

56
24'

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

Transporte de Ca^{2+} en mitocondrias de placenta
humana a término.

TESIS DE LICENCIATURA

Que para obtener el Grado de

B I O L O G O

presenta

OSCAR FLORES HERRERA

Mexico, D.F.

Marzo del 1992.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Pag.
Abreviaturas _____	1
Resumen _____	2
Introducción _____	4
Metodos _____	16
Resultados _____	21
Discusión _____	31
Referencias _____	43
Agradecimientos _____	50

ABREVIATURAS.

AdN	Adenín nucleótidos.
ADP	Adenín difosfato.
ATP	Adenín trifosfato.
BSA	Albúmina sérica de bovino.
CaBP	Proteína fijadora de calcio.
CAT	Carboxiatractilósido.
CR	Control respiratorio mitocondrial.
DNP	2',4'-dinitrofenol.
DOC	Desoxicolato.
EDTA	Etilendinitrilotetracetato disódico.
EGTA	Acido etilenglicol-bis-(β -aminoetil éter)-N,N' tetracético.
HCaBP	Proteína fijadora de calcio en placenta humana.
Kd	Constante de disociación.
Ki	Constante de inhibición.
K _{mapp}	Constante de Michaelis-Menten aparente.
MOPS	Acido morfolinopropano sulfónico.
MPH	Mitocondrias de placenta humana.
NAD ⁺	Nicotín adenín dinucleótido oxidado.
NAD(P) ⁺	Nicotín adenín dinucleótido fosfato oxidado.
NADH	Nicotín adenín dinucleótido reducido.
Pi	Fosfato inorgánico.
PTH	Paratohormona.
TCA	Acido tricloroacético.
TRIS	Tris(hidroximetil) aminometano.
V _{maxapp}	Velocidad máxima aparente.
$\Delta\psi$	Potencial de la membrana interna mitocondrial.
ΔpH	Diferencia de pH a través de la membrana interna mitocondrial.
1,25(OH) ₃ -D ₃	Vitamina D ₃ .

RESUMEN.

La regulación de la actividad de las deshidrogenasas intramitocondriales por el calcio es un hecho que ha sido bien demostrado, por lo que se ha propuesto que las mitocondrias, más que regular la concentración de calcio en el citosol, regulan su propia concentración. Sin embargo, el calcio podría intervenir en otros procesos asociados a la mitocondria. Por ejemplo, hemos observado que el calcio estimula la síntesis de progesterona e inhibe la respiración en las mitocondrias de la placenta humana. Dada la importancia de éste catión en la fisiología mitocondrial, en este trabajo estudiamos el mecanismo de transporte del calcio en las mitocondrias de placenta humana a término, mediante el empleo de mitocondrias con bajo contenido de calcio.

Al medir la captación de Ca^{2+} mitocondrial con el indicador metalocrómico Arsenazo III, observamos que el fosfato y el ADP aumentaron el transporte del ión. Por otro lado, el oxalato no provoca cambio alguno. Al estudiar el transporte de calcio radiactivo se obtuvieron resultados que muestran que el medio en el cual se lleva a cabo determina de manera importante la cinética del mismo. En un medio con KCl, la K_{mapp} fue de $111.833 \mu\text{M}$ y la V_{maxapp} de $61.230 \text{ nmolas/mg/min}$. Se estudió la naturaleza del transportador por medio del rojo de rutenio, inhibidor específico del uniportador de calcio en otros sistemas mitocondriales. Por último se estudió el efecto del transporte de Ca^{2+} sobre el $\Delta\psi$ de

Resumen.

las mitocondrias por medio del indicador metalocrómico Safranina O, y sobre el estado de reducción de los piridín nucleótidos, que se relaciona con la capacidad mitocondrial para retener al Ca^{2+} . Se observó una clara dependencia del transporte con respecto al $\Delta\psi$ y de la retención del Ca^{2+} al estado reducido de los piridín nucleótidos.

INTRODUCCION.

La placenta es un órgano transitorio encargado de llevar a término el desarrollo gestacional en los mamíferos. Existen variaciones en la estructura de la placenta dependiendo de la especie de mamífero a la que pertenece. De acuerdo con el arreglo de las diferentes capas celulares que presenta, ésta se ha clasificado en: epicoriónica, sindesmocoriónica, endocoriónica, hemocoriónica, etc (1). La placenta humana pertenece al tipo hemocoriónico, en donde el epitelio uterino es degradado, lo que permite un contacto íntimo entre el flujo sanguíneo materno y el epitelio de la placenta.

La morfología de la placenta humana es discoidal, con un promedio de 20 cm de diámetro y 3 cm de espesor en la parte central; su unidad funcional es el trofoblasto, con características sinciciales, y con un arreglo vascular que forma vellosidades, constituidas por dos capas celulares denominadas sinciotrofoblasto y citotrofoblasto (fig. 1), que rodean al capilar fetal (1); es en esta estructura en donde se lleva a cabo el transporte selectivo de nutrientes, a corriente y contracorriente, entre el flujo sanguíneo fetal y el materno (2).

La placenta tiene la capacidad de sintetizar hormonas proteicas (gonadotropina coriónica, somatomotropina coriónica y tirotropina coriónica) y esteroideas (pregnenolona, progesterona, dehidroepiandrosterona, androstenediona, 16 α -hidroxiandrostenedio-

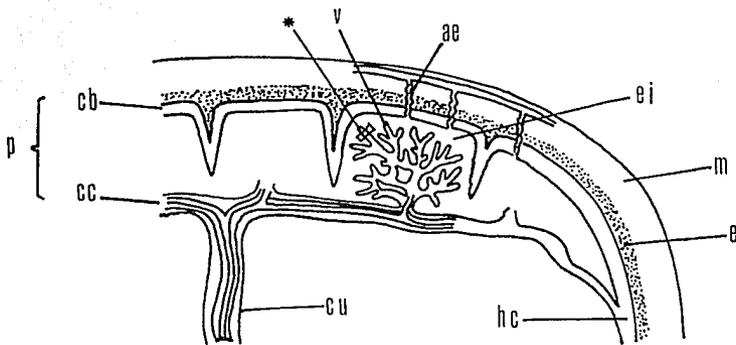


Fig.1. DIAGRAMA DE UN CORTE TRANSVERSAL DE LA PLACENTA HUMANA. EL FLUJO SANGUINEO MATERNO ENTRA AL ESPACIO INTERVELLOSO A TRAVES DE LAS ARTERIAS ESPIRALES; EL FLUJO SANGUINEO FETAL ENTRA A LA VELOCIDAD A TRAVES DE LA ARTERIA Y LA VENA UMBILICAL, LO QUE PERMITE EL TRANSPORTE DE NUTRIENTES Y DESECHOS ENTRE LA MADRE Y EL FETO. DONDE SE INDICA, v, VELOCIDAD; ae, ARTERIAS ESPIRALES; ei, ESPACIO INTERVELLOSO; m, MIOMETRIO; e, ENDOMETRIO -DECIDUA-; hc, HOJA CORIONICA; cu, CORDON UMBILICAL; cc, CARA CORIONICA DE LA PLACENTA; cb, CARA BASAL DE LA PLACENTA; p, CUERPO DE LA PLACENTA. EL ASTERISCO MUESTRA UNA REGION DE LA VELOCIDAD MARCADA EN UN RECUADRO QUE SE MUESTRA EN LA FIG. 2.

na, estrona y estriol), proteínas específicas, glucoproteínas (β_1 -glicoproteína, β -globulina fijadora de esteroides) y enzimas (fosfatasa alcalina, diamina oxidasa, L-cistina aminopeptidasa, y renina), que pueden modificar el metabolismo tanto del feto como de la madre (3, 4).

De las hormonas esteroideas, la progesterona es importante en el mantenimiento del embarazo. En condiciones normales, su síntesis está entre 250-800 mg en 24 horas en el último trimestre

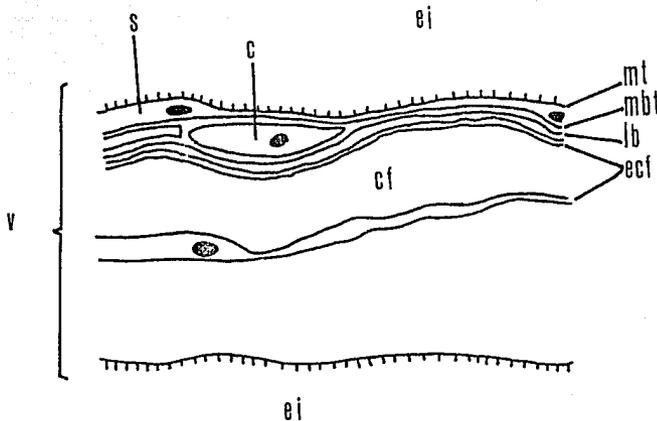


Fig.2. DIAGRAMA DE UN CORTE TRANSVERSAL DE UNA VELLOCIDAD DE PLACENTA HUMANA. POR SIMPLICIDAD SOLO SE MUESTRA UN CAPILAR FETAL. LA CIRCULACION FETAL Y MATERNA ESTAN SEPARADAS POR LAS MICROVELLOCIDADES Y EL ENDOTELIO DEL CAPILAR FETAL. ESTAS CAPAS CELULARES CONSTITUYEN LA BARRERA DE TRANSFERENCIA DE NUTRIENTES DE LA PLACENTA. DONDE SE INDICA, v, VELLOCIDAD; s, SINCICIOTROFOBLASTO; c, CITOTROFOBLASTO; ei, ESPACIO INTERVELLOSO; mt, MICROVELLOCIDADES DEL TROFOBLASTO; mbt, MEMBRANA BASAL DEL TROFOBLASTO; lb, LAMINA BASAL; ecf, ENDOTELIO DEL CAPILAR FETAL; cf, CAPILAR FETAL.

del mismo (5). Aunque su sitio y mecanismo de acción no se conoce, su ausencia provoca el aborto espontáneo del producto (6).

La placenta además de sintetizar compuestos de diversa naturaleza tiene la característica de poseer un transporte selectivo uni y bidireccional de nutrientes; aunado a esto, es la única zona de intercambio entre el feto y la madre, constituyendose así como una barrera selectiva entre ambos.

De entre los diferentes transportes que la placenta realiza, los más estudiados son aquellos relacionados con los siguientes nutrientes: carbohidratos, aminoácidos, lípidos e iones. El transporte de los principales compuestos de cada grupo se describe en seguida:

Carbohidratos. De estos, la glucosa que además de proporcionar energía, tiene como papel el aportar al feto el esqueleto carbonado necesario para la síntesis de otras moléculas (7), se transporta por difusión facilitada (8-11). Estudios sobre el gradiente de glucosa en el segundo trimestre del embarazo, muestran que el transporte se incrementa conforme avanza el desarrollo fetal (12). De la glucosa que llega a la placenta, el 60 - 80% se degrada en el trofoblasto a través de la glucólisis, hasta lactato. Esta vía metabólica es la principal fuente de obtención de energía en este órgano.

Aminoácidos. Los aminoácidos neutros son transportados por 3 de los 6 sistemas de transporte descritos para otros tejidos (13). Estos sistemas son A (alanina), L (leucina) y ASC (alanina, serina y cisteína). En conjunto, los tres sistemas transportan glutamina, alanina, glicina, prolina, serina, treonina, leucina, isoleucina, valina y fenilalanina (1). El resto de los aminoácidos, con excepción del glutámico que es acumulado en la placenta, son transportados por difusión facilitada (7, 14-16).

Lípidos. Se ha reportado que los ácidos grasos libres son transportados a través de la placenta por difusión simple (1). El

colesterol se transporta casi exclusivamente en partículas lipoproteicas (17) de la madre al feto, por medio de endocitosis mediada por receptores para lipoproteínas de baja densidad. La concentración total de colesterol en el plasma materno es 4 veces mayor que en el plasma umbilical a término (1), lo que sugiere que el colesterol es retenido por la placenta donde es utilizado en la síntesis de hormonas esteroideas, particularmente progesterona (3, 4).

Iones. Los aniones y cationes son transportados a través de la placenta de manera selectiva, dependiendo de las necesidades fetales. Existe un transporte pasivo de iones tales como el Cl^- (18) y el Na^+ (1) y un transporte activo de K^+ (19), Li^+ (1), Ca^{2+} y Pi^- (20, 21). Entre estos, el Ca^{2+} es particularmente vital y necesario en la formación del esqueleto, el mantenimiento de la función neuromuscular y la homeostasis de los mecanismos de coagulación fetal (22). Durante el desarrollo gestacional, el feto acumula Ca^{2+} de manera progresiva y asintótica (19, 23, 24), registrándose en el segundo mes de vida del producto, 0.032g de Ca^{2+} elemental y al octavo 20.4 g (25).

El transporte de Ca^{2+} a través de la placenta es bidireccional, con un transporte neto dependiente de ATP hacia el feto (1). No se sabe si el Ca^{2+} atraviesa la placenta en un estado libre, secuestrado en vesículas o unido e interiorizado en receptores de membrana plasmática (26). Sin embargo, algún mecanismo de control debe de existir en este órgano para que el

transporte de Ca^{2+} sea en dirección materno-fetal. Aún más, la presencia de este mecanismo de control se ve reforzada por el descubrimiento de un transporte activo de Ca^{2+} catalizado por dos ATPasas, una de baja y otra de alta afinidad, localizadas en la membrana celular del trofoblasto (23). Además de estas enzimas, se ha identificado, por técnicas inmunohistoquímicas, una proteína citosólica en el trofoblasto, capaz de unir específicamente Ca^{2+} (22), de manera similar a como lo hace la calmodulina. El descubrimiento de estas proteínas y su posible relación con el transporte de Ca^{2+} , sumado al transporte masivo del ión en la placenta, sugieren que el control de la transferencia de Ca^{2+} probablemente se encuentre en el lado fetal de la misma (23).

Los estudios de microscopia electrónica en la placenta humana han mostrado que el Ca^{2+} se distribuye preferentemente, como en otras células, en el retículo endoplásmico, aparato de Golgi y en las mitocondrias (27), por lo que se ha propuesto para estos orgánulos, un papel regulador de la concentración de Ca^{2+} citosólico. Esto se debe a que el Ca^{2+} a nivel intracelular tiene como función regular una amplia variedad de actividades celulares, que incluyen el movimiento y división celular, secreción, endocitosis, transmisión sináptica, contractilidad, función del citoesqueleto y metabolismo intermedio, el Ca^{2+} actúa además como segundo mensajero de ciertas moléculas extracelulares (28). Por lo tanto la concentración de éste catión debe ser finamente regulada. Aunque la concentración de Ca^{2+} en las células, suponiendo que se

encuentra en estado libre, es similar a la concentración del calcio extracelular ($\geq 10^{-3}$ M), la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol es más de mil veces inferior ($\leq 10^{-7}$ M), ya que la mayor parte del Ca^{2+} en las células está unido a otras moléculas o secuestrado en los orgánulos arriba mencionados (29).

A nivel subcelular, el Ca^{2+} también es un regulador importante de diversas vías metabólicas. En las mitocondrias, el Ca^{2+} modula la actividad de dos deshidrogenasas del ciclo de Krebs (la isocitrato deshidrogenasa y 2-oxoglutarato deshidrogenasa) y de la piruvato deshidrogenasa, las cuales se ven afectadas por cambios en la concentración de Ca^{2+} libre intramitocondrial (30-32).

Las mitocondrias de placenta humana a término (MPH), tienen, al igual que otros sistemas mitocondriales, la capacidad de sintetizar ATP a través de la cadena clásica de transporte de electrones, caracterizada por la susceptibilidad por rotenona, antimicina y cianuro (33). Sin embargo, la fosforilación oxidativa de estas mitocondrias es lenta en comparación con la de mitocondrias aisladas de otras fuentes (34, 35). La baja actividad de la fosforilación oxidativa puede ser causada por la anoxia relativa a la que el tejido se expone durante el trabajo de parto (36). Sin embargo, no se descarta la posible influencia que pudieran tener las altas concentraciones de hormonas esteroideas sobre la fosforilación oxidativa (35, 37), ya que se ha observado que inhiben la fosforilación en otros sistemas mitocondriales.

Otra característica importante de las MPH en comparación con las mitocondrias de otros tejidos esteroideogénicos, es la naturaleza de los sustratos que pueden ser utilizados para formar equivalentes reductores; por ejemplo, el glutamato y glicerol 3-fosfato son oxidados por las MPH pero no mantienen la respiración de las mitocondrias de la corteza adrenal de cerdo (38).

Además de la formación de ATP, las MPH también utilizan oxígeno y agentes reductores para la biosíntesis de progesterona a partir del colesterol (33, 39, 40) a través de un sistema de transporte de electrones alterno (33,41,42) constituido por una flavoproteína, una proteína hierro-azufre y un citocromo P450 (41-43). Es este citocromo el que lleva a cabo la transformación de colesterol a pregnenolona (33, 44).

Por último, las MPH presentan una elevada concentración de colesterol en la membrana interna (30 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína mitocondrial en comparación con 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en las mitocondrias de hígado de rata; 45) que podría rigidizar la membrana considerablemente, restringiéndose la capacidad catalítica de las proteínas de membrana.

Durante algún tiempo se postuló que el transporte de Ca^{2+} mitocondrial estaba relacionado con la regulación fina del catión a nivel citosólico (46-49). Sin embargo, se ha demostrado que el retículo endo(sarco)plásmico y la membrana plasmática contribuyen en la regulación del Ca^{2+} citosólico en mayor medida que la

mitocondria (30, 50, 51). Si bien es cierto que la mitocondria, en condiciones de alto contenido de Ca^{2+} citosólico, puede almacenar grandes cantidades de Ca^{2+} en su matriz sin alterar su concentración iónica, debido a la acumulación simultánea de Pi, y la formación de precipitados de cristales de hidroxapatita (51, 52), éste proceso se realiza en un periodo de tiempo de minutos; por esto, la mayor importancia del transporte de Ca^{2+} en las mitocondrias es la de regular su propia concentración y no la del citosol.

El Ca^{2+} es transportado en las mitocondrias de mamíferos a expensas del potencial de membrana generado por la respiración, o en condiciones experimentales, por la hidrólisis del ATP (53). Este transporte no es inhibido por la oligomicina, lo que sugiere que la ATPasa no participa directamente. Por otra parte, durante el transporte de Ca^{2+} la fosforilación del ADP no ocurre (54), lo que indica que el transporte de Ca^{2+} tiene prioridad sobre la fosforilación del ADP para el uso de la fuerza protón motriz.

Se ha reportado que el transporte de Ca^{2+} se favorece en presencia de otras moléculas como el Pi, el cual restablece el ΔpH que se modificó por la entrada de Ca^{2+} y la salida neta de protones a través de la cadena respiratoria (55). Además, como se mencionó, el Pi ayuda a almacenar Ca^{2+} en la matriz mitocondrial en forma de cristales de hidroxapatita.

Por otra parte se ha reportado que el oxalato aumenta el transporte de Ca^{2+} en las mitocondrias, formando de manera similar

a la acción del fosfato, la sal de oxalato de calcio (54).

Vasington y Murphy (56), han reportado que el ATP o ADP son moléculas que también facilitan el transporte de Ca^{2+} . Estos nucleótidos favorecen la precipitación de los cristales de hidroxapatita, y al igual que el Mg^{2+} , evitan el deterioro estructural de la mitocondria. De igual manera, se ha reportado que el ATP o el ADP, en combinación con el Mg^{2+} , son capaces de restaurar el $\Delta\psi$ colapsado por la acción del Ca^{2+} y el Pi dentro de la mitocondria (56-58).

Chávez y Jay (59), demostraron que los adenín nucleótidos podrían estimular a la malato deshidrogenasa, lo que favorecería la reducción de los piridín nucleótidos mitocondriales evitando la salida del Ca^{2+} acumulado por la mitocondria (60, 61). Lehninger (60) reportó que la oxidación de los piridín nucleótidos se acompaña de una salida masiva de Ca^{2+} de la mitocondria; por otro lado, la reducción del NAD^+ es seguida de una recaptura de Ca^{2+} . Es importante hacer notar que las mitocondrias durante la oxidación del NADH permanecen energizadas (60), por lo que la liberación de Ca^{2+} no se puede atribuir a un efecto indirecto sobre el transportador debido a un colapso del $\Delta\psi$ (54).

Las investigaciones en otros sistemas mitocondriales revelan que la naturaleza del transportador de Ca^{2+} es un uniportador (53). Este uniportador que está presente en casi todos los tipos de mitocondrias muestra las siguientes características: 1) es de baja especificidad, ya que puede transportar Sr^{2+} en proporciones

relativamente altas en condiciones especiales (62-65), 2) dependiente del $\Delta\psi$ para su actividad, siendo la fuerza protón motriz utilizada para llevar a cabo el transporte de Ca^{2+} , 3) se inhibe por lantánidos (53, 66-71) y por rojo de rutenio, un complejo inorgánico hexavalente de rutenio (72), que inhibe con alto grado de especificidad al uniportador (68, 73, 74) de forma no competitiva con una K_i de 3×10^{-8} M en el caso de las mitocondrias de hígado de rata (66, 68, 74,).

El Mg^{2+} , en concentraciones citosólicas, interactúa con el uniportador y disminuye su actividad (53), por lo que se le considera como un regulador natural del transporte de Ca^{2+} a nivel celular.

Existen, sin embargo, una variedad de posibles mecanismos para explicar el sistema de transporte de Ca^{2+} , entre los que se encuentran, además del uniportador, un antiportador de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (75), un simportador de $(\text{Ca}_2)^{4+}-\text{HPO}_4^{2-}$ (76, 77) y otro de $\text{Ca}^{2+}-\beta$ -hidroxibutirato (78). Estos tres últimos mecanismos son termodinámicamente equivalentes (72). Por otra parte, se ha calculado la acumulación de Ca^{2+} en el equilibrio para los mecanismos propuestos, encontrándose que el más eficiente es el uniportador (79).

Datos preliminares de éste laboratorio indican que el Ca^{2+} estimula la síntesis de progesterona mitocondrial y al mismo tiempo inhibe la cadena respiratoria. Estos resultados sugieren que el Ca^{2+} podría regular el metabolismo mitocondrial en la

placenta humana a término.

En este trabajo se estudia y caracteriza la cinética del transporte de Ca^{2+} en MPH, así como el efecto del Pi, adenín nucleótidos, oxalato y rojo de rutenio sobre dicho transporte. Además se estudió el efecto del transporte de Ca^{2+} sobre el $\Delta\psi$ y la relación oxido-reducción de los piridín nucleótidos.

METODOS.

Aislamiento de mitocondrias de placenta humana.

Las mitocondrias se obtuvieron de placentas humanas a término procesadas dentro de los primeros 40 minutos después de su expulsión. El tejido se mantuvo en baño de hielo, y se lavó con 250 mM de sacarosa, 1 mM EDTA, pH 7.3 (medio A) para eliminar el exceso de sangre. Después se separaron los cotiledones y se cortaron en trozos pequeños, homogenizándolos de manera controlada en dos pulsos, uno de 30 segundos y otro de 1 minuto en un Polytron Brinkmann Instruments a 3,000 revoluciones/minuto, en 850 ml de medio A, a 4°C. El homogenado se filtró y el pH se ajustó a 7.3 con Tris base. Posteriormente se centrifugó a $1,250 \times g$ durante 15 minutos. El sobrenadante se recuperó y se centrifugó a $10,250 \times g$ por 10 minutos. El precipitado conteniendo a las mitocondrias, se resuspendió en 15 ml de medio A y se centrifugó a $1,250 \times g$ durante 4 minutos. Finalmente el sobrenadante se centrifugó a $11,220 \times g$ por 10 minutos (80). Las mitocondrias se resuspendieron en el menor volumen posible y se mantuvieron en hielo.

Cuantificación de proteína mitocondrial.

La concentración de proteína mitocondrial se determinó por el método de Lowry y cols (81), empleando albúmina sérica de bovino (BSA) como referencia.

Determinacion del consumo de oxigeno de las MPH.

A las MPH, se les determinó polarográficamente, el consumo de oxígeno con un electrodo tipo Clark en un medio que contenía 10 mM Pi, 10 mM succinato-Tris, 10 mM Mg^{2+} , 1 mM EGTA y 0.2 % BSA, suplementado con medio A para completar 3 ml, a un pH final de 7.3. La respiración se estimuló con la adición de 300 nmolas de ADP. La temperatura fue de 20°C y una concentración de proteína mitocondrial de 1 mg/ml de medio.

Obtencion de MPH con bajo contenido de Ca^{2+} .

Para estudiar el transporte de Ca^{2+} , se emplearon mitocondrias con bajo contenido del ión, las cuales se obtuvieron después de incubar a las MPH en diferentes medios que contenían:

- i) 2 mM EGTA, 0.2% BSA.
- ii) 2 mM EGTA, 0.2% BSA, 4 mM Mg^{2+} .
- iii) 2 mM EGTA, 0.2% BSA, 2 mM ADP.
- iv) 2 mM EGTA, 0.2% BSA, 2 mM ATP.
- v) 2 mM EGTA, 0.2% BSA, 4 mM Mg^{2+} , 2 mM ATP.
- vi) 2 mM EGTA, 0.2% BSA, 2 mM Mg^{2+} , 2 mM ATP.

Después de 15 minutos de incubación a 4°C con agitación constante, las mitocondrias se recuperaron por centrifugación a $11,220 \times g$ por 10 minutos y se cuantificó el Ca^{2+} intramitocondrial precipitando a las MPH con ácido tricloroacético (TCA) al 30%, separando las proteínas mitocondriales desnaturalizadas por centrifugación, se neutralizó el sobrenadante

con KOH y se cuantificó la concentración de Ca^{2+} por medio del indicador metalocrómico murexida (82), en el siguiente medio: 100 mM KCl, 20 mM MOPS, pH de 7.2. El ensayo se realizó en un espectrofotómetro Beckman DU-70 a 540-507 nm. Se utilizó como control del ensayo, la cuantificación del contenido de Ca^{2+} de las mitocondrias de hígado de rata.

Determinación del transporte de Ca^{2+} en MPH.

Las condiciones óptimas para un mayor transporte de Ca^{2+} se determinaron en presencia del indicador metalocrómico arsenazo III (59,82), en un espectrofotómetro Aminco DW 2A a 685-675 nm en un medio que contenía 250 mM sacarosa, 10 mM succinato-Tris, 10 mM acetato-Tris, 10 mM HCl-Tris y 10 mg rotenona con un pH final de 7.3 (59). La concentración de proteína fue de 1 mg/ml de medio.

Para determinar la cinética del transporte, se incubaron las MPH (1 mg/ml de medio) con diferentes concentraciones de Ca^{2+} radiactivo en los siguientes medios:

Medio B) 250 mM sacarosa, 10 mM succinato-Tris, 10 mM acetato-Tris, 10 mM HCl-Tris y 10 mg de rotenona, con un pH final de 7.3.

Medio C) 125 mM KCl, 10 mM succinato-Tris, 10 mM acetato-Tris, 10 mM HCl-Tris y 10 mg de rotenona, con un pH final de 7.3.

Para determinar el transporte se utilizó un sistema de filtración en membranas de Millipore (0.45 μm). La reacción se

inicio al adicionar las MPH y se tomaron alicuotas de 100 μ l de la suspensión de mitocondrias a diferentes tiempos, que se filtraron y lavaron con 10 ml de CaCl_2 100 mM o de LaCl_3 1 mM, para eliminar la unión inespecífica de Ca^{2+} a la mitocondria. Los parámetros cinéticos se obtuvieron por medio del programa Simplex, ajustando los datos a la ecuación de Michaelis-Menten.

A los diferentes medios empleados en los experimentos descritos, se les eliminó el Ca^{2+} contaminante al pasarlos por una resina de intercambio denominada Chelex-100; la concentración final del Ca^{2+} que fue aproximadamente de 15 μM , se cuantificó en un espectrofotómetro Aminco DW 2A utilizando Arsenazo III.

Inhibición del transporte por rojo de rutenio.

El efecto de rojo de rutenio sobre el transporte de Ca^{2+} se ensayó con Ca^{2+} radiactivo en el medio C. Se utilizaron diferentes concentraciones de rojo de rutenio en el orden μM con una secuencia creciente de concentración de Ca^{2+} . Se tomaron alicuotas de 100 μ l de la suspensión de mitocondrias a diferentes tiempos y se continuo con el proceso descrito para el estudio de la cinética del transporte de Ca^{2+} .

Efecto del transporte de Ca^{2+} sobre el $\Delta\psi$.

El efecto del Ca^{2+} sobre el $\Delta\psi$ se estudió por medio del indicador metalocrómico Safranina O en un espectrofotómetro Aminco DW 2A a 533-511 nm (83) en el medio C. La concentración de Ca^{2+} en

cada adición fue de 100 nmolas. La concentración final de proteína mitocondrial fue de 1 mg/ml.

Efecto del transporte de Ca^{2+} sobre el estado final de oxido-reduccion de los piridin nucleotidos.

El efecto del transporte de Ca^{2+} sobre el estado de oxido-reducción de los piridin nucleótidos, se estudió usando un espectrofotómetro Aminco DW 2A a 370-340 nm (59) en el medio C. La concentración de Ca^{2+} en cada adición fue de 100 nmolas. La concentración final de proteína mitocondrial fue de 1 mg/ml.

RESULTADOS.

El efecto del ATP, ADP, Mg^{2+} EGTA y BSA sobre el contenido de Ca^{2+} y los parámetros bioenergéticos de las MPH se muestran en la Tabla I. Se puede observar que las MPH incubadas con el medio "iv", que contiene 2 mM EGTA, 2 mM ATP, 2 mM Mg^{2+} y 0.2 % BSA tuvieron la menor concentración de Ca^{2+} intramitocondrial, (23.0 nmolas/mg) con una disminución del 56.2% comparado con el control.

Por otro lado, el control respiratorio (CR) mejoró con la reducción del Ca^{2+} intramitocondrial, elevándose de 3.83 a 5.7. Sin embargo, el consumo total de oxígeno se incrementó de 116 a 462 nat g oxígeno/mg/min, por lo que la relación P:O disminuyó de 1.81 a 0.65.

Las MPH con bajo contenido de Ca^{2+} intramitocondrial se utilizaron para caracterizar el transporte de este ión. En los experimentos de la figura 3 se estudió el efecto del ADP, Pi y oxalato sobre el transporte, ya que se ha reportado que la presencia de estos en el medio de incubación favorece el transporte de Ca^{2+} . En la figura como se puede observar, la presencia de 3.3 mM Pi y 0.2 mM ADP favorecen el transporte de Ca^{2+} (trazo d) en relación al control (trazo a). Sin embargo, cabe hacer notar que la adición de ADP o Pi por separado (trazos b y c respectivamente), no modifica significativamente el transporte de Ca^{2+} cuando se compara con el control, por lo que se puede concluir que tanto el Pi como el ADP se requieren para favorecer

TABLA I.

Efecto de la presencia de EGTA, BSA, ATP, ADP y Mg^{2+}
en el contenido de Ca^{2+} intramitocondrial y en
los parámetros bioenergéticos de las MPH.

MEDIO\PARAMETRO.	EDO 3	EDO 4	CR	CONS. O_2^*	P:O	[Ca] ^e
Control	49.30	12.86	3.83	116.0	1.81	52.50
0.2% BSA, 2mM EGTA	60.00	12.44	4.82	374.0	0.66	46.01
0.2% BSA, 2mM EGTA 4mM Mg^{2+}	106.67	22.65	4.71	468.0	0.64	64.6
0.2% BSA 2mM EGTA 2mM ADP	80.95	21.65	3.74	255.0	1.18	43.89
0.2% BSA, 2mM EGTA 2mM ATP	97.67	24.33	4.01	492.0	0.51	43.22
0.2% BSA, 2mM EGTA 2mM ATP, 4mM Mg^{2+}	104.67	26.00	4.03	420.0	0.72	39.63
0.2% BSA, 2mM EGTA 2mM ATP, 2mM Mg^{2+}	53.30	9.33	5.70	462.0	0.65	23.00

* nat g Oxígeno/mg/min

^e nmol/las.

el transporte de Ca^{2+} . Por otra parte, la adición de 3 mM de oxalato a las MPH no modificó la velocidad del transporte (trazo e). En todos los casos, la liberación de Ca^{2+} como

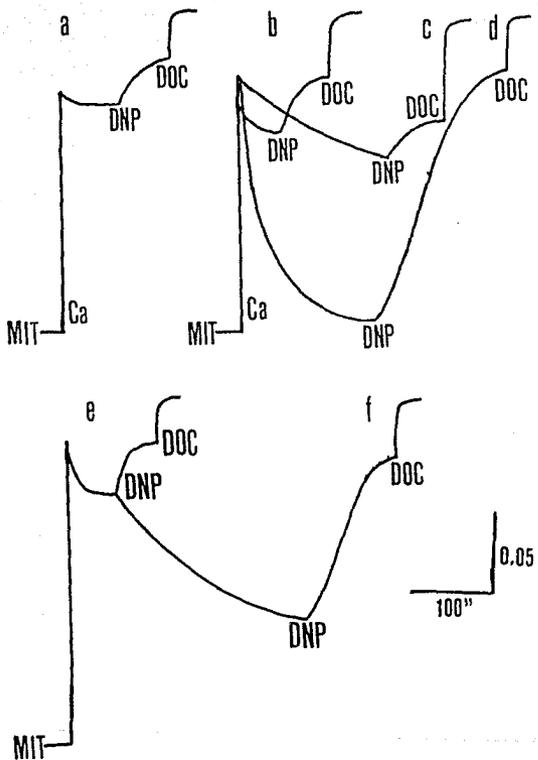


Fig.3. EFECTO DEL P_i , ADP Y OXALATO SOBRE EL TRANSPORTE DE CALCIO EN LAS MPH. a) CONTROL. LAS MPH FUERON INCUBADAS EN EL MEDIO B DESCRITO EN METODOS; LOS TRAZOS SE REALIZARON EN PRESENCIA DE b) 0.2 mM DE ADP, c) 3.3 mM DE P_i , d) 0.2 mM ADP/ 3.3 mM P_i , e) 3 mM DE OXALATO, f) 0.2 mM ADP/ 3.3 mM P_i / 3mM OXALATO. EN DONDE SE MUESTRA MIT, MITOCONDRIAS; DNP, 2', 4'-DINITROFENOL; DOC, DESOXICOLATO.

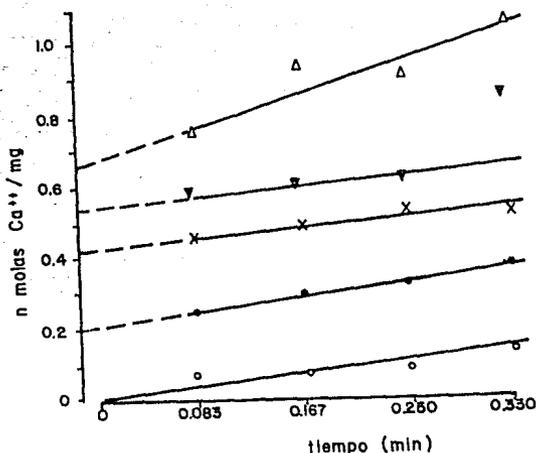


Fig. 4. VELOCIDAD DEL TRANSPORTE DE CALCIO EN HPH INCUBADAS EN EL MEDIO B DESCRITO EN METODOS. LAS CONCENTRACIONES DEL ION SON (O) 10 mM, (●) 30 mM, (X) 50 mM, (▼) 75 mM Y (Δ) 100 mM.

resultado de la adición del desacoplante 2',4'-dinitrofenol (DNP), sugiere que los cambios observados en la absorvencia del Arsenazo III se deben al transporte del catión y no a una fijación inespecífica, mientras que la adición de desoxicolato de sodio (DOC), un detergente que desorganiza la membrana, muestra la concentración total de Ca^{2+} presente.

Con base en estos resultados se determinaron las características cinéticas del transporte de Ca^{2+} , con el empleo de un medio suplementado con 3.3 mM Pi y 0.2 mM ADP. En la figura 4 se muestra el transporte de Ca^{2+} radiactivo en el medio B,

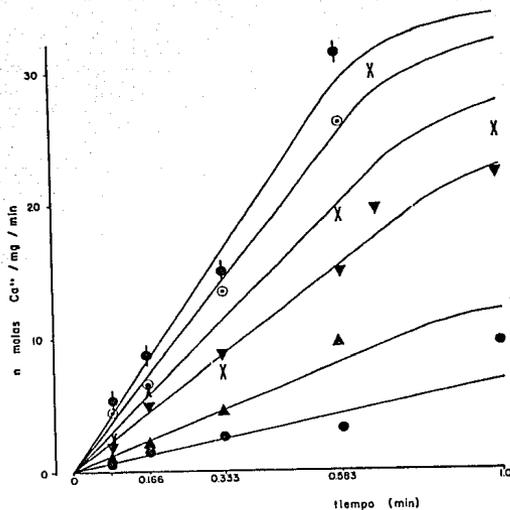


Fig. 5. VELOCIDAD DEL TRANSPORTE DE CALCIO EN MPH INCUBADAS EN EL MEDIO C DESCRITO EN METODOS. LAS CONCENTRACIONES DEL ION SON (●) 20 mM, (▲) 60 mM, (X) 100 mM, (▼) 200 mM, (⊙) 400 mM Y (⊕) 600 mM.

suplementado con sacarosa, debido a que en presencia de esta molécula se determinó el consumo de oxígeno, el CR y la relación P:O. Como se puede observar, el transporte no parte de cero, probablemente debido a la presencia de un transporte demasiado rápido y complejo. Sin embargo, se muestra un aumento en la cantidad total de Ca^{2+} transportado al incrementar la concentración del ión en el medio. Por otro lado, en la figura 5 se muestra que el transporte de Ca^{2+} en un medio con potasio y sin

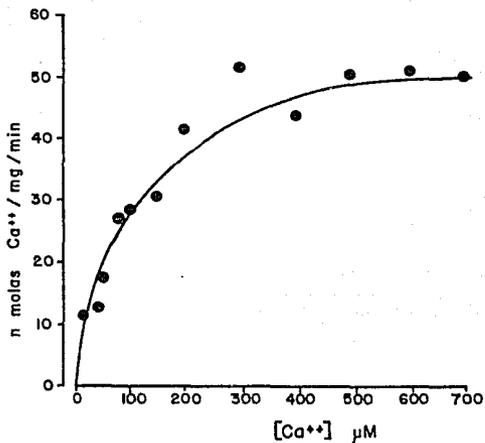


Fig. 6. CINETICA DEL TRANSPORTE DE CALCIO EN HPH, INCUBADAS EN EL MEDIO C DESCRITO EN METODOS. SE OBSERVA UN COMPORTAMIENTO DE TIPO MICHAELIS-MENTEN, CON UNA K_{mapp} DE 111.83 mM Y UNA V_{maxapp} DE 61.23 nmolas Calcio/mg/minuto.

sacarosa, es lineal con respecto al tiempo hasta los 40 segundos y parte de cero. En estas condiciones las velocidades que se obtienen a partir de las pendientes muestran una cinética de tipo Michaelis-Menten con respecto a las concentraciones de Ca^{2+} extramitocondrial. El lavado con 100 mM de $CaCl_2$ o 1 mM de $LaCl_3$, asegura dentro de un intervalo razonable, que los resultados obtenidos sean el producto del transporte del catión y no de la fijación inespecífica.

Sin embargo, se quiso descartar la presencia de un transporte de Ca^{2+} independiente de energía. Para esto se midió el transporte

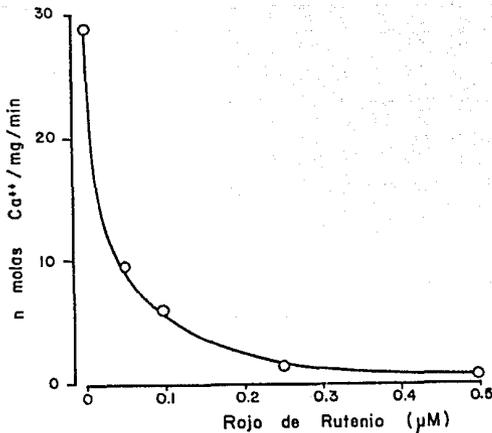


Fig.7. EFECTO DEL INHIBIDOR ROJO DE RUTENIO EN EL TRANSPORTE DE CALCIO. LAS MPH SE INCUBARON EN EL MEDIO C DESCRITO EN METODOS. SE PUEDE OBSERVAR UNA DISMINUCION DEL 97.1 % EN EL TRANSPORTE DE CALCIO.

o fijación inespecífica de Ca^{2+} en las MPH en el medio B, sin sustrato. Los resultados muestran que hay una captura de Ca^{2+} que no depende de energía cuyo valor es solamente del 11% en relación con el transporte en presencia de sustrato (datos no mostrados). Sin embargo estos resultados no modifican la cinética del transporte.

Con los resultados obtenidos se calcularon los parámetros cinéticos del transporte de Ca^{2+} y su obtuvieron una K_{mapp} de 111.833 μM y una V_{maxapp} de 61.23 nmolas/mg/min (fig.6). Como se puede observar, el transporte muestra una cinética de saturación,

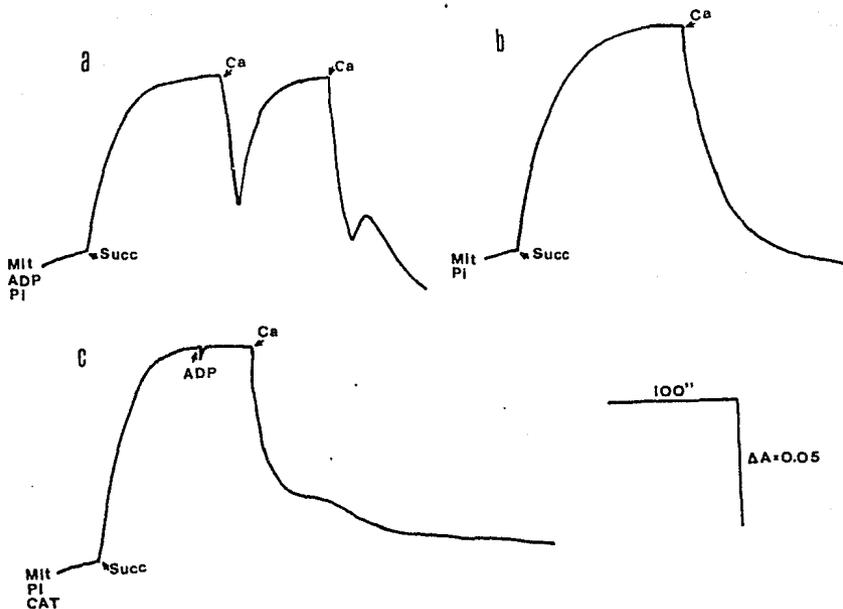


Fig. 8. EFECTO DEL TRANSPORTE DE CALCIO EN EL $\Delta\psi$ DE LAS MPH. EL MEDIO DE INCUBACION ES EL C DESCRITO EN METODOS. LA REACCION SE INICIO CON LA ADICION DEL SUCCINATO. DONDE SE INDICA, Mit, MITOCONDRIAS; Pi, FOSFATO; ADP, ADENIN DINUCLEOTIDO, Succ, SUCCINATO, Ca, CALCIO; cat, CARBOXYTRACTILOSIDO A UNA CONCENTRACION FINAL DE 40 mM.

de tipo Michaelis-Menten.

De acuerdo con lo reportado, el rojo de rutenio inhibe el transporte de Ca^{2+} . En la figura 7 se observa que el transporte disminuye en un 97.1% con $0.5 \mu M$ del inhibidor, sin embargo una inhibición del 62 % se puede registrar a partir de una

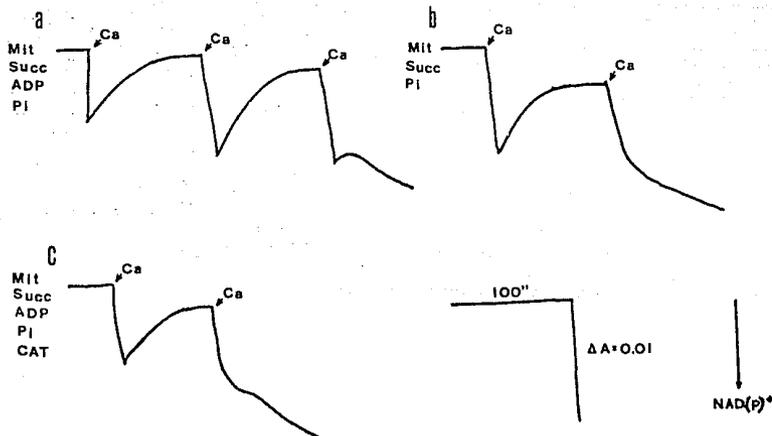


Fig. 9. EFECTO DEL TRANSPORTE DE CALCIO EN EL ESTADO FINAL DE OXIDO REDUCCION DE LOS PIRIDIN NUCLEOTIDOS EN LAS MPH. EL UTILIZADO FUE EL C DESCRITO EN METODOS. EL EXPERIMENTO SE INICIO CON LA ADICION DEL CALCIO, SIENDO SU CONCENTRACION EN CADA PULSO DE 100 nmolas. DONDE SE INDICA, Mit, MITOCONDRIAS; SUCCINATO; ADP, ADENIN DINUCLEOTIDO; PI, MITOCONDRIAS; CARBOXIATRACTILOSIDO, CONCENTRACION FINAL DE 40 mH; Ca, CALCIO.

concentración de $0.05 \mu\text{M}$, lo que sugiere que el acarreador de Ca^{2+} de las MPH es similar a los descritos en otros sistemas mitocondriales.

Se ha observado que la entrada de Ca^{2+} a las mitocondrias produce una rápida disminución del $\Delta\psi$ seguida de una fase lenta de recuperación, como consecuencia del aumento de la actividad de la cadena respiratoria. En la figura 8 se muestra el efecto de este catión y del ADP sobre $\Delta\psi$ de las MPH. Se puede observar que en

presencia de ADP el $\Delta\psi$ se disipa y recupera después de la adición de 100 nmolas de Ca^{2+} (trazo a), mientras que en ausencia del ADP, el potencial se abate permanentemente con la misma adición del catión (trazo b). El carboxiatractilósido (CAT), un inhibidor del translocador de adenín nucleótidos, se utilizó para determinar si el efecto del ADP se lleva a cabo en el interior mitocondrial o era resultado de un efecto quelante (trazo c). Los resultados muestran que en presencia de CAT y ADP el colapso del $\Delta\psi$ sigue la misma cinética que la del trazo b al añadir 100 nmolas de Ca^{2+} . Lo que sugiere que el ADP ejerce su efecto en el interior mitocondrial.

El efecto del transporte de Ca^{2+} sobre el estado de reducción de los piridín nucleótidos se muestra en la figura 9. Como se puede observar, en presencia de succinato, ADP y fosfato los piridín nucleótidos se oxidan rápido y se reducen lentamente con cada adición de Ca^{2+} (trazo a). En el trazo b se puede observar que la presencia de ADP es necesaria para que los piridín nucleótidos se reduzcan en presencia de Ca^{2+} , ya que en su ausencia solamente se requieren dos pulsos de Ca^{2+} para que estos no vuelvan a ser reducidos. Para saber el sitio en donde se lleva a cabo el efecto del ADP, se empleo el CAT. En el trazo c se muestra el efecto que tiene el CAT sobre el efecto del ADP en la oxidación de los piridín nucleótidos, observandose que la acción del ADP es en el interior mitocondrial.

DISCUSION.

Los resultados obtenidos con las MPH incubadas en presencia de EGTA, BSA, Mg^{2+} y ATP muestran que la disminución del contenido de Ca^{2+} intramitocondrial (de 52.5 a 23 nmolas/mg de proteína) se asocia con un incremento del CR (de 3.83 a 5.7 nat g oxígeno/mg/min). Bajas concentraciones de Ca^{2+} intramitocondrial podrían favorecer la estimulación de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs, y promover el consumo de oxígeno y la salida de protones a través de la cadena respiratoria, lo que restablecería así el $\Delta\psi$ (30-32). Aunado a esto, se debe considerar la eliminación de desacoplantes naturales de la cadena respiratoria, tales como los ácidos grasos libres y los derivados esteroidogénicos (33) por la adición de la BSA durante la incubación de las MPH. Sin embargo, después del tratamiento para disminuir la concentración de Ca^{2+} de la matriz mitocondrial y eliminar los desacoplantes de la cadena respiratoria, la relación P:O está por debajo del valor teórico -que al utilizar el succinato como sustrato debe ser 2-, debido a que el consumo total de oxígeno se incrementa. Para este fenómeno aún no tenemos una explicación. No obstante, se logró obtener mitocondrias con un bajo contenido de Ca^{2+} y un CR superior a 4, lo que permitió realizar los experimentos de transporte de Ca^{2+} .

La determinación de las condiciones óptimas para ensayar el transporte de Ca^{2+} se hizo con el Arsenazo III, observandose que, al igual que en otras mitocondrias, el Pi y el ADP mejoraron el

transporte de Ca^{2+} hacia la matriz mitocondrial, posiblemente debido a que el Pi ayuda en el almacenaje de Ca^{2+} en la matriz y a restablecer el ΔpH . Por otro lado, el ADP además de favorecer la precipitación del complejo Pi-Ca^{2+} , estimula la cadena respiratoria provocando la salida de protones de la mitocondria y restableciendo así, el $\Delta\psi$ (63,64). Con la salida de protones de la mitocondria se forma la fuerza protónmotriz (63-65), la cual, como se ha reportado (64,65), se utiliza para transportar el Ca^{2+} . Esto se confirma por el efecto que tiene el desacoplante dinitrofenol (DNP) en el transporte, al provocar una salida neta de Ca^{2+} mitocondrial.

Por otra parte, el oxalato no aumentó el transporte como se ha reportado (54), posiblemente porque no atravieza la membrana interna mitocondrial. No obstante, el transporte máximo se observó en presencia de Pi y ADP. En estas condiciones experimentales, el transporte de Ca^{2+} radiactivo mostró un comportamiento que dependió de la presencia de sacarosa o KCl en el medio. Esto se hizo evidente al observar que en el medio que contenía sacarosa, la velocidad del transporte no se ve modificada por la concentración de Ca^{2+} extramitocondrial; si bien es cierto que la concentración de Ca^{2+} intramitocondrial aumenta, la velocidad de transporte no, esto sugiere que en estas condiciones experimentales el transporte muestra una cinética compleja. Sin embargo, en el medio que contenía KCl, el transporte fue lineal con respecto al tiempo y la velocidad inicial dependió de las

concentraciones de Ca^{2+} extramitocondrial. El efecto que tiene el medio sobre el transporte de Ca^{2+} se podría deber a un fenómeno de osmolaridad. A este respecto, Brierley (84, 85) ha reportado que las mitocondrias depletadas de cationes divalentes presentan un comportamiento diferente en relación al grado de hinchamiento, mostrando una disminución del consumo de oxígeno y del CR, según el medio en el que se encuentren (por ejemplo KCl en comparación a sacarosa). Este fenómeno se explicó por la presencia de un antiportador K^+/H^+ en la membrana mitocondrial (84-86), el cual transporta K^+ tanto al interior como al exterior mitocondrial y regula de este modo la osmolaridad mitocondrial. Sin embargo, un efecto de carga generado por el K^+ también podría ser considerado (59).

En el caso particular de las MPH, en el medio que contenía KCl, el transporte de Ca^{2+} muestra un comportamiento michaeliano, lo que permite calcular sus parámetros cinéticos. Se ha reportado que los parámetros cinéticos para el transporte de Ca^{2+} en otros sistemas mitocondriales puede presentar valores de Km entre 1-13 μM (52, 88) o 1-100 μM (63, 89), y una Vmax de 100-700 nmolas/mg/min (90, 91). Al comparar estos datos con los presentados en este trabajo, se observó que en las MPH el transporte de Ca^{2+} presenta una baja afinidad y capacidad de transporte.

Al considerar las funciones del trofoblasto, el transporte de Ca^{2+} mitocondrial cobra una importancia fisiológica. Como se

mencionó en la introducción, el trofoblasto realiza un transporte masivo de Ca^{2+} de la madre al feto; sin embargo, poco se sabe acerca del mecanismo de transporte transcelular del Ca^{2+} en la placenta. Debido a esto, el modelo que en este trabajo se propone para explicar dicho fenómeno es el que se ha descrito para riñón e intestino. Este transporte se ha dividido en tres pasos: la entrada de Ca^{2+} a la célula (para el caso del intestino es en las células de borde de cepillo y en el riñón, a través del túbulo contorneado distal), su difusión a través de la célula y por último, su salida por el lado opuesto a su entrada (84, 92).

La entrada de Ca^{2+} a las células es a favor de su gradiente electroquímico, pues su concentración extracelular es de 1 a 3 mM y la intracelular aproximadamente de 1 μM (1). Debido a que la entrada de Ca^{2+} al interior celular es a favor de su gradiente, se cree que lo hace por medio de un canal selectivo y no una bomba (93, 94). Este canal es estimulado por la $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ en el intestino y en el riñón por la PTH, la cual estimula la síntesis de $1,23(\text{OH})_2\text{-D}_3$. Aunque el sitio de acción de la vitamina D_3 es desconocido, se ha reportado que la calmodulina podría mediar su efecto en el intestino (95, 96), ya que el transporte de Ca^{2+} se puede bloquear al usar antagonistas de la calmodulina (95).

Una vez que ha entrado a la célula, el Ca^{2+} tiene que difundir a través de ésta acoplado a proteínas citosólicas, antes de salir. En este sentido, se han reportado dos tipos de proteínas que unen de manera específica al Ca^{2+} : una proteína tipo aviano

con un peso molecular de 28,000 y cuatro sitios de unión para el Ca^{2+} , y una tipo mamíferiano con un peso molecular de 9,000 y dos sitios de unión (97). La proteína tipo aviano, miembro de la familia de la calmodulina, ha sido localizada en diversos tejidos de mamíferos como riñón, cerebro y placenta (98), y se ha denominado CaBP. En el citosol, esta proteína se encuentra a una concentración de 0.15 mM y su distribución es de manera heterogénea, sin embargo se puede observar que su concentración aumenta en la parte basal y terminal de la célula (99, 100). Kretsinger, et al (101) y Feher, et al (102, 103), han demostrado que la proteína CaBP es capaz de unir al Ca^{2+} inmediatamente después de su entrada a la célula y actuar como un acarreador del mismo hasta llegar a la membrana basal, en donde es expulsado de la célula por medio de un transporte activo.

La expulsión del Ca^{2+} de la célula intestinal es efectuado por una ATPasa de Ca^{2+} y un intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. No obstante, parece ser que la función más importante del intercambiador no está relacionada con la expulsión del Ca^{2+} , sino con la regulación del flujo del Na^+ (104), dejando así, a la ATPasa de Ca^{2+} con el papel de expulsar al Ca^{2+} de la célula.

Esta ATPasa de Ca^{2+} tiene una K_m de 0.5 μM en presencia de calmodulina (84, 85) y una $V_{\text{máx}}$ de 59 nmol $\text{Ca}^{2+}/\text{mg}/\text{min}$ (105). Su localización en la membrana basolateral no ha sido discutida, pero existen reportes de su actividad en la región luminal de las células epiteliales (106, 107).

Cerca de la membrana basolateral, la concentración de Ca^{2+} es menor que en el resto del citoplasma, debido a la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} ; es entonces cuando el acoplamiento de la proteína CaBP y la ATPasa de Ca^{2+} se hace evidente. Al aproximarse, por difusión la proteína CaBP a la zona del citoplasma que tiene una menor concentración de Ca^{2+} , tiende a liberar al Ca^{2+} unido, incrementando así la concentración de Ca^{2+} en la proximidad de la ATPasa de Ca^{2+} , con lo que se acelera la expulsión del catión.

Cuando se utiliza el modelo descrito arriba para explicar el transporte transcelular de Ca^{2+} en la placenta (fig 10), se supone el siguiente esquema:

En la placenta, como en el intestino y riñón, el transporte de Ca^{2+} al interior celular se lleva a cabo a favor del gradiente electroquímico del ión, debido a la diferencia de concentración del Ca^{2+} en las lagunas maternas (2.5 mM) y en el interior celular (aproximadamente 1 μM). No se conoce, sin embargo, cual es el mecanismo de entrada del catión, aunque se ha sugerido que se lleva a cabo por medio de un canal selectivo que utiliza el gradiente electroquímico del ión para moverlo del exterior al interior celular. Cuando el Ca^{2+} entra a la célula, debe ser capturado rápidamente para regular su concentración, función que realizan las proteínas fijadoras de Ca^{2+} . En la placenta se ha identificado, además de la CaBP reportada para intestino, riñón y cerebro, una proteína citoplásmica fijadora de Ca^{2+} denominada HCaBP (22). Esta proteína posee por lo menos 10 sitios de unión

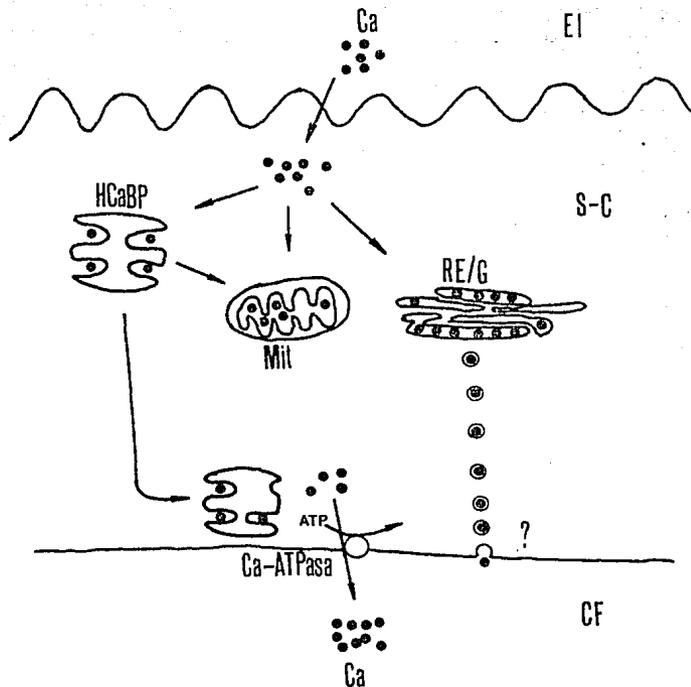


Fig.10. MODELO PROPUESTO PARA EL TRANSPORTE TRANSCELULAR DE CALCIO EN LAS CELULAS TROFBLASTICAS. DONDE SE INDICA, Ca, CALCIO; HCaBP, PROTEINA DE LA PLACENTA FIJADORA DE CALCIO -por simplicidad solo se muestra con 4 sitios afines por calcio-; Mit, MITOCONDRIAS; RE/G, RETICULO ENDOPLASHICO Y APARATO DE GOLGI; Ca-ATPasa, ATPasa DE CALCIO; EI, ESPACIO INTERVELLOSO; S-C, SINCICIO Y CITOTROFBLASTO; CF, CAPILAR FETAL.

al Ca^{2+} con una K_d de $5 \mu M$, y se localiza en las vellocidades coriónicas, las células trofoblásticas y en pequeñas cantidades en

la membrana amniótica (22).

La HCaBP, de manera similar a la proteína CaBP de intestino, tiene el papel de fijar al Ca^{2+} inmediatamente después de su entrada a la célula y acarrearlo hasta la membrana basal, en donde es expulsado. Tuan (22) ha reportado evidencias que apoyan esta hipótesis, ya que al utilizar anticuerpos contra la HCaBP se produce una inhibición del transporte de Ca^{2+} , esto sugiere que la actividad de la proteína HCaBP interviene directamente en el transporte de Ca^{2+} en la placenta.

Para la expulsión del Ca^{2+} de la célula, se han reportado dos tipos de ATPasas de Ca^{2+} en la placenta: una de baja afinidad, en donde la K_m va desde $99.7 \mu\text{M}$ (108), $130 \mu\text{M}$ (22) y $250 \mu\text{M}$ (109), y con una $V_{m\acute{a}x}$ de entre $1,150 \text{ nmolas/mg/min}$ (109) y $1,540 \text{ nmolas/mg/min}$ (108). La variación en la afinidad reportada por los diferentes autores puede deberse a las diversas metodologías utilizadas para su aislamiento. Esta ATPasa de Ca^{2+} se localiza en la membrana basal del sincicio y citotrofoblasto y se propone que es la encargada de mantener el flujo de Ca^{2+} de la madre al feto.

El otro tipo de ATPasa de Ca^{2+} reportada es de alta afinidad, con una K_m de 18.3 nM y una $V_{m\acute{a}x}$ de $233 \text{ nmolas/mg/min}$ (108), localizada en las membranas de borde de cepillo de la placenta. Sin embargo, no se ha determinado su función fisiológica en el transporte de Ca^{2+} del trofoblasto.

Por otra parte, algunos orgánulos celulares también desempeñan un papel importante en el transporte transcelular de

Ca^{2+} . Durante el flujo de la HCaBP unida al Ca^{2+} , desde el sitio de entrada del ión, hasta el sitio en donde es expulsado de la célula, el Ca^{2+} puede ser capturado o fijado por orgánulos que tienen constantes de unión para el ión relativamente altas, tales como el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico, los lisosomas y las mitocondrias. Estos orgánulos podrían actuar como obstáculos para el flujo del catión (94).

En este sentido, las constantes cinéticas del transporte de Ca^{2+} en las MPH, responden a una necesidad fisiológica del trofoblasto y de la misma mitocondria. Si la mitocondria tuviese unos parámetros de transporte que reflejaran una mayor afinidad y actividad cinética, ésta podría ser capaz de formar a su alrededor un microambiente de menor concentración de Ca^{2+} , lo que originaría que la HCaBP liberara en esta zona al Ca^{2+} unido y no en la vecindad de la ATPasa de Ca^{2+} , siendo entonces el Ca^{2+} capturado por la mitocondria. Esto daría lugar a dos fenómenos: por una parte el flujo de Ca^{2+} a través de la célula se vería afectado, y con éste, el aporte de Ca^{2+} requerido por el feto; por otra, el ingreso masivo de Ca^{2+} a la mitocondria pondría en peligro su propia integridad fisiológica, afectando su metabolismo y posteriormente el buen funcionamiento de la célula del trofoblasto. Así, las características del transporte de Ca^{2+} en las mitocondrias están acordes con la fisiología del órgano al que pertenecen. Sin embargo, podría existir otro mecanismo de regulación de la HCaBP que asegure que la liberación del Ca^{2+} sea

en las cercanías de la ATPasa de Ca^{2+} y no en otra zona del citoplasma.

Ahora bien, una posible explicación del por qué las MPH presentan estos parámetros cinéticos, se podría sugerir al considerar que la actividad del transportador de Ca^{2+} está íntimamente ligada a la composición lipídica de la propia membrana. La membrana de las MPH presenta una alta concentración de colesterol (30 μg de colesterol/mg de proteína) en comparación con las mitocondrias de hígado de rata (5 μg de colesterol/mg proteína, 45), lo que, en conjunto con datos de nuestro laboratorio, que muestran que el resto de su composición lipídica es muy similar a la que presenta la membrana plasmática, podría conferirle mayor rigidez que a otras membranas mitocondriales. Esta rigidez, o la interacción directa del colesterol con el transportador, podrían estar relacionadas con la baja actividad catalítica del mismo, de manera similar a como se ha sugerido para el transportador de AdN (80). Por lo tanto, se puede considerar a la membrana mitocondrial como un mecanismo de regulación del transportador de Ca^{2+} que evita que la mitocondria se constituya en un importante obstáculo para el flujo de Ca^{2+} a través de la placenta.

En lo que se refiere a la naturaleza del transportador de Ca^{2+} , la incubación de las mitocondrias con rojo de rutenio facilitó especificar, de una variedad de posibles mecanismos que han sido reportados (75-78), el tipo de transportador presente en

las mitocondrias estudiadas. La naturaleza del transportador es la de un uniportador sensible a rojo de rutenio, de acuerdo con los reportes para otros sistemas mitocondriales (68, 73, 74). La dirección del transporte de este uniportador depende del $\Delta\psi$, ya que al colapsarse éste, el transporte de Ca^{2+} al interior de la mitocondria se inhibe, como lo demuestra el efecto que tiene el desacoplante DNP. Sin embargo, al utilizar Safranina O para registrar el $\Delta\psi$ mitocondrial, se observó que la adición de $100 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} abate transitoriamente al $\Delta\psi$, seguido de su total recuperación que se mantiene por un periodo de aproximadamente 5 minutos. Por otra parte, se observó un colapso permanente del $\Delta\psi$ al añadir varios pulsos de Ca^{2+} ($200 \mu\text{M}$), lo cual podría deberse a la permeabilización de la membrana interna mitocondrial, por la estimulación (111) de la fosfolipasa A_2 por el Ca^{2+} y la liberación de ácidos grasos saturados e insaturados, que promueven la entrada de H^+ a través de la membrana. Con el colapso del $\Delta\psi$ se observó la salida de Ca^{2+} de las mitocondrias (60, 111).

Por otro lado, una salida parcial de Ca^{2+} se observó solo a tiempos largos y concentraciones de Ca^{2+} mayores de $300 \mu\text{M}$. Debido a esto, se estudió el estado de reducción de los piridín nucleótidos en relación a la capacidad mitocondrial para retener el Ca^{2+} . Se observó que el estado de oxido reducción final del NAD(P)^+ se mantuvo reducido aún con la adición de $300\text{-}400 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} . A este respecto, se ha reportado que las mitocondrias de hepatoma de rata son capaces de acumular Ca^{2+} en altas

concentraciones (112), debido a la actividad de la enzima málica, que reduce NADP^+ , y con menor afinidad NAD^+ durante la descarboxilación del malato para formar piruvato (112). En las MPH esta enzima málica podría ser la responsable de mantener el estado reducido de los piridín nucleótidos de manera similar a lo reportado para mitocondrias de hepatoma, aún a concentraciones en las que el Ca^{2+} podría abatir el $\Delta\psi$. En este sentido, podría proponerse que el transporte de Ca^{2+} depende del $\Delta\psi$, mientras que su retención en la matriz mitocondrial podría deberse a que los piridín nucleótidos se mantienen reducidos por la actividad de la enzima málica. Así pues, la capacidad mitocondrial para acumular más Ca^{2+} dependerá del estado de reducción de los piridín nucleótidos. Sin embargo, se observó que a concentraciones superiores a $400 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} , existe una mayor captación de Ca^{2+} que con respecto a la reducción de los piridín nucleótidos, posiblemente debida a proteínas mitocondriales que fijan de manera específica al Ca^{2+} , aunque esta fijación no modifica la cinética del transporte.

REFERENCIAS.

1. Morriss, Jr. F.H & Boyd, R.D.H (1980). THE PHYSIOLOGY OF REPRODUCTION. Cap 50. Raven Press. Ltd. New York.
2. Truman, P. & Ford. H.C. (1984). Biochem. Biophys. Acta. 779, 139-160.
3. Diczfalusy, E. (1974). PHYSIOLOGY AN GENETICS OF REPRODUCTION. Plimium Press. New York.
4. Diczfalusy, E. (1974). Am. J. Obstet. Gynecol. 119, 419-433.
5. Simpson, E.R. & McDonald, P.C. (1981). A. Rev. Physiol. 43, 163-168.
6. Wiener, M. & Friedlander, R.L. (1971). Am. J. Obstet. Gynecol. 111, 942-946.
7. Battaglia, F.C. (1986). Federation Proc. 45, 2508-2512.
8. Beaconsfield, P. & Ville, C. [eds]. (1979). PLACENTA -A NEGLECTED EXPERIMENTAL ANIMAL. Pergamon Press, Oxford.
9. Fox, H. (1979). IN PLACENTA TRANSFER. Pitman Medical. Kent, UK.
10. Johnson, L.W. & Smith, C.H. (1980). Am. J. Physiol. C160-C168.
11. Bissonnette, J.M., Black, J.A., Wickham, W.K. & Acott, K.M. (1981). J. Membrane Biol. 58, 75-80.
12. Bozzetti, P., Buscaglia, M., Marconi, A.M., Makowski, E.L., Pardi, G. & Battaglia, F.C. (1988). Metabolism. 37, 358-363.
13. Enders, R.H., Judd, R.M., Donohue, T.M. & Smith, C.H. (1976). Am. J. Physiol. 230, 706-710.
14. Stegink, L.D., Pitkin, R.M., Reynolds, W.A., Filer, L.J., Boaz, D.P. & Brummel, M.S. (1975). Am. J. Obstet. Gynecol. 122, 70-78.
15. Morriss, F.H., Adeock, E.W., Paxson, C.L. & Greeley, W.J. (1979). Am. J. Obstet. Gynecol. 135, 601-608.

Referencias.

16. Holzman, I.R., Lemons, J.A., Meschia, G. & Battaglia, F.C. (1979). *J. Dev. Physiol.* 1, 137-149.
17. Havel, R.J. (1980). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 348, 16-27.
18. Faber, J.J. & Thornburg, K.L. (1983). *PLACENTAL, PHYSIOLOGY, STRUCTURE AND FUNCTION OF FETOMATERNAL EXCHANGE*. Raven Press. New York.
19. Faber, J.J. & Thornburg, K.L. (1981). *METHOD AND INTERPRETATIONS*. Placenta Suppl. 2. Saunders. London.
20. van Dijk, H.P. (1981) *TRANSFER ACROSS THE PRIMATE AND NON-PRIMATE PLACENTA*. Placenta Suppl. 1. Saunders. London.
21. Stulc, J. & Stulcová, B. (1984). *Placenta.* 5, 9-20.
22. Tuan, R.S. (1985). *Biochem. J.* 227, 317-326.
23. Brunnette, M.G. (1988). *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 66, 1261-1269.
24. Schauberger, C.W. & Pitkin, R.M. (1979). *Obstet. Gynecol.* 53, 74-76.
25. Comar, C.L. (1956). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 64, 281-298.
26. Whitsett, J.A. & Tsang, R.C. (1980). *Pediatr. Res.* 14, 769-775.
27. Croley, T.E. (1973). *Am. J. Obstet. Gynecol.* 117, 926-932.
28. Karp, G. (1987). *Biología celular*. McGraw Hill. Mexico. 950 pp.
29. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J.D. (1983). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing Inc. U.S.A. 1232 pp.
30. Denton, R.M. & McCormak, J.G. (1980). *FEBS Lett.* 119, 1-8.
31. Moreno-Sánchez, R. (1985). *J. Biol. Chem.* 260, 4028-4034.
32. Johnston, J.D. & Brand, M.D. (1987). *Biochem. J.* 245, 217-222.

Referencias.

33. Olivera, A.A. & Meigs, R.A. (1975). *Biochim. Biophys. Acta.* 376, 426-435.
34. Schreiner, W. & Ville, C.A. (1965). *J. Obstet. Gynecol.* 91, 961-
35. Moriyama, I.S. (1976). *Acta Obst. et Gynaec. Jap.* 23(1), 10-13.
36. Klimek, J., Aleksandrowicz, Z., Wrzolkowa, T. & Zelewski, L. (1972). *Biochemical Medicine.* 6, 426-437.
37. Wade, R. & ones, H.W.Jr. (1956). *J. Biol. Chem.* 220, 547-
38. Cammer, W. & Estabrook, R.W. (1967). *Arch. Biochem. Biophys.* 122, 721-734.
39. Morrison, G., Meigs, R.A. & Ryan, K.L. (1965). *Steroids Suppl. II.* 177-188.
40. Ryan, K.L., Meigs, R.A. & Petro, Z. (1966). *Am. J. Obstet. Gynecol.* 96, 676-682.
41. Meigs, R.A. & Yan, K.L. (1968). *Biochim. Biophys. Acta.* 165, 476-482.
42. Mason, .I. & Boyd, G.S. (1971). *Eur. J. Biochem.* 21, 308-321.
43. Billiar, R.B. & Litte, B. (1969). *Biochim. Biophys. Acta.* 187, 243-249.
44. Meigs, R.A. & Sheean, L.A. (1977). *Biochim. Biophys. Acta.* 489, 225-235.
45. Daum, G. (1985). *Biochim. Biophys. Acta.* 822, 1-42.
46. Brinley, F.J., Tiffert, T., Scarpa, A. & Mullins, L.J. (1977). *J. Gen. Physiol.* 70. 355-384.
47. Blackmore, P.f., Dehaye, J.P. & Exton, J.H. (1979). *J. Biol. Chem.* 254. 6945-6950.
48. Nicholls, D.G. & Crompton, M. (1980). *FEBS Lett.* 111. 261-268.
49. Crompton, M., Heid, I. & Carafoli, E. (1980). *FEBS Lett.* 155. 257-259.

Referencias.

50. Carafoli, E. (1980). In "Exercise Bioenergetics and Gas Exchange". Edis. P.Cerretelli & B.J. Whipp. 3-12. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
51. Carafoli, E. (1988). METHODS IN ENZYMOLOGY. 157. 3-11
52. Lehninger, A.L., Rossi, C.S. & Greenawalt, J.W. (1963). Biochem. Biophys. Res. Commun. 10. 444-448.
53. Saris, N-E.L. & Allshire, A. (1989). METHODS IN ENZYMOLOGY. 174, 68-85.
54. Carafoli, E. (1982). MEMBRANE TRANSPORT OF CALCIUM. Cap 3. Wiley. New York.
55. Lötscher, H.R., Winterhalter, K.H., Carafoli, E. & Richter, C. (1980). Eur. J. Biochem. 110. 211-216.
56. Vasington, F.D. & Murphy, J.V. (1962). J. biol. Chem. 237. 2670-2677.
57. Rossi, C.S. & Lehninger, A.L. (1964). J. biol. Chem. 239. 3971-3980.
58. Toninello, A., Siliprandi, D. & Siliprandi, N. (1985). Biochem. Biophys. Res. Commun. 111. 792-797.
59. Chávez, E. & Jay, D. (1987). J. Bioener. and Biom. 19. 571-580.
60. Lehninger, A.L., Vercesi, A. & Bababunmi, E.A. (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 1690-1694.
61. Fiskum, G. & Lehninger, A.L. (1979). J. Biol. Chem. 254, 6236-
62. Campbell, A.K. (1983). INTRACELLULAR CALCIUM: ITS UNIVERSAL ROLE AS REGULATOR. Wiley. New York.
63. Saris, N-E.L. & Åkerman, K.E.O. (1980). Curr. Top. Bioenerg. 10, 103-
64. Nicholls, D.G. & Åkerman, K.E.O. (1983). Biochim. Biophys. Acta. 183, 57-
65. Carafoli, E. & Sottocasa, G. (1984). in: BIOENERGETICS. (L. Ernster, ed.). Elsevier. Amsterdam.
66. Reed, K.C. & Bygrave, F.L. (1974). Biochem. J. 140, 143-155.

67. Mela, L. (1968). Arch. Biochem. Biophys. 123, 286-293.
68. Mela, L. (1969). Biochemistry. 8, 2481-2486.
69. Reed, K.C. Bygrave, F.L. (1974). Biochem. J. 138, 239-252.
70. Tew, W.P. (1977). Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 624-630.
71. Crompton, M., Heid, I., Baschera, C. & Carafoli, E. (1979). FEBS Lett. 104, 352-354,
72. Nicholls, D. & Åkerman, K. (1982). Biochim. Biophys. Acta. 683, 57-88.
73. Vasington, F.D., Gazzotti, P., Tiozzo, R. & Carafoli, E. (1972). Biochim. Biophys. Acta. 256, 43-54.
74. Moore, C.L. (1971). Biophys. Res. Commun. 42, 298-305.
75. Reed, K. C. & Bygrave, F.L. (1975). Eur. J. Biochem. 55, 497-504.
76. Moyle, J. & Mitchell, P. (1977). FEBS Lett. 73, 131-136.
77. Moyle, J. & Mitchell, P. (1977). FEBS Lett. 77, 136-140.
78. Moyle, J. & Mitchell, P. (1977). FEBS Lett. 84, 135-140.
79. Heaton, G.M. & Nicholls, D.G. (1976). Biochem, J. 156, 635-646.
80. Martínez, F., Chávez, E. & Echevoyán, S. (1987). Int. J. Biochem. 19, 275-279.
81. Lowry, O.H., Resebraugh, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). J. Biol. Chem. 193, 265-275.
82. Scarpa, A., Brinley, F.J., Tiffert, T. & Dubyak, G.R. (1978). In "Calcium transport and cell function". Edis. Scarpa, A. and Carafoli, E. New York, U.S.A. 307, 86-112.
83. Åkerman, K.E.O. & Wikström, M.K.F. (1976). FEBS Lett. 68, 191-197.
84. Brierley, G.P., Jurkowitz, M.S., Farooqui, T. & Jung, D.W. (1984). J. Biol. Chem, 259, 14672-14678.

85. Brierley, G.P. & Jung, D.W. (1988). in "Advances in experimental medicine and biology". 232, 47-57. (D.R. Pfeiffer, J.B. McMillin, T.S. Little eds.), Plenum press.
86. Garlid, K.D. (1988). in "Advances in experimental medicine and biology". 232, 37-46. (D.R. Pfeiffer, J.B. McMillin, T.S. Little eds.), Plenum press.
87. Scarpa, A. & Graziotti, P. (1973). J. Gen. Physiol. 62, 756-772.
88. Bygrave, F.L. (1977). Curr. Top. Bioenerg. 6, 259-318.
89. Vinogradov, A. & Scarpa, A. (1973). J. Biol. Chem. 248, 5527-5531.
90. Crompton, M., Sigel, E., Salzmann, M. & Carafoli, E. (1976). Eur. J. Biochem. 69, 429-434.
91. Vercesi, A., Reynafarje, B. & Lehninger, A.L. (1978). J. biol. Chem. 253, 6379-6385.
92. van Os, C.H. (1987). Biochim. Biophys. Acta. 906, 195-222.
93. Bronner, F. (1989). Am. J. Physiol. 257, F707-F711.
94. Bronner, F. (1990). in "Intracellular calcium regulation". Cap. 14, 415-437. (Felix Bronner eds.).
95. Bikle, D.B., Munson, S. & Chafouleas, J. (1984). FEBS Letts. 174, 30-33.
96. Bikle, D.B. & Munson, S. (1986). Endocrinology. 118, 727-732.
97. Wasserman, R.H. & Fullmer, C.S. (1982). in "Calcium and cell function" vol. 2. (Chung, W.Y. eds.).
98. Henry, H.L. & Norman, A.K. (1984). Annu. Rev. Nutr. 4, 493-520.
99. Marche, P., Carrier, P. & Mathiew, H. (1980). Cell Tissue Res. 212, 63-72.
100. Thorens, B., Roth, J., Norman, A.W., Perrelet, A. & Ocri, L. (1982). J. Cell. Biol. 94, 115-128.

Referencias.

101. Kretsinger, R.H., Mann, J.E. & Simmons, J.G. (1982). Biochemistry and Clinical Endocrinology of Calcium Metabolism. New York. 233-246.
102. Feher, J.J. (1983). Am. J. Physiol. 244, C303-C307.
103. Feher, J.J. (1984). Biochim. Biophys. Acta. 773, 91-98.
104. Taylor, A. & Windhager, E. (1979). Am. J. Physiol. 236, F505-F512.
105. van Heeswijk, M.P.E., Geertsen, J.A.M. & van Os, C.H. (1984). J. Membr. Biol. 79, 19-21.
106. Holdsworth, E.S. (1970). J. Membr. Biol. 3, 43-53.
107. Ohyashiki, T., Ohta, A. & Mohri, J. (1987). Biochim. Biophys. Acta. 902, 46-52.
108. Treinen, K.A. & Kulkarni, A.P. (1986). Placenta. 7, 365-373.
109. McKercher, H.G. (1984). Placenta. 5, 281-292.
110. Beatrice, M.C., Palmer, J.W. & Pfeiffer, D.R. (1980). J. Biolog. Chem. 255, 8663-8671.
111. Murphy, A.N. & Fiskum, G. (1988). in "Advances in experimental medicine and biology". 232, 139-150. (D.R. Pfeiffer, J.B. McMillin, T.S. Little eds.), Plenum press.

A G R A D E C I M I E N T O S .

Al Dr. Federico Martínez Montes por su apoyo y dirección durante el desarrollo de TODO el trabajo de Tesis. Además por ser un buen amigo.

Al Dr. Juan Pablo Pardo Vazquez, Dr. Jesus Manuel León Cázares, M en C. Georgina Garza Ramos Martínez y Bióloga Virginia Esmeralda Urbietta Ubilla, miembros del jurado, por su discusión y comentarios del trabajo escrito de Tesis, ayudandome así a elaborar la versión final del mismo.

A mis amigos de "negocio" Federico, Juan Pablo, Juan Luis, Tere, Memo, Roberto, Carlos Alberto y Lupita, por su enseñanza, apoyo, compañía y por todas esas tardes en las que las morbosas discusiones "coloquiales" solo se veían interrumpidas por "un balerito" o "ponte una clásica pa' que aprendan".....

Al Dr. Juan C. Díaz Zagoya por su apoyo al integrarme como miembro del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina, y a la D.G.A.P.A. por el apoyo económico durante la realización del trabajo de Tesis.

Quiero extender este agradecimiento a la Familia Flores Herrera por apoyarme durante toda mi vida, tanto en el aspecto sentimental como económico. Gracias a todos ellos.