

114
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INCORPORACION DE COLESTEROL EN
MITOCONDRIAS DE HEPATOMA Y SU EFECTO
SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

JUANA NAVARRETE CORONA



DIRECTOR DE TESIS: DR. FEDERICO MARTINEZ MONTES.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

266234



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Incorporación de colesterol en mitocondrias de hepatoma y su efecto sobre
la actividad de la ATPasa"
realizado por Navarrete Corona Juana

con número de cuenta 8533894-2 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dr. Federico Martínez Montes

Propietario Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez

Propietario Dra. Alejandra Mainero del Paso

Suplente Dra. Luisa Alvarina Alba Lozano

Suplente M. en IBB. Oscar Flores-Hérrera

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

Dra. Edna María Paredes Nolasco
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

A mis padres, Sr. Abraham Navarrete Valencia y Sra. Carmen Corona Sánchez, ante todo con respeto, porque con su apoyo y comprensión siempre han estado conmigo, brindándome la oportunidad de conocer cada día algo nuevo.

A cada uno de mis hermanos, Tere, Felipe, Toño, José Luis, Abraham, Carlos, Miguel, Edmundo y Fer, porque de cada uno he aprendido cosas buenas. Gracias por su paciencia y confianza.

En especial a esos dos pequeños remolinos que ponen de cabeza a toda la casa y a todos sus habitantes cada vez que nos visitan, si, mis sobrinos Carmen Paola y José de Jesús, porque al recordar una sonrisa de ellos se ilumina cualquier momento.

A Rolando, que ante todo siempre has sido mi amigo y compañero.

A mis amigas(os) Yolanda, Imelda, Lourdes, Julio, María Elena, Mario, Antonio, Elisa, Flora, Soledad, Rafa, Marina, Pancho, Tere, Chucho, Araceli, Marty, e Isabel, por ser de lo mejor.

A mis compañeros del departamento de Bioquímica, los hologramas chambeadores : Oscar, Aida, Edna, Rafael, Teutli, Alberto, así como a Isabel, Juan Luis, Lupita, Cecilia, Rebeca y María Teresa, con los que he pasado ratos agradables.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Federico Martínez Montes, por su apoyo, interés y discusión en la dirección de esta tesis.

A los miembros del jurado : Dr. René Cárdenas Vázquez, Dra. Alejandra Mainero del Paso, Dra. Luisa Alvarina ALba Lois, y M. en IBB. Oscar Flores Herrera, por la revisión crítica de este trabajo y por que sus sugerencias mejoraron la calidad de este trabajo.

Al Dr. René Cárdenas Vázquez, por su ayuda en el análisis estadístico de los datos contenidos en esta tesis.

Al M. en IBB. Oscar Flores Herrera, por su enseñanza y apoyo en el manejo de la computadora.

Al Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, por permitirme ocupar un espacio en su laboratorio.

A la Fundación U.N.A.M. A.C., que a través de su Programa de Becas para tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación, me otorgó una beca durante dos semestres con el fin de obtener mi título profesional, así como por el apoyo que de esta manera ofrece a la investigación.

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	1
Resumen	2
Introducción	3
Objetivos	19
Material y métodos	20
Resultados	30
Discusión	44
Conclusiones	52
Bibliografía	53

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotrópica.
BSA	Albúmina sérica de bovino (del inglés "Bovine Serum Albumin").
(Bu) ₂ AMPc	Dibutiril adenosín monofosfato cíclico.
C/FL	Relación colesterol-fosfolípido.
Cit P450 _{scc}	Citocromo P450 que rompe la cadena lateral del colesterol (del inglés "Cytochrome P450 side chain cleavage").
C-BSA-C	Complejo colesterol-albúmina sérica de bovino (del inglés "Cholesterol-BSA-Complex").
DMSO	Dimetilsulfóxido.
EGTA	Ácido etilenglicol-bis-(β-aminoetil éter)-N, N' tetra acético.
GRP-78	Proteína 78 reguladora de la glicosilación (del inglés "Glycosylation Regulatory Protein").
HMGCoA	3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A.
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (del inglés "Low Density Lipoproteins").
MHR	Mitocondrias del hepatoma de la rata AS-30D.
MHRT	Mitocondrias del hepatoma de la rata AS-30D tripsinizadas.
MPH	Mitocondrias de la placenta humana.
MPHT	Mitocondrias de la placenta humana tripsinizadas.
SAP	Polipéptido activador de la esteroidogénesis (del inglés "Steroidogenesis Activator Polypeptide").
SCP ₂	Proteína acarreadora de esteroides (del inglés "Sterol Carrier Protein 2").
SDS	Dodecilsulfato de sodio.
STAR	Proteína de la regulación aguda de la esteroidogénesis (del inglés "Steroidogenic Acute Regulatory Protein").
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano.

RESUMEN

El colesterol es un lípido que se encuentra en todas las membranas de las células animales; sin embargo, no se conocen totalmente los mecanismos relacionados con su transporte e incorporación a éstas. En los tejidos esteroideogénicos, sobre todo en las glándulas suprarrenales, se ha observado que el colesterol participa como precursor en la síntesis de hormonas esteroideas, en donde varias proteínas se han descrito como acarreadoras del colesterol. De manera excepcional, aunque la placenta humana es un tejido esteroideogénico, no presenta a las proteínas que están asociadas a la movilización del colesterol, lo que ha permitido sugerir que emplea mecanismos similares a los que existen en los tejidos no esteroideogénicos. Un ejemplo de este tipo de tejidos son los hepatomas que presentan, al igual que la placenta humana, una alta concentración de colesterol en su membrana mitocondrial.

En este trabajo se observó que las mitocondrias del hepatoma de la rata AS-30D tripsinizadas captaron colesterol exógeno en una cantidad similar a las mitocondrias del hepatoma de la rata control; a su vez, las mitocondrias de la placenta humana tratadas con tripsina no presentaron aumento en la concentración de colesterol al compararlas con su control, lo cual indica diferentes mecanismos de incorporación.

Por otra parte, la adición de ATP incrementó la captación de colesterol en las mitocondrias de la placenta humana, sugiriendo un mecanismo que requiere de energía. El efecto estimulador producido por el ATP fue inhibido por vanadato. El análisis de estos experimentos permite proponer la existencia de un mecanismo de transporte e incorporación de colesterol en las mitocondrias de la placenta humana relacionado con un sistema proteico que requiere de energía.

INTRODUCCIÓN

Los lípidos son importantes componentes estructurales de las membranas biológicas. Participan en diversos procesos fisiológicos, tales como la estimulación del crecimiento, el desarrollo y la función celular (1). Un lípido interesante es el colesterol, cuya participación biológica es compleja, ya que puede formar parte de los distintos tipos de membranas modificando tanto su estructura como su fluidez (2). También es el precursor de diferentes biomoléculas importantes como la vitamina D (3), diversas hormonas esteroideas y de los ácidos y sales biliares (1).

Los requerimientos fisiológicos de este esteroide se satisfacen por la ingestión diaria de los alimentos, así como por la síntesis *de novo* celular; sin embargo, es necesario tener en cuenta que la sobreproducción de colesterol y su mal manejo a nivel celular puede provocar su aumento en el torrente sanguíneo o en la misma célula, dando como resultado enfermedades que pueden ser fatales para el individuo. Por ejemplo, enfermedades como la arteriosclerosis (4) y los daños coronarios, los cuales ocupan uno de los primeros lugares de mortandad en el mundo, son el reflejo del mal manejo del colesterol celular (5). Otro ejemplo es la enfermedad de Niemann-Pick, en la cual se almacena el colesterol de manera anormal en los lisosomas, provocando la muerte del individuo ya que afecta severamente el funcionamiento de las vísceras y el sistema nervioso central (4,6,7). Por esta razón, es importante mantener la concentración y distribución del colesterol celular dentro de los límites fisiológicos.

A pesar de la importancia biológica de este esteroide, aún no se conoce el mecanismo que mantiene la concentración del colesterol en las diferentes membranas biológicas. Se ha propuesto que un posible regulador de la concentración de colesterol en la bicapa lipídica es la relación que existe en ésta entre la cantidad de colesterol y los fosfolípidos, denominada relación colesterol/fosfolípido (C/FL) (5). Esta relación puede ser modificada por la dieta (8), por la incubación *in vitro* de las células u organelos con colesterol, o por la alteración de los mecanismos celulares internos en la regulación de la síntesis *de novo* del colesterol (9).

Con respecto a este último punto, se sabe que la HMGCoA reductasa es la enzima que regula la vía metabólica de la síntesis de colesterol. Esta enzima tiene una vida media de 2 a 3 horas, por lo que cualquier cambio en su velocidad de síntesis afecta la concentración real de la enzima *in vivo* (10); incluso, se ha propuesto que algunos metabolitos derivados de los esteroides como son la ubiquinona, la isopentenil adenina y el 25-hidroxicolesterol pueden tener un efecto regulador (11).

Por otra parte, se ha observado que la fluidez de las membranas biológicas es directamente proporcional a la cantidad de colesterol que contienen (12). Se conoce con certeza que la concentración de colesterol en los diferentes compartimientos celulares es diferente. Por ejemplo, la membrana plasmática de los hepatocitos normales tiene una concentración de 30 μg de colesterol/mg proteína, mientras que en las membranas mitocondriales es de tan solo 3 μg colesterol/mg proteína (13). Estos datos sugieren que

aún cuando la concentración de colesterol varía en cada membrana subcelular, tiene una función específica, por lo que debe de mantenerse estrictamente regulada (4). Con base en los datos mencionados se ha sugerido la existencia de varios mecanismos de control que se encargan de mantener constante la concentración de colesterol en las diferentes membranas subcelulares (4,5). Entre estos, se pueden mencionar de manera general los siguientes:

-La desabsorción del colesterol: En este mecanismo, se propone que las moléculas de colesterol pasan, en un corto período de tiempo, de una membrana "donante" hacia la fase acuosa y de ahí son transferidas a una membrana "aceptora" cuyo contenido de colesterol es menor. Lange demostró que en los eritrocitos enriquecidos con colesterol, este transporte es de aproximadamente 3 segundos a una temperatura de 37°C (10,12,14).

-La transferencia de colesterol por contacto entre membranas: Aquí se ha considerado la capacidad que tiene el esteroles para moverse de manera espontánea entre las membranas que se encuentran en contacto. Se ha sugerido que este tipo de transporte es mediado únicamente por el contacto físico que puede existir entre las diferentes membranas (10).

-La transferencia mediada por fosfolípidos: Se ha observado que la estructura y composición del colesterol favorece en especial su asociación a la fosfatidilcolina y a la esfingomielina, por lo que se ha sugerido que la composición fosfolipídica membranar

podría ser un factor que determina la concentración de colesterol (8,12,15,16).

-La transferencia de colesterol membranal mediada por vesículas: Dawidowicz (1987) y Phillips (1972) examinaron el transporte de colesterol *in vitro* mediado por vesículas lipídicas. Los resultados demostraron que la relación C/FL, tanto en la membrana plasmática como en las vesículas de células del hígado de la rata es muy similar, por lo que sugirieron que el colesterol se transporta por endocitosis de manera espontánea hacia las membranas celulares, un sistema que se ve favorecido por el gradiente de concentración del colesterol (10,15,17).

-Las proteínas acarreadoras específicas para colesterol: Se han descrito diferentes tipos de proteínas cuya función involucra la remoción y depósito del colesterol; como por ejemplo la SCP₂ (18).

Aunque estos mecanismos han sido estudiados usando tanto a las membranas artificiales como a las biológicas, en la actualidad no se sabe con exactitud cual(es) de todos estos mecanismos podría estar operando. Por su parte, Reinhart (1990) ha sugerido que estos mecanismos podrían funcionar, ya sea de manera coordinada o independiente, en un mismo sistema biológico para favorecer la movilización del colesterol (19); sin embargo, también se ha propuesto que cada compartimiento subcelular o cada estirpe celular podría emplear mecanismos propios, lo que le permitiría a cada célula regular su propia concentración y distribución del colesterol a nivel membranal.

El transporte del colesterol adquiere particular relevancia en las mitocondrias de los tejidos esteroideogénicos (glándulas suprarrenales, testículo, ovarios y placenta, entre otros), ya que éstos se encargan de transformarlo en hormonas esteroideas, las cuales son necesarias para el desarrollo y la diferenciación celular, así como para la aparición, maduración y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios y la manutención del embarazo (20). De algunos de estos tejidos esteroideogénicos se han aislado diferentes proteínas a las que se les ha asignado la función de transportar al colesterol del citoplasma hacia la mitocondria y entre las membranas mitocondriales. Estas proteínas aparecen como una consecuencia al estímulo de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (21) y se clasifican en dos grupos, 1) aquellas que transfieren el colesterol del citoplasma a la mitocondria a través del citoesqueleto, siendo independiente de la síntesis proteica *de novo*, y 2) las que transportan colesterol de la membrana externa a la membrana interna mitocondrial, requiriendo la síntesis *de novo* de proteínas inducida por el AMPc como resultado de la estimulación producida por la ACTH (22).

La proteína acarreadora de esteroides denominada SCP₂ pertenece al primer grupo. Pesa 13.2 kDa y se ha propuesto que promueve el transporte y acumulación de colesterol. Chanderbhand, en 1986, observó que en las células de las glándulas suprarrenales de la rata hay una inhibición parcial de la esteroideogénesis en presencia de anticuerpos anti-SCP₂; sin embargo, existen abundantes evidencias que indican una participación más general de esta proteína en los procesos celulares del metabolismo del colesterol (10,23,24).

La proteína SAP corresponde al segundo grupo de proteínas. Tiene un peso molecular de 2.2 kDa y se ha aislado de las glándulas suprarrenales y de las células de Leydig. Al parecer, este péptido se deriva de la proteólisis de la proteína GRP-78, que se relaciona con la regulación de la expresión de los receptores de la glucosa (25). Sin embargo, la capacidad de la SAP para transportar colesterol entre las membranas mitocondriales es baja, por lo que su actividad no cubre el aporte de colesterol que requiere la mitocondria para la síntesis hormonal; esta evidencia ha permitido sugerir que la SAP podría estar relacionada únicamente con la transferencia de colesterol desde la membrana interna mitocondrial hacia el Cit P450_{scc} (26). Dicha propuesta se apoya en los estudios hechos por Pedersen (1987), en los que observó un aumento en la síntesis de pregnenolona en presencia de la SAP tanto en las células tumorales de Leydig como en las células de las glándulas suprarrenales de la rata (26); sin embargo, de manera contradictoria, existen trabajos que muestran la baja capacidad de la proteína para estimular la síntesis de pregnenolona mitocondrial (25).

Por otra parte, Pon y cols. (27), aislaron de las glándulas suprarrenales del cuerpo lúteo y de las células de Leydig de la rata una proteína de entre 28 a 30 kDa denominada actualmente pp30, cuyas características permiten proponerla como intermediaria en la transferencia de colesterol intermembranal de las mitocondrias. Se sabe que la presencia de hormonas peptídicas específicas como la gonadotropina coriónica humana y el análogo de AMPc, el (Bu)₂AMPc, estimulan la síntesis y la fosforilación de esta proteína en el citoplasma. Por otro lado, su permanencia en el citoplasma es transitoria y viaja

rápidamente hacia la mitocondria por un mecanismo aún desconocido. En 1993, Stocco demostró que en las células tumorales MA-10 de Leydig el incremento en la concentración de esta proteína se asoció a un aumento en la síntesis de pregnenolona; sin embargo, su función no se ha confirmado aún (28).

En 1988, Yanagibashi aisló de las glándulas suprarrenales una proteína de 8.2 kDa que aumenta el aporte de colesterol a la membrana interna mitocondrial y estimula su conversión en pregnenolona. Este resultado sugiere que dicha proteína puede tener un papel importante en la síntesis de esteroides estimulada por la ACTH (21). Besman y cols. (1989) al estudiar esta proteína, encontraron que se trata de una endozepina que promueve la unión del colesterol al Cit P450_{scc} al asociarse específicamente a los receptores periféricos a benzodiazepinas, los cuales se localizan en la membrana externa mitocondrial de los tejidos esteroideogénicos. Estudios *in vitro*, han mostrado que varias benzodiazepinas son capaces de estimular la síntesis de esteroides a partir de colesterol en las células MA-10 de Leydig en cultivo; sin embargo, aún no se sabe si la unión de esta proteína al receptor modula la entrada, la distribución y/o la disponibilidad del colesterol dentro de la mitocondria (22,29).

Otra proteína que ha cobrado relevancia y que pertenece al segundo grupo, es la proteína STAR, que tiene un peso de 30 kDa y fue aislada inicialmente de las glándulas suprarrenales de la rata. La STAR se sintetiza como producto de la estimulación por la ACTH. La presencia del AMPc o análogos de este nucleótido, también inducen la

producción de la StAR, así como su fosforilación. Hasta el momento, ésta es la única proteína para la cual se ha demostrado un papel indispensable en el transporte de colesterol entre las membranas mitocondriales, ya que al transfectar el gene de la StAR junto con los de la cadena del Cit P450_{scc} a células renales COS-1 en cultivo, la síntesis de pregnenolona aumentó entre 3-6 veces con respecto a un control transfectado únicamente con los genes de la cadena del Cit P450_{scc} (28). Sin embargo, los datos más espectaculares que confirman la participación central de la StAR en la esteroidogénesis, es la detección de mutaciones en el gene de la StAR en pacientes con hiperplasia adrenal congénita lipóide. Esta enfermedad se caracteriza por la ausencia de síntesis de las hormonas esteroideas en las glándulas suprarrenales y en las gónadas, dando como resultado que el colesterol no sea transformado en pregnenolona (7).

Los mecanismos proteicos de transporte de colesterol que se describieron están asociados, principalmente, a los tejidos esteroidogénicos como parte de su transformación a hormonas esteroideas. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos por los cuales las membranas biológicas regulan la concentración de colesterol.

Así, aunque las glándulas suprarrenales son el tejido esteroidogénico más estudiado, su mecanismo para el transporte de colesterol no puede aplicarse al resto de los tejidos esteroidogénicos. Tal es el caso de la placenta, un órgano que pertenece a este grupo pero que no sintetiza ninguna de las proteínas aisladas de las glándulas suprarrenales propuestas en el transporte e incorporación del colesterol mitocondrial (30).

La placenta es un órgano transitorio que aparece en los mamíferos euterios, necesario para llevar a cabo el desarrollo gestacional de un nuevo individuo y mediar el intercambio fisiológico de nutrientes y de desechos del metabolismo entre la madre y el producto. Evolutivamente se cree que apareció a partir de la fusión de un retrovirus en el genoma celular materno, dando inicio a la proliferación celular y formación del trofoblasto. Posteriormente esto condujo a la aparición de una placenta primitiva parecida a un tumor y que al terminar el desarrollo gestacional era eliminada (31). De acuerdo al arreglo de las capas celulares que presentan, actualmente las placentas se clasifican en: epicoriónica, sindesmocoriónica, endocoriónica y hemocoriónica (20). En particular, la placenta humana pertenece al grupo hemocoriónico, donde el epitelio uterino se degrada, permitiendo una estrecha relación entre el flujo sanguíneo materno con el epitelio de la placenta. La unidad funcional de la placenta es la célula del trofoblasto, la cual tiene un arreglo vascular que permite de manera selectiva el intercambio de carbohidratos, aminoácidos, lípidos, iones y gases entre el feto y la madre (32,33). Además de que la placenta funciona temporalmente como pulmón, riñón, hígado e intestino fetal, también adquiere el papel de órgano endócrino, pues actúa como el hipotálamo, la glándula pituitaria anterior y el ovario (32).

La función endócrina de la placenta humana involucra la síntesis de hormonas proteicas como la gonadotropina, la somatotropina y la tirotrópina coriónicas y de hormonas esteroideas como la dehidroepiandrosterona, la estrona, el estriol, la androstenediona, la 16α -hidroxiandrostenediona, la pregnenolona y la progesterona;

también sintetiza proteínas específicas, glucoproteínas (la β -glicoproteína, la β -globulina fijadora de esteroides) y enzimas importantes como la fosfatasa alcalina, la diamina oxidasa, la L-cistina aminopeptidasa y la renina, que pueden modificar el metabolismo tanto del feto como de la madre (34-36).

Dentro de las hormonas esteroideas, la progesterona es de las más importantes, ya que la disminución de su síntesis durante el embarazo provoca amenaza de aborto (30). En este sentido, se sabe que la producción de progesterona en el período gestacional es elevada, llegando a ser de 250-600 mg/día (36). Con respecto al papel de las hormonas esteroideas, en años recientes se han publicado varias revisiones en las cuales se acentúa la importancia que tienen en la implantación y el desarrollo embrionario (37,38). Además, entre otras cosas, la placenta humana presenta un alto grado de diferenciación, maduración y cambios morfológicos, funcionales y de composición química en un tiempo relativamente corto, ya que de manera natural este órgano tiene una vida de aproximadamente 266 días (32).

La esteroidogénesis en la placenta humana inicia durante la séptima semana de la gestación cuando el colesterol es captado del torrente sanguíneo en forma de LDL y transformado a progesterona (39). Sin embargo, la placenta no es totalmente autónoma, ya que la síntesis de estrógenos en este órgano es incompleta, requiriendo para su producción de la participación del feto y de esta forma completar su metabolismo. A esta relación funcional entre el feto y la placenta se le conoce como unidad feto-placentaria

(32). Diczfalusy (1962) retomó la importancia de esta asociación con las siguientes palabras: "tal unidad lleva a cabo reacciones biosintéticas acopladas, las cuales, la placenta o el feto de manera independiente son incapaces de completar". Incluso Padykula (1988), menciona que la placenta humana es un "órgano único, resistente a la destrucción inmunológica, la cual funciona de manera autónoma a lo largo del tiempo y es independiente del mecanismo de regulación homeostático de la madre" (32).

Como se mencionó, el colesterol del plasma materno es acarreado por las LDL (39), que son captadas por las células del trofoblasto a través de un proceso mediado por receptores específicos (40); sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual el colesterol es transportado dentro de las células del trofoblasto para llegar a la mitocondria, así como el proceso de transferencia del colesterol entre las membranas mitocondriales (41).

Puesto que la placenta humana no tiene las proteínas que se han asociado al transporte de colesterol mitocondrial en otros tejidos esteroideogénicos, los datos permiten entonces sugerir que existen otros mecanismos que emplean las células del trofoblasto para distribuir el colesterol en sus membranas o para ser transformado en hormonas esteroideas. En este sentido, podría ser útil emplear un modelo no esteroideogénico para explicar el transporte y distribución del colesterol en el trofoblasto. De esta forma, en el modelo del hepatocito normal de la rata las diferencias evidentes entre la concentración de colesterol de la membrana plasmática y las membranas mitocondriales, sugieren que

debe existir en los tejidos no esteroideogénicos mecanismos de distribución y control del colesterol intracelular. Por lo tanto, es posible suponer que estos mecanismos pudieran ser similares a los que expresa la placenta para realizar sus funciones esteroideogénicas.

En este sentido, se ha reportado que en algunos hepatomas la concentración de colesterol mitocondrial puede llegar a valores semejantes a los reportados para la membrana plasmática (9). Lo anterior permite sugerir que en estos procesos patológicos, los mecanismos de transporte y regulación de la concentración de colesterol mitocondrial podrían estar sobreexpresados.

Aunque se ignora el mecanismo por el cual aumenta la concentración de colesterol en las membranas mitocondriales del hepatoma de la rata (12), se ha visto que tales mitocondrias presentan algunas modificaciones con respecto al hígado normal, entre las que se pueden mencionar: la disminución tanto en la permeabilidad pasiva a los protones (9), como en la capacidad respiratoria, lo cual es resultado de modificaciones sobre la fluidez membranal (9), por lo que de acuerdo a Lehninger (1990) y Nakashima (1986), la célula cancerosa dirige su metabolismo energético hacia la glucólisis (2,42).

Lo anterior implica un aumento en la concentración intracelular de glucosa-6-fosfato, un precursor clave en la síntesis *de novo* de los ácidos nucleicos, los fosfolípidos y otras macromoléculas como el ATP requeridas para el crecimiento celular (42). De acuerdo a Müller y cols. (1986), la glucólisis provee un 13% de la cantidad total del ATP necesario

durante la fase proliferativa de las células de Ehrlich; estos autores sugieren que el ATP restante es proporcionado por la fosforilación oxidativa (43).

Por otra parte, mientras que el crecimiento y la proliferación celular normal son regulados para cumplir con las necesidades del organismo, la presencia de cáncer indica un estado de enfermedad en el cual el comportamiento normal celular se altera; por lo tanto, las células se duplican de manera autónoma e incontrolada hasta que invaden e interfieren la función normal de otros tejidos (44). Tal transformación celular ha despertado el interés de médicos y científicos que buscan la causa por la cual se origina el cáncer. Hoy en día existen varias hipótesis sobre su origen, entre las cuales se involucran a las infecciones virales, los procesos genéticos, las mutaciones e incluso problemas irritativos crónicos producidos por los contaminantes o por agentes químicos (12,44).

Las células cancerosas se pueden clasificar de acuerdo a la velocidad con la que se dividen. De esta forma, se tienen a las células denominadas como poco desdiferenciadas, donde su velocidad de división es similar a la presentada por células normales, un ejemplo de este tipo celular es el hepatoma Mcrris 66 (45). Por otra parte se tiene a las células cancerosas que presentan una velocidad de duplicación muy alta, como las líneas celulares AS-30D y Walker-256 (46), conocidas como altamente desdiferenciadas; sin embargo, en ninguno de los casos se producirán células normales, lo cual apoya la hipótesis de que los cambios genéticos son responsables de la

transformación neoplásica y aumenta la perspectiva de identificar genes críticos que desempeñan un papel crucial en el desarrollo del tumor (44,47).

En general, la aparición del cáncer afecta al huésped en dos niveles:

1.- Produce cambios en el metabolismo y medio hormonal del huésped como resultado de la competencia del tejido tumoral con el normal por metabolitos importantes, por lo que ambos tejidos construyen bloques y sustratos energéticos así como factores tróficos para evitar su muerte (48,49).

2.- El cáncer influye sobre algunos tejidos del huésped, produciendo disminución en su diferenciación, cambiando sus características enzimáticas (50), así como la sensibilidad a hormonas (51,52) y perturba el sistema de retroalimentación negativa, el cual coordina las actividades de las glándulas endócrinas centrales y las periféricas (46,53).

Al parecer, la glucólisis es la vía metabólica más afectada en todas las líneas celulares con cáncer; sin embargo, no es la única, ya que la vía glutaminolítica, la síntesis de colesterol, el uso de los cuerpos cetónicos, la síntesis de ácidos grasos, así como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos se pueden encontrar alteradas en diferentes líneas cancerosas (6).

En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar la vía de transporte e incorporación de colesterol en las mitocondrias de la placenta humana. Feo y cols. (1975)

(8), al estudiar la concentración de colesterol en las células del hepatoma 5123 de la rata, encontraron 6 veces más esterol en las membranas mitocondriales de éste que en las membranas de mitocondrias normales (32.4 ± 6.7 y 5.2 ± 1.5 μg colesterol/mg proteína, respectivamente) (8); al parecer esto se debe a la falta de control de la HMGCoA reductasa (54), ya que Edwards (1984) y Coleman (1997) demostraron que la ausencia del control sobre la HMGCoA reductasa produce el aumento en la concentración de colesterol en las membranas mitocondriales de las células tumorales, además de serias consecuencias metabólicas. Por otro lado, en las mitocondrias del hepatoma Morris 3924 A, se ha observado que los esqueletos carbonados del piruvato son destinados en su mayoría a la síntesis de colesterol y una menor cantidad a la producción de energía (oxidación hasta CO_2), lo cual no se observa en las mitocondrias del hígado normal (7,55,56).

A su vez, se ha demostrado que el colesterol se encuentra en altas concentraciones en las mitocondrias de la placenta humana (MPH), donde actúa como precursor de las hormonas esteroideas (57,58), en particular de la progesterona, que es vital en el mantenimiento del embarazo. Sin embargo, la placenta tiene una capacidad muy limitada en la síntesis de colesterol. Además, las MPH presentan características respiratorias similares a las del hepatoma, entre las que se puede mencionar la rigidez y la disminución en la permeabilidad de la membrana, así como el bajo consumo de oxígeno (40).

En nuestro laboratorio se ha demostrado la presencia de una ATP-difosfohidrolasa localizada en la membrana interna de las mitocondrias de la placenta humana, orientada hacia el espacio intermembranal (59), la cual se cree esta implicada en el transporte de colesterol desde la membrana externa hacia la membrana interna mitocondrial. Esta ATP-difosfohidrolasa se ha caracterizado parcialmente, y se ha observado que es capaz de hidrolizar ATP o ADP extramitocondrial, además de que puede ser inhibida por vanadato de sodio. En particular se piensa que la actividad de esta enzima puede estar participando en el transporte del colesterol hacia la membrana interna mitocondrial, y que podría estar asociado a los puntos de contacto entre ambas membranas.

Ya que no se conocen los mecanismos que regulan la concentración de colesterol en las mitocondrias de la placenta ni de su transferencia al Cit P450 para su transformación hormonal, y que sus características metabólicas son semejantes a las de las MHR, en donde la incorporación de colesterol está estimulada, el objetivo de este trabajo es determinar, comparativamente, la incorporación de colesterol en estos dos sistemas *in vitro*.

OBJETIVOS

Objetivo General :

- Determinar el mecanismo de incorporación de colesterol en las mitocondrias de la placenta humana y del hepatoma de la rata AS-30D.

Objetivos particulares:

- Determinar si las mitocondrias de la placenta humana y del hepatoma de la rata AS-30D aisladas incorporan colesterol *in vitro*.
- Determinar si la incorporación del colesterol a las membranas mitocondriales es mediada por un sistema proteico.
- Evaluar el efecto del vanadato en la incorporación de colesterol en las MPH.
- Determinar si la incorporación del colesterol en las MPH es mediado por compuestos de alta energía (ATP).

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las células del hepatoma AS-30D de la rata. La línea celular fue gentilmente proporcionada por los Doctores M. E. Torres-Márquez y R. Moreno-Sánchez de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina y del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" respectivamente. El hepatoma se mantuvo en ratas hembra Wistar, con un peso aproximado de 250-280 g, mediante la inoculación por vía intraperitoneal de 1 a 2 ml del líquido de ascitis conteniendo las células AS-30D (60). El período para el desarrollo del cáncer fue de 5-7 días, al término del cual la rata se sacrificó por dislocación cervical e inmediatamente se obtuvo el líquido de ascitis por punción abdominal.

Las células del hepatoma se recuperaron por centrifugación a 500 x g durante dos minutos a 4°C. El paquete celular se resuspendió cuidadosamente y se diluyó en 30 ml de un medio que contenía 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7.5 (denominado NKT), y se centrifugó a 500 x g por dos minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y el paquete celular se procesó dos veces más en las mismas condiciones experimentales.

El paquete celular obtenido se resuspendió con 30 ml de un medio que contenía 250 mM sacarosa, 5 mM HEPES, 1 mM EGTA, pH 7.2 (denominado SHE) y se centrifugó a 625 x g durante 10 min a 4°C. Posteriormente, la pastilla se resuspendió y se diluyó en 175 ml totales del medio SHE en agitación mínima constante a 4°C. Se realizó el conteo

celular en una cámara de Neubauer usando una dilución 1:100 del lote celular. La viabilidad de las células se determinó por la capacidad de excluir al azul Tripan (0.1% concentración final). Las células en el medio SHE se diluyeron hasta una concentración de 3-6 millones/ml y se les adicionó el detergente digitonina (10 mg/ml diluida en DMSO), hasta observar el 50% de lisis celular. Posterior a este paso, las células se recuperaron por centrifugación a 3015 x g por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se desechó.

Aislamiento de las mitocondrias del hepatoma AS-30D de la rata (MHR). Las células del hepatoma se resuspendieron en 25 ml del medio SHE y se rompieron en un homogenizador de vidrio con un pistilo de teflón. El volumen se duplicó y se centrifugó a 625 x g durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se recuperó y el procedimiento se repitió dos veces. Los sobrenadantes recuperados se centrifugaron a 9770 x g 10 min a 4°C. El paquete mitocondrial se incubó en presencia de albúmina libre de ácidos grasos (BSA) al 5% y 1 mM de ADP durante 5 minutos a 4°C.

La muestra se diluyó 1:2 con el medio SHE suplementado con BSA al 0.5% y se centrifugó a 9770 x g 10 minutos. La pastilla se resuspendió en el menor volumen posible del medio remanente y se llevó a 30 ml con SHE para ser centrifugado a 9770 x g 10 minutos a 4°C. Este lavado se repitió dos veces y finalmente la pastilla conteniendo la fracción mitocondrial se resuspendió en un volumen mínimo de medio (61) al cual se le determinó la concentración de proteína la actividad de ATPasa y concentración de colesterol.

Aislamiento de las mitocondrias de la placenta humana a término (MPH).

Las mitocondrias se obtuvieron de placentas humanas a término procesadas preferentemente dentro de los primeros 60 minutos después de su expulsión. El tejido se mantuvo en baño de hielo y se lavó en una solución que contenía 250 mM sacarosa, 1 mM EDTA pH 7.4 (medio A). Después se separaron los cotiledones (fragmentos de las vellocidades coriónicas, aproximadamente 100 g) y se cortaron en trozos pequeños, homogenizándolos de manera controlada en 2 pulsos, uno de 30 segundos y otro de 1 minuto en un Polytron Brinkmann a 3000 RPM, en 850 ml del medio A a 4°C, con un intervalo de 1 minuto para evitar daño mitocondrial. El homogenado se filtró y el pH se ajustó a 7.4 con Tris-base, después se centrifugó a 1250 x g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 5600 x g por 10 minutos a 4°C. La pastilla contenía las mitocondrias pesadas, mientras que en el sobrenadante se encontraban las mitocondrias ligeras y pequeñas, el cual se centrifugó a 10250 x g durante 10 minutos a 4°C. Para eliminar los eritrocitos, el precipitado se resuspendió en 15 ml del medio A y se centrifugó a 1250 x g por 3 minutos a 4°C. Finalmente el sobrenadante se centrifugó a 11200 x g durante 10 minutos a 4°C y el paquete mitocondrial se resuspendió en un mínimo volumen del medio A (62) determinandosele la concentración de proteína, colesterol y la actividad de la ATPasa.

Determinación de la concentración de la proteína mitocondrial. La concentración de proteína mitocondrial se determinó por el método de Lowry y cols. (63), empleando BSA como referencia.

Consumo de oxígeno por las MHR. El consumo de oxígeno de las MHR se cuantificó polarográficamente utilizando un oxímetro marca YSI, modelo 53 y un electrodo de oxígeno tipo Clark de la misma marca, en un medio denominado de respiración que contenía 250 mM sacarosa, 10 mM succinato-Tris, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1% BSA y 10 mM H_3PO_4 , pH 7.3, en un volumen final de 3 ml a 37°C, utilizando 0.5 mg de proteína mitocondrial (64).

El estado de acoplamiento de las mitocondrias se cuantificó al adicionar 250 nmolas de ADP, y se determinó la velocidad del consumo de oxígeno en el estado 3 sobre la velocidad de respiración en ausencia del ADP (estado 4). La relación que existe entre el estado 3/estado 4 se conoce como control respiratorio y refleja, además del acoplamiento, el estado e integridad de las mitocondrias, ya que mientras mayor sea dicha relación, mejor es el funcionamiento de las mitocondrias (64).

Hidrólisis del ATP en las MHR y las MPH. La hidrólisis de ATP en las MHR y en las MPH, se determinó para cada fracción colectada en un medio que contenía 10 mM de Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM $MgCl_2$. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 500 μ l, la concentración de proteína de 50 μ g y la temperatura de 30°C. La reacción enzimática se inició adicionando 2 mM de ATP, al cabo de 15 minutos se detuvo con la adición de 6% de ácido tricloroacético en frío. La mezcla se centrifugó por 10 minutos a 1800 x g a 4°C. Se tomó una muestra del sobrenadante para determinar la concentración de fosfato libre mediante el método de Sumner (65). Una metodología semejante se realizó en presencia

de 1 $\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ de oligomicina para determinar que la hidrólisis de ATP correspondiera a la F_0F_1 -ATPasa.

Cuantificación de colesterol en las MHR y las MPH. La determinación de colesterol en las mitocondrias se realizó por un método químico, el cuál consta de la extracción etérea del colesterol de 2 mg de proteína mitocondrial en 1 ml de agua. Cada muestra recibió 5 ml de éter y se agitó vigorosamente por 60 segundos, obteniendo 2 fases: una orgánica y otra acuosa; los tubos fueron depositados en nitrógeno líquido hasta que la fase acuosa se congeló y la fase orgánica fue recuperada. El tratamiento para la extracción del colesterol de cada muestra se realizó tres veces en total. La fase orgánica se evaporó a sequedad y a cada muestra se le adicionaron 6 ml del reactivo de Liebermann-Buchard, el cual consta de anhídrido acético, ácido sulfúrico y ácido acético glacial en una relación de 20:1:10, respectivamente. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro marca Sequoia-Turner 340 (66).

Incorporación de diferentes concentraciones de colesterol en las MHR.

Martínez y cols. (1988) reportaron un método para la incorporación de colesterol tanto en las mitocondrias del hígado de la rata, como de las glándulas suprarrenales de perro utilizando un complejo denominado colesterol-BSA-C (C-BSA-C), el cual favorece la incorporación del colesterol a las membranas mitocondriales (9). En este experimento se utilizó dicho complejo para observar si las MHR incorporan colesterol extra del que

normalmente presentan en su membrana. Después de obtener a las MHR, estas fueron tratadas de la siguiente manera: 12.5 mg de proteína/ml se preincubaron 10 minutos a 30°C, posteriormente se incubaron con diferentes concentraciones de colesterol (31.2, 62.5, 125, 250 y 450 µg colesterol por ensayo). Al término de dicho tiempo, el paquete mitocondrial fue obtenido por centrifugación a 11640 x g durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se desechó y el procedimiento fue repetido dos veces. Después del tercer lavado se les determinó la concentración de proteína, de colesterol y la actividad de ATPasa a cada paquete mitocondrial.

Incorporación de colesterol en las MHR tratadas con 0.05% de tripsina. Existen reportes en los cuales se demuestra la presencia de proteínas específicas involucradas en el transporte de colesterol en las mitocondrias de las glándulas suprarrenales (67). El uso de la tripsina en este experimento sirvió para determinar si en las MHR intervenía una proteína que permitiera la incorporación del colesterol en la mitocondria. Para lograr tal objetivo, las MHR (10 mg de proteína/ml) se preincubaron por 5 minutos a 37°C en el medio SHE, en la presencia de 0.05% de tripsina y se realizaron cursos temporales (5, 10, 15, y 20 minutos), tomando alícuotas de 2 mg de proteína/ml, las cuales se diluyeron en 10 ml con el medio SHE en frío, y se centrifugaron a 11640 x g durante 10 minutos a 4°C; el sobrenadante se desechó y el paquete mitocondrial se lavó dos veces con el medio SHE. A cada lote se le calculó la concentración de proteína, el control respiratorio, la actividad de ATPasa, y la concentración de colesterol. Simultáneo a este experimento se mantuvo un lote control sin tratamiento.

Posteriormente las MHR (12.5 mg de proteína/ml), se preincubaron 10 min a 30°C. para después ser incubadas por 1 minuto en la presencia de 250 µg de colesterol; en seguida se diluyeron hasta 30 ml en medio SHE y se centrifugaron a 11640 x g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y el paquete mitocondrial se lavó 2 veces con el medio SHE, determinandoseles concentración de proteína, actividad de ATPasa y colesterol.

Incubación de las MPH con 0.125% de tripsina. Para verificar la existencia de alguna proteína que intervenga en la incorporación de colesterol en las MPH, éstas se trataron de la siguiente manera: en un volumen total de 20 ml del medio de respiración se incubaron 40 mg de MPH a 37°C en agitación constante, un lote similar incubado con 0.125% de tripsina se mantuvo en las mismas condiciones, la reacción fue detenida a los 20 min duplicando el volumen con medio de respiración. Inmediatamente después el paquete mitocondrial se recuperó por centrifugación a 17600 x g durante 30 min a 4°C, el sobrenadante se desechó y el lavado se repitió dos veces con el medio A. Posteriormente las MPH control, MPH a 37°C y MPH a 37°C tripsinizadas, fueron incubadas con 275 µg de colesterol, y se determinó la cantidad del esterol que había incorporado cada lote, así como la concentración de proteína y la actividad de ATPasa.

Incorporación de colesterol a las MPH en presencia de ATP. Para algunos sistemas mitocondriales se ha propuesto que la transferencia e incorporación de colesterol requiere de energía (68), por lo que se exploró esta posibilidad en las MPH. En

este experimento se preincubaron 12.5 mg de proteína/ml de MPH en el medio A durante 10 minutos a 30°C, posteriormente se agregaron 275 µg de colesterol y se incubaron por 1 minuto. En otro lote, bajo las mismas condiciones, se adicionó 5 mM de ATP y 275 µg de colesterol. Un tercer lote incubado de manera similar y sin tratamiento se mantuvo como control. Al final las MPH se diluyeron hasta 30 ml con el medio A y el paquete mitocondrial se recuperó por centrifugación a 11640 x g por 10 minutos a 4°C; este lavado se repitió dos veces. Posteriormente se le determinó la concentración de proteína y de colesterol a cada paquete mitocondrial.

Incorporación de colesterol a las MPH en presencia de ATP y de vanadato.

Datos previos de nuestro laboratorio han demostrado la existencia de una ATP-difosfohidrolasa asociada a la membrana interna de las MPH, la cual es sensible al vanadato (59). Actualmente se desconoce el papel fisiológico de esta enzima; sin embargo, la literatura sugiere que el proceso de transferencia del colesterol en las glándulas suprarrenales podría estar mediada por una GTPasa (69). Con el siguiente protocolo se pretendió determinar si la actividad de la ATP-difosfohidrolasa de las MPH se relaciona con la transferencia de colesterol. Tal experimento constó de 7 lotes, 6 de ellos, con una concentración de proteína mitocondrial de 12.5 mg de proteína/ml en el medio A, se preincubaron a 30°C por 10 min; en las siguientes condiciones:

1er. lote : MPH mantenidas a 30°C.

2o. lote : MPH incubadas durante un minuto con 275 µg de colesterol.

- 3er. lote: MPH incubadas durante un minuto con 5 mM de ATP y 275 μ g de colesterol.
- 4o. lote : MPH incubadas durante un minuto con 1 mM vanadato.
- 5o. lote : MPH incubadas por un minuto con 1 mM vanadato y 275 μ g de colesterol.
- 6o. lote: MPH incubadas por un minuto con 1 mM vanadato, 5 mM de ATP y 275 μ g de colesterol .
- 7o. lote : MPH mantenidas a 4°C durante todo el experimento.

Al transcurrir el tiempo de incubación, los seis primeros lotes se diluyeron en 30 ml de medio A, el paquete mitocondrial se obtuvo por centrifugación a 11640 x g por 10 min a 4°C, el sobrenadante se desechó y la pastilla se lavó dos veces en el medio A. Después del tercer lavado se determinó concentración de proteína y de colesterol a cada paquete mitocondrial.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en presencia de SDS. La electroforesis de las proteínas mitocondriales se realizó de acuerdo al método de Laemli (70) en geles en placa al 10% de poliacrilamida y 0.1% de dodecilsulfato de sodio (SDS). La presencia de las proteínas se reveló con azul de Coomassie R 125. La concentración de proteína utilizada para cada muestra fue de 50 μ g. El patrón de peso molecular proteico consistió en: miosina (205 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa b (97 kDa), albúmina de bovino (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa).

Análisis estadístico. El análisis estadístico de los resultados se realizó con una prueba de varianza (ANOVA) respaldado por la prueba de Bonferroni, considerando un valor de $p < 0.05$ como diferencia estadística significativa.

Finalmente, los datos de la actividad específica de ATPasa en cada Tabla están presentados como la media y la desviación estándar de los resultados. La cuantificación de colesterol está expresada como porcentaje o como $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, lo cual se indica al inicio de la columna.

RESULTADOS

MITOCONDRIAS DEL HEPATOMA DE LA RATA AS-30D.

Como se puede observar en la Tabla 1, la concentración de colesterol incorporado en las MHR incrementa en relación a la cantidad adicionada de éste en el medio de incubación, alcanzando valores de hasta $51.5 \pm 10 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína mitocondrial, es decir, 3.65 veces más la concentración de colesterol de las mitocondrias control. Para determinar si la incorporación de colesterol modifica el metabolismo mitocondrial, se cuantificó la actividad de la ATPasa, ya que se conoce que las mitocondrias presentan una ATPasa F_0F_1 , en su membrana interna, la cual es indispensable para obtener energía en forma de ATP que será utilizado en múltiples procesos. Una característica de esta ATPasa es que *in vitro*, su actividad es reversible y bajo ciertas condiciones puede hidrolizar ATP. Los resultados mostraron que la hidrólisis de ATP aumentó un 45% sin importar la concentración de colesterol con la que se incubó a las MHR (483.2 ± 113.2 a $701.0 \pm 82.1 \text{ nmolas}/\text{Pi}/\text{mg}/\text{min}$, respectivamente), indicando que dicha actividad aumenta independientemente de la cantidad de colesterol que incorpore la mitocondria. Para comprobar que la actividad de la ATPasa estudiada correspondía a la enzima mitocondrial y no a una posible contaminación, se incubaron MHR y MHR + colesterol en presencia de oligomicina ($1 \mu\text{g}/500 \mu\text{l}$), un inhibidor específico de la subunidad F_1 de la ATPasa mitocondrial. Los resultados mostraron que la hidrólisis de ATP se inhibió totalmente con oligomicina. Por otro lado, en cuanto al estado de integridad de las MHR control, estas

presentaron un control respiratorio entre 2 y 3.5 lo cual coincide con lo reportado por Coleman en 1986, quien menciona que la creciente concentración de colesterol presente en la membrana le produce una disminución en su permeabilidad, y por tanto hay bajo consumo de oxígeno en el estado 4, también llamado de reposo (56). De la Tabla 1 se puede inferir que tal sistema de incorporación de colesterol se lleva a cabo *in vitro*, sin que se trate de una unión inespecífica, ya que las MHR fueron lavadas 3 veces.

Tabla 1. Incorporación de colesterol en MHR

colesterol adicionado (μg / mg de proteína)	Actividad de la ATPasa (%)	Incorporación de colesterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína)	incorporación de colesterol (%)	n
0	100 ^a	14 ± 2.70^a	100	30
31.25	155 ± 58^b	17.9 ± 2.0^b	127.3	5
62.5	143 ± 43^b	17.4 ± 2.0^b	123.7	5
125	107 ± 13^a	24.2 ± 4.4^b	150.7	9
250	140 ± 27^b	33.3 ± 13^b	236.8	7
450	145 ± 17^b	51.5 ± 10^b	365.5	6

El 100% de la actividad de ATPasa equivale a 483.2 ± 113.2 nmolas $\text{P}_i/\text{mg}/\text{min}$. Valores de cada columna con diferente superíndice son estadísticamente diferentes entre sí (a Vs. b), con una $p < 0.05$.

Para incorporar el colesterol a la membrana mitocondrial se utilizó un complejo formado por colesterol-BSA; sin embargo, se ha observado que la BSA puede secuestrar lípidos (71,72), por lo que se determinó su efecto sobre este sistema experimental. Para esto, se incubaron diferentes lotes de MHR con concentraciones de BSA equivalentes a

las empleadas en la incubación con el complejo colesterol-BSA. En la Tabla 2 se observa que, aún en presencia de una alta concentración de BSA, el valor de colesterol determinado en las MHR se mantuvo cercano al valor obtenido para las MHR control. Por otro lado, la actividad de la ATPasa no se modificó, mientras que en el patrón electroforético la intensidad de las bandas proteicas en cualquiera de las condiciones experimentales es similar (Figura 1). Lo anterior sugiere que el tratamiento empleado no deteriora ni altera las funciones mitocondriales y mantiene intacta su estructura. Con base en estos datos, podemos sugerir que el colesterol incorporado en la membrana de las MHR es el resultado de un sistema de transporte y que la BSA no interfiere con éste.

Tabla 2. Efecto de la presencia de BSA en el contenido de colesterol en las MHR

BSA adicionada (mg/ml)	Actividad de la ATPasa (%)	Concentración de colesterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína)	Concentración de colesterol (%)	n
0	100	14.0 ± 2.7	100	27
1.48	141.0 ± 46	11.0 ± 2.5	78	5
2.97	100.0 ± 43	13.3 ± 2.8	94	5
5.94	117.0 ± 18	14.4 ± 3.4	102	8
11.9	84.0 ± 13	11.7 ± 3.0	83	3
21.4	95.0 ± 35	13.2 ± 2.4	93	6

El 100% de la actividad de la ATPasa fue de 579.3 ± 113.2 nmolas Pi/mg/min. En estos experimentos no hubo diferencias estadísticas entre los diferentes grupos.

A continuación se determinó si dicho transporte e incorporación *in vitro* en las mitocondrias del hepatoma AS-30D de la rata es mediado por una o varias proteínas específicas. Para este fin se empleó la tripsina, una enzima que hidroliza el enlace peptídico por el lado del α -COOH de los residuos de lisina y arginina, en este caso, de las proteínas periféricas de la membrana mitocondrial (73-74). Las condiciones óptimas de tripsinización se obtuvieron con un curso temporal de hasta 20 minutos de incubación de las MHR en presencia de 0.05% de tripsina.

Después de lavar el exceso de tripsina, a las mitocondrias se les determinó el control respiratorio y la hidrólisis de ATP como parámetros para comprobar su acoplamiento. En la Tabla 3 se observa que a los 20 minutos, la actividad de la ATPasa de las MHR tripsinizadas no se modificó con respecto a las MHR control, mientras que el control respiratorio se mantuvo constante durante todo el tiempo de tratamiento con un valor de 2 a 3 (Figura 2), lo cual indica que las proteínas, enzimas y acarreadores involucrados en el consumo de oxígeno y en la actividad de la ATPasa permanecen intactas después del tratamiento.

Al analizar el patrón electroforético de las MHR control y de aquellas tratadas durante 20 minutos con tripsina, se observó que las mitocondrias tripsinizadas presentan cambios electroforéticos con respecto a las control, lo cual confirma la acción de la tripsina sobre algunas proteínas mitocondriales (Figura 3).

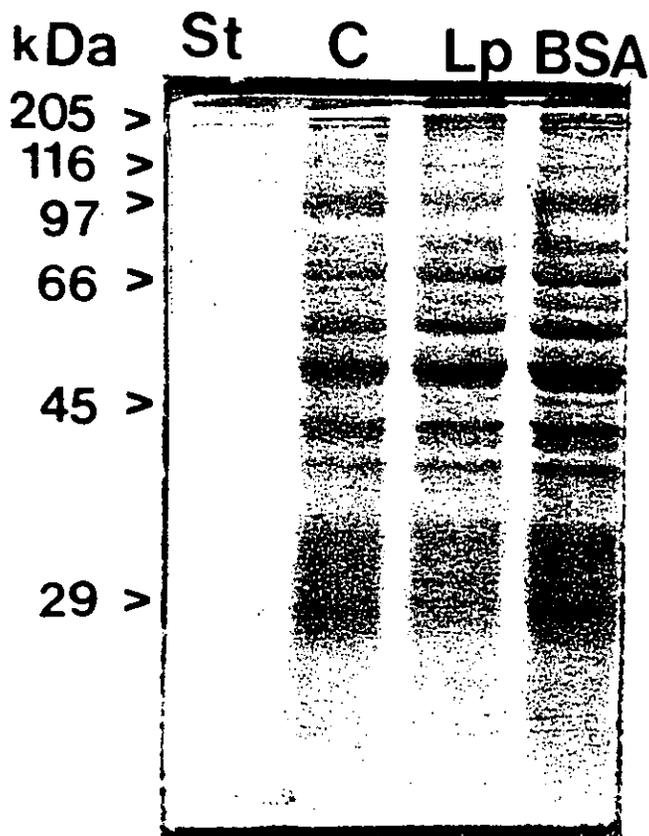


Figura 1. *Electroforesis en condiciones desnaturizantes de las MHR control (C), MHR + el complejo colesterol-BSA (Lp), y en presencia de 11.9 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA). Patrón de peso molecular (St): miosina (205 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa b (97 kDa), albúmina de bovino (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa).*

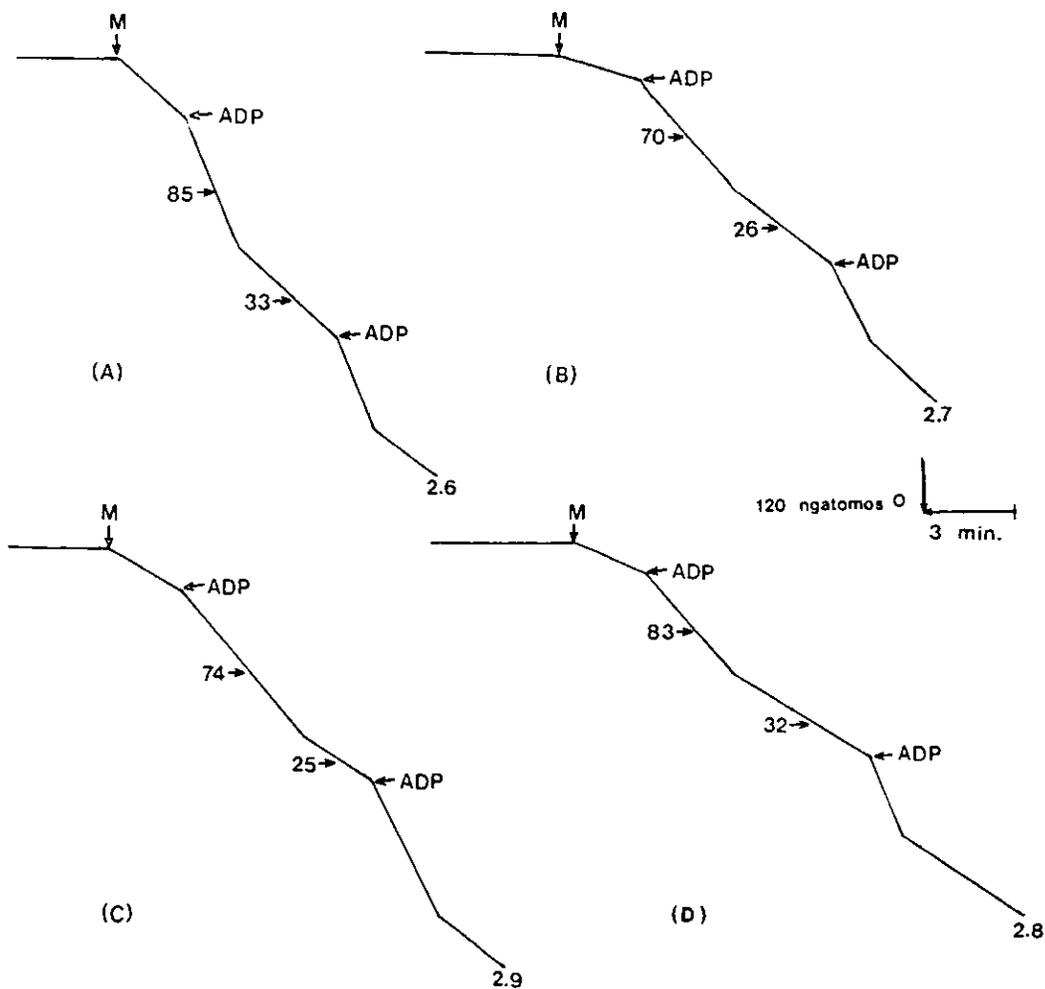


Figura 2. Respiración de MHR tripsinizadas a diferentes tiempos. MHR control (A); MHR tripsinizadas durante 10 (B), 15 (C) ó 20 minutos (D). Las MHR se incubaron en un medio que contenía 250 mM sacarosa, 10 mM succinato-Tris, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 1% BSA y 10 mM H_3PO_4 , pH 7.3 en un volumen final de 3 ml a 37°C utilizando 0.5 mg de proteína mitocondrial. Los números con flechas indican los nanoátomogramos de oxígeno consumido $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, los números restantes indican el control respiratorio de las mitocondrias. La concentración final de ADP fue de 250 nmolas.

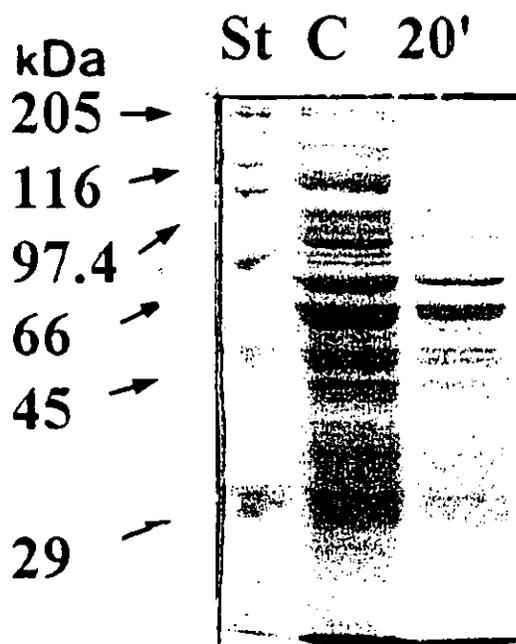


Figura 3. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes de las MHR control (C) y de las incubadas con tripsina durante 20 minutos (20'). Patrón de peso molecular (St): miosina (205 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa b (97 kDa), albúmina de bovino (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa).

Tabla 3. Curso temporal del tratamiento con tripsina al 0.05% y su repercusión en el contenido de colesterol y la actividad de la ATPasa en las MHR

Tiempo de incubación (min)	Actividad de la ATPasa (%)	Concentración de colesterol ($\mu\text{g} / \text{mg}$ de proteína)	Control respiratorio	n
0	100	12.3 ± 1.9	1.9	4
5	100.0 ± 30.0	13.2 ± 2.7	1.7	3
10	115.0 ± 31.0	9.8 ± 2.0	2.7	3
15	117.0 ± 24.0	12.0 ± 2.9	2.9	3
20	108.0 ± 11.4	10.8 ± 2.3	2	4

El 100.0 % de la actividad específica de la ATPasa corresponde a 402.0 ± 146.0 nmolas $\text{Pi}/\text{mg}/\text{min}$. La concentración de colesterol adicionado fue de $250 \mu\text{g}$ colesterol/ mg de proteína. En estos experimentos no hubo diferencias estadísticas significativas.

Puesto que los parámetros bioenergéticos de las mitocondrias control y las tratadas con tripsina son similares, se buscó si existía algún efecto sobre la incorporación de colesterol en las MHR después de ser tripsinizadas (MHRT). La Tabla 4 permite observar que las MHRT llevan a cabo la incorporación de colesterol de una manera similar a las MHR sin tripsinizar, lo cual sugiere que las proteínas degradadas por la tripsina no están involucradas en este transporte, o bien, que la incorporación de colesterol en estas mitocondrias sigue un camino que no depende de un sistema proteico.

Tabla 4. Incorporación de colesterol en MHR tratadas con tripsina al 0.05%

MHR tratadas con:	Actividad de la ATPasa (%)	Colesterol mitocondrial ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína)	n
Control	100 ^a	13.6 \pm 3.6 ^a	8
Tripsina	155.0 \pm 28.0 ^b	12.5 \pm 6.8 ^a	8
Tripsina + 250 μg de colesterol/mg proteína	151.0 \pm 20.0 ^b	31.8 \pm 7.0 ^b	8

El 100.0 % de la actividad de la ATPasa específica corresponde a 509.1 \pm 68.8 nmolas Pi/mg/min. Los valores de cada columna con diferente superíndice son estadísticamente diferentes entre sí, con una $p < 0.05$.

MITOCONDRIAS DE LA PLACENTA HUMANA.

Por otro lado, al realizar experimentos similares con tripsina en las MPH, se observó que la concentración de colesterol en las MPH control, las incubadas a 37°C y las tratadas a 37°C con la tripsina, fue de 13.5 \pm 2.7, 24.6 \pm 7.0 y 35.0 \pm 11.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína, respectivamente (Tabla 5). Estos resultados sugieren que a 37°C se activa una enzima proteolítica presente en la preparación de las MPH que incrementa la relación colesterol/proteína. Esta propuesta se apoya con los datos obtenidos de los experimentos de la incubación de las MPH con tripsina a 37°C, ya que en presencia de las dos enzimas proteolíticas, la relación colesterol/proteína aumenta aún más.

Tabla 5. Incorporación de colesterol en las MPH después del tratamiento con 0.125 % tripsina

MPH tratadas con:	Actividad de la ATPasa (%)	Concentración de colesterol mitocondrial ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína)	n
Control	100 ^a	13.5 \pm 2.7 ^a	11
37°C	120.0 \pm 27.5 ^a	24.6 \pm 7.2 ^b	11
37°C + tripsina	30.5 \pm 6.1 ^b	35.0 \pm 11.2 ^b	10
Colesterol	102.6 \pm 25.0 ^a	43.0 \pm 9.9 ^b	8
37°C + colesterol	78.3 \pm 20.4 ^a	39.1 \pm 11.3 ^b	8
37°C + Tripsina + colesterol	24.3 \pm 10.8 ^b	39.1 \pm 11.8 ^b	11

El 100.0 % de la actividad de la ATPasa específica corresponde a 513.4 \pm 84.8 nmol Pi/mg/min. La concentración de colesterol adicionado fue de 275 μg por ensayo. Los valores de cada columna con diferente superíndice son estadísticamente diferentes entre sí (a Vs b), con una $p < 0.05$.

Con respecto a la actividad de la ATPasa, se observó que las MPH incubadas a 37°C muestran una hidrólisis de ATP similar a las mitocondrias control; sin embargo, las mitocondrias tripsinizadas disminuyeron la actividad de la ATPasa en un 70%. Posteriormente, se determinó la capacidad de las MPH para incorporar colesterol después de los diferentes tratamientos. La Tabla 5 muestra que tanto las MPH control y las MPH a 37°C incorporaron colesterol de 13.5 \pm 2.7 a 43.0 \pm 9.9 y de 24.6 \pm 7.2 a 39.1 \pm 11.3

$\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína mitocondrial, es decir, 3.2 y 1.6 veces más, respectivamente, mientras que las tratadas a 37°C + tripsina incorporaron solo 1.1 veces más colesterol; esto último sugiere que la tripsina modificó el sistema encargado de la incorporación de colesterol en MPH a término eliminando una proteína que participa en dicho proceso.

Tabla 6. Incubación de las MPH tratadas con 0.125 % tripsina en presencia de diferentes concentraciones de colesterol

MPH tratadas con:	Control	+ 275 μg colesterol	+ 550 μg colesterol	n
Control	$13.8 \pm 1.8_{(1)}^a$	37.7 ± 3.7^c	$56.0 \pm 8.3_{(1)}^c$	4
37°C	27.5 ± 3.3^b	33.7 ± 0.6^c	59.3 ± 2.0^c	4
37°C + tripsina	$52.8 \pm 6.0_{(2)}^c$	60.9 ± 1.6^c	$73.9 \pm 15.0_{(2)}^c$	4

La concentración de colesterol es la adicionada por ensayo. La comparación del valor del control contra los tratados tuvo una $p < 0.05$ para a Vs b, y de $p < 0.0001$ para a Vs c. Los valores con el subíndice 1 son estadísticamente diferentes entre sí con una $p < 0.0001$, pero no hay diferencia estadística entre los valores con el subíndice 2.

Para determinar si el tratamiento con tripsina disminuye la incorporación de colesterol, se determinó la capacidad de estas mitocondrias para incorporar más colesterol en sus membranas. En la Tabla 6 se observa que la concentración de colesterol incorporado en las mitocondrias fue de 4 veces más en relación al control, mientras que las tratadas con tripsina con el doble de colesterol sólo incrementaron 1.4 veces más la

concentración de colesterol, apoyando la hipótesis de que la tripsina afectó un sistema proteico encargado de regular la captación de colesterol en las MPH.

Por otro lado, existen datos bibliográficos que sugieren que el transporte de colesterol en los tejidos esteroideogénicos se favorece en presencia de energía. Kowluru y cols., en 1995, demostraron que en las mitocondrias de las glándulas suprarrenales la síntesis de pregnenolona se duplicó con la adición de GTP (75). Con base en estos datos se determinó si la incorporación de colesterol en las MPH requiere de energía en forma de ATP. La Tabla 7 muestra que en presencia del ATP, las MPH incorporaron 5.4 veces más colesterol en su membrana cuando se compara con las mitocondrias control. Por otro lado, la incubación de las MPH más colesterol mostraron un aumento 4 veces mayor con respecto a las control. Estos datos sugieren que la incorporación de colesterol en las MPH es mediado por un sistema proteico dependiente de energía.

Se ha observado que en la membrana mitocondrial externa de la placenta humana se localiza la actividad de una ADPasa y una ATPasa diferentes de la ATP sintetasa. La hidrólisis de ATP por la ATPasa extramitocondrial se lleva a cabo en el espacio intermembranal, dando como resultado que se estimule el consumo de oxígeno sin desacoplar la respiración, lo que ha permitido sugerir que estas enzimas podrían estar relacionadas estrechamente con el metabolismo mitocondrial (76). Al parecer, estas actividades pertenecen a una misma enzima que tal vez sea una ATP-difosfohidrolasa, la cual describió Flores-Herrera y cols. en 1997. Los autores proponen que esta enzima

está involucrada en la transferencia de colesterol de la membrana externa a la membrana interna de la mitocondria, proporcionando el sustrato para la síntesis de progesterona (76). Se ha observado que la actividad de esta enzima en partículas submitocondriales se inhibe un 80% con 1 mM de vanadato, mientras que en mitocondrias intactas de placenta humana con la misma concentración de vanadato solo se inhibe un 40%, por lo que para determinar la posible participación en el transporte de colesterol de este sistema mitocondrial, se realizaron experimentos en presencia y en ausencia de vanadato.

Tabla 7. Efecto del ATP y del vanadato sobre la incorporación de colesterol en las MPH

Colesterol mitocondrial incorporado (%)			
MPH tratadas con :		+ Vanadato 1 mM	n
Control	100	127.6±23.6	5
275 µg colesterol / mg de proteína	393.4±77.6	393.1±71.8	5
5 mM ATP + colest.	544.6±106.9	447.9±96.5	5

El 100.0 % de colesterol en las mitocondrias corresponde en este caso a 11.9 ± 1.9 µg colesterol/mg proteína.

En la Tabla 7 se observa que al incubar solo con vanadato, la incorporación de colesterol en las MPH es similar a la que observó cuando éste análogo del fosfato no se encuentra en el medio, mientras que tratamientos similares en presencia de ATP

mostraron que las MPH + ATP + colesterol y las MPH + vanadato + ATP + colesterol contenían 5.4 ± 1.06 y 4.4 ± 0.96 veces más colesterol en sus membranas al compararlas con las MPH control, lo cual, a pesar de no existir una diferencia estadística entre estos lotes, la tendencia del vanadato es a inhibir la incorporación del colesterol, como se observa en la Figura 4, sugiriendo que la ATP-difosfohidrolasa podría estar participando en la incorporación del colesterol en las MPH.

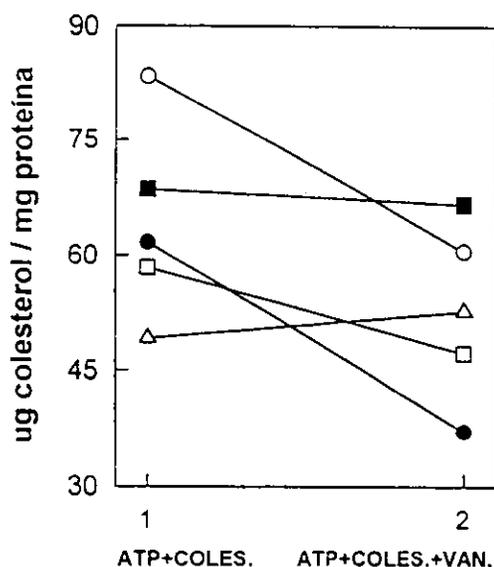


Figura 4. Efecto del vanadato en la incorporación del colesterol en las mitocondrias de la placenta humana. La concentración de ATP fue de 5 mM, de colesterol fue de 275 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína y de vanadato de 1 mM. Las mitocondrias se incubaron a 30°C durante 1 minuto en la presencia de estos compuestos.

DISCUSIÓN

Los estudios realizados en las membranas mitocondriales del hígado de la rata han mostrado que éstas presentan una baja concentración de colesterol; sin embargo, Feo y cols. en 1975 demostraron que el contenido de colesterol puede aumentar hasta 3.7 veces más, principalmente en la membrana externa de las mitocondriales del hígado de la rata cuando los animales son sometidos a una dieta hipercolesterolémica, esto indica que las membranas pueden incorporar en su bicapa más colesterol del que tienen normalmente. Feo y cols. también observaron que la concentración de colesterol existente en las mitocondrias de los hepatomas AH-130, 3924 A y 5123 de la rata, es similar al observado en las mitocondrias del hígado de la rata enriquecidos con colesterol (8); la diferencia es que el incremento en éstas últimas no es inducida ya que se presenta como una característica de la línea celular (Tabla 8).

La diferencia en la concentración de las mitocondrias de hepatoma AS-30D (12-14 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína) con respecto a las mitocondrias de los hepatomas estudiados por Feo y cols. puede deberse a que se trata de líneas celulares diferentes o al tipo de alimentación que recibieron los animales en experimentación durante el tiempo de estudio. No obstante, es evidente que las mitocondrias de hepatoma de rata AS-30D presentan una mayor concentración de colesterol comparado con las mitocondrias del hígado de la rata (3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína). En cuanto a la creciente incorporación del colesterol en las membranas mitocondriales del hepatoma AS-30D, esta se llevó a cabo *in vitro*, sin que al

parecer exista un mecanismo encargado de inhibir la captación de colesterol bajo las condiciones experimentales con las que se trató a las MHR AS-30D.

Tabla 8. Contenido de colesterol y fosfolípidos en las mitocondrias del hígado de la rata adulta, hígado fetal, hígado enriquecido con colesterol y de hepatomas

Fuente de la mitocondria	Colesterol (µg/mg proteína)	Fosfolípidos (mg/mg proteína)	Colesterol (µg/mg fosfolípidos)	Tasa molar (colesterol: fosfolípido)	n
Hígado de adulto	5.2 ± 1.5	0.158 ± 0.012	33 ± 9	1 : 16.8	20
Hígado de feto	5.1 ± 1.1	0.130 ± 0.022	39 ± 11	1 : 14.1	4
Hígado enriquecido con colesterol	19.2 ± 0.6	0.182 ± 0.008	107 ± 15	1 : 5.2	10
Hepatoma AH-130	22.6 ± 2.4	0.168 ± 0.026	134 ± 24	1 : 4.1	5
Hepatoma 3924A	20.2 ± 4.2	0.134 ± 0.008	151 ± 29	1 : 3.7	7
Hepatoma 5123	32.4 ± 6.7	0.124 ± 0.035	261 ± 91	1 : 2.1	8

Los datos son los valores promedio ± la desviación estándar (DS). La DS de la tasa colesterol: fosfolípido (µg/mg) fue calculado según Worthing y Jeffner. El peso molecular del colesterol es 387, y de los fosfolípidos es 700. Tabla obtenida de Feo y cols. (9).

El método utilizado en los experimentos de incorporación de colesterol en las mitocondrias del hepatoma de la rata permitió observar un aumento desde 27 hasta 365% de colesterol con respecto a las mitocondrias del hepatoma de la rata control. Un resultado similar obtuvieron Martínez y cols. en 1988, al incubar con concentraciones semejantes de colesterol a las mitocondrias del hígado normal de la rata (9). Con respecto a la actividad de la ATPasa en las mitocondrias del hepatoma de la rata tratadas con diferentes concentraciones de colesterol, se observó en general un aumento, que de acuerdo con las investigaciones hechas por Calanni en las mitocondrias del corazón de bovino, podría deberse a pequeños cambios en la concentración del colesterol en la membrana interna mitocondrial (78); sin embargo, será necesario aislar partículas submitocondriales del hepatoma AS-30D con el propósito de determinar tanto la concentración de colesterol como la actividad de la ATPasa y correlacionar si estos parámetros están asociados.

En la membrana interna mitocondrial se encuentra la cadena respiratoria transportadora de electrones, así como la ATPasa de protones cuya subunidad F_1 está orientada hacia la matriz mitocondrial; la relación de ambos procesos indica el estado de acoplamiento de la mitocondria. Dicha ATPasa de protones se encuentra altamente conservada en estructura y función en la membrana de diferentes organismos como son las bacterias y además en organelos como los cloroplastos, incluso se ha demostrado que la subunidad F_0 de la ATPasa localizada en las bacterias, así como en la membrana interna de las mitocondrias del corazón de bovino, del carcinoma de Ehrlich y de las

mitocondrias de la placenta humana, entre otros organos, puede ser inhibida por bajas concentraciones de oligomicina (76,79-83). Al estudiar el efecto de la oligomicina (1 $\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$) sobre la actividad de la ATPasa en las MHR control y en las incubadas con colesterol se observó que en estas últimas la actividad fue completamente inhibida (datos no mostrados), lo cual indica que la fosforilación oxidativa en la F_0F_1 no se llevó a cabo.

En cuanto a la BSA, se sabe que si está se adhiere a la membrana externa mitocondrial, provoca un aumento en el valor de la determinación de proteína y por lo tanto la ATPasa disminuye (9). En los resultados (Tabla 2) se observó que la incubación de las mitocondrias del hepatoma de la rata más BSA no modificó la actividad de la ATPasa con respecto a las mitocondrias del hepatoma de la rata control, lo cual muestra que la BSA no se adhiere a la membrana cuando el colesterol es incorporado. Este resultado concuerda con las investigaciones realizadas por Martínez y cols. en 1988, quienes, al incubar las mitocondrias del hígado de la rata con colesterol utilizando como vehículo BSA marcada radioactivamente con I^{125} , mostraron que la albúmina iodada se libera totalmente en el primer lavado mitocondrial, lo cual permite comprobar que la BSA no es retenida en la mitocondria, permitiendo la incorporación de colesterol en este organelo (9).

Se sabe que la cara citoplásmica de la membrana externa mitocondrial presenta múltiples proteínas, algunas de ellas permiten llevar a cabo reacciones de biosíntesis de ácidos grasos y fosfolípidos, así como de oxidación, e incluso, algunas permiten la

difusión de moléculas con un peso menor a los 10 kDa hacia el espacio intermembranal, por ejemplo la porina. Con base en esto, al estudiar el efecto de la tripsina sobre las proteínas periféricas de la membrana externa mitocondrial, se observó que la tripsina degrada de manera importante algunas proteínas sin inhibir la captación de colesterol por las mitocondrias del hepatoma de la rata, ya que la concentración del esterol que éstas presentan es similar al de las MHR incubadas con colesterol, lo cual indica que la enzima no degradó proteínas involucradas en el sistema de incorporación estudiado. Por su parte, la actividad de la ATPasa mostró un aumento del 50% tanto en las MHR + tripsina como en las MHR + tripsina + colesterol, lo cual se podría deber a un efecto combinado de la presencia de colesterol incorporado en la mitocondria, con la degradación de algunas proteínas periféricas localizadas en la membrana externa.

En cuanto al control respiratorio, este varió entre 2 a 3.5 tanto en las MHR control como en las tripsinizadas, y en las tripsinizadas + colesterol. Martínez y cols. (1993), sugieren que esto es debe a la elevada concentración de colesterol que presentan las mitocondrias en la membrana, lo cual produce cambios en su fluidez y además se relacionan con la disminución de la respiración (5); un efecto similar con respecto al control respiratorio fue demostrado por los mismos investigadores al enriquecer artificialmente con colesterol a mitocondrias aisladas de hígado normal (9). Las electroforesis realizadas con las MHR, las MHR + colesterol, las MHR + BSA, y las MHR + tripsina, confirman que la albúmina no quedó adherida a la membrana externa mitocondrial, ya que el patrón electroforético en las tres primeras condiciones

experimentales es similar. Por su parte, el análisis de las MHR + tripsina mostró una ligera disminución en el número de bandas con respecto a las mitocondrias control, lo cual indica que la enzima degradó algunas proteínas periféricas de la membrana externa mitocondrial, pero a su vez, con base en la actividad de la ATPasa, se puede concluir que la membrana interna mitocondrial se conservó íntegra.

Por su parte, los experimentos realizados en las mitocondrias de la placenta humana (MPH) mostraron que al aumentar la temperatura de 30°C a 37°C la concentración de colesterol también se elevó, esto sugirió la presencia de una enzima proteolítica responsable de dicho efecto. Al incubar las mitocondrias de la placenta humana con tripsina a 37°C (es decir 2 enzimas proteolíticas), la concentración de colesterol fue aún mayor; sin embargo, al incubarlas con colesterol (275 µg colesterol por ensayo), la concentración final de esterol en los tres lotes (MPH + colesterol, MPH a 37°C y MPH tripsinizadas a 37°C + colesterol) no varió, sugiriendo que la tripsina degradó alguna proteína relacionada con el mecanismo de transporte e incorporación de colesterol en las MPH. En presencia de 550 µg colesterol por ensayo, se observó una ligera incorporación de colesterol, apoyando la hipótesis de que se está(n) degradando alguna(s) proteína(s) involucrada(s) en la captación de colesterol. Sin embargo, la incorporación de colesterol a la membrana mitocondrial sugiere la posibilidad de que cierta cantidad del colesterol captado forme parte estructural de la membrana, y el resto se destine para la síntesis de progesterona, por lo que experimentos posteriores nos permitirán evaluar estas hipótesis.

En cuanto a la actividad de la ATPasa ésta disminuyó un 70% tanto en las MPHT como en las MPHT + colesterol, sugiriendo que la tripsina degradó a la ATP difosfohidrolasa mitocondrial y que el 30% restante de la hidrólisis de ATP corresponde a la actividad de la F_0F_1 .

Durante esta caracterización, se observó que en presencia de colesterol y ATP, la incorporación del esterol a la membrana mitocondrial aumentó 5.4 veces, indicando que dicho mecanismo se favorece por la presencia del ATP. Un efecto similar se reportó por Xu y cols. (1989) al incubar mitocondrias de las glándulas suprarrenales en presencia de GTP, logrando estimular la transferencia de colesterol extramitocondrial hacia el Cit P450_{scc} el cual cataliza la conversión del esterol a pregnenolona, duplicando la síntesis de esta hormona (68). Los datos anteriores sugieren que los nucleótidos favorecen el transporte de colesterol mitocondrial, muy posiblemente a través de los sitios de contacto, que de acuerdo a Brdicza, permiten la transferencia de ADP, fosfolípidos y proteínas a la membrana interna mitocondrial (84).

Con respecto a la participación de la ATP-difosfohidrolasa en el mecanismo de transporte e incorporación de colesterol, se observó que en presencia de vanadato la captación de colesterol exógeno por las mitocondrias de la placenta tiende a disminuir. En este caso, se sugiere que el vanadato ocupa el sitio del fosfato en la enzima, inhibiendo la actividad de la ATP-difosfohidrolasa e impidiendo la incorporación del colesterol en la membrana mitocondrial (85,86).

Con los resultados anteriores y con base en los datos de la literatura, se propone que el transporte e incorporación de colesterol en las mitocondrias del hepatoma de la rata podría ser mediado por vesículas como ya había sido sugerido por Martínez y cols. (1988) en las mitocondrias del hígado de la rata, sugiriendo también que en dicho mecanismo podría intervenir algún sistema proteico (9), el cual, de acuerdo con nuestros datos podrían ser proteínas insensibles a la acción de la tripsina; sin embargo, aún no se ha logrado determinar este mecanismo.

En cuanto a la función de la ATP-difosfohidrolasa proponemos que ésta se encuentra asociada a los puntos de contacto localizados entre la membrana externa e interna mitocondrial; de esta manera y en presencia de energía (ATP), la ATP-difosfohidrolasa promueve la incorporación y el paso de colesterol entre las membranas mitocondriales para sintetizar progesterona.

CONCLUSIONES

- 1.- Las mitocondrias del hepatoma de la rata incorporan colesterol *in vitro*.
- 2.- Independientemente de la concentración de colesterol incorporado por las membranas mitocondriales del hepatoma de la rata, no se observó un aumento significativo en la hidrólisis de ATP.
- 3.- La incubación de las mitocondrias del hepatoma de la rata en presencia de tripsina, sugieren que el transporte de colesterol no requiere de un sistema proteico, y que las proteínas degradadas por la tripsina no están involucradas en tal mecanismo.
- 4.- No se observó incorporación de colesterol en las mitocondrias de la placenta humana incubadas con tripsina, lo cual sugiere que el tratamiento con tripsina eliminó alguna(s) proteína(s) encargadas(s) de la incorporación de colesterol.
- 5.- El incremento en la incorporación de colesterol de las mitocondrias de la placenta humana incubadas con ATP, sugiere que este mecanismo de incorporación necesita de energía. Además, el hecho de que la incorporación de colesterol se inhiba por la adición de vanadato, sugiere que en el sistema de transporte podría estar involucrada la ATP-difosfohidrolasa.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Echegoyen, S., Oliva, E., Sepúlveda, J., Díaz, J. C., Espinoza, M. T., Pardo, J. P. and Martínez, F. (1993). Cholesterol increase in mitochondria: its effect on inner membrane functions, submitochondrial localization and ultrastructural morphology. *Biochem. J.* **289**: 703-708.
- 2.-Lehninger, A. L. (1990). *Bioquímica*. 2a ed., Omega. Barcelona, España; pp 1117.
- 3.-Okuda, K. I. (1994). Liver mitochondrial P450 involved in cholesterol catabolism and vitamin D activation. *J. Lipid Res.* **35**(3): 361-72.
- 4.-Pennisi, E., (1997). Newfound Gene Holds Key to Cell's Cholesterol Traffic. *Science*, **277**:180-181.
- 5.-Martínez, F., Flores, O., Pardo, J. P., Mendoza, G. y Espinoza, M. T. (1993). El papel del colesterol en los procesos tumorales. *BEB* **12** (2): 41-45.
- 6.-Carstea, E. D., Morris, J. A., Coleman, K. G., Loftus, S. K., Zhang, D., Tagle, D. A., and cols. (1997). Niemann-Pick C1 Disease Gene: Homology to Mediators of Cholesterol Homeostasis. *Science*, **277**:228-231.
- 7.-Loftus, S. T., Morris, J. A., carstea, E. D., and cols. (1997). Murine Model of Niemann-Pick C Disease: Mutation in a Cholesterol Homeostasis Gene. *Science*, **277**:232-235.
- 8.-Feo, F., Canuto, R. A., Garcea, R., and Gabriel, L., (1975). Effect of cholesterol content on some physical and functional properties of mitochondria isolated from adult rat liver, fetal liver, cholesterol enriched liver and hepatomas AH-130, 3924A and 5123, *Biochim. Biophys. Acta* **413**:116-134.
- 9.-Martínez, F., Echegoyen, S., Briones, R. and Cuellar, A. (1988). Cholesterol increase in mitochondria: a new method of cholesterol incorporation. *J. Lipid Res.* **29**:1005-1011.
- 10.-Liscum, L., Dahl, N. K. (1992). Intracellular cholesterol transport. *J. Lipid Res.* **33**:1239 - 1254.
- 11.-Coleman, P. S. (1986). Membrane cholesterol and tumor bioenergetics, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **488**:451-467.
- 12.-Lange, Y., Ye, J., and Chin J. (1997). The fate of cholesterol of exiting lysosomes. *J. Biol. Chem.*, **272**(27):17018-17022.

- 13.-Daum, G. (1985). Lipids of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **822**:1-42.
- 14.-Bruckdorfer, R., Sherry, K. M. (1984). The solubility of cholesterol and its exchange between membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **769**: 187-196.
- 15.-Dawidowicz, E. A. (1987). Dynamics of membrane lipid metabolism and turnover. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 43-61
- 16.-Phillips, M. C. (1972). Progress in Surface and membrane Science, Danielli, J. F., Rosenberg, N. D. and Cadenhead, D. A. eds., pag 139-221, Academic Press, New York.
- 17.-Phillips, M. C., Johnson W. J. and Rothblat G. H. (1987). Mechanism and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer. *Biochim. Biophys. Acta* **906**:223-276.
- 18.-Cooper, R. A., Strauss, J. F. (1984). En Physiology of membrane fluidity. Vol. I, Editor : M. Shinitzky. CRC Press, Inc. Florida, USA, 73-97.
- 19.-Reinhart, M. P. (1990). Intracellular sterol trafficking. *Experientia* **46**:599-611.
- 20.-Morris, F. H., Boyd, R. D. H. (1980). The physiology of Reproduction. Cap. 50 Raven Press. Ltd. New York.
- 21.-Yanagibashi, K., Ohno, Y., Kawamura, M., Hall, P. F. (1988). The regulation of intracellular transport of cholesterol in bovine adrenal cells : Purification of a novel protein. *Endocrinology* **123** (4):2075 - 2082.
- 22.-Besman, M. J., Yanagibashi, K., Lee, T. D. L., Kawamura, M., Hall, P. F., Shively, J. E. (1989). Identification of des - (gly - ile) - endozepine as an effector of corticotropin - dependent adrenal steroidogenesis : stimulation of cholesterol delivery is mediated by the peripheral benzodiazepine receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **86**:4897 - 4901.
- 23.-Pfeifer, S. M., Furth, E. E., Ohba, T., Chang, Y. J., Rennert, H., Sakuragi, N., Billheimer, J. T., Strauss, J. F. (1993). Sterol carrier protein 2 : a role in steroid hormone synthesis? *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **46**:167-172.
- 24.-Chanderbhand R. F., Kharroubi A. T., Noland B. J., Scallen T. J., Vahouny G. V. (1986). SCP₂: Further evidence for its role in adrenal steroidogenesis. *Endocrine Res.* **12**:351-360.
- 25.-Jefcoate, C. R., McNamara, B. C., Artemenko, I. and Yamazaki, T. (1992). Regulation of cholesterol movement to mitochondrial cytochrome P450_{scc} in steroid hormone synthesis. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **43**:751-767.

- 26.-Pedersen, R. C., Brownie, A. (1987). Steroidogenesis-activator polypeptide isolated from a rat Leydig cell tumor. *Science*, **236**:188-190.
- 27.-Pon, L., Moll, T., Vestweber, D., Marshallsay, B., Schatz, G. (1989). Protein import into mitochondria ATP-dependent protein translocation activity in submitochondrial fraction enriched in contact sites and specific proteins. *J. Cell Biol.* **109**:2603-2616.
- 28.-Stocco, D. M., Ascoli, M. (1993). The use of genetic manipulation of MA - 10 Leydig tumor cells to demonstrate the role of mitochondrial protein in the acute regulation of steroidogenesis. *Endocrinology* **132**:959-967.
- 29.-Papadopoulos V.(1995). Role of peripheral-type benzodiazepine receptor. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* **53**(1-6) 103-110.
- 30.-Martínez, F., Uribe, A., Espinosa, M., Flores, H. O. (1995). Las mitocondrias de los tejidos esteroideogénicos. *Mensaje Bioquímico*, **19**:95-114.
- 31.-Harris, J. R., (1991). The evolution of placenta mammals. *Fed. of Eur. Biochem. Soc.* **295** (1.2.3.):3-4.
- 32.-Padykula, H. A., (1988). *Cell and Tissue Biology*, Leon Weiss, 6th edition, Urban and Schwarzenberg, Baltimore-Munich, 900-927.
- 33.-Flores, H. O., Martínez, F., Pardo, J. P., Rendón, G. J. L., Espinosa, T. (1991). Transporte de calcio en mitocondrias de placenta humana a término. *BEB* **10**:23-28.
- 34.-Dicsfaluzi, E. (1974). En: *Physiology and Genetics of Reproduction*. Plinium Press. New York.
- 35.-Dicsfaluzi, E. (1974). Endocrine functions of the human fetus and placenta. *Am. J. Obst. Gyn.* **119**, 419-433.
- 36.-Simpson, R. E., Mac Donald, P. C., (1981). Endocrine Physiology of the Placenta. *Ann. Rev. Physiol.* **43**:163-88.
- 37.-Knight, J. W. (1994). Aspects of placental estrogen synthesis in the pig. *Exp. Clin. Endocrinol.* **102**:175-184.
- 38.-Möstl, E. (1994). The horse feto-placental unit. *Exp. Clin. Endocrinol.* **102**:166-168.
- 39.-Parker, C. R., Deahl, T., Drewry, P., and Hankins, G. (1983). Analysis of the potential for transfer of lipoprotein-cholesterol across the human placenta. *Early Hum. Dev.*, **8**:289-295.

- 40.-Winkel, C. A., Gilmore, J., Mac Donald, P. C., and Simpson, E. R. (1980). Uptake and degradation of lipoproteins by human trophoblastic cells in primary culture. *Endocrinology*, **107**:1892-1898.
- 41.-Morriss Jr, F. H., Boyd, R. D. H.,(1988). En: *Placental Transport. The Physiology of Reproduction*, E, Knobil and J. Neill *et al.* Raven Press, Ltd., New York, 2043-2083.
- 42.-Nakashima, R. A., Scott, L. J., Pedersen, P. L.(1986). The Role of Mitochondrial Hexokinase Binding in the Abnormal Energy Metabolism of Tumor Cell Lines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **488**:438-450.
- 43.-Müller, M., Siems, W., Buttgereit, F., Dumdey, R., Rapoport, S. M. (1986). Quantification of ATP-producing and consuming processes of Ehrlich ascites tumour cells. *Eur. J. Biochem.*, **161**:701-707
- 44.-Cooper, G. M.(1990). En: *Oncogenes*. Jones and Bartlett Publishers, London.
- 45.-Pedersen, P. L.(1978). Tumor mitochondria and the bioenergetics of Cancer Cells. *Prog. exp. Tumor Res.* **22**:190-198
- 46.-Argiles, J. M., López-Soriano, F. J. (1991). The Energy State of Tumor-bearing Rats. *J. Biol. Chem.* **266**(5):2978-2982.
- 47.-Brill, S., Holst, P. A., Zvidel, I., Fiorino, A. S., Sigal, S. H., Somasudaran, U., Reid, L. M., (1994). En: *Extracellular Matrix Regulation of Growth and Gene Expression in Liver Cell Lineages and Hepatomas. The Liver: Biology and Pathobiology*, Third Edition, edited by I. M. Arias, J. L. Boyer, N. Fausto, W. B. Jacoby, D. A. Schachter, and D. A. Shafritz. Raven Press, Ltd., New York, 869-891.
- 48.-Costa, G.(1977). Cachexia, the metabolic component of neoplastic diseases. *Cancer Res.* **37**:2327-2335.
- 49.-Shapot, V. S.(1979). On the multiform relationships between the tumor and the host. *Adv. Cancer Res.* **30** : 89-150.
- 50.-Herzfeld, A., Greengard, O. (1972). The dedifferentiated pattern of enzymes in livers of tumor-bearing rats. *Cancer Res.* **32**:1826-1832.
- 51.-Jasani, B., Donalson, L. J., Ratcliffe, J. G., Sokhi, G. S. (1978). Mechanism of impaired glucose tolerance in patients with neoplasia. *Br. J. Cancer*, **38** : 287-292.

- 52.-Weber, M. J., Nakamura, K. D., Salter, D. W. (1984). Molecular events leading to enhanced glucose transport in Rous sarcoma virus-transformed cells. *Fed. Proc.* **43**: 2246 - 2250.
- 53.-Argilés, J. M., Azcón, B. J. (1988). The metabolic environment of cancer. *Mol. Cell. Biochem.* **81**:3 - 17.
- 54.-Mason, J. I., Rainey, W. E. (1987). Steroidogenesis in the human fetal adrenal: a role for cholesterol synthesized *de novo*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **64**:149-155
- 55.-Edwards, P. A., Lan, S. F. and Fogelman, A. M. (1984). High Density lipoproteins and lecithin dispersions increase the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by increasing the rate of synthesis and decreasing the rate of degradation of the enzyme, *J. Biol. Chem.* **259**:8190-8194.
- 56.-Coleman, P. S., Chuan, C. L. Sepp, L. L.(1997). Cholesterol Metabolism and Tumor Cell Proliferation. Chapter 13.
- 57.-Mason, J. I., Boyd, S. G. (1971). The Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme System in Mitochondria of Human Term Placenta. *Eur. J. Biochem.* **21**:308-321.
- 58.-Strauss, J. F., Martínez, F., Kiriakidou, M. (1996). Placental Steroid Hormone Synthesis: Unique Features and Unanswered Questions. *Biol. Reprod.* **54**:303-311.
- 59.-Flores-Herrera, O., Uribe, A., Pardo, J. P., Rendón, J. L., Martínez, F. (1998). A novel ATP-diphosphohydrolase from human term placental mitochondria. *Placenta*. Enviado a publicar.
- 60.-Smith, D. F., Walborg, Jr. E. F., Chang, P. J. (1970). Establishment of a Transplantable Ascites Variant of a Rat Hepatoma Induced by 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzane. *Cancer Res.* **30**:2306-2309.
- 61.-Moreadith, R. W., Fiscum, G. (1984). Isolation of mitochondria from ascites tumor cells permeabilized with digitonin. *Anal. Biochem.* **137**:360-367.
- 62.-Martínez, F., Chavéz, E., Echegoyán, S. (1987). Decreased exchange of adenine nucleotides in human placental mitochondria. *Int. J. Biochem.* **19**:275-279.
- 63.-Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.

- 64.-Martínez, F., Pardo, J. P., Flores, H. O., Espinosa, G. T. (1995). The effect of osmolarity on human placental mitochondria function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27** (8):795-803.
- 65.-Sumner, J. B. (1944). A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science* **100**:413-414.
- 66.-Díaz-Zagoya, J. C., Hurtado, M. E., González, J. (1976). Alteration of cholesterol synthesis in liver as induced by 4 methyl-5-hydroxy-valeric acid. *Experientia*, **32**:1138-1139.
- 67.-Devlin, T. M. (1991). En: *Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas*. 2a. ed. Barcelona: Editorial Reverté, pag. 56.
- 68.-Xu, X., Xu, T., Robertson, D. G., Lambeth, J. D. (1989). GTP stimulates pregnenolone generation in isolated rat adrenal mitochondria. *J. Biol. Chem.* **264**:17674-17680.
- 69.-Xu, T., Bowman, E. P., Glass, D. B., Lambeth, J. D. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**: 6801-6807.
- 70.-Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- 71.-Bartholow, L. C., Geyer, R. P. (1981). Sterol release in mammalian cells. The role of a liposomal-free albumin-phospholipid complex. *Biochim. Biophys. Acta* **655**:40-47.
- 72.-Bartholow, L. C., Geyer, R. P. (1982). Sterol efflux from mammalian cells induced by human serum albumin-phospholipid complexes. Dependence on phospholipid acyl chain length, degree of saturation, and net charge. *J. Biol. Chem.* **257**: 3126-3130.
- 73.-Méndez, J. A., Oram, F. J. (1997). Limited proteolysis of high density lipoprotein abolishes its interaction with cell-surface binding sites that promote cholesterol efflux. *Biochim. Biophys. Acta*, **1346**: 285-299.
- 74.-Li, Q., Czarnaiecka, H., Yokoyama, S. (1995). Involvement of a cellular surface factor(s) in lipid-free apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *Biochim. Biophys. Acta*, **1259**: 227-234.
- 75.-Kowluru, R., Yamazaki, T., McNamara, B. C., Jafcoate, C. R. (1995). Metabolism of exogenous cholesterol by rat adrenal mitochondria is stimulated equally by physiological levels of free Ca^{2+} and by GTP. *Mol. Cel. Endocrinol.* **107**:181-188.

- 76.-Flores-Herrera O. (1996). En: *Purificación parcial y caracterización directa de la nucleotidasa de mitocondrias de placenta humana a termino*. 47, Tesis para obtener el grado de Maestro en Investigación Biomedica Básica, UNAM, México.
- 77.-Lange, Y., Dlodé, J., Steck, T. L. (1981). The rate of transmembrane movement of cholesterol in the human erythrocyte. *J. Biol. Chem.* **256** (11):5321 - 5323.
- 78.-Voelker, D. R. (1985). En: *Biochemistry of lipids and membranes*, ed D. E. Vance, J. E. Vance, Menlo Park, Calif: Cummings, pag 475-502.
- 79.-Calanni, R. F., Baracca, A., Solaini, G., Rabbi, A., Parenti, C. G. (1986). Effects of cholesterol on the kinetics of mitochondrial ATPase. *FEBS Letters*, **198**(2):353-356.
- 80.-Tzagoloff, A., Mac Lennan, H. D., Byington, H. K. (1968). Studies on the Mitochondrial Adenosine Triphosphatase System III. Isolation from the Oligomycin-Sensitive Adenosine Triphosphatase Complex of the Factors Which Bind F_1 and Determine Oligomycin Sensitivity of Bound F_1 . *Biochemistry*, **7** (4):1596-1602.
- 81.-Mac Lennan, H. D., Tzagaloff, A. (1968). Studies on the Mitochondrial Adenosine Triphosphatase System IV. Purification and Characterization of the Oligomycin Sensitivity Conferring Protein. *Biochemistry*, **7** (4):1603-1610.
- 82.-Cherniak, B. V., Dedov, V. N., Gabai, V. L. (1994). Mitochondrial ATP hydrolysis and ATP depletion in thymocytes and Ehrlich ascites carcinoma cells. *FEBS letters*, **337**:56-59.
- 83.-Capuano, F., Varone, D., D'Eri, N., Russo, E., Tommasi, S., Montemurro, S., Prete, F., Papa, S. (1996). Oxidative Phosphorylation and F_0F_1 ATP Synthase Activity of Human Hepatocellular Carcinoma. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **38** (5):1013-1022.
- 84.-Brdiczka, D. (1991). Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy - and protein - transfer. *Biochim. Biophys. Acta* **1071**:291-312.
- 85.-Worku, Y., Newby, A. C. (1982). Nucleoside exchange catalysed by the cytoplasmic 5'-nucleotidase. *Biochem. J.* **205**:503-510.
- 86.-Baiocchi, C., Pesi, R., Turriani, M., Tozzi, M. G., Camici, M., Ipata, L. P. (1993). Membrane-bound 5'-nucleotidase/nucleoside phosphotransferase from *Bacillus Cereus*. *Int. J. Biochem.* **205** (11):1625-1629.