



11261

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

7  
2eg.

**EVIDENCIAS DE LA EXISTENCIA DE UNA TERCERA  
CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES EN  
LAS MITOCONDRIAS DE LA PLACENTA HUMANA.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS  
BIOMÉDICAS BIOQUÍMICA**  
**P R E S E N T A :**  
**Q.F.B. MARÍA TERESA ESPINOSA GARCÍA**

MÉXICO, D. F.

1998.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

263119



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

**Esta tesis fue realizada en el departamento de  
Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM  
bajo la dirección del Dr. Federico Martínez Montes.**

**JURADO ASIGNADO:**

**Dr. Edmundo Chávez Cossio**

**Dra. Marina Gavilanes Ruiz**

**Dr. Federico Martínez Montes**

**Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez**

**Dr. Juan Luis Rendón Gómez**

## AGRADECIMIENTOS

**Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Federico Martínez Montes por el apoyo que me ha brindado durante todos estos años de trabajo.**

**A los miembros del jurado, quienes amablemente accedieron a revisar esta tesis y por sus aportaciones para mejorar este trabajo.**

## I N D I C E

I.	RESUMEN	1.
II.	INTRODUCCIÓN	2.
	CARACTERÍSTICAS DE LAS MITOCONDRIAS	
	DE PLACENTA HUMANA	5.
	EL CITOCROMO P450	14.
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	18.
IV.	RESULTADOS	21.
V.	DISCUSIÓN	35.
VI.	BIBLIOGRAFÍA	38.
	ANEXO	44.

## RESUMEN

En las partículas submitocondriales de la placenta humana se identificaron los citocromos de la cadena respiratoria y el citocromo P450. Estas partículas sintetizan progesterona y consumen oxígeno con sustratos oxidables como el succinato y el NADH. También el NADPH redujo a los citocromos de la cadena respiratoria y estimuló el consumo de oxígeno con una respuesta similar a la producida por el NADH.

Se determinó el camino de la oxidación de los piridín-nucleotidos en las partículas submitocondriales empleando inhibidores de la cadena respiratoria y de aceptores artificiales de electrones. Los resultados mostraron que los equivalentes reductores siguen una vía que incluye una NAD(P)H deshidrogenasa diferente a la de la cadena respiratoria y que estas mitocondrias presentan al menos dos tipos de citocromos *b*. Uno que se inhibe eficientemente por la antimicina cuando el donador de electrones es el succinato, el cual probablemente corresponde al citocromo *b* del complejo III de la cadena respiratoria; y otro que es poco sensible a este inhibidor, y que se hizo evidente cuando se empleó como agente reductor a los piridín-nucleotidos. Los resultados de este trabajo sugieren la presencia de una tercera cadena de transporte de electrones constituida, al menos, por una NAD(P)H deshidrogenasa y un citocromo tipo *b* y que podría estar conectada tanto a la cadena respiratoria como a la cadena asociada al citocromo P450.

## INTRODUCCIÓN

El interés del grupo de trabajo dentro del cual se realizó este proyecto, está encaminado a estudiar las funciones metabólicas de las mitocondrias de la placenta humana a término.

La placenta es una estructura multifacética que combina en un órgano muchas actividades que en el organismo adulto están separadas; físicamente sujeta el feto al útero, participa de forma activa en la transferencia selectiva de varias sustancias, desarrolla funciones nutritivas, renales, respiratorias, hepáticas y funciona como barrera inmunológica entre la madre y el feto; también cumple funciones endócrinas esenciales para el mantenimiento del embarazo (1,2).

Durante los 280 días de la gestación normal, la placenta está continuamente adaptándose a los requerimientos del feto y a procesos que ocasionan rápidas modificaciones de su estructura y su función.

Los reportes de la literatura han marcado la importancia que tiene la placenta en la síntesis de hormonas, especialmente de la progesterona (3), así como en la producción de gonadotropina coriónica y lactógeno placentario (4).

La progesterona se sintetiza en la fracción mitocondrial a partir del colesterol por el rompimiento de su cadena lateral. En este proceso participa la cadena de transporte de electrones asociada al citocromo P450<sub>sc</sub>, que obtiene sus equivalentes reductores del NADPH (5). Debido a que este nucleótido no puede atravesar la membrana interna mitocondrial, su principal fuente de reducción está asociada a la oxidación de sustratos como el malato y el isocitrato, para los cuales hay deshidrogenasas intramitocondriales (6-8). Se ha sugerido que la cadena de

transporte de electrones asociada al citocromo P450<sub>sec</sub> y la cadena respiratoria compiten por el oxígeno molecular y por los mismos sustratos, ya que son capaces de reducir tanto al NAD<sup>+</sup> como al NADP<sup>+</sup>. Esto muestra un aspecto interesante de estas mitocondrias que aún no se ha aclarado completamente, como es la posible relación entre la hidroxilación de esteroides y la fosforilación oxidativa. Datos de la literatura sugieren que en otros tejidos esteroideogénicos existen mecanismos que permiten la transferencia de equivalentes reductores entre ambas cadenas, involucrando a los intermediarios del ciclo de Krebs, o bien por medio de uno o varios citocromos o flavoproteínas que no se encuentran ligadas directamente al funcionamiento hasta ahora conocido de estas cadenas (9,10). Varios de los estudios con las mitocondrias de la placenta se han realizado suponiendo que las funciones de éstas son iguales a las descritas para las mitocondrias de las glándulas suprarrenales. Aquí cabe hacer notar que existen diferencias importantes entre ambos sistemas; por ejemplo, en los parámetros cinéticos, (lo cual se refleja como una velocidad de conversión del colesterol a progesterona más lenta en las mitocondrias de la placenta) (11), en la diferente compartimentalización de las enzimas que participan en la transformación de progesterona (5,12), en los mecanismos descritos para la regulación del transporte de colesterol hacia la membrana interna mitocondrial (13, 18), y en la concentración del citocromo P450<sub>sec</sub> (14), etc.

De tal forma que la extrapolación de los datos obtenidos para las mitocondrias de las glándulas suprarrenales a las de la placenta no es completa ni suficiente para explicar las funciones de las mitocondrias de este último órgano.

Datos de nuestro laboratorio muestran que las partículas submitocondriales de la placenta, al igual que las mitocondrias íntegras de este órgano, sintetizan progesterona en presencia de sustratos de la cadena respiratoria como el NADH y el succinato (15), aún cuando las enzimas generadoras de NADPH no se encuentran presentes. Esto sugiere que podría existir otro mecanismo de conexión



entre ambas cadenas de transporte de electrones diferente al postulado para los demás tejidos esteroideogénicos.

El objetivo de este trabajo es determinar la posible relación entre la cadena respiratoria y la cadena de transporte de electrones asociada al citocromo P450<sub>sc</sub> en partículas submitocondriales de (PSM) la placenta humana a término.

Los resultados sugieren una posible conexión entre ambas vías a través de un camino alternativo que involucra a una deshidrogenasa de los piridin-nucleotidos y a un citocromo que no pertenece ni a la cadena respiratoria ni a la cadena del citocromo P450<sub>sc</sub>.

## **CARACTERÍSTICAS DE LAS MITOCONDRIAS DE LA PLACENTA HUMANA.**

Las mitocondrias aisladas de la placenta, cuando se observan al microscopio electrónico, presentan varios tipos morfológicos (16,17). De los dos más abundantes, el primero corresponde a mitocondrias redondas con crestas bien definidas y con una matriz que presenta una densidad electrónica media, similares a las mitocondrias de hígado de rata. El segundo tipo son mitocondrias de forma ancha y angulosa con membranas tortuosas que forman espacios de diferentes tamaños, con pocas crestas y una matriz electrodensa. Estos tipos característicos se han observado en las preparaciones mitocondriales obtenidas en nuestro laboratorio, las cuales presentan un control respiratorio mayor (entre 4 y 6, con succinato como sustrato), cuando se comparan con los valores reportados en la literatura (de 2.5 a 3.5) (22), así como una baja actividad de la deshidrogenasa láctica, una enzima marcadora del citosol (10% en relación al homogenado total).

Las membranas de las mitocondrias de la placenta están constituidas por fosfatidilcolina (44%), esfingomielina y fosfatidiletanolamina (22%), y el 12% restante entre fosfatidilinositol y fosfatidilserina (19); además, presentan un alto contenido de colesterol (30 µg/mg de proteína) en comparación con la mitocondrias de otros tejidos (3 a 5 µg/mg de proteína) (20). La composición lipídica de esta membrana la hace similar a la membrana plasmática y a la membrana del retículo endoplásmico, lo que le confiere características diferentes a las encontradas en las membranas mitocondriales de hígado o de corazón de rata (16). Por otro lado, se ha demostrado que la composición lipídica de las mitocondrias de tejidos tumorales (21) es parecida a la descrita para la placenta; aunque hasta el momento no hay estudios comparativos, varios datos de la literatura sugieren que las características funcionales de las mitocondrias de placenta se podrían explicar con base en la composición de su membrana.

Desde el punto de vista metabólico, la mayoría de los estudios realizados en las mitocondrias de placenta se han interesado en el mecanismo de síntesis de progesterona y pocos se han enfocado al estudio de la fosforilación oxidativa (22, 23). La cadena de transporte de electrones se ha caracterizado usando inhibidores específicos como la rotenona, la antimicina y el cianuro en presencia de diferentes sustratos. La cuantificación de los citocromos en las mitocondrias de la placenta indican que las concentraciones de los citocromos a, b y c son menores a las observadas en otros tejidos esteroideos (22), y que en las mitocondrias de hígado o de corazón de rata (26) con una concentración del P450<sub>sc</sub> similar a la concentración de la citocromo oxidasa. Esto contrasta con las mitocondrias de las glándulas suprarrenales, en donde hay un predominio de la concentración de P450<sub>sc</sub> en relación con los citocromos de la cadena respiratoria (27), como se muestra en la siguiente tabla.

CONCENTRACIÓN DE LOS CITOCROMOS EN MITOCONDRIAS  
DE DIFERENTES FUENTES

	Placenta humana (22)	Cuerpo lúteo (24)	Glándulas suprarrenales (25)	Hígado de rata (26)
a	0.140	0.230	0.230	0.295
b	0.08	0.150	0.170	0.245
c+c <sub>1</sub>	0.125	0.350	0.290	0.432
P450	0.110	—	1.500	—

Tabla A. La concentración de los citocromos está expresada en nmoles por mg de proteína mitocondrial. Los números en paréntesis indican la referencia bibliográfica.

La adición de varios intermediarios del ciclo de Krebs estimulan el consumo de oxígeno, la síntesis de ATP y la síntesis de progesterona en las mitocondrias de la placenta humana (42), con una oxidación eficiente del isocitrato, el citrato y el cis-aconitato. Por otro lado la síntesis de progesterona también se ve favorecida por la adición de malato, fumarato y succinato, probablemente debido a la transformación de estos metabolitos en oxaloacetato o piruvato que alimentan el ciclo de Krebs. De estos resultados se ha sugerido que los sistemas de transporte de los tri y di-carboxílicos, al igual que las enzimas del ciclo del ácido cítrico, se encuentran presentes en estas mitocondrias (43).

La oxidación preferencial del isocitrato se ha explicado por la presencia de dos isocitrato deshidrogenasas, una dependiente de  $\text{NAD}^+$  y otra del  $\text{NADP}^+$ , con una actividad varias veces más alta para esta última. Se ha descrito que el citrato se puede sintetizar en estas mitocondrias a partir del malato como único sustrato (6,43), a través de la acción conjunta de la malato deshidrogenasa y la enzima mítica, las cuales forman oxaloacetato y piruvato respectivamente, los cuales a su vez se pueden metabolizarse en el ciclo de Krebs.

La cadena de transporte de electrones puede recibir los equivalentes reductores derivados de los sustratos dependientes del  $\text{NAD}^+$ , así como los generados por succinato, glicerol 3 fosfato y por sustratos artificiales como el ascorbato combinado con TMPD (N,N,N,N tetrametil-p-fenilendiamina). A diferencia de otras mitocondrias, los sustratos que generan NADH estimulan en menor proporción el consumo de oxígeno en comparación con los sustratos que producen  $\text{FADH}_2$ . Se ha observado que el 20% de la respiración estimulada por glutamato es insensible a los inhibidores y se ha propuesto que el consumo de oxígeno procede por la vía asociada al citocromo  $\text{P450}_{\text{sc}}$  (23).

La adición de ADP en las mitocondrias induce la transición del estado 4 al estado 3, con controles respiratorios que van desde 2.5 hasta 4 con glutamato-malato como sustratos. La relación ADP/O es cercana al máximo teórico. La

velocidad de respiración de las mitocondrias de la placenta es más lenta que la descrita para las mitocondrias del hígado, del cerebro o del corazón de rata, por lo que se ha sugerido que las enzimas de la cadena respiratoria tienen actividades bajas (22,28). Se han descrito características similares para el translocador de los adenín nucleótidos (29) y para la  $F_1F_0$  ATPasa (30), proteínas que al ser parcialmente purificadas presentan velocidades similares a las de otros tejidos; sin embargo, en las mitocondrias íntegras la actividad es baja en comparación con las mitocondrias de tejidos no esteroideogénicos. Este comportamiento podría deberse a la singular composición lipídica de su membrana, caracterizada por su alto contenido de colesterol, que daría lugar a la modificación de su fluidez y que impediría el funcionamiento óptimo de las enzimas embebidas en ella. Sin embargo, otros autores han propuesto que la respiración en las mitocondrias de la placenta es baja por la presencia de las hormonas esteroides, ya que se ha descrito que la progesterona puede inhibir la respiración en las mitocondrias de tejidos no esteroideogénicos (35,36).

Aleksandrowicz (30) mostró que la  $F_1F_0$ -ATPasa de las mitocondrias de la placenta parcialmente purificada presenta características similares a la  $F_1F_0$ -ATPasa de mitocondrias de hígado de rata, incluyendo la sensibilidad a la temperatura, la especificidad por el ATP, el requerimiento de cationes divalentes, la sensibilidad a oligomicina y su modulación por ATP, bicarbonato y  $Mg^{2+}$  libre, así como la participación de tres sitios de la  $F_1F_0$ -ATPasa para la hidrólisis del ATP (31).

Por otro lado, se ha encontrado que la concentración de los adenín-nucleótidos (32) en las mitocondrias de la placenta es similar a la cuantificada en las mitocondrias del hígado fetal de rata (2 a 3 nmoles/mg) pero menor a la descrita para las del hígado de rata adulta (29,33).

Las mitocondrias de la placenta poseen un metabolismo especial para los adenín-nucleótidos, ya que se han descrito varias enzimas que participan en su

síntesis y degradación. Se ha reportado la actividad de una ADPasa asociada a membrana interna mitocondrial con una actividad máxima de hidrólisis a pH 8; (similar a lo reportado para otras ADPasas), se estimula por  $Mg^{2+}$  con una estequiometría 1:1, lo que sugiere que el sustrato para esta enzima es el complejo  $Mg^{2+}$ -ADP y además, es insensible a los inhibidores específicos para la fosfatasa alcalina, la miocinasa o la 5' nucleotidasa (37).

En las mitocondrias aisladas de la placenta humana es posible estimular el consumo de oxígeno al adicionar ATP, induciendo la transición entre el estado 4 y el estado 3, sugiriendo que hay una hidrólisis del ATP por alguna enzima localizada en la cara externa de la membrana interna mitocondrial y que el ADP liberado es el responsable del consumo de oxígeno observado (38).

En relación con ella se ha mostrado la existencia de una ATPasa diferente a la  $F_1F_0$ -ATPasa que se encuentra fuertemente unida a la membrana interna mitocondrial (38). Estas enzimas se han caracterizado para la hidrólisis del ATP en partículas submitocondriales de la placenta humana (39). Los resultados mostraron que su actividad presentó un comportamiento similar en relación al pH y fue necesario el uso de inhibidores como el vanadato y la oligomicina para diferenciar la actividad de cada una de las enzimas. La ATPasa fuertemente unida a la membrana se inhibió parcialmente por el vanadato y por  $Mg^{2+}$ , en tanto que la  $F_1F_0$  se inhibió completamente por  $Mg^{2+}$  y parcialmente por oligomicina, aún cuando con esta concentración la respiración se inhibió completamente en las mitocondrias íntegras (37).

Posteriormente se observó que la ATPasa fuertemente unida a la membrana no hidroliza específicamente ATP, sino que se comporta como una 5'-nucleotidasa que puede hidrolizar los nucleósidos di y tri-fosfato de adenina y guanina a diferencia de la  $F_1F_0$ -ATPasa que es específica para el ATP. Esta actividad se ha caracterizado con la combinación de inhibidores como la oligomicina, la venturicidina y/o el vanadato y con modificaciones en las condiciones

experimentales.

Otros factores que influyen en la hidrólisis del ATP y del ADP es la presencia de los diferentes sustratos en el medio de incubación y la osmolaridad (40), ya que estas dos actividades están reguladas por el estado energético mitocondrial. Aunque el papel fisiológico de estas enzimas se desconoce, se ha propuesto que podrían participar en varios procesos como el movimiento de sustratos, por ejemplo del colesterol, ya que se ha mostrado que en las mitocondrias de las glándulas suprarrenales hay una GTPasa que esta íntimamente ligada al mecanismo de transporte del colesterol entre las membranas mitocondriales (49) ya que se ha mostrado que en estas mitocondrias la hidrólisis del GTP favorece el metabolismo del colesterol (41). Por otro lado, se ha propuesto que la actividad del citocromo P450 del retículo de las glándulas suprarrenales, se podría regular a través de un mecanismo de fosforilación-desfosforilación, en el cual estaría involucrada una enzima que utiliza ATP como sustrato (50). Es probable que tales enzimas puedan estar ligadas a los mecanismos de regulación, tanto de la transferencia de colesterol para la síntesis de progesterona, como de la regulación de la actividad del citocromo P450<sub>sc</sub>. También se ha reportado que la inhibición de la síntesis de ATP puede aumentar la reducción del NADP<sup>+</sup> y favorecer la síntesis de hormonas esteroideas (42,51).

Prácticamente todos los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, además del glutamato y del glicerol 3 fosfato, estimulan la síntesis de progesterona a partir del colesterol, tanto endógeno como exógeno. Para las hidroxilaciones sobre la molécula de colesterol hay un requerimiento específico de NADPH. Los mecanismos propuestos para la generación de este piridín-nucleotido en su forma reducida incluyen a la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup> (44), a la enzima málica (22), y a la transhidrogenasa que cataliza la reacción de intercambio del hidruro entre el NADP<sup>+</sup> y el NADH y que requiere de la energía del gradiente electroquímico de protones (45). El ADP y el ATP estimulan la síntesis de

progesterona como consecuencia de la activación de esta última enzima, sugiriendo que los niveles energéticos podrían controlar la síntesis de progesterona. Sin embargo, en las mitocondrias desacopladas hay una transformación importante de colesterol a progesterona inducida por malato o por los sustratos que pueden derivarse hacia este metabolito, por ejemplo el fumarato y el succinato. Esta estimulación se atribuye a la actividad de la enzima málica como principal fuente generadora de los equivalentes reductores para las funciones de oxidasas múltiples (46,47).

Otro modulador de la actividad enzimática que se debe considerar es el calcio, que en estas mitocondrias se encuentra en altas concentraciones (60 nmoles/mg de proteína) (29), ya que se ha descrito que este catión contribuye al control del metabolismo oxidativo intramitocondrial al modular la actividad de varias enzimas como son la piruvato deshidrogenasa, la isocitrato deshidrogenasa, la  $\alpha$  cetoglutarato deshidrogenasa (53), la NADH-ubiquinona reductasa (34) y el translocador de los adenin nucleótidos (54). En las mitocondrias de placenta de borrego la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio de incubación incrementa la síntesis de progesterona, lo que sugiere su participación en los procesos de regulación del esteroide (55). También se ha reportado que en las mitocondrias de la placenta humana el calcio modifica la velocidad de consumo de oxígeno a través de la cadena respiratoria, en donde se observó que la respiración mitocondrial se inhibe cuando las concentraciones libres, de este catión varían de  $10^{-9}$  a  $5 \times 10^{-6}$  M; esta inhibición se asoció a un incremento temporal de la síntesis de progesterona (52).

Además de la cadena respiratoria, las mitocondrias de la placenta contienen un sistema de transporte de electrones asociado al citocromo P450<sub>scc</sub> que recibe los equivalentes reductores provenientes del NADPH, este sistema está formado por tres elementos: la adrenedoxina reductasa, que es una flavoproteína que cuenta con un nucleótido de flavina como aceptor de hidrógenos; la adrenedoxina que es una proteína Fe-S intermediaria entre la adrenedoxina reductasa y el



citocromo P450, que es una oxidasa de función mixta (56). Esta cadena de transporte de electrones no genera un gradiente de protones y tiene como aceptor final al oxígeno

La biosíntesis de la pregnenolona se realiza con tres mono-oxigenaciones sucesivas que involucran dos hidroxilaciones en las posiciones 20 y 22 de la molécula del colesterol y el rompimiento de la cadena lateral, dando lugar al isocaproaldehído y a la pregnenolona. No se ha encontrado una disociación significativa de los intermediarios hidroxilados; en contraste, la pregnenolona tiene una constante de disociación entre 40 y 600 veces más alta que la de los intermediarios, lo que facilita su liberación de la enzima (57).

Por cada hidroxilación se requiere de una molécula de NADPH y otra de oxígeno, con una relación estequiométrica total para la síntesis de 3:3:1 (58). Se ha encontrado que para obtener los equivalentes reductores en forma de NADPH para el rompimiento de la cadena lateral del colesterol en las mitocondrias de las glándulas suprarrenales, se puede estimular un transporte reverso de los electrones de la cadena respiratoria y una transhidrogenación (59). La velocidad de la síntesis de la pregnenolona es relativamente alta en las mitocondrias de las glándulas suprarrenales y se puede limitar cuando la relación NADPH/NADP<sup>+</sup> es baja (60). La pregnenolona después se transforma en progesterona a través del complejo  $\Delta^5$ -isomerasa 3 $\beta$ -esteroideshidrogenasa (5,61), que se encuentra presente en las mitocondrias de la placenta. La progesterona formada sale de la mitocondria para llegar al torrente circulatorio materno y fetal.

El colesterol que participa en la síntesis de progesterona procede principalmente de la circulación materna, en forma de complejos lipoproteicos de alta y baja densidad o como ésteres de colesterol, ya que es muy baja la velocidad de síntesis *de novo* en la placenta. Su incorporación a las mitocondrias se podría realizar por un sistema transmembranal similar al propuesto para las glándulas suprarrenales, en donde se ha demostrado que la disponibilidad del colesterol para

el citocromo P450<sub>ccc</sub> se puede considerar una etapa limitante sobre todas las reacciones esteroideogénicas (62).

Hay varias evidencias que sugieren que la placenta carece de una regulación a corto plazo para la síntesis de pregnenolona a partir del colesterol. Por un lado, en la placenta no se ha identificado a la proteína STAR (proteína reguladora de la respuesta aguda esteroideogénica) reportada para la regulación de la síntesis de los esteroides, en la corteza de las glándulas suprarrenales, testículos y cuerpo lúteo (63). Además hay pocas evidencias de cambios diurnos en los niveles séricos de progesterona durante el embarazo (64) y la concentración de colesterol en la membrana interna mitocondrial de la placenta humana *in vivo* podría ser saturante para la reacción de rompimiento de la cadena lateral del colesterol, al igual que se ha observado para los trofoblastos aislados, en donde la síntesis de progesterona sucede en condiciones saturantes de colesterol durante las primeras 3 horas de cultivo (65). Sin embargo, hay reportes que sugieren que hay una regulación a largo plazo; por ejemplo, la producción de progesterona se incrementa de manera importante durante la gestación y se acompaña de un incremento en la concentración de citocromo P450<sub>ccc</sub> y adreodoxina. En este contexto, el AMP<sub>c</sub> estimula la síntesis de progesterona y aumenta los niveles de P450<sub>ccc</sub> en las células de la placenta en cultivo, mientras que los niveles de adreodoxin reductasa no responden a esta estimulación (66)

Tuckey encontró que el número de recambio (mol de producto formado /min /mol de enzima) para el citocromo P450<sub>ccc</sub> en las mitocondrias aisladas de la placenta o de los trofoblastos en cultivo es de 3-5 /min, son casi un orden de magnitud menor que el observado para el citocromo purificado. Esto sugiere que algunos otros factores, además de la concentración de P450<sub>ccc</sub> limitan la producción de progesterona en la placenta humana, como puede ser el transporte de electrones (67) y la disponibilidad de equivalentes reductores.

## CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y ESPECTROSCÓPICAS DEL CITOCROMO P450

Los citocromos P450 están integrados por una molécula de proteína con una protoporfirina, que no está unida covalentemente. En su estructura se forma una región hidrofóbica en la que se sitúa el grupo hemo, y una región de unión para el sustrato.

El hierro del hemo es capaz de formar seis enlaces de coordinación, cuatro con los nitrógenos de los pirroles (enlaces planares). El quinto se forma con un residuo de cisteína de la proteína y el sexto enlace es débil, no siempre está presente, y puede llevarse a cabo con el agua o con algún aminoácido de la cadena polipeptídica como la histidina o la tirosina, para algunas formas de P450.

Las técnicas espectrofotométricas han sido las más utilizadas para la caracterización de los citocromos, gracias a la presencia de tres bandas de absorción características en su espectro diferencial, denominadas banda  $\alpha$  (entre 545 y 650 nm), banda  $\beta$  (520-530nm) y la banda Soret  $\gamma$  (410-450 nm). Con excepción del citocromo *a*, el cual sólo presenta las bandas  $\alpha$  y  $\gamma$ , todos los demás citocromos presentan las tres (71).

Las señales espectrales varían considerablemente en relación con el estado en el que se encuentra la molécula. La señal del hemo se modifica por los cambios en los enlaces del hierro, que a su vez es el resultado del movimiento de sus electrones en los orbitales d.

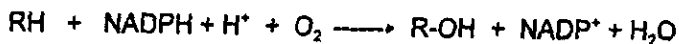
El espectro de absorción nativo de todos los citocromos P450 revela una gran banda a 420 nm que es característica del grupo hemo (banda de Soret) y además se pueden apreciar bandas adicionales en 540 y 570 nm. Cuando se combina el CO con el grupo hemo en forma reducida, el máximo de Soret para este

complejo cambia a 450 nm. Esta banda es la que le da el nombre a la familia de los citocromos P450 y fue descrito por primera vez por Omura y Sato en 1964, quienes establecieron la naturaleza protohémica del grupo prostético de este citocromo (69).

En cualquier citocromo P450 el cambio conformacional por la unión del sustrato está asociado con un cambio de la banda Soret. Hay dos tipos principales de cambios: el tipo I que presenta un mínimo cercano a 420 nm y un máximo entre 385 - 395 nm, por ejemplo, al interaccionar con el colesterol; mientras que para el tipo II el máximo se encuentra a 430 nm con un mínimo entre 390 - 395 nm, por ejemplo con la pregnenolona, la progesterona, el 20 $\alpha$ -hidroxi-colesterol, la 17 $\alpha$ -hidroxi-pregnenolona o con la 17 $\alpha$ -hidroxi-progesterona. Estos cambios son el resultado de perder el sexto enlace de coordinación, asociado con el desplazamiento del hierro desde el plano del anillo hacia el azufre del tiolato (68,70).

### CICLO CATALÍTICO DEL CITOCROMO P-450

Todos los citocromos P450 emplean básicamente el mismo ciclo catalítico, aunque éste puede modificarse para permitir algunas variaciones según la naturaleza de la reacción a catalizar. La reacción típica de este citocromo es la hidroxilación de un sustrato lipofílico.



Es importante hacer notar que la enzima usa el oxígeno molecular. Un

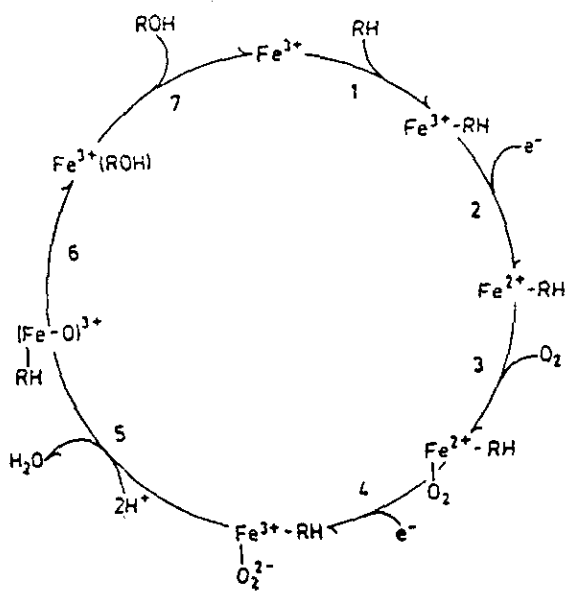
átomo aparece en el sustrato y el segundo es reducido para formar agua.

El ciclo catalítico puede ser considerado como una secuencia de siete etapas, dos de las cuales consisten en la adición de un solo electrón a la enzima. La primera es la formación del complejo enzima sustrato; esta unión se favorece por una interacción hidrofóbica entre el sitio activo y el sustrato. Esto genera un cambio espectrofotométrico importante, que consiste en el desplazamiento del máximo de absorción en la banda del Soret (420 a 390 nm).

En la segunda etapa, la adrenodoxina forma un complejo con el P450 dando como resultado la reducción del hierro a la forma ferrosa. La tercera es la unión del oxígeno, con la sustitución del sexto enlace de coordinación en el hierro del P450. En el siguiente paso, un segundo electrón activa al oxígeno a una forma capaz de completar el ciclo, con un rearrreglo interno para establecer la forma férrica del átomo. En la quinta etapa se separa la molécula de oxígeno y uno de los dos átomos queda reducido en la molécula de agua y el otro permanece asociado con el hierro hémico.

El paso que sigue es la inserción del oxígeno al sustrato. Aunque no son claros los detalles de este paso, se piensa que la enzima forma un radical alquilo por la separación de un hidrogeno del carbono que sera hidroxilado, el cual a su vez forma un radical hidroxilo con el átomo de oxígeno y éste se combina con el radical alquilo para formar el substato hidroxilado.

La séptima y última etapa es la disociación del producto; el ciclo catalítico completo se puede esquematizar de la siguiente forma (68):



## MATERIAL Y MÉTODOS

*Aislamiento de las mitocondrias y preparación de las partículas submitocondriales.* Las placentas se obtuvieron de partos normales o de cesáreas. Los cotiledones se cortaron y se lavaron con sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4 (solución A); posteriormente se cortaron en pequeños fragmentos y se homogenizaron con un Politrón a 3000 rpm por dos períodos de un minuto y con uno de intervalo; se ajustó el pH del homogenado a 7.4 con Tris y las mitocondrias se aislaron por centrifugación diferencial a 1500 xg durante 15 min en una centrífuga refrigerada. El sobrenadante nuevamente se centrifugó a 12000 xg durante 10 minutos. El precipitado que contiene a las mitocondrias se resuspendió en la solución A y finalmente se centrifugaron a 12000 xg para obtener la fracción de las mitocondrias (29); se resuspendieron en un volumen pequeño y se congelaron a -20°C hasta su uso. Para la preparación de partículas submitocondriales, las mitocondrias descongeladas se diluyeron para tener aproximadamente 5 mg de proteína por ml en la misma solución de sacarosa-EDTA, y se ajustó el pH a 8.2 con Tris. La suspensión se sonicó en volúmenes aproximadamente de 60 ml en un sonicador MSE Soniprep 150 a su máxima potencia (30 microns), por tres períodos de 45 seg, en baño de hielo, dejando un intervalo de 2 min entre uno y otro período. La suspensión se centrifugó a 10000 xg durante 10 min para separar las mitocondrias que no se rompieron y el sobrenadante se centrifugó a 105000 xg durante 45 min. Las PSM se resuspendieron en la solución A.

*Consumo de oxígeno.* La determinación del consumo de oxígeno se realizó en un oxímetro marca YSI, manteniendo la temperatura constante a 30° C, en un medio que contenía KCl 100 mM, Tris-HCl 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 5 mM,

EDTA 1 mM, pH 7.3 y una concentración de 1 mg de proteína por ml. Las concentraciones finales en todos los ensayos, para el succinato o para NAD(P)H fueron de 10 mM y de 300  $\mu$ M, respectivamente. La concentración usada de cada inhibidor se indica en la figura correspondiente.

*Espectros de absorción.* Los espectros de absorción de las PSM se obtuvieron en un espectrofotómetro de doble haz Aminco DW-2a entre 340 y 700 nm, en el medio de respiración antes mencionado, con una concentración de proteína de 4 mg por ml. Las longitudes de onda que se emplearon para identificar los citocromos fueron las reportadas en la literatura (71). El citocromo P450<sub>scc</sub> se identificó por el método reportado por Omura y Sato (72). La identificación de los citocromos se hizo a partir de los espectros diferenciales en condiciones de anaerobiosis.

*Inmunotransferencia.* Las proteínas de las partículas submitocondriales se sometieron a un electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 7%, de acuerdo con el procedimiento de Laemmli (73) y después se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, siguiendo el método descrito por Towbin y cols (74). Posteriormente se identificó el citocromo P450<sub>scc</sub> con anticuerpos de conejo anti P450 de bovino, los cuales se habían caracterizado previamente (75,76).

*Síntesis de progesterona.* La progesterona se cuantificó por radioinmunoensayo (77) después de su extracción etérea. La reacción cruzada de estos anticuerpos con otros esteroides es menor al 1%.



*Actividad de los segmentos de la cadena respiratoria.* La actividad del complejo I en PSM o mitocondrias congeladas-descongeladas se determinó por la reducción de 2,6 diclorofenol indofenol (DCPIP) en un espectrofotómetro de doble rayo a 600 nm y usando un coeficiente de extinción para el DCPIP de  $21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (79). La actividad de la succinato deshidrogenasa se determinó usando DCPIP y fenacina metasulfato (PMS),

Los segmentos del NADH-citocromo *c* y succinato-citocromo *c* se determinaron a 550 nm por la reducción del citocromo *c* adicionado y empleando el coeficiente de extinción de  $19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , de acuerdo a Hatefi (80).

*Determinación de proteína.* La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry y cols. (81) usando albúmina sérica bovina como estándar.

## RESULTADOS

### **Identificación del citocromo P450<sub>acc</sub> y síntesis de progesterona.**

Clásicamente el citocromo P450<sub>acc</sub> se ha identificado por el máximo de absorción que se obtiene a 450 nm en un espectro diferencial, cuando se reduce en presencia de monóxido de carbono. Con las PSM de la placenta humana en condiciones de CO vs. ditionita, se observó solamente un hombro a 450 nm en el espectro diferencial, lo que podría sugerir la presencia de este citocromo (Fig. 1, trazo A), por lo que se consideró necesario verificar su presencia con otra técnica. En el recuadro de la figura 1 se muestra la inmunotransferencia de las PSM, observándose una sola banda que corresponde al citocromo P450, reconocido por anticuerpos monoclonales, confirmando su presencia en las preparaciones de las PSM de la placenta.

La dificultad para identificar al citocromo P450 en estas PSM posiblemente se debe a su baja concentración y al tipo de lípidos que constituyen la membrana, factores que podrían interferir con su identificación espectrofotométrica. Esta explicación se apoya con algunos reportes de la literatura, en donde se señala que tanto el tipo de lípidos de la membrana como los cambios en sus concentraciones, pueden modificar las enzimas como resultado de las alteraciones en las interacciones lipido-proteína, las cuales pueden a su vez inducir cambios en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas (20,82).

Como se ha descrito que las PSM preparadas a partir de glándulas suprarrenales pierden su capacidad de sintetizar pregnenolona, se consideró conveniente estudiar si las PSM de la placenta conservan la capacidad de transformar colesterol a progesterona en presencia de NADPH (sustrato específico para la síntesis de esta hormona), NADH o succinato, que son alimentadores de la cadena respiratoria, y los cuales estimulan la síntesis de esta hormona en las mitocondrias de placenta (15). Los resultados mostraron que, en presencia de

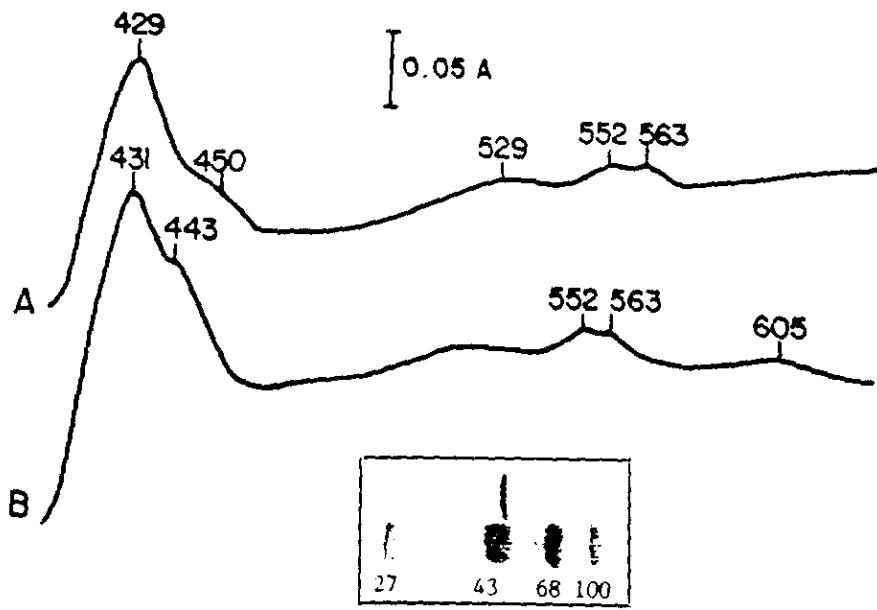


Figura 1. identificación del citocromo P450 en PSM de la placenta humana a término. El espectro diferencial de las PSM se hizo en presencia de CO y ditionita en las celda de muestra contra la muestra oxidada en la celda de referencia (trazo A), o ditionita en la celda de muestra contra la muestra oxidada en la celda de referencia (trazo B). El inserto corresponde a la inmunoreplicad de las proteínas de PSM con el anticuerpo anti-citocromo P450, en donde se emplearon 50 µg de proteína.

NADPH, NADH o succinato las PSM sintetizaron progesterona (96.6, 179.3, y 155.4 pg/mg/min respectivamente), sugiriendo que la cadena de transporte de electrones asociada al citocromo P450<sub>3A2</sub> y el complejo Δ<sup>5</sup> isomerasa 3β esteroide deshidrogenasa son funcionales en las PSM de la placenta humana. Es importante hacer notar que tanto el NADH como el succinato estimularon la síntesis de progesterona en ausencia de la enzima isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup> y de la enzima málica, a través de las cuales se ha propuesto una

interacción de las dos cadenas. Si bien es cierto que estas enzimas y el  $\text{NADP}^+$  se pudieran encontrar como contaminantes en las preparaciones de PSM, cuando se adicionaron citrato o malato al medio de incubación no se observó consumo de oxígeno o reducción de los citocromos por métodos espectrofotométricos. Lo anterior sugiere que existe una conexión entre la cadena respiratoria y la cadena asociada al citocromo  $\text{P450}_{\text{occ}}$ , diferente de la descrita en mitocondrias de otros tejidos esteroideogénicos, lo que hace de las PSM de la placenta un buen modelo para el estudio de esta relación.

### **Citocromos de la cadena respiratoria.**

Es bien conocido que durante el aislamiento de las mitocondrias de hígado de rata se pierde parcialmente el citocromo *c*, por lo que se hicieron experimentos para identificar a los citocromos de la cadena respiratoria en las PSM de la placenta. El espectro diferencial de mostró las bandas  $\alpha$  características de los citocromos *b*, *c+c*, y *aa<sub>3</sub>* cuando se usó la ditionita como agente reductor (Fig 1, trazo B), o bien el NADH o el succinato (Fig 2 trazos A y C), mostrando que las PSM de la placenta contienen a todos los citocromos de la cadena respiratoria.

### **Reducción de los citocromos por NADPH.**

Aunque se ha establecido que el NADPH es el donador específico de los equivalentes reductores para la cadena del citocromo  $\text{P450}_{\text{occ}}$  (5), el espectro generado con este nucleótido mostró la reducción de los citocromos de la cadena respiratoria en forma similar a la obtenida con el NADH (Fig. 2, trazo B). Estos resultados sugieren que el NADPH, además de ser sustrato para la síntesis de progesterona, podría ser sustrato para la cadena respiratoria, a través de un mecanismo que es independiente de la transhidrogenasa dependiente de energía

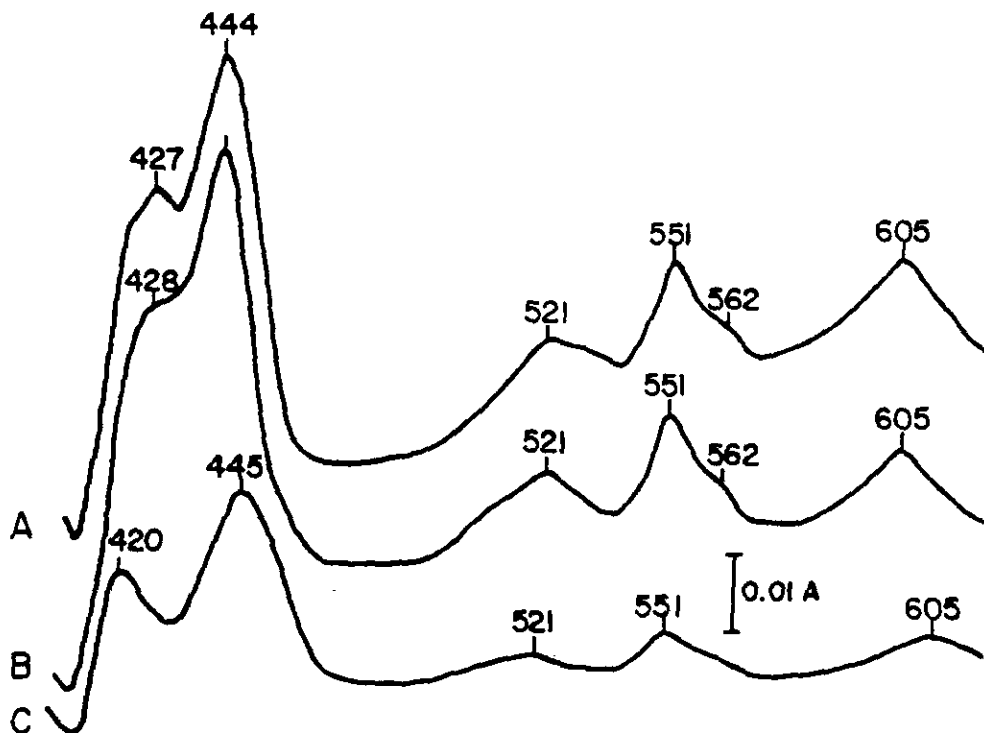


Figura 2. Identificación de los citocromos de la cadena respiratoria. Las PSM se incubaron en el medio A, descrito en Material y Métodos, en presencia de 300  $\mu\text{M}$  de NADH (trazo A), 300  $\mu\text{M}$  NADPH (trazo B), o 10 mM de succinato (Trazo C).

(45), ya que los sustratos necesarios para la actividad de esta enzima, la combinación de  $\text{NAD}^+$  y NADPH o NADH y  $\text{NADP}^+$ , no se encuentran en el medio de incubación.

Se exploró la posibilidad de que los electrones del NADPH siguieran el mismo camino que los procedentes del NADH, para esto, se alimentó a las PSM con los piridín-nucleotidos y se inhibió el sitio I de la cadena respiratoria con 10  $\mu\text{M}$  de rotenona, concentración que reduce el consumo de oxígeno casi al 100% en las mitocondrias de la placenta humana (23). El espectro resultante mostró que ambos piridín-nucleotidos reducen a los citocromos  $c+c_1$  y  $aa_3$  (Fig. 3 trazo A y B). Estos resultados podrían explicarse por una disminución en la sensibilidad al inhibidor en

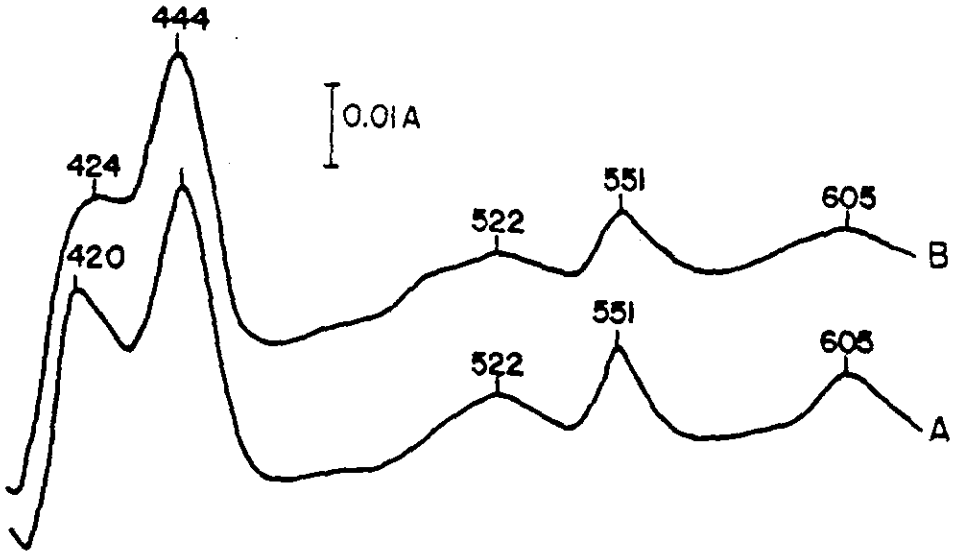


Figura 3. Espectro de las PSM en presencia de rotenona y los piridín-nucleotidos. Al medio de incubación se le adicionó  $10 \mu\text{M}$  de rotenona, y se obtuvo el espectro diferencial en presencia de NADH (A) o NADPH (B).

las PSM, o bien a que la rotenona sí inhibe eficientemente, pero los equivalentes reductores siguen otro camino que se "salta" el sitio de inhibición producido por la rotenona.

#### Consumo de oxígeno por las PSM de la placenta.

A continuación se determinó el consumo de oxígeno estimulado por NAD(P)H o succinato y se hicieron titulaciones en presencia de rotenona, antimicina y/o cianuro. Las PSM consumieron oxígeno en presencia de los sustratos antes mencionados, aunque la velocidad de la respiración con succinato fue mayor que con los piridín-nucleotidos. La baja respuesta al NADH nos condujo a cuantificar el consumo de oxígeno en las mitocondrias descongeladas para

descartar un efecto del proceso de preparación de las PSM; los resultados mostraron el mismo fenómeno, es decir, un mayor consumo de oxígeno con el succinato y no con los piridín-nucleotidos.

#### **Titulación del consumo de oxígeno con rotenona, antimicina o cianuro.**

Con respecto a las titulaciones, se observó que la rotenona, la antimicina y el cianuro inhibieron parcialmente el consumo de oxígeno, aún con las máximas concentraciones probadas; para la rotenona y la antimicina se usaron hasta 16 y 6  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína respectivamente, y para cianuro hasta 100  $\mu\text{M}$ . Cuando la respiración se estimuló con NADH, el consumo de oxígeno se inhibió en un 30% con rotenona, 20% con antimicina y 70% con cianuro (el 100% de respiración corresponde a 16 ng átomos de  $\text{O}_2$  /mg/min). Con succinato como sustrato la inhibición con cianuro y antimicina fue de 70 y 90 % respectivamente (27 ng átomos de  $\text{O}_2$  /mg/min es el 100% de respiración). Estos valores son similares a los reportados para otros sistemas (83).

La inhibición que se observó con antimicina se refleja en el espectro diferencial que se obtiene cuando las PSM se reducen con succinato en presencia del inhibidor, en donde únicamente se identifica al citocromo *b* (Fig. 4 trazo A). Cuando el sustrato fue el NADPH, el porcentaje de inhibición producido por la rotenona, la antimicina y el cianuro fue de 12, 25 y 45% respectivamente. El consumo de oxígeno estimulado por el NADPH representa aproximadamente el 35% del estimulado por el succinato.

La inhibición parcial del consumo de oxígeno en presencia de rotenona y de los piridín-nucleotidos, se refleja también en los espectros obtenidos bajo las mismas condiciones. Sin embargo, estos resultados no apoyan la primera alternativa propuesta, ya que si la reducción de los citocromos sólo se debiera a la baja sensibilidad de las PSM a la rotenona, se esperaría que con el

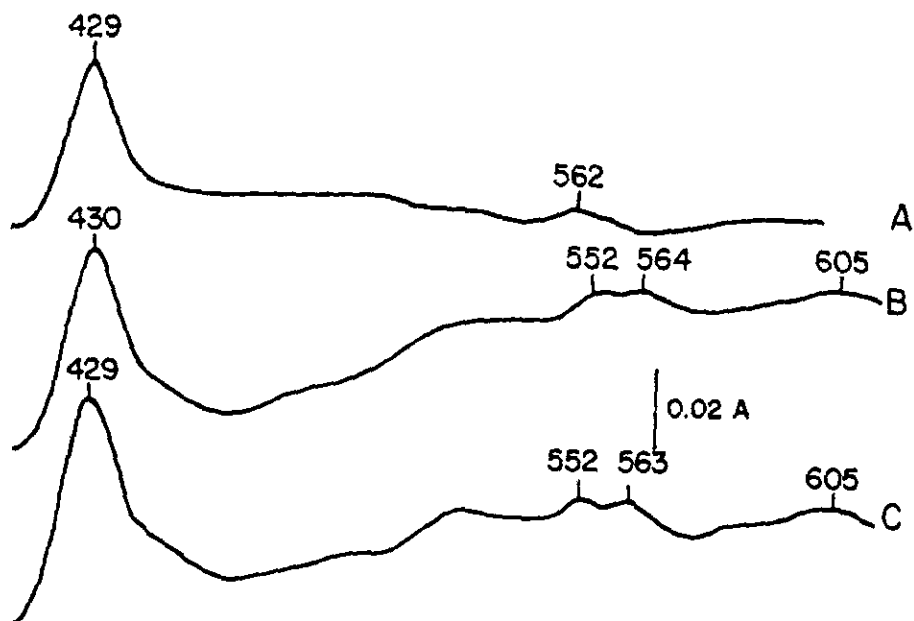


Figura 4. Reducción de citocromos en presencia de antimicina. El trazo A muestra el efecto de la antimicina (6 ng/mg de proteína) en presencia de succinato. El trazo B y C corresponden a NADH o NADPH respectivamente, pero con 6  $\mu$ g de antimicina por mg de proteína.

tiempo, en presencia del inhibidor, también se redujera el citocromo *b* del complejo III de la cadena respiratoria, y esto no, sucede aún cuando se llega a las condiciones de anaerobiosis (Fig. 3).

Cuando a las PSM se les adicionan los piridín-nucleotidos en presencia de antimicina, es posible identificar en la zona de los  $\alpha$  al citocromo *b*, pero también se detecta la reducción del citocromo *c* y en menor proporción la de la citocromo oxidasa (Fig. 4, trazos B y C) y con succinato más antimicina sólo se identificó al citocromo *b* (Fig. 4, trazo A).

Con la combinación de ascorbato y TMPD como donadores de electrones, se observó un consumo extra de oxígeno en las mitocondrias de la placenta previamente inhibidas con cianuro y aminoglutatimida, este último es un inhibidor del citocromo P450, lo que podría explicar por qué en las PSM encontramos que el cianuro inhibe parcialmente el consumo de oxígeno estimulado por NADH, NADPH o succinato y además, porque la combinación de ascorbato más TMPD en



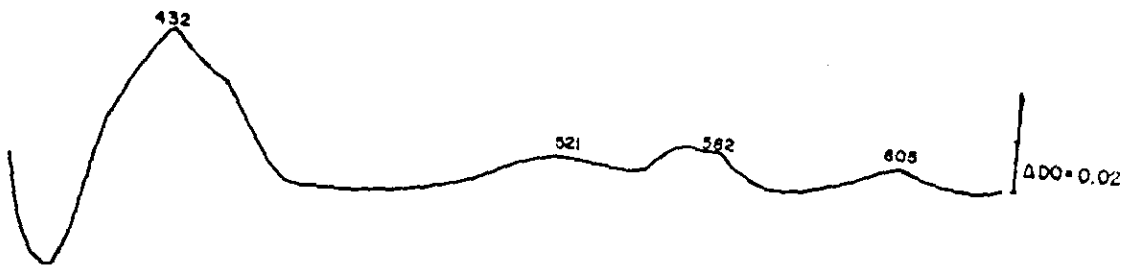


Figura 5. Espectro de los citocromos de la cadena respiratoria en presencia de rotenona 10  $\mu$ M, antimicina 6  $\mu$ g/mg de proteina y cianuro 1 mM con ascorbato/TMPD contra la muestra oxidada.

presencia de los inhibidores, rotenona, antimicina y cianuro, reduce a los citocromos  $c+c_1$  y  $aa_3$  y también reduce a un citocromo  $b$  (Fig. 5).

#### Oxidación de los piridin-nucleotidos.

Se determinó la vía de oxidación del NADPH en estas PSM, evaluando la actividad de los segmentos, de la cadena respiratoria; para ello se utilizaron inhibidores específicos y aceptores artificiales de electrones. El primer segmento se estudia con antimicina y comprende desde NAD(P)H hasta el DCPIP como aceptor artificial; el segundo fragmento se determina en presencia de antimicina y va desde succinato hacia DCPIP; finalmente, los segmentos tercero y cuarto se cuantificaron en presencia de cianuro y van desde el NAD(P)H o succinato, hasta el citocromo  $c$ .

La Tabla I muestra que para el segmento NAD(P)H  $\longrightarrow$  DCPIP, la

velocidad de oxidación del NADH es aproximadamente 12 veces mayor que para el NADPH. Estos datos están de acuerdo con lo reportado para otro tipo de mitocondrias, en donde se describe que la NADH-deshidrogenasa tiene poca afinidad por el NADPH a un pH de 7.5 (84). Por otro lado, en los segmentos III y IV, en donde el aceptor final fue el citocromo c, la velocidad de reducción fue similar, independientemente del sustrato empleado.

ACTIVIDAD DE LOS DIFERENTES SEGMENTOS DE LA CADENA RESPIRATORIA CON ACEPTORES ARTIFICIALES.

NADH ----> DCPIP	143.3 ± 38.1	NADH ----> CIT C	52.0 ± 16.0
NADPH ----> DCPIP	11.5 ± 5.1	NADPH ----> CIT C	41.0 ± 17.0
SUCC. ----> DCPIP	60.5	SUCC. ----> CIT C	43.0 ± 12.0

Tabla I. La actividad está expresada como nmoles de aceptor reducido por miligramo de proteína por minuto. Los resultados son el promedio de 6 experimentos con su desviación estándar.

La Tabla II muestra la actividad del fragmento succinato ----> cit c en presencia de los piridin-nucleótido y/o los inhibidores. Al agregar NAD(P)H más el succinato, se observó que la actividad de este segmento fue aditiva (en relación con la observada cuando los sustratos se añadieron en forma independiente). Por otro lado, la adición de antimicina o de la combinación rotenona más antimicina en presencia de succinato, inhiben completamente la actividad de este segmento debido a un eficiente bloqueo del sitio II; sin embargo con la posterior adición de NAD(P)H la actividad que se alcanza es similares a las que se obtuvieron para el segmento NAD(P)H ----> cit c.

---

REDUCCIÓN DEL CITOCROMO C ADICIONADO EN PSM DE PLACENTA HUMANA.

Adición	Actividad.
SUCC + NADH	88.3 ± 15.8
SUCC + NADPH	85.0 ± 25.0
SUCC + Rot.	43.0 ± 12.4
SUCC + A A.	N. D.
SUCC + AA + Rot.	N. D.
SUCC + AA + Rot + NADH	51.8 ± 15.2
SUCC + AA + Rot + NADPH	41.0 ± 20.0

---

**Tabla II.** La actividad se expresa como nmoles de citocromo c reducido por miligramo de proteína por minuto. La concentración del NADH y NADPH fue de 300  $\mu$ M, y para el succinato de 10 mM. Los resultados son el promedio de 5 experimentos con su desviación estandar;

*Succ.* = succinato; *AA* = antimicina; *Rot* = rotenona; *N. D.* = no detectado.

**Consumo de oxígeno estimulado por citocromo c.**

El consumo de oxígeno en las PSM estimulado por la adición de citocromo c, en presencia de succinato, NAD(P)H y/o inhibidores, se presentó una conducta similar a la señalada para los segmentos de la cadena respiratoria. En los trazos de la figura 6 se puede apreciar que el consumo de oxígeno inducido por el succinato se inhibe en presencia de la antimicina en un 90 % y que bajo estas condiciones no hay respuesta a la adición del citocromo c (trazos A y B). Sin embargo, el consumo de oxígeno inducido por los piridín-nucleotidos (trazos C al

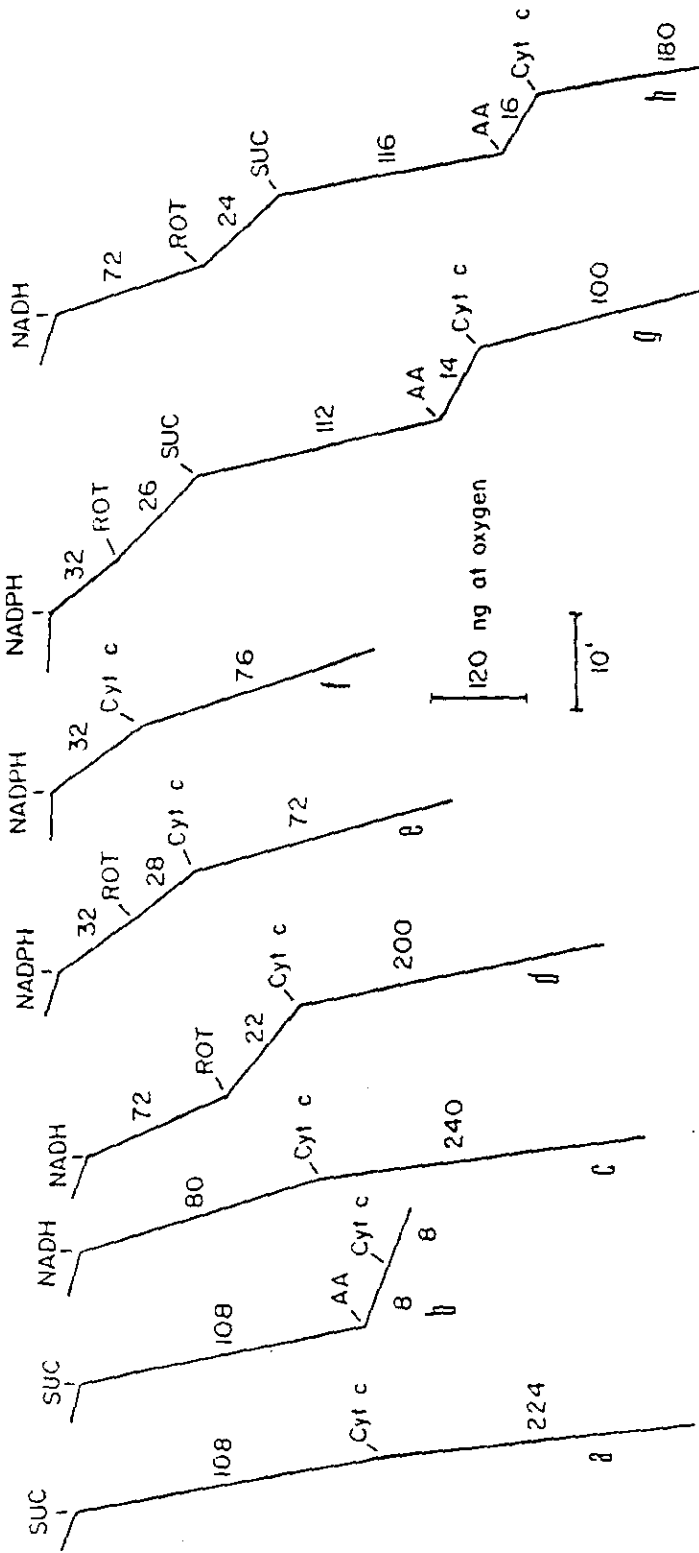
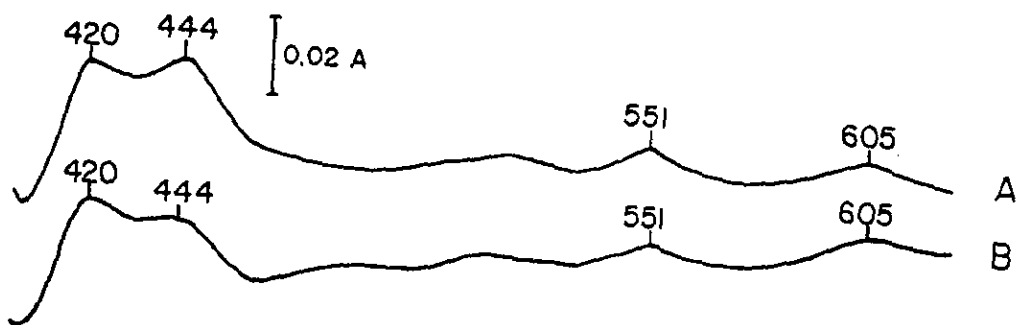


Figura 6.- Consumo de oxígeno por las PSM en presencia de succinato (SUC), NADH o NADPH y de los inhibidores de la cadena respiratoria. Las PSM se incubaron en el medio A, adicionandoles NADH, NADPH o succinato más 300  $\mu$ g de citocromo c (cyt c) por miligramo de proteína, con la adición de antimicina (AA) o rotenona (ROT) en una concentración de 3.3  $\mu$ g/l mg, cuando se indica. Los valores corresponden a ng at de oxígeno consumido por mg de proteína en 5 minutos.



*Figura 7. Espectro de los citocromos de la cadena respiratoria en presencia de algunos inhibidores. Las concentraciones usadas para cada inhibidor fueron: rotenona 10  $\mu$ M, antimicina 6  $\mu$ g/mg de proteína, cianuro 1 mM y aminoglutatimida 400  $\mu$ M. El espectro que se obtuvo en presencia de NADH fue sin aminoglutatimida (trazo A) y el que se obtuvo con NADPH fue en presencia de todos los inhibidores (trazo B).*

F), aunque mostró una inhibición parcial por la rotenona (trazos D y E), responde a la adición del citocromo c en forma similar a la que se obtiene en ausencia del inhibidor. Los trazos G y H muestran el consumo de oxígeno estimulado primero por NAD(P)H, seguida por la inhibición con rotenona, y la adición de succinato y antimicina, en estas condiciones las PSM conservan una respuesta a la adición del citocromo c, lo cual puede pensarse que se debe a los piridín-nucleotidos.

#### **Espectros diferenciales de los citocromos de la cadena respiratoria en presencia de diferentes inhibidores.**

La titulación con los inhibidores, al igual que los datos mostrados en la figura 6, indican que el NADH y el NADPH, en presencia de rotenona y antimicina, probablemente ceden sus equivalentes reductores a la cadena respiratoria a través de una vía alterna, lo cual se refleja como un consumo de oxígeno. Con base en estos datos nos interesó conocer cuáles de los citocromos de la cadena respiratoria

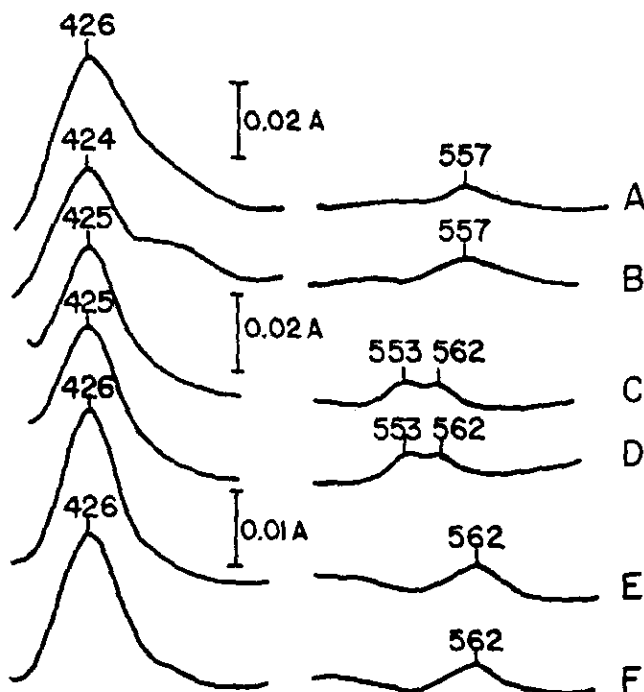


Figura 8. Reducción extra de los citocromos en presencia de los piridin-nucleotidos. Las PSM se incubaron en presencia de 10 mM de succinato y de los inhibidores (rotenona 10  $\mu$ M, antimicina 6  $\mu$ g/mg de proteína o cianuro 1 mM) en ambas cuvetas, para reducir todos los citocromos de la cadena respiratoria. Para los trazos A y B, las PSM se incubaron primero con succinato y posteriormente se les adicionó NADH (300  $\mu$ M) trazo A o NADPH en la misma concentración, trazo, B en la cuveta muestra. Los trazos C y D corresponden a PSM incubadas con succinato, rotenona y cianuro durante 10 minutos, posteriormente se le adicionó NADH (trazo E) o NADPH (trazo F).

se reducen en presencia de las combinaciones de los inhibidores rotenona, antimicina y cianuro. Los espectros de diferenciales que se obtuvieron con el NADH o el NADPH, se muestran en la figura 7 (trazos A y B, respectivamente), en donde fue posible identificar a los citocromos  $c + c_1$  y  $aa_3$  a pesar de la presencia de los tres inhibidores.

De acuerdo con los resultados anteriores se determinó si los piridin-nucleotidos eran capaces de incrementar la reducción de los citocromos que previamente se redujeron por el succinato. Los espectros son similares tanto para

el NADH como para el NADPH, los cuales mostraron un máximo de absorción a 562 nm en todas las condiciones, lo que sugiere la presencia de un citocromo tipo b (Fig. 8). Los mismos resultados se obtuvieron cuando se usaron mitocondrias de placenta congeladas-descongeladas en lugar de las PSM (datos no mostrados).

## DISCUSIÓN

Los resultados que se obtuvieron en este trabajo muestran que las PSM de la placenta humana tienen los citocromos de la cadena respiratoria, el citocromo P450<sub>900</sub> y a la cadena asociada a él, al igual que al complejo  $\Delta^5$ -isomerasa-3 $\beta$  esteroide deshidrogenasa por lo que son capaces de sintetizar progesterona y de consumir oxígeno.

El NADH y el NADPH reducen a los citocromos de la cadena respiratoria, lo cual sugiere que estos siguen caminos similares para su oxidación, lo que se mostró con el uso de los diferentes inhibidores. En presencia de rotenona los piridín nucleótidos reducen a los citocromos  $c+c_1$  y  $aa_3$ , esto se podría explicar por medio de un mecanismo en el que los equivalentes reductores siguen otro camino que "salta" el sitio I de la cadena respiratoria, pero que regresa a ésta posteriormente.

Con la antimicina se bloquea eficientemente el transporte de electrones provenientes del succinato, pero no los de los piridín-nucleótidos. Estos últimos podrían estar transfiriendo sus electrones a un citocromo que no forma parte de la cadena respiratoria, pero que está conectado con ella. Los resultados sugieren la presencia de dos citocromos  $b$  diferentes, uno que se reduce por el succinato, probablemente el del complejo III de la cadena respiratoria y que es sensible a la antimicina y otro menos sensible a éste inhibidor y que es reducido por los piridín-nucleótidos. Esta conclusión se apoya también en el hecho de que se necesitan cantidades diferentes de antimicina para obtener la inhibición del citocromo  $b$  con succinato como sustrato (6 ng/mg de proteína) y para la inhibición parcial con NAD(P)H (6  $\mu$ g/mg de proteína). Este citocromo se encuentra probablemente en baja concentración ya que no es posible observarlo en los espectros cuando está presente la rotenona. Podría pensarse que este citocromo forma parte de una tercera cadena, que conectaría a los dos sistemas de transporte de electrones, lo cual explicaría la estimulación de la síntesis de progesterona en las PSM de la placenta por el NADH.

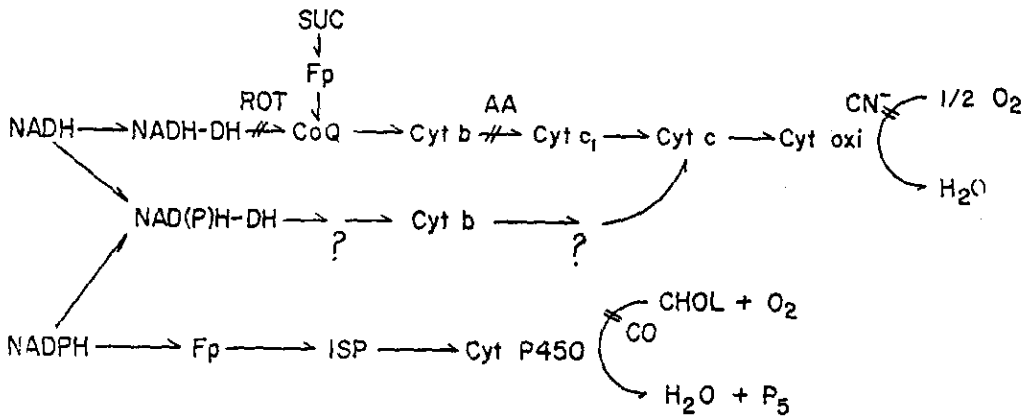


Oliveira y Meigs propusieron una tercera cadena capaz de consumir oxígeno, basándose en el hecho de que al adicionar ascorbato y TMPD a las mitocondrias de la placenta se produce un consumo extra de oxígeno en presencia de cianuro y aminoglutatimida; estos datos explicarían los resultados que se obtienen en el espectro diferencial bajo estas condiciones (en presencia de cianuro y aminoglutatimida), donde se puede apreciar la reducción de un citocromo *b*, el cual podría estar participando en esta tercera cadena.

Al comparar los segmentos  $\text{NADH} \longrightarrow \text{DCPIP}$  y  $\text{NADH} \longrightarrow \text{cit c}$  se observa una diferencia importante en cuanto a la actividad de la NADH deshidrogenasa, que se podría explicar por la presencia de un paso limitante que podría ser desde la CoQ, que frenaría la actividad de dicha enzima cuando se valora el segmento  $\text{NADH} \longrightarrow \text{cit c}$ . Sin embargo, la respuesta de estos segmentos al NADPH sugiere que la reducción de los citocromos de la cadena respiratoria, no se inicia a través de la NADH deshidrogenasa del complejo I, sino por la vía alterna que se está proponiendo, la cual incluye a otra deshidrogenasa que es insensible a la rotenona y que puede tomar los equivalentes reductores tanto del NADH como del NADPH. Esta vía se une con la cadena respiratoria después de la CoQ y sus equivalentes reductores siguen un camino diferente al que toman los equivalentes provenientes del succinato. Este punto se apoya por los resultados la tabla II en donde se muestra la actividad del segmento succinato  $\longrightarrow \text{cit c}$  en presencia de los piridín nucleótidos y/o los inhibidores, en donde se observa que los equivalentes reductores del succinato y de los piridín nucleótidos llegan por diferente vía para reducir al citocromo *c*.

Estos resultados también concuerdan con lo encontrado en los trazos de consumo de oxígeno (Fig. 7, trazos g y h), sugiriendo un camino diferente para los equivalentes reductores del succinato y de los piridín-nucleotidos ya que a pesar de la presencia de rotenona y antimicina se puede estimular el consumo de oxígeno al adicionar citocromo *c*.

En conclusión, los resultados apoyan la existencia de una vía alterna para la oxidación de los piridin nucleótidos, que puede ser la tercera cadena propuesta por Olivera y Meigs, integrada por una piridin-nucleotido deshidrogenasa que reconoce tanto al NADH como al NADPH y un citocromo tipo *b*, el cual pudiera estar asociado con centros hierro azufre, como se ha descrito para otras cadenas, o en combinación con otras proteínas que permiten el consumo de oxígeno. La organización de esta cadena no es clara pero un posible esquema sería el siguiente:



Quedaría por aclarar si hay otros componentes en esta cadena, así como estudiar su papel fisiológico en el metabolismo de las mitocondrias de la placenta humana; una posible función podría ser como mecanismo de regulación de la síntesis de progesterona usando al NADH en presencia de concentraciones bajas NADPH ya que se ha reportado que una relación baja de NADPH/NADP<sup>+</sup> limita la síntesis de esteroides en las mitocondrias de las glándulas suprarrenales (70), en donde la cadena del citocromo P450 reconoce específicamente al NADPH.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Padykula, H. A. (1988). In: "Cell and Tissue Biology". Edited by L. Weiss. 6th Ed. Urban & Schwarzenberg. Baltimore-Munich.
- 2.- Wiener, M. and Friedlander, R. (1971). *Am. J. Obstet. Gynecol.* 111: 942-946.
- 3.- Talamantes, F. and Ogren, L. (1988). In: "The Physiology of Reproduction". Edited by E. Knobil and J Neill et al. Raven Press Ltd., New York.
- 4.- Simpson, E. R. and Mc Donal, P. C. (1981). *Ann. Rev. Physiol.* 43: 163-188.
- 5.- Mason, J. I. and Boyd, G. S. (1971). *Eur. J. Biochem.* 21: 308-321.
- 6.- Scislowski, W. D., Zolnierowicz, S. and Zelewski, L. (1983). *Biochem. J.* 214: 339-343.
- 7.- Swierczynski, J., Scislowski, P., Aleksandrowicz, Z. and Zelewski, L. (1982). *Biochem. Med.* 28: 247-255.
- 8.- Swierczynski, J., Klimek, J. and Zelewski, L. (1985). *J. Steroid Biochem.* 22: 415-418.
- 9.- Uzgiris, V. I., McIntosh, E. N., Alonso, C. and Salhanick, H. A.. (1971). *Biochemistry* 10: 2916-2923.
- 10.- Robinson, J. and Stevenson, M. P. (1972). *FEBS Lett.* 23: 327- 331.
- 11.- Pasanen, M. and Pelkonen, O. (1984). *Steroids* 43: 517-528.
- 12.- Rabe, T., Weidanhanmer, K. and Runnebaun, B. (1983). *J. Steroid Biochem.* 18: 333-340.
- 13.- Martínez, F. and Strauss III, J. F. (1997). En: *Subcellular Biochemistry*. vol 28 capitulo 8, 205. Edit. por R. Birtman Plenum Prees, New York.
- 14.- Tuckey, R. C., Kostadinovic, Z. and Cameron, K, J. (1994). *Mol. Cell. Endocrinology* 105: 103-109.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- 15.- Klimek, J., Boguslawski, W., Ilalowska, B. and Zelewski, L. (1976). *Acta Biochim. Pol.* 23: 185-192.
- 16.- Klimek, J., Aleksandowicz, Z., Wrzolkowa, T. and Zelewski, L. (1972). *Biochem. Med.* 6: 426-437.
- 17.- Zolnierowicz, S., Swierczynski, J. and Zelewski, L. (1982). *Placenta* 3: 197-210.
- 18.- Papadopulus, V. (1993). *Endocr. Rev.* 14: 222-240.
- 19.- Chakraborti, A. S., Biswas, R., Majundar, R. and Mukherjea, M. (1980). *Gynecol. Obstet. Invest.* 11: 294-300.
- 20.- Daum, G. (1985). *Biochem. Biophys. Acta* 822: 1-42.
- 21.- Brossa, O., Garcca, R., Canuto, R. A. Gautero, B. and Feo, F. (1980). *Medical Sci.* 8: 73-74.
- 22.- Négrié, Ch., Triadou, N., Michel, O., Bouhnik, J. and Michel, R. (1979). *J. Steroid Biochem.* 11: 1135-1140.
- 23.- Olivera, A. A. and Meigs, R. A. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 376: 436-445.
- 24.- McIntosh, E. M., Mitami, F., Uzgiris, V. I., Alonso, C. and Salhanick, H. A. (1973). *Ann N. Y. Acad. Sci.* 212: 392-405.
- 25.- Cammer, W. and Estabrook, R. W. (1976). *Arch. Biochem. Biophys.* 122: 735-747.
- 26.- Williams, J. N. (1964) *Archiv. Biochem. Biophys.* 107: 537-543.
- 27.- Meigs, R. A. and Ryan, K. J. (1968). *Biochim. Biophys. Acta* 165: 476-482.
- 28.- Olivera, A. A. and Meigs, R. A. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 376: 426-435.
- 29.- Martinez, F., Chavez, E. and Echegoyen, S. (1987). *Int. J. Biochem.* 19: 275-279.
- 30.- Aleksandrowicz, Z. (1980). *Int. J. Biochem.* 11: 165-175.
- 31.- Aleksandrowicz, Z. (1985). *Int. J. Biochem.* 17: 229-234.

- 32.- Harkness, R. A., Coade, S. B., Simmonds, R. J. & Duffy. (1985). *Placenta* 6: 199-216.
- 33.- Illsley, N. P. Coade, S. B. & Harkness, R. A. (1985). *Placenta* 6: 187-198.
- 34.- Kotlyar, A. B., Sled, V. D. and Vinogradov, A. D. (1992). *Biochim. Biophys. Acta* 1098: 144-150.
- 35.- Jung, D. W. and Brierley, G. P. (1981). *Experientia* 37: 237-238.
- 36.- Varricchio, F. (1967). *Arch. Biochem. Biophys.* 121: 187-193.
- 37.- Martínez, F., Moncada, R., Barceñas, F. J. and Espinosa-García, M. T. (1992). *Placenta* 13: 463-473.
- 38.- Martínez, F., Espinosa-García, M. T., Flores-Herrera, O. and Pardo, J. P. (1993). *Placenta* 14: 321-331.
- 39.- Martínez, F., Meaney, A., Espinosa-García, M. T., Pardo, J. P., Uribe A. and Flores-Herrera, O. (1996). *Placenta* 17: 345-350.
- 40.- Martínez, F., Pardo, J. P., Flores-Herrera, O. and Espinosa-García, M. T. (1995). *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 27: 795-803.
- 41.- Thomson, M., Korn, M. and Hall, P. F. (1995). *Biochim. Biophys. Acta* 1248: 159-169.
- 42.- Meigs, R.A. and Sheean, L. A. (1977). *Biochim. Biophysica Acta* 489: 225-235.
- 43.- Swierczynski, J., Scislowski, P., Aleksandrowicz, Z. and Zelewski, L. (1976). *Acta Biochim. Pol.* 23: 93-102.
- 44.- Boguslowski, W., Klimek, J. and Zelewski, L. (1976). *J. Steroid Biochem.* 7:39-44.
- 45.- Oldham, S. B., Bell, J. J. and Harding B. W. (1968). *Arch. Biochem. Biophys.* 123: 496-506.
- 46.- Boguslowski, W., Klimek, J. and Zelewski, L. (1972). *FEBS Lett.* 27: 181-183.
- 47.- Swierczynski, J., Klimek, J. and Zelewski, L. (1986). *J. Steroid Biochem.* 24: 591-59.

- 48.- Schreiner, W. and Ville, C. (1965). *Am. J. Obst. & Gynec.* 91:961-966.
- 49.- Xu, X., Xu, T., Robertson, D. G. and Lambeth, J. D. (1989). *J. Biol. Chem.* 264: 30, 17674-17680.
- 50.- Driscoll, W. J., Lec, C. L. and Strott, Ch. A. (1990). *J. Biol. Chem.* 265: 12306-1231.
- 51.- Klimek, J. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* 196: 436-446.
- 52.- Garduño, J.P., Espinosa-García, M. T., Pardo, J. P. and Martínez, F. (1992). *Placenta* 1: 535-544.
- 53.- Denton, R. M., Mc Cormack, J. G. and Edgel, N. J. (1980). *Biochem. J.* 190: 107-117.
- 54.- Moreno-Sánchez, R. (1985). *J. Biol. Chem.* 260: 12554-12560.
- 55.- Shemesh, M., Hansel, W. and Strauss III, J. F. (1984). *Proct. Nalt. Acad. Sci. USA* 81:6403-6407.
- 56.- Simpson, E. R. and Miller, D. A. (1978). *Arch. Biochem. Biophys.* 190: 800-808.
- 57.- Hanukoglu, I. (1992). *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 43: 779-804.
- 58.- Shikita, M. and Hall, P. F. (1974). *Proct. Nalt. Acad. Sci. USA* 71: 1441-1445.
- 59.- Hall, P.F. (1985). *Recent progress in hormone Research.* 41: 1-39.
- 60.- Jefcoate, C. R., Mc.Namara, B. C., Artemenko, I. and Yamazaki, T. (1992). *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 43:8, 751-767.
- 61.- Morrison, G., Meigs, R. A. and Ryan, K. J. (1965). *Steroids, Supplement II:* 177-188.
- 62.- Rabe, T., Kiesel, L. and Rennebaum, B. (1985). *J Steroid Biochem.* 22, 5: 657-664.
- 63.- Strauss III, J. F., Martínez, F. and Kiriakidou, M. (1996). *Biol. Reprod.* 54: 303-311.

- 64.- Challis, J. R. G., Workewych, J. V. and Patrick, J. E. (1981). *J. Endocrinol.* 89: 337-341.
- 65.- Tuckey, R. C., Kostadinovic, Z. and Cameron, K. J. (1994). *Mol. Cell Endocrinol* 105: 103-109.
- 66.- Black, S. M., Szklarz, G. D., Harikrishna, J. A., Lin, D., Wolf, C. R. and Miller, W. L. (1993). *Endocrinology* 132: 539 -545.
- 67.- Tuckey, R. C. Woods, S. T. and Tajbakhsh, (1997). *Eur. J. Biochem.* 244: 835-839.
- 68.- Hall, P.F. (1986). *Steroids* 48: 3-4: 131-196.
- 69.- Omura, T. and Sato, R. (1964). *J. Biol. Chem.* 239: 2370-2385.
- 70.- Graves, P. E., Uzgiris, V. I. and Salthonick, H. A. (1980). *Steroid* 35: 543-559.
- 71.- Lemberg, R. and Barrett, J. (1973). *En: Cytochromes*, Academic Press, London.
- 72.- Omura, T. and Sato, R. (1967). *Methods in Enzymology.* 10: 556-561.
- 73.- Laemmli, U. K. (1970). *Nature* 227: 680-685.
- 74.- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- 75.- Nalsen, J. E., Silvin, S. L., Kao, L. C., Ringler, G. E., Kliman, H.J. and Strauss, J.F. III (1989). *J. Reprod. Fert.* 375: 137-143.
- 76.- Shalem, Z., Izhar, M., Shore, L. S., Shemesh, M., Hansel, W. and Strauss, J. F. III (1986). *J. Steroid Biochem.* 31: 835-838.
- 77.- Sufi, S. B., Danalson, A. and Jefcoate, S. L. (1983). *Method Manual of Matched Assay Reagent Programme 7th Ed. Special Programme of Research in human Reproduction*, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- 78.- Martinez, F., Echegoyen, S., Briones, R. and Cuellar, A. (1988). *J. Lipid Res.* 29: 1005-1011.
- 79.- Galante, Y. M. and Hatefi, Y. (1978). *Methods Enzymol* 53: 15-21.

81.- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall R. J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

82.- Chang, H. M., Reitsster, R., Mason, R.P. and Gruener, R. (1995). *J. Membran. Biol.* 143, 51-63.

83.- Moreno-Sánchez, R., Espinosa-García, M. T. and Raya, J. C. (1988). En: *Integration of Mitochondrial Function*, edited by J. Lemasters, Ch. R. Hackembrock, R. G. Thurman, and V. Westerhoff. 279-304.

84.- Hatefi, Y. (1985). *Ann. Rev. Biochem.* 54: 1015-1069.



**PRESENCE OF AN NAD(P)H DEHYDROGENASE AND A b-TYPE CYTOCHROME  
DIFFERENT FROM THE RESPIRATORY CHAIN IN SUBMITOCHONDRIAL  
PARTICLES FROM HUMAN PLACENTA**

Ma. Teresa Espinosa-García and Federico Martínez.

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-159, 04510, Mexico D.F., MEXICO.

Received October 22, 1995

### SUMMARY

Placental submitochondrial particles can synthesize progesterone. Both, progesterone synthesis and oxygen consumption were stimulated in the presence of succinate, NADH, or NADPH. NADPH reduced the cytochromes of the respiratory chain in a similar way as NADH. NADPH oxidation was not achieved by NADH-DH from the respiratory chain, and the presence of an NAD(P)H-DH is suggested. Submitochondrial particles contain at least two b-type cytochromes, one inhibited by antimycin when the electron donor is succinate, whereas the other is less sensitive to antimycin in the presence of pyridine nucleotides. The results suggest a connection between the respiratory chain and cytochrome P450, through an NAD(P)H-DH and a b-type cytochrome, both different from the respiratory chain.

### INTRODUCTION

Human placental mitochondria (HPM) have two respiratory chains, one coupled to ATP synthesis, and the other to cytochrome P450<sub>sc</sub> responsible for the transformation of cholesterol into pregnenolone (1,2). The mechanism that regulates the activity of each chain and their possible association is not well understood. However, NADPH may be involved in the connection between both electron transport chains has been proposed (3-6). NADP is reduced in mitochondria by malate dehydrogenase (E.C. 1.1.1.40), isocitrate dehydrogenase (E.C. 1.1.1.42), and transhydrogenase (E.C. 1.6.1.1). Although the enzymatic reduction of NADP has been studied (7-11), there is not enough information about their possible association to these chains in HPM. This event takes importance, since at the present the mechanism used by the human placenta to regulate the cholesterol transformation into pregnenolone is unknown.

We have studied the reduction of the cytochromes by NAD(P)H and succinate in submitochondrial particles (SMP) from human term placenta, which were characterized previously (12). In this work, evidence for the presence of a b-type cytochrome and an NAD(P)H-dehydrogenase different from the complex I is presented.

## MATERIALS AND METHODS

Human term placentas were obtained from normal deliveries or cesarean sections. HPM were isolated as previously described (13), and suspended in 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, pH 7.4 (isolation medium), and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until used. After thawing, mitochondria were diluted to 5 mg of protein/ml in the isolation medium; pH was adjusted to 8.2 with Tris-base. The suspension was sonicated in an MSE Soniprep 150 at its maximal output (30 microns) for 45 sec in an ice bath, three times with two-min intervals, and then, centrifuged at  $10,000 \times g$ , 10 min; the supernatant was centrifuged at  $105,000 \times g$  for 45 min, and the pellet containing the SMP was suspended in the isolation medium. Protein concentration was determined according to Lowry et al. (24), using bovine serum albumin as standard.

Oxygen consumption was determined in an oxymeter YSI model 53, at  $37^{\circ}\text{C}$  in a medium containing 100 mM KCl, 30 mM Tris-HCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 mM EDTA, adjusted to pH 7.3 (Medium A); protein content was 1 mg/ml. Succinate (10 mM) and (NAD(P)H) 300  $\mu\text{M}$  were used. Other additions are shown under Results.

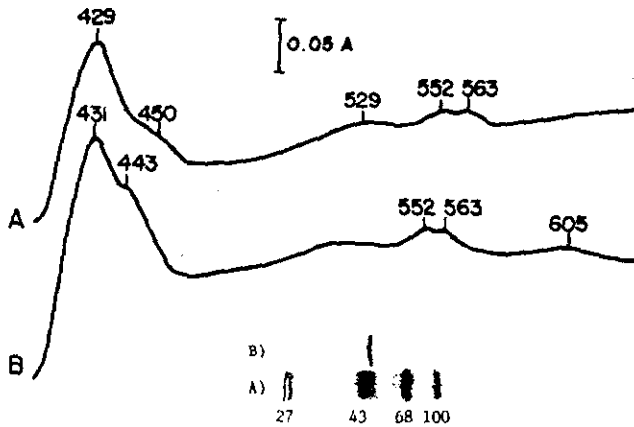
Differential spectra under anaerobiosis for cytochromes identification was done in a double beam DW-2a Aminco spectrophotometer, using 4 mg SMP/ml in the Medium A. The wavelengths used to identify the cytochromes (cytochrome a, 605 nm; cytochrome b, 564 nm; cytochrome c, 552 nm) were reported previously (13). Cytochrome P450<sub>scc</sub> was identified by the method reported by Omura and Sato (14). NADH-CoQ and succinate-CoQ reductase activities were assayed in the presence of 2,4 dichlorophenol indophenol (DCPIP) and phenazine methosulfate, as electron acceptors (15,16). Cytochrome c reduction was determined in the presence of NADH, NADPH, or succinate, as reported by Hatefi (17).

Cytochrome P450<sub>scc</sub> from SMP was evaluated by western blot. Briefly, samples were electrophoresed in 7% SDS-polyacrylamide gels, according to the procedure of Laemmli (18), and then transferred to nitrocellulose membranes as described by Towbin et al. (19). Cytochrome P450<sub>scc</sub> was detected using a rabbit anti-bovine P450<sub>scc</sub> antibody, which has been characterized previously (20-21).

Progesterone was determined by radioimmunoassay (22). The cross-reacting of antibodies with other steroids was less than 1%. Cholesterol was quantified as reported by Martinez *et al.* (23). The experiments were performed at least three times by duplicate, using different batches of SMP.

## RESULTS

The differential spectra of SMP assessed in the presence of dithionite plus CO against dithionite, showed a shoulder at 450 nm (Figure 1, Trace A), suggesting the presence of cytochrome P450<sub>scc</sub>. Since P450<sub>scc</sub> did not give a well-defined peak as previously reported (25-26), its presence was confirmed by the immunoblot (Inset, Figure 1). Also, in conditions of dithionite reduced minus



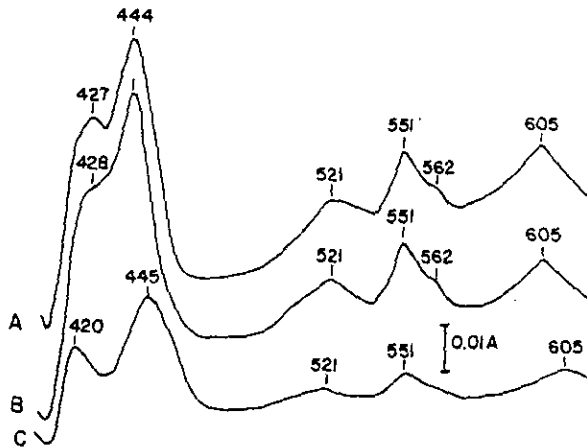
**Figure 1.** Identification of cytochrome P-450 in SMP from human term placenta. The differential spectrum of SMP was made in the presence of CO and dithionite in the sample cuvette vs dithionite in the reference cuvette (Trace A), or dithionite in the sample vs oxidized in the reference (Trace B). The inset correspond to the immunoblot of P-450scc using 50  $\mu$ g of protein. A: Molecular weight standards, B: SMP.

oxidized, the cytochromes of respiratory chain were observed (Figure 1, Trace B). Synthesis of progesterone by these SMP was observed, and supported by NADPH, NADH, or succinate (96.6, 179.3, and 155.4  $\mu$ g progesterone  $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ , respectively).

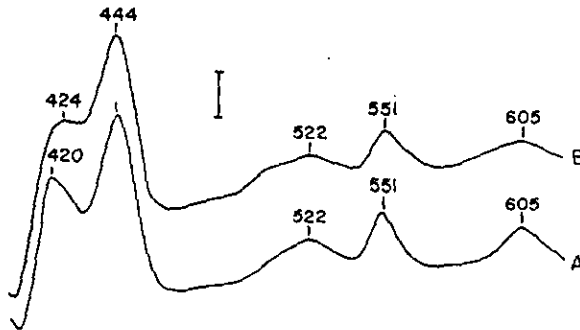
The reduction of the respiratory chain cytochromes in the presence of NAD(P)H or succinate was evaluated. Cytochromes b, c+c<sub>1</sub>, and aa<sub>3</sub> were observed in the presence of NADH or succinate (Figure 2, Trace A and C). Although NADPH is the specific electron donor for the P450scc (2), our results showed the reduction of the respiratory chain cytochromes by NADPH in a similar extent to that observed with NADH (Figure 2, Trace B).

Rotenone inhibits oxygen consumption in HPM stimulated by glutamate/malate by blocking the electron transport from NADH-DH to CoQ (4). Therefore, the effect of 10  $\mu$ M rotenone on NADPH-induced cytochrome reduction was studied. In the presence or absence of rotenone (Figure 3), NADPH and NADH reduced the cytochromes c+c<sub>1</sub> and aa<sub>3</sub>, suggesting that: a) rotenone partially inhibits the complex I in SMP from placenta; or, b) there is an alternate pathway, including a dehydrogenase that oxidizes NAD(P)H, and transfers the electrons to cytochromes through a rotenone-insensitive pathway.

The first assumption was tested measuring the oxygen consumption of the respiratory chain stimulated by NADH, NADPH, or succinate, in the presence of increasing concentration of rotenone (1 to 16  $\mu$ g  $\text{mg}^{-1}$ ), antimycin (1 ng to 50 ng  $\text{mg}^{-1}$  for succinate, and from 2  $\mu$ g to 16  $\mu$ g  $\text{mg}^{-1}$  for NAD(P)H), or cyanide (5 to 100  $\mu$ M).



**Figure 2.** Identification of cytochromes of respiratory chain. SMP were incubated in Medium A as described under Material and Methods in the presence of 300  $\mu$ M NADH (Trace A), 300  $\mu$ M NADPH (Trace B), or 10 mM succinate (Trace C). The inset shows the optical density change of cytochrome b (562 nm) in the presence of NADH in the sample vs oxidized in the reference (Trace A), or NADPH in the sample vs oxidized in the reference (Trace B).



**Figure 3.** Spectrum of SMP in the presence of rotenone and pyridine nucleotides. The incubation Medium A was supplemented with 10  $\mu$ M rotenone, and the differential spectrum was obtained in the presence of 300  $\mu$ M NADH in the sample vs oxidized in the reference (Trace A), or 300  $\mu$ M NADPH in the sample cuvette vs oxidized in the reference cell (Trace B). Inset shows the reduction of cytochrome c+c<sub>1</sub> (551-552 nm) versus time when the substrate was NADH (A) or NADPH (B).

In the presence of NADH, the oxygen consumption ( $16 \text{ ngat oxygen mg}^{-1} \text{ min}^{-1} = 100\%$ ) was maximally inhibited 30% by rotenone ( $4 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$ ), 20% by antimycin ( $6 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$ ), and 70% by cyanide ( $100 \text{ } \mu\text{M}$ ). For succinate, inhibition of respiration ( $27 \text{ ngat oxygen mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  is 100%) was 70% with cyanide ( $100 \text{ } \mu\text{M}$ ) and 90% with antimycin ( $45 \text{ ng mg}^{-1}$ ). The respiratory rate stimulated by succinate in the presence or absence cyanide was similar to that reported previously (28). The oxygen consumption in the presence of NADPH ( $10 \text{ ngat oxygen mg}^{-1} \text{ min}^{-1} = 100\%$ ) was inhibited 12% by rotenone ( $4 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$ ), 25% by antimycin ( $6 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$ ), and 45% by cyanide ( $5 \text{ } \mu\text{M}$ ).

The following experiment was performed to determine whether NADPH oxidation occurred through the known NADH-DH, by using the artificial electron acceptor DCPIP. The results (as  $\text{nmol DCPIP reduced mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) showed that DCPIP reduction was  $143.3 \pm 38.1$  for NADH, and  $11.5 \pm 5.1$  for NADPH, suggesting NADPH was not oxidized by NADH-DH from the respiratory chain. However, NADPH reduced the added cytochrome c (Figure 2, Trace B). NADH, NADPH, or succinate have similar rate for the reduction of cytochrome c (Table 1). Although the cytochrome c was no reduced by succinate in the presence of antimycin, reduction of cytochrome c by pyridine nucleotides was achieved even in the presence of antimycin, suggesting an extra-pathway for NAD(P)H oxidation.

At this stage, it was interesting to determine whether inhibitors, at their maximal concentration tested in the titration curve, produced a parallel effect on the absorption spectra. Succinate reduced only cytochrome b in the presence of  $6 \text{ ng antimycin per mg}$  of protein; whereas NAD(P)H reduced cytochromes b,  $c+c_1$ , and  $aa_3$ , in the presence of  $6 \text{ } \mu\text{g antimycin per mg}$  of protein (1000 times more inhibitor), suggesting that antimycin blocked the electron transfer derived from succinate, but not from NADH or NADPH (Figure 4). Cytochromes  $c+c_1$  and  $aa_3$  were also reduced by NADH or NADPH in the presence of rotenone, antimycin, or cyanide (data not shown), suggesting that NADPH transferred its electrons to cytochrome  $c+c_1$  and  $aa_3$  through a pathway insensitive to these inhibitors.

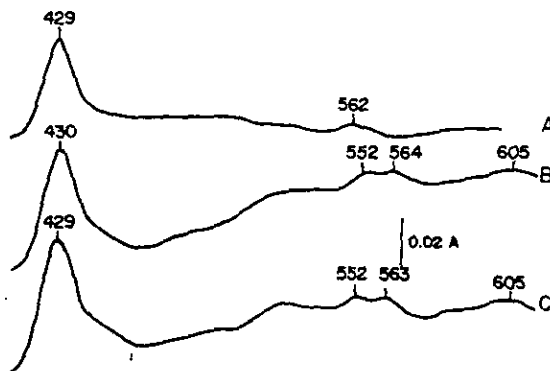
These data were reinforced when succinate-induced oxygen consumption was inhibited with  $3.3 \text{ } \mu\text{g antimycin/mg}$  (Figure 5); further addition of cytochrome c ( $300 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ) did not modify respiration. In the absence of antimycin, NADH or NADPH stimulated oxygen consumption, which increased when succinate was added; this respiration stimulated by succinate was inhibited by antimycin; however, further addition of cytochrome c stimulates oxygen uptake, showing that both, NADH or NADPH oxidation follows a different pathway from the electron transport chain (Fig. 5).

Finally, SMP were incubated in the presence of succinate and rotenone, and then, NADH or NADPH was added to sample cuvette. Figure 6 shows that pyridine nucleotides reduced a

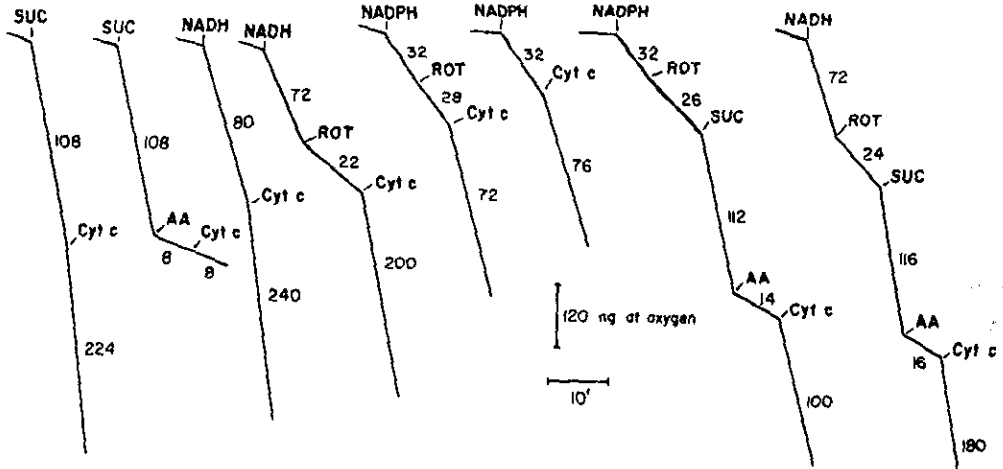
**Table 1.** Spectrophotometric reduction of added-cytochrome c in SMP from human placenta in the presence of several inhibitors.

Addition	Activity
NADH	52.0 ± 16.0
NADPH	41.0 ± 17.0
Succinate	43.0 ± 12.0
Succinate + NADH	88.3 ± 15.8
Succinate + NADPH	85.0 ± 25.0
Succinate + Rot	43.0 ± 12.4
Succinate + AA	N.D.
Succinate + AA + Rot	N.D.
Succinate + AA + Rot + NADH	51.8 ± 15.2
Succinate + AA + Rot + NADPH	41.0 ± 20.0

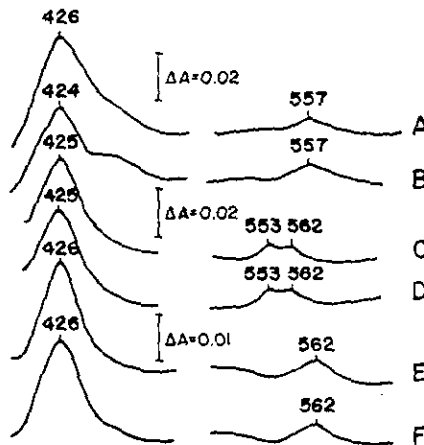
Activity is expressed as nmol cytochrome c reduced/mg/min between weavelengh 550-575 nm. NADH or NADPH were 300  $\mu$ M, succinate was 10 mM. Results are the mean of 6 experiments with its standard deviation. N.D. = non detected; AA = 6  $\mu$ g/mg antimycin; Rot = 10  $\mu$ M rotenone.



**Figure 4.** Reduction of cytochromes in the presence of antimycin. Trace A shows the effect of antimycin (6 ng/mg protein) in the presence of 10 mM succinate in the sample cuvette vs oxidized in the reference. Traces B and C are similar to trace A but with 6  $\mu$ g of antimycin/mg and 300  $\mu$ M NADH (Trace B) or 300  $\mu$ M NADPH (Trace C) as reductant in the sample cuvette.



**Figure 5.** Oxygen consumption of SMP in the presence of succinate, NADH or NADPH, and respiratory chain inhibitors. SMP were incubated in Medium A, described under Material and Methods, supplemented with 300  $\mu$ g of cytochrome c/mg of protein. NADH, NADPH (300  $\mu$ M, each), or succinate (10 mM) were added as indicated. Antimycin (AA) or rotenone (Rot) were added at 3.3  $\mu$ g/mg, each. The values indicate the ng atoms oxygen consumed/mg/5 min.



**Figure 6.** Extra reduction of cytochromes in the presence of pyridine nucleotides. SMP were incubated in the presence of 10 mM succinate and 10  $\mu$ M rotenone, 1 mM cyanide, or 6  $\mu$ g antimycin/mg in both cuvettes to reduce the respiratory chain cytochromes. For trace A and B the SMP were incubated with succinate and rotenone 10 min, and then 300  $\mu$ M NADH (Trace A) or 300  $\mu$ M NADPH (Trace B) were added to the sample cuvette. In trace C and D the SMP were incubated with succinate and antimycin for 10 min followed by the addition of NADH (Trace C or NADPH (Trace D). Finally, NADH (Trace E) or NADPH (Trace F) were added to SMP preincubated 10 min with succinate, rotenone, and cyanide.

cytochrome type-b. Similar results were obtained when the inhibitor was antimycin or rotenone plus cyanide. In freeze-thawed HPM these results were reproduced (data not shown).

## DISCUSSION

Our data give evidence that cytochromes from the respiratory chain and the P450<sub>scc</sub> are present and active in SMP from human placental mitochondria. It was previously demonstrated that SMP from placenta contain low extramitochondrial contamination (12). SMP from adrenal gland fail to synthesize pregnenolone, because they lack P450<sub>scc</sub> (29), although pregnenolone synthesis was described recently in the inner membrane from adrenal mitochondria obtained similarly as described in this paper (30). However, the properties and features of adrenal and placental tissues are quite different, i.e., HPM synthesize progesterone from cholesterol, suggesting that the electron transport chain coupled to P450<sub>scc</sub> and the  $\Delta^5$ -isomerase-3 $\beta$  steroid dehydrogenase complex, are located in this subcellular fraction (31-32).

The low progesterone synthesis induced by NADPH in SMP from placenta regarding the synthesis observed in the presence of NADH or succinate is difficult to explain. However, the results strongly suggest a connection between the two electron transport chains. Supporting this assumption, it has been observed that adrenodoxin reductase from adrenal mitochondria, catalyzes the reduction of cytochrome c when the isolated proteins are mixed *in vitro* (33).

Although NADPH can donate electrons to the respiratory chain via transhydrogenase (TH) reaction (11), our experimental system lacked NAD<sup>+</sup>, the co-substrate of TH. The results suggest that NADPH reduces the respiratory chain cytochromes through complex I or a different NAD(P)H-DH. Furthermore, we found that citrate or malate in the respiratory medium did not cause oxygen consumption and failed to produce any cytochrome reduction (data not shown).

The spectrum obtained with NADPH suggests that NADH-DH could take electrons from NADPH. However, when NADH-DH activity was assayed in the presence of DCPIP plus NADH or NADPH, the NADH-DH activity was higher with NADH than with NADPH, suggesting that the reduction of cytochromes observed in the presence of NADPH is not through complex I, NADH-DH. In spite of this, in all the experiments described, NADH and NADPH showed similar reduction of cytochromes, suggesting the presence of a different enzyme from NADH-DH, which oxidizes NADH or NADPH and transfers the electrons to b-type cytochrome not contained in the respiratory chain.



Although the amount of cytochrome b was not quantified, the results suggest a low concentration of this component, since it was not observed in the spectrum obtained in the presence of rotenone (Figures 3 and 5). This assumption is supported by the results that demonstrate the presence of two different b-type cytochromes, one reduced by succinate through an antimycin sensitive process, whereas the other is less sensitive to the inhibitor and is reduced by pyridine nucleotides. This conclusion is also supported by the different amount of antimycin required to produce a partial cytochrome b inhibition in the spectrum in the presence of pyridine nucleotides (6 µg/mg) and a total inhibition with succinate (6 ng/mg), being 1,000 times more sensitive with succinate than with NAD(P)H.

Olivera and Meigs (4) proposed a third way of oxygen uptake in HPM, since the combination of TMPD (N,N,N',N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamine) plus succinate produces an extra oxygen consumption in mitochondria inhibited with cyanide and aminoglutethimide. According to our data, the described NAD(P)H-DH and b-type cytochrome could be components that connect the two electron transport chains, and could account for the increased progesterone synthesis in the presence of NADH. The location of this enzyme and the b-type cytochrome is not known. The NAD(P)H-DH and the b-type cytochrome may be associated with the iron-sulfur centers of the chains (34), or in combination with other proteins to support oxygen consumption (4), but further research should be necessary to explain their physiological role in the mitochondrial metabolism of the human placenta.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank Dr. Armando Gómez-Puyou, Dr. Juan Pablo Pardo, and Dr. Diego González-Halphen for their criticisms of the manuscript. Dr. Jerome Strauss III, Dr. David Cooper, Dr. Heins Schleyer, and Dr. Larry Babalola from the University of Pennsylvania for their help in the identification of P-450<sub>scc</sub>. This work was partially supported by Grant IN200194 UNAM from the Dirección General de Asuntos de Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México, and PLACIRH, grant number PLI-167/94.

#### REFERENCES

1. Hall, P.F. (1986) *Steroids* 48: 131-196.
2. Mason, I. and Boyd, G.S. (1971). *European Journal of Biochemistry* 21: 308-321.
3. Robinson, J. and Stevenson, P.M. (1971). *European Journal of Biochemistry* 24: 18-30.
4. Olivera, A.A. and Meigs, R.A. (1975). *Biochimica et Biophysica Acta* 376: 436-445.
5. Klimek, J., Boguslawski, W. and Zelewski, L. (1979). *Biochimica et Biophysica Acta* 587: 362-372.
6. McInstosh, E.N., Mitani, F., Uzgiris, V.I., Alonso, C. and Salhanick, H.A. (1973). *Annals of N.Y. Academy of Science, USA* 212: 392-405.

7. Swierczynski, J., Scislowski, P. and Aleksandrowicz, Z. (1982) *Biochemical Medicine* 28:247-255.
8. Swierczynski, J., Klimek, J. and Zelewski, L. (1985). *Journal of steroid Biochemistry* 22:415-418.
9. Swierczynski, J., Klimek, J. and Zelewski, L. (1986). *Journal of steroid Biochemistry* 24:591-595.
10. Boguslawski, W., Klimek, J. and Zelewski, L. (1976). *Journal of steroid Biochemistry* 7: 39-44.
11. Oldham, S.B., Bell, J.J. and Harding B.W. (1968). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 123: 496-506.
12. Martinez, F., Moncada, R., Bárcenas, F.J. and Espinosa-García, M.T. (1992). *Placenta* 13:463-473.
13. Martinez, F., Chávez, E. and Echegoyen, S. (1987). *International Journal of Biochemistry* 19:275-279.
14. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
15. Lemberg, R. and Barrett, J. (1973), In: *Cytochromes*, Academic Press, London.
16. Omura, T. and Sato, R. (1967). *Methods in Enzymology* 10: 556-561.
17. Galante, Y.M. and Hatefi, Y. (1978). *Methods in Enzymology*, 53: 15-21.
18. Hatefi, Y. (1978a). *Methods in Enzymology*, 53: 27-35.
19. Hatefi, Y. (1978b). *Methods in Enzymology*, 53: 35-47.
20. Laemmli, U.K. (1970). *Nature* 227: 680-685.
21. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 76: 4350-4354.
22. Nulsen, J.E. Silavin, S.L., Kao, L.C., Ringler, G.E., Kliman, H.J. and Strauss, J.F.III (1989). *Journal Reproduction and Fertility* supp. 375: 137-143.
23. Shalem, Z., Izhar, M., Shore, L.S., Shemesh, M., Hansel, W. and Strauss, J.F. III (1988). *Journal of steroid Biochemistry* 31: 835-838.
24. Sufi, S.B., Donalson, A. and Jefcoate, S.L. (1983). *Method Manual of Matched Assay Reagent Programme 7th Ed. Special Programme of Research in Human Reproduction*, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
25. Martinez, F., Echegoyen, S. Briones, R. and Cuellar, A. (1988) *Journal of Lipid Research* 29: 1005-1011.
26. Meigs, R.A. and Ryan K.J. (1968). *Biochimica et Biophysica Acta* 165: 476-482.
27. Simpson, E.R. and Miller, D.A. (1978). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 190:800-808.
28. Moreno-Sánchez, R., Espinosa-García, M.T. and Raya, J.C. (1988). In: *Integration of Mitochondrial Function*, edited by J. Lemasters, Ch. R. Hackenbrook, R.G. Thurman and V. Westerhoff, pp:279-304.
29. Yago, N. and Ichii, S. (1969). *Journal of Biochemistry* 65: 215-224.
30. della-Cioppa, G., Muffly, K.E., Yanagibashi, K. and Hall, P.F. (1986). *Molecular and Cellular Endocrinology* 48: 111-120.
31. Rabe, T., Hiesel, L. and Runnebaum, B. (1985). *Journal of steroid Biochemistry* 22: 657-664.
32. Boguslawski, W. (1983). *Journal of steroid Biochemistry* 18: 771-775.
33. Orme-Johnson, N.R. (1990). *Biochimica et Biophysica Acta* 1020: 213-231.
34. González-Halphen, D., Lindofer, M.A. and Capaldi, R.A. (1988). *Biochemistry* 27: 7021-7031.