67 ^b
Arg-vasopresina 1 μmol/l	3.53 ± 0.59 ^a	3.41 ± 0.45

Túbulo aislados de corteza renal de ratas controles se preincubaron con solución salina o PTHRP, y posteriormente las BLM obtenidas como se describe en el texto (ver Materiales y Métodos), se trataron con los agonistas en presencia de ATP 125 μmol/l. Los valores son media ± D.E. (n=4). ^ap<0.01 frente al basal de túbulo preincubados con solución salina; ^bp<0.01 frente al basal de túbulo preincubados con PTHRP(1-34).

5. DISCUSSION

Actualmente se conocen pocos modelos experimentales de tumores productores de alteraciones en el metabolismo mineral similares a las observadas en sujetos con ciertas neoplasias, lo que se conoce como síndrome de HTH [192]. Uno de estos modelos es una variedad del carcinosarcoma W256, inductor de este síndrome en la rata a través de un mecanismo aún no completamente caracterizado [167].

En el presente estudio hemos encontrado que el implante subcutáneo del tumor W256 induce en la rata portadora hipercalcemia e hipofosfatemia a los 10-12 días tras el implante, cuando la función renal es aún normal, como lo indica la excreción urinaria de creatinina. Otras características que presentan las ratas portadoras del tumor W256 son un incremento de la resorción ósea, indicado tanto por la histomorfometría ósea como por el aumento de la excreción urinaria de hidroxiprolina, en ausencia de metástasis esqueléticas, y un aumento de la excreción urinaria de AMPc. Esta última característica se ha utilizado para diferenciar el síndrome de HTH de otras hipercalcemias de origen tumoral [90].

La producción por el tumor de un factor (o factores) que altera el transporte renal de iones en la rata portadora, se puso de manifiesto al estudiar las características bioquímicas de estos animales antes y después de serles extirpado el tumor. En una fase inicial, cuando el tumor alcanza unos 4 g de peso medio, el aumento de resorción ósea se evidenciaba por la tendencia a una excreción urinaria elevada de hidroxiprolina y la eliminación del exceso de calcio por la orina. La elevada excreción urinaria de magnesio que aparece paralela a la elevada excreción urinaria de calcio, apoya la existencia de un mecanismo de transporte común para ambos cationes en el túbulo renal [24].

En la siguiente fase del crecimiento tumoral estudiada, cuando comienza a aparecer la hipercalcemia, la excreción urinaria de calcio descendió hasta el valor del grupo control, mientras que la excreción urinaria de magnesio seguía siendo elevada. Estos resultados sugieren que en esta fase existe un aumento de la reabsorción tubular de calcio.

En el período más avanzado de crecimiento tumoral estudiado se observó hipercalcemia, hipercalciuria, hipofosfatemia e hiperfosfaturia. Las ratas portadoras del tumor W256 en esta fase presentaban además una excreción urinaria de hidroxiprolina y de AMPc elevadas. Todas estas características se han descrito en pacientes con HTH [90]. El exceso de calcio extracelular procedente de la resorción ósea, muy aumentada durante este período, impediría poner de manifiesto el incremento de reabsorción tubular de calcio sugerido en la fase anterior, cuando la hipercalcemia era todavía moderada.

En nuestro estudio hemos observado que la excreción urinaria de calcio aumentó notablemente tras extirpar el tumor sólo en los períodos en los que las ratas mostraban hipercalcemia (grupos II y III, tabla III). Este aumento era independiente de posibles alteraciones en la excreción urinaria de sodio, ya que las ratas se rehidrataron con suero salino durante las 48 horas anteriores a la eliminación del tumor. Al mismo tiempo, observamos una *disminución de la eliminación de magnesio por la orina tras extirpar el tumor*, en los tres grupos estudiados. Por otra parte, tras extirpar el tumor, se observó una tendencia a la normalización de los valores postoperatorios de la calcemia y de las eliminaciones de fosfato y de AMPc. Sin embargo, la excreción urinaria de hidroxiprolina no varió significativamente tras eliminar el tumor, aunque este hecho podría explicarse porque esta sustancia puede proceder no sólo del colágeno óseo, sino también de otros tejidos posiblemente afectados en el proceso quirúrgico.

Estos resultados sugieren que el tumor W256 produce un factor (o factores) capaz de estimular la reabsorción tubular renal del calcio, independientemente del sodio, en la rata huésped. El origen de la hipercalcemia en las ratas portadoras del tumor W256 parece deberse fundamentalmente a un mecanismo renal en una primera fase (grupo II, tabla II), junto a un aumento de la resorción ósea posterior (grupo III, tabla II). Algo similar se ha observado en pacientes en diferentes estadios de desarrollo del síndrome de HTH [193].

Nuestros estudios, junto con los de otros investigadores [171,193,194], apoyan la hipótesis del papel importante del riñón en la patogénesis de la hipercalcemia asociada a ciertas neoplasias.

Entre los factores propuestos como mediadores del síndrome de HTH, la PTHRP es uno de los que se considera tienen más importancia en el desarrollo de esta patología asociada al cáncer [195]. Previamente, se ha detectado ACSA en extractos del tumor W256 parcialmente purificados por filtración en gel, e inmunoreactividad para PTHRP en el plasma de ratas portadoras del tumor W256 y en células del tumor W256 en cultivo [196-198]. En este trabajo, hemos aislado la PTHRP a partir de homogeneizados del tumor W256 extraídos secuencialmente con urea-HCl y NaCl-etanol, y repurificados mediante diversas técnicas cromatográficas.

Hemos aplicado un método de purificación por inmovinoafinidad, desarrollado originariamente para aislar la PTHRP a partir de leche bovina y medio de cultivo de queratinocitos [181]. La rapidez de este método representa una mejora notable sobre otros métodos empleados previamente, que requerían numerosos pasos en el proceso de purificación. Debido a la gran homología en la estructura primaria de la PTHRP de diversas especies, cuyas secuencias se determinaron a partir de sus respectivos cDNA [101,110,111], los anticuerpos

obtenidos contra fragmentos sintéticos de la PTHRP humana reconocen también la PTHRP de esas otras especies, entre ellas, la rata. Siguiendo el protocolo mencionado anteriormente, la ACSA del tumor W256 repurificada por inmunoafinidad eluía de una columna de HPLC de fase reversa a una concentración de acetonitrilo que coincide con la obtenida para PTHRP de otras especies [96,172]. La presencia de un pico de bioactividad no totalmente homogéneo tras la purificación por HPLC de fase reversa podría sugerir que existe más de una forma de PTHRP en el extracto del tumor W256. Sin embargo, el análisis por transferencia western de las fracciones de HPLC que contenían la ACSA reveló una única banda correspondiente a un Mr de unos 18000 dalton, de acuerdo con el Mr aparente obtenido por cromatografía de exclusión molecular. Este Mr de 18000 dalton es similar al obtenido para la PTHRP aislada de tumores asociados a la HTH en humanos [96-98].

No sabemos si esta especie de PTHRP es la única forma circulante en la rata. Trabajos previos han demostrado inmunoreactividad para PTHRP en el plasma de ratas portadoras de tumores asociados a HTH incluido el W256 [197,199]. En humano, se han detectado al menos dos especies de PTHRP, N-terminal y C-terminal, en el plasma de pacientes con HTH [125]. Además, en pacientes con insuficiencia renal se ha encontrado una acumulación de fragmentos C-terminales de la PTHRP [133]. Sin embargo, se desconoce si los diferentes fragmentos circulantes de PTHRP detectados en diversas circunstancias ejercen o no alguna función específica.

Nuestros resultados, junto con otros previos, apoyan la existencia de una PTHRP similar en la rata y en humano [172]. El procedimiento de purificación por inmunoafinidad descrito puede ser válido para la purificación de la PTHRP de especies distintas, o para la detección de diferentes fragmentos empleando columnas con anticuerpos dirigidos contra distintos

epítomos de la molécula, como se ha descrito para plasma humano [125].

Según se ha descrito en la Introducción, la mayor parte de la reabsorción de calcio en la nefrona tiene lugar en el túbulo proximal. En este segmento, el transporte de calcio ocurre principalmente por difusión peritubular asociada a la de sodio, aunque también parece estar implicada una ruta transcelular activa independiente del sodio. En el túbulo distal, el calcio se reabsorbe en contra de un gradiente electroquímico por un mecanismo transcelular activo. Este segmento de la nefrona es el responsable de la regulación fina del transporte de calcio [17,21-23]. El transporte transcelular de calcio comprende su entrada por la BBM y su salida por la BLM mediante el intercambiador sodio/calcio y/o la llamada bomba de calcio dependiente de ATP, siendo esta última predominante [53-55].

Nuestros resultados demuestran una tendencia al aumento de la captación de calcio por vesículas de BBM de ratas portadoras del tumor W256 comparada con la de membranas procedentes de animales controles; aunque la diferencia no alcanzó significación estadística. Esta tendencia al incremento de la captación de calcio se observó en paralelo con la disminución en el contenido de proteína de las BBM de ratas portadoras del tumor W256, como consecuencia tal vez de la caquexia asociada con este modelo tumoral [200]. Datos previos han demostrado que la captación de calcio por la BBM ocurre principalmente a través de la unión del catión a fosfolípidos acídicos de la membrana seguido de su translocación a la cara interna de la membrana [43,44]. Por lo tanto, la disminución de proteínas de la BBM podría promover esta unión del calcio y su translocación. Este efecto podría contribuir al descenso en el movimiento transcelular del calcio en el túbulo proximal de las ratas portadoras del tumor W256, segmento que además carece de la CaBP implicada en la difusión del calcio a través de la célula epitelial [47].

Por otra parte, nuestros resultados indican que la captación de calcio dependiente de ATP por la BLM está estimulada en las ratas portadoras del tumor W256. Más aún, esta estimulación parece ser debida a una disminución de la Km para el calcio. Trabajos previos indican que la mayor actividad de la bomba de calcio dependiente de ATP está en el túbulo distal, y que la mayoría de esta actividad en preparaciones de BLM de corteza renal se debe a la del túbulo distal [30,32,56]. Por lo tanto, el aumento de la captación de calcio dependiente de ATP en nuestra preparación de BLM parece reflejar una estimulación de esta actividad en el túbulo distal.

Nuestras ratas hipercalcémicas portadoras del tumor W256 presentaban cierta insuficiencia renal, estimada por los niveles de creatinina sérica. Por lo tanto, en ausencia de una filtración glomerular aumentada en estos animales, la captación de calcio dependiente de ATP elevada observada en la BLM es más probable que sea consecuencia del efecto de uno o varios factores humorales. La PTHRP, que es sintetizada por este tumor como hemos demostrado anteriormente, podría ser un posible mediador, ya que se ha visto que incrementa la reabsorción tubular de calcio cuando se infunde a ratas tiroparatiroidectomizadas [116]. Más aún, en un trabajo previo, hemos encontrado que una fracción parcialmente purificada del tumor W256 que presentaba ACSA aumentaba el flujo unidireccional de calcio en células renales con características de túbulo distal [196]. Sin embargo, la preestimulación de túbulos corticales de rata con PTHRP (o con Bt_2 AMPc) no afectaba la captación de calcio dependiente de ATP en vesículas de BLM aisladas posteriormente a partir de esos túbulos, a pesar de que dichas membranas presentaban una estimulación de la adenilato ciclasa, que además mantenía la capacidad de responder a diferentes agentes.

En este sentido, Care y cols. [201], no encontraron ningún efecto en el transporte de calcio en placenta ovina cuando infundían el fragmento (1-34) de la PTHRP y sí cuando el péptido contenía la secuencia 67-86. Por otra parte, Barlet y cols. [202], han asociado el aumento del transporte de calcio en placenta ovina producido por la infusión de PTHRP(1-34) con el aumento de los niveles de 1,25-(OH)₂-D circulantes en el feto.

Nuestra preparación de BLM corticales contiene membranas de túbulo proximal y de túbulo distal. Esto podría enmascarar los posibles cambios en la actividad de la bomba de calcio dependiente de ATP si tales alteraciones fueran diferentes en ambos segmentos de la nefrona, como se ha sugerido para la PTH [32], que comparte con la PTHRP el mismo receptor asociado a adenilato ciclasa en la corteza renal [121]. La ausencia de efecto del Bt₂ AMPc sobre la captación de calcio dependiente de ATP observada en nuestra preparación de BLM coincide con los resultados de Bouhtiauy y cols. [188], que empleaban BLM derivadas de túbulo proximal y distal de conejo. Sin embargo, estos investigadores demostraron que la PTH y/o el Bt₂-APMc estimulan el intercambio Na⁺/Ca²⁺ sólo en las BLM aislados de túbulo distal [188]. Aunque nuestra preparación de BLM corticales presentaba actividad del intercambiador Na⁺/Ca²⁺, no pudimos detectar ningún cambio en esta actividad en BLM de ratas portadoras del tumor W256 comparadas con membranas procedentes de animales control. Quizás debido a la heterogeneidad de nuestra preparación de BLM (proximales y distales), ya que este sistema Na⁺/Ca²⁺, parece estar localizado en ambos segmentos [62,63].

Otros grupos han publicado un efecto directo tanto de la PTH como del AMPc sobre la actividad de la Ca²⁺,Mg²⁺-ATPasa de BLM de corteza renal de perro [203,204]. Sin embargo, este efecto sólo se observaba cuando la actividad enzimática se medía a una concentración de calcio en la porción

lineal de la curva obtenida al estudiar la cinética para el catión. Así pues, nuestros resultados no descartan un papel de la PTHRP en el mecanismo de la estimulación de la captación de calcio en las BLM de ratas portadoras del tumor W256.

No se conoce si la producción de PTHRP por los tumores o por células normales es intermitente, de la misma manera que la de la PTH por las glándulas paratiroides [205], aunque parece más probable que sea constante. Así, los estudios "in vivo" con infusiones de PTHRP durante varios días reproducen las características del síndrome de HTH [116,118]. La exposición crónica del túbulo renal a la PTHRP o su interacción con otros factores producidos por el tumor W256 o como respuesta del huésped al tumor, podrían ser responsables de los efectos observados en la rata portadora. Entre estos factores, el 1,25-(OH)₂-D sintetizado por este tumor [206], no parece afectar directamente a la bomba de calcio dependiente de ATP de la BLM [32]; aunque este agente podría aumentar el transporte activo de calcio por su efecto sobre la CaBP en el túbulo distal [50]. El efecto de los TGF y de los TNF sobre el mecanismo de transporte de calcio en vesículas de BLM, si existe, se desconoce por el momento, aunque tanto el TGF α como el TGF β o el TNF α modulan la acción de la PTH/PTHRP sobre la adenilato ciclasa en osteoblastos y/o en células de túbulo proximal "in vitro" [138,143, 207]. También se sabe poco acerca del posible papel desempeñado por otras citocinas, como la IL-1, producida por algunos tumores relacionados con HTH [149]. Así, en un trabajo reciente, se ha demostrado que la IL-1 produce hipercalcemia y aumento de la reabsorción tubular de calcio en la rata "in vivo" [152]. Por el contrario, en otro trabajo también reciente se ha sugerido una posible acción inhibitoria de esta citocina sobre el incremento de la reabsorción tubular de calcio inducido por la infusión de PTHRP en ratas [153].

6. CONCLUSIONES

- 1.- El carcinosarcoma de Walker 256 de rata es un modelo experimental adecuado para el estudio del síndrome de hipercalcemia tumoral de origen humoral (HTH).
- 2.- El riñón está implicado en la génesis de la hipercalcemia asociada a este modelo de HTH mediante un aumento de la reabsorción tubular de calcio originado por un mecanismo humoral.
- 3.- El carcinosarcoma de Walker 256 produce una proteína relacionada con la parathormona de unos 18000 dalton de peso molecular aparente, similar a la aislada de otros tumores humanos, e implicada en el desarrollo de la hipercalcemia asociada a estos tumores.
- 4.- El aumento de la reabsorción tubular de calcio en el riñón de la rata portadora del tumor de Walker 256 parece ser debido a un incremento de la afinidad para el catión en el sistema de transporte de calcio dependiente de ATP a través de la membrana basolateral de la célula epitelial renal.
- 5.- La ausencia de efecto agudo "in vitro" de la PTHRP (y del AMPc) sobre el transporte de calcio dependiente de ATP en la membrana basolateral de la célula epitelial renal, no permite descartar un efecto del factor tras una exposición prolongada (acción crónica) o por la interacción con otros factores de origen tumoral o producidos por el huésped en respuesta al tumor.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Walser M. Divalent cations: physicochemical state in glomerular filtrate and urine and renal excretions. En: Handbook of Physiology: Renal physiology. Eds. Orloff J, Berliner RW. Washington, American Physiological Society (1973); 555-558.
- 2.- Somlyo AP. Cellular site of calcium regulation. Nature (1984) 309: 516-517.
- 3.- Wasserman RH. Cellular calcium: action of hormones. Calcium in human biology. Ed. Nordin BEC. Springer Verlag, Oxford (1988); 385-419.
- 4.- Mallette LE. Regulation of blood calcium in humans. Endocrinol. Metab. Clin. North Am. (1989) 18: 601-610.
- 5.- Mundy GR. General concepts of calcium homeostasis. En: Calcium homeostasis: hypercalcemia and hypocalcemia. Ed. Martin Dunitz, London (1989); 1-15.
- 6.- Wasserman RH, Chandlen JS. Molecular mechanisms of intestinal calcium absorption. Ed. Peck WA. Bone and Mineral Research, Annual 3, Excerpta Medica Amsterdam (1985); 181-212.
- 7.- Mundy GR. Calcium homeostasis -role of the gut, kidney and bone. En: Calcium homeostasis: hypercalcemia and hypocalcemia. Ed. Martin Dunitz, London (1989); 16-27.
- 8.- Van Os CH. Transcellular calcium transport in intestinal and renal epithelial cells. Biochim. Biophys. Acta (1987) 906: 195-222.
- 9.- Nellans HN. Intestinal calcium absorption. Interplay of paracellular and cellular pathways. Miner. Electrolyte Metab. (1990) 16: 101-108.
- 10.- Karbach V. Paracellular calcium transport across the small intestine. J. Nutr. (1992) 122: 672-677.
- 11.- Bronner F. Current concepts of calcium absorption: an overview. J. Nutr. (1992) 122: 641-643.
- 12.- Bronner F. Intestinal calcium transport: the cellular pathway. Miner. Electrolyte Metab. (1990) 16: 94-100.
- 13.- Bronner F, Pansu D, Stein WD. An analysis of intestinal calcium transport across the rat intestine. Am. J. Physiol. (1986) 250: G561-G569.
- 14.- Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. N. Engl. J. Med. (1989) 13: 980-991.
- 15.- Christakos S, Gill R, Lee S, Li H. Molecular aspects of the calbindings. J. Nutr. (1992) 122: 678-682.

- 16.- Mundy GR. Calcium homeostasis: role of the gut, kidney and bone. En: Calcium homeostasis: hypercalcemia and hypocalcemia. Ed. Martin Dunitz, London (1989); 16-27.
- 17.- Parfitt AM. Bone and plasma calcium homeostasis. Bone (1987) 1: 51-58.
- 18.- Marks SC, Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development structure and function in the skeleton. Am. J. Anat. (1988) 183: 1-44.
- 19.- Martin TJ, Wah NGK, Nicholson CG. Cell biology of bone. Baillieres's Clin. Endocrinol. Metab. (1988) 2: 1-29.
- 20.- Vander AJ. Regulation of calcium balance and extracellular concentration. En: Renal physiology, 3rd ed. McGraw-Hill, Inc (1985); 190-200.
- 21.- Bronner F. Renal calcium transport: mechanisms and regulation --an overview. Am. J. Physiol. (1989) 257: F707-F711.
- 22.- Borke JL, Penniston JT, Kumar R. Recent advances in calcium transport by the kidney. Seminars Nephrol. (1990) 10: 15-23.
- 23.- Rouse D, Suki WN. Renal control of extracellular calcium. Kidney Int (1990) 38: 700-708.
- 24.- Klahr S, Hruska K. Effects of parathyroid hormone on the renal reabsorption of phosphorous and divalent cations. Ed. Peck WA. Bone and Mineral Research, Annual 2, Excerpta Medica Amsterdam (1983); 65-124.
- 25.- Kelepouris E. Renal handling of calcium. Am. J. Nephrol. (1988) 8: 226-234.
- 26.- Agus ZS, Goldfarb S. En: The Kidney. Physiology and pathophysiology. Eds. Seldin DW, Giebisch G. Raven Press, New York (1985); 1323-1335.
- 27.- Sutton PAL, Dirks JH. Calcium and magnesium: renal handling and disorders of metabolism. En: The Kidney. Eds. Brenner BM, Rector FC jr, Philadelphia (1986); 551-618.
- 28.- Ng RCK, Rouse D, Suki WN. Calcium transport in the rabbit superficial proximal convoluted tubule. J. Clin. Invest. (1984) 74: 834-842.
- 29.- Ullrich KJ, Rumrich G, Kloss S. Active Ca²⁺ reabsorption in the proximal tubule of the rat kidney. Dependence on sodium and buffer transport. Pflugers Arch. (1976) 364: 223-228.
- 30.- Doucet A, Katz AI. High-affinity Ca-Mg-ATPase along the rabbit nephron. Am. J. Physiol. (1982) 242: F346-F352.
- 31.- Ghijsen W, Gmaj P, Murer H. Ca²⁺-stimulated Mg²⁺-independent ATP hydrolysis and the high affinity Ca²⁺-pumping ATPase. Two different

activities in the rat kidney basolateral membranes. *Biochim. Biophys. Acta* (1984) 778: 481-488.

- 32.- Tsukamoto Y, Saka S, Saitoh M. Parathyroid hormone stimulates ATP-dependent calcium pump activity by a different mode in proximal and distal tubules of the rat. *Biochim. Biophys. Acta* (1992) 1103: 163-171.
- 33.- Rocha AS, Migaldi JB, Kokko JP. Calcium and phosphate transport in isolated segments of rabbit Henle's loop. *J. Clin. Invest.* (1977) 59: 975-983.
- 34.- Rouse D, Ng RCK, Suki WN. Calcium transport in the pars recta and thin descending limb of Henle of the rabbit, perfused in vitro. *J. Clin. Invest.* (1980) 65: 37-42.
- 35.- Agus ZS, Ziyadeh FN, Kelepouris E. Mechanisms of calcium transport in the thick ascending limb of the loop of Henle. *Adv. Exp. Med. Biol.* (1986) 208: 171-175.
- 36.- Costanzo LS, Windhager EE. Calcium and sodium transport by the distal convoluted tubule of the rat. *Am. J. Physiol.* (1978) 235: F492-F506.
- 37.- Bourdeau JE, Lau K. Effects of parathyroid hormone on cytosolic free calcium concentration in individual rabbit connecting tubules. *J. Clin. Invest.* (1989) 83: 373-379.
- 38.- Gesek FA, Friedman PA. Mechanism of calcium transport stimulated by chlorothiazide in mouse distal convoluted tubule cells. *J. Clin. Invest.* (1992) 90: 429-438.
- 39.- Morel F, Doucet A. Hormonal control of kidney functions at the cell level. *Physiol. Rev.* (1986) 66: 377-468.
- 40.- Bindels RJM, Hartog A, Timmermans J, Van Os CH. Active Ca²⁺ transport in primary culture of rabbit kidney CCD. Stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and PTH. *Am. J. Physiol.* (1991) 261: F799-F807.
- 41.- Bengel HH, Alexander EA, Lechere CP. Calcium and magnesium transport along the inner medullary collecting duct of the rat. *Am. J. Physiol.* (1980) 239: F24-F29.
- 42.- Borle AB. Calcium transport by kidney cells. En: *Calcium and phosphate across biomembranes*. Eds. Bronner F, Reterlik M. Academic Press, Inc, New York (1981); 193-198.
- 43.- Khalifa S, Mills S, Hruska KA. Stimulation of calcium uptake by parathyroid hormone in renal brush-border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* (1983) 258: 14400-14406.
- 44.- Ferrari C, Esbrit P. Compensatory changes in calcium uptake and phospholipid composition in rat renal brush border membranes after

- unilateral nephrectomy. *Miner. Electrolyte Metab.* (1988) 14: 297-301.
- 45.- Bacskai BJ, Friedman PA. Activation of latent Ca^{2+} channels in renal epithelial cells by parathyroid hormone. *Nature* (1990) 347: 388-391.
- 46.- Brunette MG, Mailloux J, Lajeunesse D. Calcium transport through the luminal membrane of the distal tubule. II. Effect of pH, electrical potential and calcium channel inhibitors. *Kidney Int.* (1992) 41: 289-296.
- 47.- Roth J, Brown D, Norman A, Orci L. Localization of the vitamin-D dependent calcium binding protein in mammalian kidney. *Am. J. Physiol.* (1982) 243: F243-F252.
- 48.- Bronner F, Stein WD. CaBPr facilitates intracellular diffusion for Ca-pumping in distal convoluted tubule. *Am. J. Physiol.* (1988) 255: F558-F562.
- 49.- Varghese S, Lee S, Huang YC, Christakos S. Analysis of rat vitamin D-dependent calbindin- $\text{D}_{28\text{k}}$ gene expression. *J. Biol. Chem.* (1988) 263: 9776-9784.
- 50.- Borke JL, Caride A, Verma AK, Penniston JT, Kumar R. Plasma membrane calcium pump and 28KDa calcium binding protein in cells of rat kidney distal tubules. *Am. J. Physiol.* (1989) 257: F842-F849.
- 51.- Gmaj P, Murer H. Calcium transport mechanisms in epithelial cell membranes. *Miner. Electrolyte Metab.* (1988) 14: 22-30.
- 52.- Moskowitz DW, Hruska KA. Ca^{2+} uptake by endoplasmic reticulum of renal cortex. I. Ionic requirements and regulation in vitro. *Calcif. Tissue Int.* (1992) 51: 35-41.
- 53.- Ghijsen W, Gmaj P, Murer H. Ca^{2+} -stimulated, Mg^{2+} -independent ATP hydrolysis and the high affinity Ca^{2+} -pumping ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* (1984) 778: 481-488.
- 54.- Van Heeswijk MPE, Geertsen JAM, Van Os CH. Kinetic properties of the ATP-dependent Ca^{2+} pump and the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange system in basolateral membranes from rat kidney cortex. *J. Membrane Biol.* (1984) 79: 19-31.
- 55.- Ramachandran C, Chan M, Brunette MG. Characterization of ATP-dependent Ca^{2+} transport in the basolateral membrane vesicles from proximal and distal tubules of the rabbit kidney. *Biochem. Cell Biol.* (1991) 69: 109-114.
- 56.- Borke JL, Minami J, Verma A, Penniston JT, Kumar R. Monoclonal antibodies to human erythrocyte membrane $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ adenosine triphosphatase pump recognize an epitope in the basolateral membrane of human kidney distal tubule cells. *J. Clin. Invest.* (1987) 80: 1225-1231.

- 57.- Tsukamoto Y, Suki WN, Liang T, Sacktor B. Ca^{2+} -dependent ATPases in the basolateral membrane of rat kidney cortex. *J. Biol. Chem.* (1986) 261: 2718-2724.
- 58.- Carafoli E. Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol. Rev.* (1991) 71: 129-153.
- 59.- Imai M. Effects of parathyroid hormone and N^6, O^2 -dibutyryl cyclic AMP on Ca^{2+} transport across the rabbit distal nephron segments perfused in vitro. *Pfluegers Arch.* (1981) 390: 140-145.
- 60.- Yang JM, Lee CO, Windhager EE. Regulation of cytosolic free calcium in isolated perfused proximal tubules of *Necturus*. *Am. J. Physiol.* (1988) 255: F787-F799.
- 61.- Scoble JE, Mills S, Hruska KA. Calcium transport in canine renal basolateral membrane vesicles. *J. Clin. Invest.* (1985) 75: 1096-1105.
- 62.- Ramachandran C, Brunette MG. The renal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange system is located exclusively in the distal tubule. *Biochem. J.* (1989) 257: 259-264.
- 63.- Dominguez JH, Juhaszova M, Kleiboeker SB, Hale CC, Feister HA. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger of rat proximal tubule: gene expression and subcellular localization. *Am. J. Physiol.* (1992) 263: F945-F950.
- 64.- Mundy GR. Hormonal factors which influence calcium homeostasis. En: *Calcium homeostasis: hypercalcemia and hypocalcemia*. Ed. Martin Dunitz, London (1989); 28-50.
- 65.- Kronenberg HM, Igarashi T, Freeman MW, Okazaki T, Brand SJ, Wiren KM, Potts JT jr. Structure and expression of the human parathyroid hormone gene. *Recent Prog. Horm. Res.* (1986) 40: 641-663.
- 66.- Rosenblatt M. Pre-proparathyroid hormone, parathyroid hormone, and parathyroid hormone. The biologic role of hormone structure. *Clin. Orthop.* (1982) 170: 260-276.
- 67.- Murray TM, Rao LG, Muzaffar SA, Ly H. Human parathyroid hormone carboxyterminal peptide (53-84) stimulates alkaline phosphatase activity in dexamethasone-treated rat osteosarcoma cells in vitro. *Endocrinology* (1989) 124: 1097-1099.
- 68.- Brown EM. Parathyroid secretion in vivo and in vitro. Regulation by calcium and other secretagogues. *Miner. Electrolyte Metab.* (1982) 8: 130-150.
- 69.- McSheely PMJ, Chambers TJ. Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology* (1986) 118: 824-828.

- 70.- Bell NH. Vitamin D-endocrine system. *J. Clin. Invest.* (1985) 76: 1-6.
- 71.- Gkonos PJ, London R, Hendler ED. Hypercalcemia and elevated 1,25-dihydroxyvitamin D levels in a patient with end-stage renal disease and active tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* (1984) 311: 1683-1685.
- 72.- Ghazarian JG. Perspectives: The renal mitochondrial hydroxylases of the vitamin D₃ endocrine complex: how are they regulated at the molecular level. *J. Bone Miner. Res.* (1990) 5: 897-903.
- 73.- Underwood JL, DeLuca HF. Vitamin D is not directly necessary for bone growth and mineralization. *Am. J. Physiol.* (1984) 246: E493-E498.
- 74.- Azria M. The calcitonins. *Physiology and pharmacology*. Ed. Karger S, Basilea (1989).
- 75.- Talmage RV. The physiological significance of calcitonin. Ed. Peck WA. *Bone and Mineral Research, Annual 1*. Excerpta Medica, Amsterdam (1983); 74-143.
- 76.- Heersche JNM, Marcus R, Aurbach GD. Calcitonin and the formation of 3',5'-cyclic AMP in bone and kidney. *Endocrinology* (1974) 94: 241-247.
- 77.- Chambers TJ, Magnus CJ. Calcitonin alters the behavior of isolated osteoclasts. *J. Pathol.* (1982) 136: 27-40.
- 78.- Zondek H, Petow H, Siebert W. Die bedeutung der calciumbestimmung im blute fur die diagnose der niereninsuffizienz. *Z. Klin. Med.* (1924) 99: 128-138.
- 79.- Mundy GR. Incidence and pathophysiology of hypercalcemia. *Calcif Tissue Int.* (1990) [Supp 1] 46: S3-S10.
- 80.- Pont A. Unusual causes of hypercalcemia. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* (1989) 18: 753-764.
- 81.- Stewart AF, Horst R, Deftos LJ, Cadman EC, Lang R, Broadus AE. Biochemical evaluation of patients with cancer-associated hypercalcemia: evidence for humoral and nonhumoral groups. *N. Engl. J. Med.* (1980) 303: 1377-1383.
- 82.- Gutman AB, Tyson TL, Gutman EB. Serum calcium, inorganic phosphorus and phosphatase in hyperparathyroidism, Paget's disease, multiple mieloma, and neoplastic disease of the bones. *Arch. Intern Med.* (1936) 57: 379-413.
- 83.- Garrett IR, Durie BGM, Nedwin GE, Gillespie T, Briggam T, Sabatini M, Bedolini DR, Mundy GR. Production of the bone-resorbing cytokine lymphotoxin by cultured human myeloma cells. *N. Engl. J. Med.* (1987) 317: 526-532.

- 84.- Breslau NA, McGuire JL, Zerwekh JE, Frenkel ED, Pak CYC. Hypercalcemia associated with increased serum calcitriol levels in three patients with lymphoma. *Ann. Intern. Med.* (1984) 100: 1-7.
- 85.- Isaacs C, Carcangiu ML, Stewart AF. Hypercalcemia in breast cancer. Reassessment of the mechanism. *Am. J. Med.* (1987) 82: 1143-1147.
- 86.- Mundy GR, Altman AJ, Gondek MD, Bandelin JG. Direct resorption of bone by human monocytes. *Science* (1977) 196: 1109-1111.
- 87.- Albright F. Case records of the Massachusetts General Hospital (case 27461). *N. Engl. J. Med.* (1941) 225: 789-791.
- 88.- Plimpton CH, Gelhorn A. Hypercalcemia in malignant disease without evidence of bone destruction. *Am. J. Med* (1956) 21: 750-759.
- 89.- Lafferty FW. Pseudohyperparathyroidism. *Medicine* (1966) 45: 247-260.
- 90.- Godsall JW, Burtis WJ, Insogna KL, Broadus AE, Stewart AF. Nephrogenous cyclic AMP, adenylate cyclase-stimulating activity, and the humoral hypercalcemia of malignancy. *Recent. Prog. Horm. Res.* (1986) 40: 705-750.
- 91.- Stewart AF, Vignery A, Silvergate A, Ravin ND, Livolsi V, Broadus AE, Baron R. Quantitative bone histomorphometry in humoral hypercalcemia of malignancy: uncoupling of bone cell activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1982) 55: 219-227.
- 92.- Stewart AF, Insogna KL, Goltzman D, Broadus AE. Identification of adenylate cyclase-stimulating activity and cytochemical glucose-6-phosphate dehydrogenase-stimulating activity in extracts of tumors from patients with humoral hypercalcemia of malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983) 80: 1454-1458.
- 93.- Rodan SB, Insogna KL, Vignery AM-C, Stewart AF, Broadus AE, D'Souza SM, Bertolini DR, Mundy GR, Rodan GA. Factors associated with humoral hypercalcemia of malignancy stimulate adenylate cyclase in osteoblastic cells. *J. Clin. Invest.* (1983) 72: 1511-1515.
- 94.- Strewler GJ, Williams RD, Nissenson RA. Human renal carcinoma cells produce hypercalcemia in the nude mouse and a novel protein recognized by PTH receptors. *J. Clin. Invest.* (1983) 71: 769-774.
- 95.- Simpson EL, Mundy GR, D'Souza SM, Ibbotson KJ, Bockman R, Jacobs JW. Absence of parathyroid hormone messenger RNA in nonparathyroid tumors associated with hypercalcemia. *N. Engl. J. Med.* (1983) 309: 325-330.
- 96.- Burtis WK, Wu T, Bunch C, Wysolmerski JJ, Insogna KL, Weir EC, Broadus AE, Stewart AF. Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J. Biol. Chem.*

- (1987) 262: 7151-7156.
- 97.- Stewart AF, WU T, Goumas D, Burtis WJ, Broadus AE. N-terminal amino acid sequence of two novel tumor derived adenylate cyclase- stimulating proteins: identification of parathyroid hormone-like and parathyroid hormone-unlike domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1987) 146: 672-678.
 - 98.- Moseley JM, Kubota M, Diefenbach-Jagger HD, Wettenhal REH, Kemp BE, Suva LJ, Rodda CP, Ebeling PR, Hudson PJ, Zajac JD, Martin TJ. Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987) 84: 5048-5052.
 - 99.- Strewler GJ, Stern PH, Jacobs JW, Eveloff J, Klein RF, Leung SC, Rosenblatt M, Nissenson RA. Parathyroid hormone like protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone. *J. Clin. Invest.* (1987) 80: 1803-1807.
 - 100.- Suva LJ, Winslow GA, Wettenhall REH, Hammonds RG, Moseley JM, Diefenbach-Jagger H, Rodda CP, Kemp BE, Rodriguez H, Chen EY, Hudson PJ, Martin TJ, Wood WT. A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science* (1987) 237: 893-896.
 - 101.- Mangin M, Webb AC, Dreyer BE, Posillico JT, Ikeda K, Weir EC, Stewart AF, Bander NH, Milstone L, Barton DE, Francke U, Broadus AE. Identification of a cDNA encoding a parathyroid hormone-like peptide from a human tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85: 597-601.
 - 102.- Thiede MA, Strewler GJ, Nissenson A, Rosenblatt M, Rodan GA. Human renal carcinoma expresses two messages encoding a parathyroid hormone-like peptide: evidence for the alternative splicing of a single-copy gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85: 4605-4609.
 - 103.- Habener JF, Rosenblatt M, Potts JT. Parathyroid hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action and metabolism. *Physiol. Rev.* (1984) 64: 985-1054.
 - 104.- Ikeda K, Weir EC, Mangin M, Dannies PS, Kinder B, Deftos LJ, Brown E, Broadus AE. Expression of messenger ribonucleic acids encoding a parathyroid hormone-like peptide in normal human parathyroid adenomas. *Mol. Endocrinol.* (1988) 2: 1230-1236.
 - 105.- Mangin M, Ikeda K, Dreyer BE, Broadus AE. Isolation and characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1989) 86: 2408-2412.
 - 106.- Yasuda T, Banville D, Hendy GN, Goltzman D. Characterization of the PTH-like peptide gene. *J. Biol. Chem.* (1989) 264: 7720-7725.

- 107.- Suva LJ, Mather KA, Gillespie MT, Webb GC, Ng KW, Winslow GA, Wood WT, Martin TJ, Hudson PJ. Structure of the 5' flanking region of the gene encoding human parathyroid hormone-related protein (hPTHrP). *Gene* (1989) 77: 95-105.
- 108.- Karaplis AC, Yasuda T, Hendy GN, Goltzman D, Banville D. Gene encoding parathyroid hormone-like peptide: nucleotide sequence of the rat gene and comparison with the human homologue. *Mol. Endocrinol.* (1990) 4: 441-446.
- 109.- Mangin M, Ikeda K, Broadus AE. Structure of the mouse gene encoding parathyroid hormone-related peptide. *Gene* (1990) 95: 195-202.
- 110.- Schermer DT, Chan SDH, Bruce R, Nissenson RA, Wood WI, Strewler GJ. Chicken parathyroid hormone-related protein and its expression during embryologic development. *J. Bone Miner. Res.* (1991) 6: 149-155.
- 111.- Thiede MA, Rodan GA. Expression of a calcium-mobilizing parathyroid hormone-like peptide in lactating mammary tissue. *Science* (1988) 242: 278-280.
- 112.- Abbas SK, Pickard DW, Rodda CP, Heath JA, Hammonds RG, Wood WI, Caple IW, Martin TJ, Care AD. Stimulation of ovine placental calcium transport by purified natural and recombinant parathyroid hormone-related protein (PTHrP) preparations. *Q. J. Exp. Physiol.* (1989) 74: 549-552.
- 113.- Weir EC, Brines ML, Ikeda K, Burtis WJ, Broadus AE, Robbins RJ. Parathyroid hormone-related peptide gene is expressed in the mammalian central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) 87: 108-112.
- 114.- Kremer R, Karaplis AC, Henderson J, Gulliver W, Banville D, Hendy G, Goltzman D. Regulation of parathyroid hormone-like peptide in cultured normal human keratinocytes. *J. Clin. Invest.* (1991) 87: 884-893.
- 115.- Kemp B, Moseley JM, Rodda CP, Ebeling PR, Wettenhall REH, Stapleton D, Diefenbach-Jagger H, Ure F, Michelangeli VP, Simmons HA, Raisz LG, Martin TJ. Parathyroid hormone-related protein of malignancy: active synthetic fragments. *Science* (1987) 238: 1568-1570.
- 116.- Yates AJP, Gutiérrez GE, Smolens P, Travis PS, Katz MS, Aufdemorte TB, Boyce BF, Hymar TK, Poser JW, Mundy GR. Effects of a synthetic peptide of a parathyroid hormone-related protein in calcium homeostasis, renal tubular calcium reabsorption, and bone metabolism in vivo and in vitro in rodents. *J. Clin. Invest.* (1988) 81: 932-938.
- 117.- Thorikay M, Kramer S, Reynolds FH, Sorvillo JM, Doescher L, Wu T, Morris CA, Burtis WJ, Insogna KL, Valenzuela DM, Stewart AF. Synthesis of a gene encoding parathyroid hormone-like protein-(1-141): purification and biological characterization of the expressed protein. *Endocrinology* (1989) 124: 111-118.

- 118.- Stewart AF, Elliot J, Burtis WJ, Wu T, Insogna KL. Synthetic parathyroid hormone-like protein-(1-74): biochemical and physiological characterization. *Endocrinology* (1989) 124: 642-648.
- 119.- Loveridge N, Dean V, Goltzman D, Hendy GN. Bioactivity of parathyroid hormone and parathyroid hormone-like peptide: agonist and antagonist activities of amino-terminal fragments as assessed by the cytochemical bioassay and in situ biochemistry. *Endocrinology* (1991) 128: 1938-1946.
- 120.- Caulfield MP, McKee RL, Goldman ME, Thiede MA, Thompson DD, Fisher JE, Levy JJ, Seedor G, Horiuchi N, Clemens TL, Rodan GA, Rosenblatt M. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP): studies with synthetic peptides indicate that parathyroid hormone and PTHrP interact with the same receptor. *Nucl. Med. Biol.* (1990) 17: 633-637.
- 121.- Orloff JJ, Ribaud AE, McKee RL, Rosenblatt M, Stewart AF. A pharmacological comparison of parathyroid hormone receptors in human bone and kidney. *Endocrinology* (1992) 131: 1603-1661.
- 122.- Insogna KL, Stewart AF, Morris CA, Hough LM, Milstone LM, Centrella M. Native and synthetic analogue of the malignant-associated parathyroid hormone-like protein have in vitro transforming growth factor-like properties. *J. Clin. Invest.* (1989) 83: 1057-1060.
- 123.- Fenton AJ, Martin TJ, Nicholson GG. Long-term culture of disaggregate rat osteoclasts: inhibition of bone resorption and reduction of osteoclast-like cell number by calcitonin and PTHrP(107-139). *J Cell. Physiol.* (1993) 155: 1-7.
- 124.- Wu T, Soifer NE, Burtis WJ, Milstone LM, Stewart AF. Glycosilation of parathyroid hormone-related peptide secreted by human epidermal keratinocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1991) 73: 1002-1007.
- 125.- Burtis WJ, Fodero JP, Gaich G, Debeysey M, Stewart AF. Preliminary characterization of circulating amino- and carboxy-terminal fragments of parathyroid hormone-related peptide in humoral hypercalcemia of malignancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1992) 75: 1110-1114.
- 126.- Soifer NE, Dee KE, Insogna KL, Burtis WJ, Matovcik LM, Wu T, Milstone LM, Broadus AE, Philbrick WM, Stewart AF. Parathyroid hormone-related protein. Evidence for secretion of a novel mid-region fragment by three different cell types. *J. Biol. Chem.* (1992) 267: 18236-18243.
- 127.- Budayr AA, Nissenson RA, Klein RF, Pun KK, Clark OH, Diep D, Arnaud CD, Strewler GJ. Increased serum levels of a parathyroid hormone-like protein in malignancy-associated hypercalcemia. *Ann. Int. Med.* (1989) 111: 807-812.
- 128.- Henderson JE, Shustik C, Kremer R, Rabbani SA, Hendy GN, Goltzman D. Circulating concentrations of parathyroid hormone-like peptide in malignancy and in hyperparathyroidism. *J. Bone Miner. Res.* (1990) 5:

105-113.

- 129.- Burtis WJ, Brady TG, Orloff JJ, Ersbak JB, Warrell RP, Olson BR, Wu T, Mitnick ME, Broadus AE, Stewart AF. Immunochemical characterization of circulating parathyroid hormone-related protein in patients with humoral hypercalcemia of cancer. *New Engl. J. Med.* (1990) 322: 1106-1112.
- 130.- Kao PC, Klee GG, Taylor RL, Heath H III. Parathyroid hormone-related peptide in plasma of patients with hypercalcemia and malignant lesions. *Mayo Clin. Proc.* (1990) 65: 1399-1407.
- 131.- Grill V, Ho P, Body JJ, Johanson N, Lee SC, Kukreja SC, Moseley JM, Martin TJ. Parathyroid hormone-related protein: elevated levels in both humoral hypercalcemia of malignancy and hypercalcemia complicating metastatic breast cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1991) 73: 1309-1315.
- 132.- Imamura H, Sato K, Shizume K, Satoh T, Kasono K, Ozawa M, Ohmura E, Tsushima T, Demura H. Urinary excretion of parathyroid hormone-related protein fragments in patients with humoral hypercalcemia of malignancy and hypercalcemic tumor-bearing nude mice. *J. Bone Miner. Res.* (1991) 6: 77-84.
- 133.- Orloff JJ, Soifer NE, Fodero JP, Dann P, Burtis WJ. Accumulation of carboxy-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein in renal failure. *Kidney Int.* (1993) 43: 1371-1376.
- 134.- Todaro GJ, Fryling D, De Larco JE. Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1980) 77: 5258-5262.
- 135.- Tashjian AH, Voelkel EF, Lazzaro M, Singer FR, Roberts AB, Derynck R, Winkler ME, Levine L. Alpha and beta human transforming growth factors stimulate prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82: 4535-4538.
- 136.- Yates AJP, Favarato G, Aufdemorte TB, Marcelli C, Kester MB, Walker R, Langton BC, Bonewald L, Mundy GR. Expression of human transforming growth factor α by chinese hamster ovarian tumors in nude mice causes hypercalcemia and increased osteoclastic bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* (1992) 7: 847-853.
- 137.- Ibbotson KJ, D'Souza SM, Ng KW, Osborne CK, Niall M, Martin TJ, Mundy GR. Tumor-derived growth factor increases bone resorption in a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *Science* (1983) 221: 1292-1294.
- 138.- Gutiérrez GE, Mundy GR, Derynck R, Hewlett EL, Katz MS. Inhibition of parathyroid hormone-responsive adenylate cyclase in clonal osteoblast-

- like cells by transforming growth factor alpha and epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* (1987) 262: 15845-15850.
- 139.- Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factor. *Nature* (1986) 319: 516-518.
- 140.- Yoneda T, Alsina MM, Chavez JB, Bonewald L, Nishimura R, Mundy GR. Evidence that tumor necrosis factor plays a pathogenetic role in the paraneoplastic syndromes of cachexia, hypercalcemia and leukocytosis in a human tumor in nude mice. *J. Clin. Invest.* (1991) 87: 977-985.
- 141.- Balkwill F, Bueke F, Talbot D, Tavernier J, Osborne R, Naylor S, Durbin H, Fiers W. Evidence for tumor necrosis factor/cachectin production in cancer. *Lancet* (1987) i: 1229-1232.
- 142.- Johnson RA, Boyce BF, Mundy GR, Roodman GD. Tumors producing human TNF induce hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice. *Endocrinology* (1989) 124: 1424-1427.
- 143.- Blind E, Knappe V, Raue F, Pfeilschifter J, Ziegler R. Tumor necrosis factor α inhibits the stimulatory effect of the parathyroid hormone-related protein on cyclic AMP formation in osteoblast-like cells via protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1992) 182: 341-347.
- 144.- Gowen M, Wood OD, Ihrie EJ, McGuire MKB, Russell RGG. An interleukin 1-like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature* (1983) 306: 378-380.
- 145.- Dewhirst FE, Stashenko PP, Mole JE, Tsurumachi T. Purification and partial sequence of human osteoclast activating factor. *J. Immunol.* (1985) 135: 2562-2568.
- 146.- Le J, Vilcek J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab. Invest.* (1987) 56: 234-239.
- 147.- Sabatini M, Boyce B, Aufdemorte TB, Bonewald L, Mundy GR. Infusions of recombinant human interleukin-1 alpha and 1 beta cause hypercalcemia in normal mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85: 5235-5239.
- 148.- Boyce BF, Aufdemorte TB, Garrett IR, Yates AJP, Mundy GR. Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice. *Endocrinology* (1989) 125: 1142-1150.
- 149.- Nowak RA, Morrison NE, Goad DL, Gaffney EV, Tashjian AH jr. Squamous cell carcinomas often produce more than a single bone resorption-stimulating factor: role of interleukin-1 α . *Endocrinology* (1990) 127: 3061-3069.
- 150.- Dewhirst FE, Ago JM, Peros WJ, Stashenko P. Synergism between

- , parathyroid hormone and interleukin-1 in stimulating bone resorption in organ culture. *J. Bone Miner. Res.* (1987) 2: 127-134.
- 151.- Sato K, Fujii Y, Kasono K, Ozawa M, Imamura H, Kanaji Y, Kurosawa H, Tsushima T, Shizume K. Parathyroid hormone-related protein and interleukin-1 alpha synergistically stimulate bone resorption in vitro and increase the serum calcium concentration in mice in vivo. *Endocrinology* (1989) 124: 2172-2178.
- 152.- Caverzasio J, Rizzoli R, Vallotton MB, Dayer JM, Bonjour JP. Stimulation by interleukin-1 of renal calcium reabsorption in thyroparathyroidectomized rats. *J. Bone Miner. Res.* (1993) 8: 1219-1225.
- 153.- Tørring O, Turner RT, Carter Wb, Firek AF, Jacobs CA, Heath H III. Inhibition by human interleukin-1 α of parathyroid hormone-related peptide effects on renal calcium and phosphorus metabolism in the rat. *Endocrinology* (1992) 131: 5-13.
- 154.- Bringhurst FR, Bierer BE, Godeau F, Neyhand N, Varner V, Segre GV. Humoral hypercalcemia of malignancy: release of prostaglandin-stimulating bone-resorbing factor in vitro by human transitional-cell carcinoma cells. *J. Clin. Invest.* (1986) 77: 456-464.
- 155.- Shigeno C, Yamamoto I, Dokoh S, Hino M, Aoki J, Yamada K, Morita R, Kameyama M, Torizuka K. Identification of 1,24(R)-dihydroxyvitamin D₃-like bone-resorbing lipid in a patient with cancer-associated hypercalcemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1985) 61: 761-768.
- 156.- Seyberth HW, Segre GV, Morgan JL, Sweetman BJ, Potts JT jr, Oates JA. Prostaglandins as mediators of hypercalcemia associated with certain types of cancer. *New Engl. J. Med.* (1975) 293: 1278-1283.
- 157.- Franklin RB, Tashjian AH. Intravenous infusion of prostaglandin E₂ raises plasma calcium concentration in the rat. *Endocrinology* (1975) 97:240-243.
- 158.- Attie MF. Treatment of hypercalcemia. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* (1989) 18: 807-828.
- 159.- Mundy GR, Ibbotson KJ, D'Souza SM, Bertolini DR. Animal models for tumor hypercalcemia. En: Bone resorption, metastasis and diphosphonates. Ed. Garattini S. Raven Press, New York (1985); 7-16.
- 160.- Tashjian AH, Voelkel EF, Levine L, Goldhaber P. Evidence that the bone resorption-stimulating factor produced by mouse fibrosarcoma cells is prostaglandin E₂: a new model for the hypercalcemia of cancer. *J. Exp. Med.* (1972) 136: 1329-1343.
- 161.- Dopplet SH, Slovik DM, Neer RM, Nolan J, Zusman RM, Potts JT. Gut-mediated hypercalcemia in rabbits bearing VX2 carcinoma: new mechanism

- for tumor-induced hypercalcemia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79: 640-644.
- 162.- Rice BF, Ponthier RL, Miller MC. Hypercalcemia and neoplasia: a model system. Endocrinology (1971) 88: 1210-1216.
- 163.- Sica DA, Martodam RR, Aronow J, Mundy GR. The hypercalcemic rat Leydig cell tumor —a model of the humoral hypercalcemia of malignancy. Calcif. Tissue Int. (1983) 35: 287-293.
- 164.- Rice BF, Roth LM, Cole FE, Mac Phee A, Davis K, Ponthier R, Sternberg W. Hypercalcemia and neoplasia. Biologic, biochemical and ultrastructural studies of a hypercalcemia-producing Leydig cell tumor of the rat. Lab. Invest. (1975) 33: 428-439.
- 165.- Hirschel-Scholz S, Caverzasio J, Rizzoli R, Bonjour JP. Normalization of hypercalcemia associated with a decrease in renal calcium reabsorption in Leydig cell tumor-bearing rats treated with WR-2721. J. Clin. Invest. (1986) 78: 319-322.
- 166.- Insogna KL, Weir EC, Wu T, Stewart AF, Broadus AE, Burtis WJ, Centrella M. Co-purification of transforming growth factor beta-like activity with PTH-like and bone-resorbing activities from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. Endocrinology (1987) 120: 2183-2185.
- 167.- Minne H, Raue F, Bellwinkel S, Ziegler R. The hypercalcemic syndrome in rats bearing the Walker carcinosarcoma 256. Acta Endocrinol. (1975) 78: 613-624.
- 168.- Schmidt-Gayk H, Löhre H, Fischkal A, Goerttler K, Hoffman F. Urinary cyclic AMP and bone histology in Walker carcinosarcoma: evidence of parathyroid hormone-like activity. Eur. J. Cancer (1979) 15: 1211-1218.
- 169.- D'Souza SM, Ibbotson KJ, Smith DD, Mundy GR. Co-purification of a transforming growth factor with bone resorbing activity in the Walker rat carcinosarcoma: a mechanism for the humoral hypercalcemia of malignancy. Calcif. Tissue Int. (1983) 35: 658A.
- 170.- Rizzoli R, Fleisch H. The Walker 256/B carcinosarcoma in thyroparathyroidectomized rats. A model to evaluate inhibitors of bone resorption. Calcif. Tissue Int. (1987) 41: 202-207.
- 171.- Hurtado J, Esbrit P, Rapado A. Relative role of bone and kidney in the hypercalcemia associated with the rat Walker carcinosarcoma 256. Eur. J. Cancer (1991) 27: 76-79.
- 172.- Weir EC, Burtis WJ, Morris CA, Brady TG, Insogna KL. Isolation of 16000-dalton parathyroid hormone-like proteins from two animal tumors causing humoral hypercalcemia of malignancy. Endocrinology (1988) 123: 2744-2751.

- 186.- Lowry OH, Roberts NR, Meilinge WV, Hixon WS, Crawford EJ. The quantitative histochemistry of brain. Enzyme measurements. *J. Biol. Chem.* (1954) 207: 19-37.
- 187.- Windus DW, Cohn DE, Klahr S, Hammerman MR. Glutamine transport in renal basolateral vesicles from dogs with metabolic acidosis. *Am. J. Physiol.* (1984) 246: F78-F86.
- 188.- Bouhtiauy I, Lajeunesse D, Brunette MG. The mechanism of parathyroid hormone action on calcium reabsorption by the distal tubule. *Endocrinology* (1991) 128: 251-258.
- 189.- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* (1985) 260: 3440-3450.
- 190.- Esbrit P, García Ocaña A, García Cañero R, Manzano F, Jiménez Clavero MA. Biological properties of a renotropic protein present in plasma of uninephrectomized rats. *Renal Physiol. Biochem.* (1991) 14: 224-235.
- 191.- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* (1976) 72: 248-254.
- 192.- Stewart AF, Broadus AE. Humoral hypercalcemia of malignancy. En: *Advances in Endocrinology*. Ed. Mazafferri E. Yearbook Medical Publishers, Chicago (1990); 1-21.
- 193.- Ralston SH, Boyce BF, Cowan RA, Gardner MD, Fraser WD, Boyle IT. Contrasting mechanisms of hypercalcemia in patients with early and advanced humoral hypercalcemia of malignancy. *J. Bone Miner. Res.* (1989) 4: 103-111.
- 194.- Tuttle K, Kunan RT, Loveridge N, Mundy GR. Altered renal calcium handling in hypercalcemia of malignancy. *J. Am. Soc. Nephrol.* (1991) 2: 191-199.
- 195.- Halloran BP, Nissenson RA (eds.) *Parathyroid hormone-related protein: normal physiology and its role in cancer*. CRC Press, Boca Raton (1992).
- 196.- De Miguel F, García Cañero R, Esbrit P. Co-purification of calcium transport-stimulating and DNA-synthesis-stimulating agents with parathormone-like activity isolated from the hypercalcemic strain of the Walker 256 tumour. *Eur. J. Cancer* (1991) 27: 1022-1026.
- 197.- Torres R, Díaz Diego EM, de la Piedra C, Rapado A. Plasma of Walker 256 carcinosarcoma-bearing rats contains parathormone-related peptide. *Horm. Metab. Res.* (1992) 24: 246-247.
- 198.- Scharla SH, Minne HW, Lempert UG, Krieg P, Rappel S, Maurer E, Grohe U, Ziegler R. Osteolytic activity of Walker carcinosarcoma 256 is due to