



DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS

EFECTO DEL POTASIO EN EL MECANISMO DE SÍNTESIS
DE PROGESTERONA EN LAS MITOCONDRIAS DE LA
PLACENTA HUMANA..

T E S I S
QUE SUSTENTA LA
MAESTRA EN CIENCIAS
REBECA ETELVINA MILAN CHAVEZ
PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, D.F.

JUNIO 2011



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.

Indice

Resumen.....	3
Abstract.....	3
Introducción	4
Antecedentes.....	4
1.1 Desarrollo de la Placenta.....	6
1.2 Esteroidogénesis.....	9
1.3 Transporte de K ⁺	15
Planteamiento del Problema.....	20
Hipótesis.....	20
Objetivos.....	20
Materiales y Métodos.....	21
Resultados	
1.1 Esteroidogénesis mitocondrial.....	25
1.2 Transporte de K ⁺	29
1.3 Localización de la subunidad Kir 6.1.....	32
1.4 Fosforilación de proteínas mitocondriales.....	32
1.5 Sitios de contacto.....	33
1.6 Discusión y Conclusión.....	35
Referencias.....	40

Apéndice

R Milan, O Flores-Herrera, MT Espinosa-Garcia, S Olvera-Sanchez, F Martinez.
Contribution of Potassium in Human Placental Steroidogenesis. Placenta 31(2010)
860-866.

EFFECTO DEL POTASIO EN EL MECANISMO DE SÍNTESIS DE PROGESTERONA EN LAS MITOCONDRIAS DE LA PLACENTA HUMANA

Resumen

El potasio (K^+) es el catión intracelular más abundante, entre sus funciones se encuentra la de mantener la osmolaridad, pero también tiene un papel importante manteniendo el potencial de la membrana el cual es necesario para la transmisión del impulso nervioso. El efecto del K^+ no solamente se da a nivel citosólico sino que también en las mitocondrias de hígado de rata se ha descrito que cambios en la concentración de K^+ modifican su actividad acelerando la fosforilación oxidativa.

En mitocondrias de la placenta humana se encontró que existen cambios en la morfología en presencia K^+ así como también la esteroidogénesis se ve favorecida conforme aumenta la concentración de K^+ .

Abstract

Potassium (K^+) is the most abundant intracellular cation, among its functions is to maintain osmolarity, but also has an important role in maintaining membrane potential necessary for the transmission of nerve impulses. The effect of K^+ does not only happen at cytosol but also in rat liver mitochondria had been reported that changes in K^+ concentration alter their activity by accelerating the oxidative phosphorylation.

In human placental mitochondria was found that there are changes in the morphology in the presence of K^+ as well the steroidogenesis is enhanced with increasing concentration of K^+ .

INTRODUCCION

Los tejidos esteroidogénicos como el ovario, el testículo, las glándulas suprarrenales así como la placenta tienen la capacidad de transformar al colesterol en pregnenolona y posteriormente a las diferentes hormonas esteroides como pregnenolona, progesterona y aldosterona. Al igual que otros procesos celulares la esteroidogénesis se encuentra regulada a través de varios mecanismos entre los que se encuentran la fosforilación de proteínas, la movilización de colesterol de sus depósitos así como la síntesis de diversas enzimas asociadas al transporte como a las de la cadena P450 scc (side cleavage chain).

El mecanismo la estimulación de la esteroidogénesis está mediado por hormonas entre las que se encuentran la hormona luteinizante (LH) así como la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) las cuales al unirse a su receptor generan segundos mensajeros que median en este proceso. Pero no solamente las hormonas pueden modular a la esteroidogénesis sino que se ha descrito en caso de las glándulas suprarrenales que cambios en la concentración de potasio (K^+) estimulan al proceso.

Pero en la placenta no se conoce los mecanismos que regulan la síntesis de progesterona.

ANTECEDENTES

Los iones en la célula no solamente sirven para mantener el potencial de la membrana plasmática, sino que cambios en su concentración modifican al metabolismo celular, teniendo un papel como mensajeros celulares (Orlov et al., 2006). El potasio (K^+) es el principal catión intracelular; su concentración citoplasmática es de 100-140 mM (Brierley et al., 1994; Inoue et al., 1991; Noma, 1983), siendo mayor en la mitocondria (140-180 mM) (Garlid, 1996). Entre las funciones que desempeña el K^+ en la célula no solo se encuentra la de mantener la osmolaridad, sino que es necesario para la actividad de la piruvato cinasa (Oria et al., 2005). Así mismo se ha encontrado que cambios en la concentración de iones modulan la expresión de ciertas proteínas como lo descrito por el grupo de Takemori et al (2002) que demostró que al aumentar la concentración de K^+ extracelular se produce la activación de una cinasa denominada cinasa inducible por sales y cuya actividad está asociada a la esteroidogénesis en las glándulas adrenales, a la respuesta a la insulina en los adipocitos (Horike, 2003) y a la despolarización inducida por el K^+ en las neurona (Feldman, 2000). En diferentes tipos celulares los cambios en la concentración extracelular de K^+ se asocian con la excitabilidad neuronal, la transmisión del impulso eléctrico y la viabilidad por ejemplo, es necesario restablecer la concentración citoplasmática de K^+ para mantener la actividad de las neuronas por lo que el K^+ que entra a la célula es transportado hacia la mitocondria, manteniendo así la concentración de K^+ citoplasmático y la función neuronal (Kozoriz et al., 2010).

Los cambios en la concentración mitocondrial de K^+ no solamente se dan en las neuronas, sino también se han observado en las mitocondrias hepáticas de ratas tratadas con glucagón en las que se encontró un aumento en la respiración mitocondrial el cual ha sido vinculado con un aumento en el volumen mitocondrial asociado con la entrada de K^+ (Halestrap 1987). Los cambios en la concentración de K^+ no solamente activan a la mitocondria en sus funciones respiratorias y en los procesos de la fosforilación oxidativa sino que se ha descrito que en células de la corteza suprarrenal los cambios en la concentración extracelular de K^+ de 0.5 mM aumentan la reducción del $NADP^+$ mitocondrial, así como la estimulación de la

producción de aldosterona. Se ha descrito que la estimulación por el aumento en la concentración de K^+ citosólico conlleva a la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico que es secuestrado por la mitocondria generando un aumento en la concentración de Ca^{2+} mitocondrial libre (Spät et al., 2004) estimulando a la isocitrato deshidrogenasa dependiente de $NADP^+$. Pequeños cambios en la concentración de K^+ mitocondrial son suficientes para que exista una modificación en el metabolismo de las células de la glomerulosa y en la esteroidogénesis.

En la placenta humana cuando se emplea sacarosa o K^+ para evaluar el efecto de la osmolaridad sobre ciertas actividades mitocondriales como son la respiración en presencia de 100 mM K^+ se estimula el estado 3 pero hay una disminución del estado 4 debido a que el control respiratorio es la relación entre los estados respiratorio este ve mejorado. Otra de las funciones que se vio modificada fue el transporte de Ca^{2+} que en presencia de sacarosa presenta dos fases: una rápida que se da durante los primeros 10 segundos siendo dependiente de la concentración de Ca^{2+} y una segunda fase lenta que se caracteriza por ser independiente de la concentración de Ca^{2+} . En cambio, en presencia de K^+ , la cinética del transporte de Ca^{2+} se vuelve simple.

Pero no solamente las actividades mitocondriales se modificaron, sino que también la morfología de las mitocondrias cuando se aislaron en un medio con sacarosa se encuentran dispersas, mientras que aquellas que fueron aisladas con K^+ se muestran agregadas (Fig. 1). Estos cambios están dados por la presencia del K^+ y no por la osmolaridad (Martínez et al. 1995).

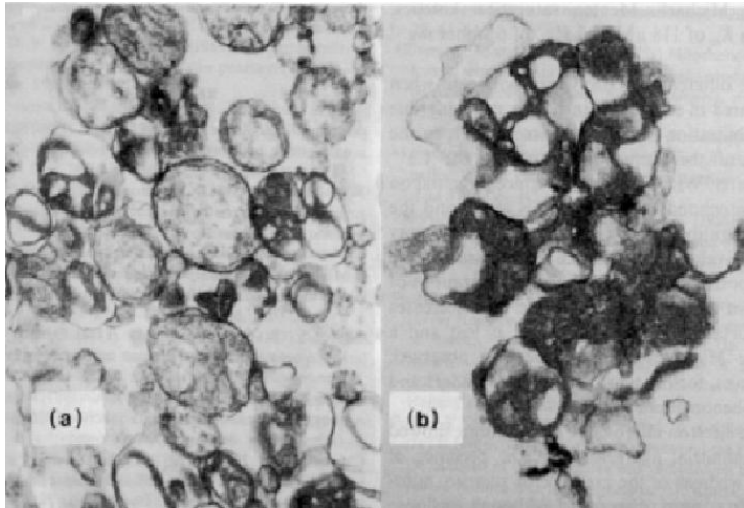


Figura 1. Mitocondrias aisladas en un medio con sacarosa (a). Mitocondrias aisladas en un medio con KCl como agente iso-osmótico (b). (Martínez et al. 1995).

Desarrollo de Placenta

La placenta es un órgano transitorio, que funciona como interfase entre el producto y la pared uterina de la madre durante etapas tempranas del desarrollo. Este órgano regula la absorción de nutrientes, eliminación de desechos metabólicos y el intercambio de gases con el sistema circulatorio de la madre, durante la vida in útero.

Desde aproximadamente el tercer día después de la fecundación, al final de la etapa del desarrollo denominada segmentación, se inicia la formación de un tejido epitelial especializado en la superficie de la mórula, dando origen al blastocisto. El epitelio plano simple en la superficie del blastocisto se denomina trofoblasto y se encarga de proporcionar una barrera selectiva entre el embrioblasto (porción interna) y el medio circundante. Es este tejido con el cual se establece el reconocimiento e interacción con endometrio materno y a partir de la adhesión del trofoblasto al endometrio, la proliferación celular del trofoblasto genera dos estratos epiteliales hacia el final de la primera semana. El estrato original cuya división celular es la típica de cualquier otro tipo celular del cuerpo, denominada citotrofoblasto y el nuevo estrato cuya proliferación celular carece de

citocinésis, por lo que se forma un tejido sincicial, invasivo y con importantes propiedades endocrinas llamado sinciciotrofoblasto (Fig. 2).

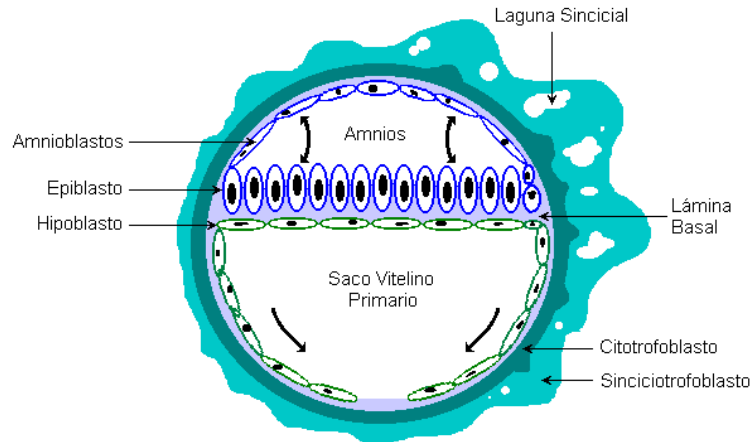


Figura 2. Esquematación de la transformación del trofoblasto en una estructura de dos estratos, citotrofoblasto y sinciciotrofoblasto, durante el proceso de invasión del tejido endometrial (anidación) (Castillo-Romero 2002).

A principios de la tercera semana del desarrollo, el embrioblasto (las células internas del blastocisto) sufre el proceso de gastrulación, por medio del cual se forman los tres tejidos característicos el endodermo, mesodermo y ectodermo. La porción extraembrionaria del mesodermo en conjunto con los estratos del trofoblasto conforma el corion. Conforme el sinciciotrofoblasto degrada e invade el tejido endometrial, se forman lagunas sinciciales que se llenan de sangre materna, y posteriormente éstas se transforman en los espacios intervillosos de la cara materna de la placenta. Al progresar la invasión e incorporación del blastocisto en los estratos internos del tejido endometrial del útero se genera el desarrollo de las vellosidades coriales. Las vellosidades coriales se denominan primarias cuando están constituidas sólo por trofoblasto, secundarias cuando han sido invadidas en su parte central por mesodermo corial (extraembrionario) y terciarias cuando a partir del mesodermo se inicia la formación de los vasos coriales (Fig. 3). El conjunto de las cuatro capas de tejido, endotelio de vasos coriales, mesodermo corial (extraembrionario), y los dos estratos del trofoblastos constituyen la barrera

placentaria. Esta barrera es una estructura selectiva a través de la cual se logra el intercambio de gases (O_2 y CO_2 principalmente), nutrientes y desechos metabólicos, que separa las circulaciones sanguíneas fetal y materna.

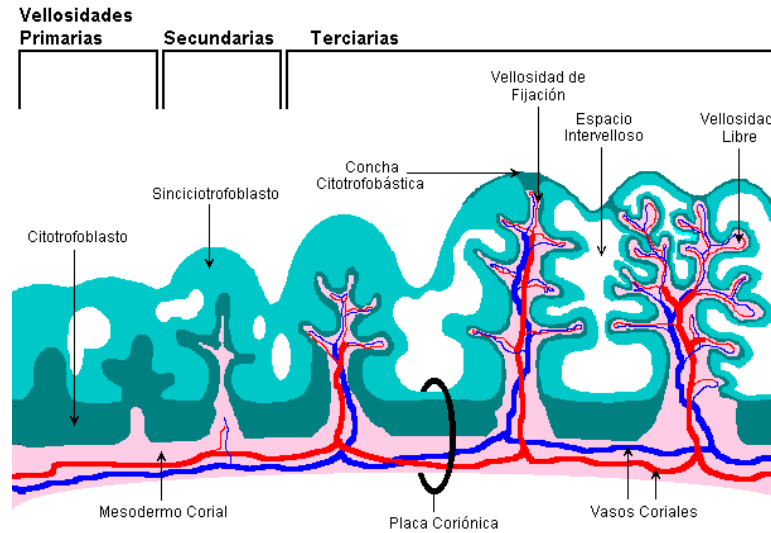


Figura 3. Esquema del desarrollo de las vellosidades coriales. Los tejidos que separan la circulación sanguínea fetal y la sangre materna son el endotelio de los vasos coriales del producto, el estroma placentario derivado del mesoderma corial, en citotrofoblasto y el sincitiotrofoblasto, que en conjunto constituyen la barrera placentaria (Castillo-Romero 2002).

El corion se forma por toda la superficie del blastocisto, pero posee una polaridad por la diferencia temporal en su desarrollo desde el punto de contacto inicial del trofoblasto con el endometrio. Esta diferencia en la formación de las estructuras derivadas del corion van mas avanzadas en la región de contacto inicial (corion frondoso), mientras que la porción que interactúa con el tejido endometrial se encuentra menos desarrollada (corion leve). Es a partir de la región del corion frondoso que la placenta se forma, mientras que en el corion leve degeneran las vellosidades coriales y se transforma en corion liso (Fig. 4) (Castillo-Romero ME 2002).

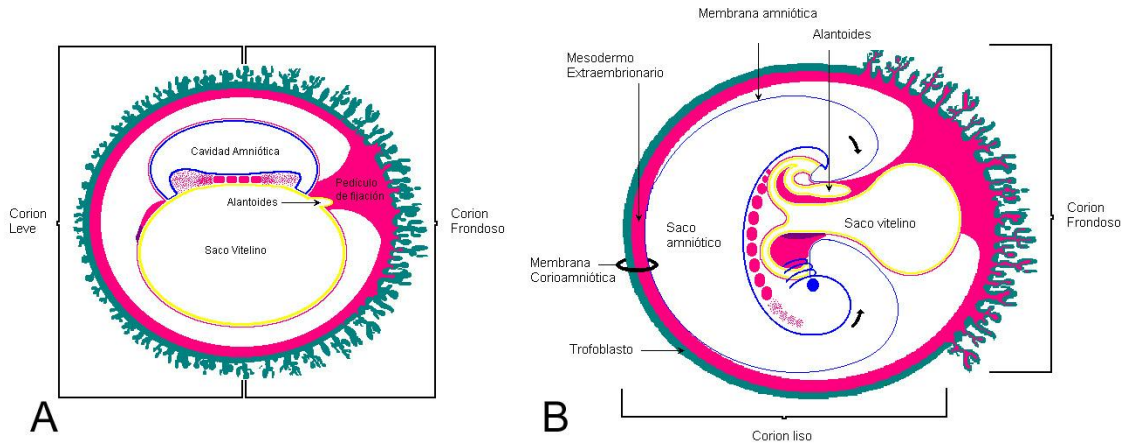


Figura 4. Transformación de las estructuras coriales. En etapas tempranas de su desarrollo (A) el corion frondoso es la porción que da origen a la placenta y corion leve que se transforma en corion liso y que en conjunto con el saco amniótico forma la membrana corioamniótica (B) (Castillo-Romero 2002).

Esteroidogénesis

El proceso de la esteroidogénesis requiere de la movilización del colesterol desde los depósitos presentes en el citosol hacia la mitocondria, para lo cual se requiere de un estímulo hormonal. En las células suprarrenales el estímulo está dado por las hormonas tróficas como la hormona lutenizante (LH) y la adrenocorticotrópica (ACTH), que al unirse a su receptor membranal, mismo que está acoplado a la proteína G, activa a la adenilato ciclasa asociada a la membrana que cataliza la formación de AMPc, activando a una proteína cinasa A, que fosforila diferentes factores de transcripción asociados con la expresión de la proteína transportadora del colesterol.

En glándulas adrenales, así como en las células de la granulosa los depósitos de colesterol se restablecen mediante la captura de colesterol a través de las lipoproteínas. La conversión de colesterol en pregnenolona se lleva a cabo en la mitocondria, por lo cual se requiere de un sistema que permita su transporte a través del citosol hacia la matriz en donde mediante ruptura de la cadena lateral del colesterol por el citocromo P450 scc (**s**ide **c**leavage **c**hain) se obtiene pregnenolona (Hall PF., 1987) siendo el transporte de colesterol hacia la mitocondria el paso limitante de la vía.

Se han identificado diversas proteínas asociadas con el transporte de colesterol desde el citosol hacia la mitocondria entre ellas se encuentra la proteína transportadora de esteroides (**S**terol **C**arrier **P**rotein) (SCP₂), cuya función está relacionada con el movimiento del colesterol entre los lisosomas y los diferentes compartimentos celulares. En estudios realizados con preparaciones citosólicas de células adrenales incubadas con el anticuerpo de la SCP₂ se inhibe la síntesis de pregnenolona, pero solamente sucede en las preparaciones citosólicas, ya que en la fracción mitocondrial no se observa la inhibición ya que la síntesis de pregnenolona se mantuvo en presencia del anticuerpo anti-SCP₂ (Vahouny et al., 1983) lo que indica que existe otra proteína transportando el colesterol en la mitocondria manteniendo la esteroidogénesis pero el papel principal de esta proteína está asociado con el movimiento de fosfolípidos y ácidos grasos (Kriska et al., 2010).

Otra de las proteínas involucradas en el transporte de colesterol es la proteína activadora de la esteroidogénesis (**S**teroidogenesis **A**ctivator **P**olypeptide) (SAP). Esta proteína fue aislada por Pedersen y Brownie (1983) tiene una masa molecular de 3.2 kDa (30 residuos de aminoácidos). Está proteína es producto de la proteólisis de una proteína de choque térmico de 78 kDa denominada proteína reguladora de glucosa (GRP78) identificada en la rata. La estructura de SAP tiene identidad con los 29 aminoácidos del carboxilo terminal de la región 608-636 de la proteína de choque térmico. La presencia de GTP, pero no de otros nucleótidos, estimula la actividad de la cadena del P450_{scc}, así como la expresión de la proteína SAP. Esta relación entre el GTP y la proteína SAP en el paso limitante de la translocación del colesterol sugiere que el transporte de colesterol requiere de energía (Xu et al., 1991).

La unión de ACTH a su receptor genera un aumento en la producción de los niveles de AMPc, este segundo mensajero estimula a la esteroidogénesis en dos etapas. En la inicial existe un aumento en los niveles de expresión de SAP esto es en los primeros minutos de la estimulación y se le denomina regulación de tipo aguda, en la segunda etapa es a largo plazo o crónica que puede durar horas o días siendo su regulación a nivel genes de las proteínas asociadas con la

esteroidogénesis como la cadena del citocromo P450_{scc} así como de la proteína SAP o aquellas proteínas involucradas en el transporte de colesterol. En experimentos con inhibidores de la síntesis de proteínas se bloqueó el efecto de las hormonas pituitarias así como de los análogos del AMPc en la producción de esteroides. En estos experimentos también se encontró que se acumula colesterol libre en la membrana externa mitocondrial, lo que nos indica que en este sistema se encuentra bloqueada la síntesis de la proteína involucrada en el transporte de colesterol entre las membranas mitocondriales.

En la actualidad se ha demostrado que ni la proteína SAP ni la SCP₂ son esenciales para el transporte de colesterol. Se describió que la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (Steroidogenic Acute Regulatory, StAR) es indispensable para que se lleve a cabo el transporte de colesterol y la esteroidogénesis (Christenson et al 2000), ya que su ausencia ocasiona la aparición del síndrome adrenal lipóide (Pollack et al., 1997, Fujieda et al 2003., Strauss et al., 2004). La proteína StAR se identificó como una fosfoproteína de 30 kDa asociada a la mitocondria, pero esta proteína proviene de un precursor de mayor peso molecular que aparece después de los primeros minutos del estímulo hormonal. Orme-Johnson (1990) demostró que se sintetiza una proteína de 37 kDa que es fosforilada y en los primeros minutos después de la estimulación es procesada hacia su forma madura de 30 kDa que se encarga del transporte de colesterol del citosol hacia la mitocondria. Las drogas que colapsan el potencial de la membrana mitocondrial inhiben el transporte de la proteína hacia la mitocondria. La proteína StAR fue la primera proteína que se identificó que contenía un dominio de fijación para el colesterol al que se le llamó sitio START.

A diferencia de lo que ocurre en otros tejidos esteroidogénicos, la placenta humana carece de la proteína StAR, pero se ha descrito la presencia de la proteína MNL64 que contiene el dominio START para fijar al colesterol, esta proteína se encontró por primera vez en células tumorales de mama y ovario. Al comparar esta proteína con la proteína StAR, el 37% de sus aminoácidos del extremo carboxilo terminal son idénticos así como un 60% de aminoácidos son similares (Watari et al., 1997). La proteína MNL64 en su extremo amino terminal

contiene el péptido o secuencia líder y mas adelante, cuatro cruces transmembranales, por lo que se asoció su función de transporte de colesterol a diferentes compartimentos celulares de manera semejante a como lo lleva a cabo la proteína StAR.

La proteína MNL64 se localizó en los endosomas tardíos que están relacionados con el transporte de colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad (**Low Density Lipoprotein**), que en el humano proporcionan el colesterol para la biosíntesis de hormonas esteroides (Alpy et al., 2001; Neufeld et al., 1999; Watari et al., 2000). La liberación del sitio START de la proteína MNL64 permite que ésta funcione como una proteína transportadora de colesterol desde los endosomas hasta la mitocondria.

En la placenta humana no se ha descrito a la proteína responsable de llevar a cabo el transporte de colesterol hacia la mitocondria, pero se ha identificado a la proteína MNL64. En preparaciones mitocondriales, se identificó al fragmento START liberado de los endosomas, pudiéndose llevar a cabo de esta forma el transporte de colesterol hacia mitocondria como la proteína StAR en otros tejidos esteroideogénicos (Sugawara et al., 1995; Bose et al., 2000).

El transporte de colesterol entre las membranas mitocondriales se realiza a través de los sitios de contacto entre las membranas mitocondriales. Los sitios de contacto son estructuras dinámicas que se forman de acuerdo a las necesidades de la mitocondria siendo de diferente naturaleza, entre los que se encuentran para el transporte de proteínas, metabolismo energético (Brdizcka, 1991), los involucrados en procesos apoptóticos (Kroemer et al., 2000). La formación de los sitios de contacto puede darse tanto por estímulos hormonales como por cambios en el volumen asociado con el movimiento de K^+ (Halestrap et al., 1987). En los tejidos esteroideogénicos se han caracterizado las proteínas que conforman a los sitios de contacto entre las que se encuentran el translocador de los adenín nucleótidos, la porina, la creatina cinasa en su forma octamérica, así como el receptor periférico a las benzodiazepinas y una GTPasa, entre otras proteínas (Thomson et al., 1998).

Las mitocondrias de la placenta humana también forman sitios de contacto para el transporte de colesterol. Entre las proteínas que forman los sitios de contacto se encuentran la porina, la creatina cinasa, el traslador de los adenín nucleótidos, así como la apirasa, esta enzima puede hidrolizar tanto mono, di y tri nucleótidos y cuando se inhibe no hay síntesis de progesterona, al parecer proporciona la energía necesaria para la translocación de colesterol (Flores-Herrera et al., 2002); de manera similar como lo hace la GTPasa que está presente en células suprarrenales (Xu y Lamberth, 1989). También se ha descrito la presencia de una proteína de choque térmico (HSP60) (Uribe et al; 2003) así como una proteína parecida a la porina que probablemente puede unir al colesterol (Fig. 5) y de esa manera transportarlo hacia el interior de la mitocondria (Jefcoate et al., 1995; Espinosa-Garcia et al., 1996), en donde se encuentra el citocromo P450/Cyp11A que se encarga de transformar el colesterol en pregnenolona. Las mitocondrias de la placenta humana cuentan con la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ^5 - Δ^4 - isomerasa en la membrana interna mitocondrial que transforma a la pregnenolona en progesterona (Thomas et al., 1989; Martinez et al., 1997). La progesterona tiene un papel relevante en el embarazo ya que facilita la implantación e impide las contracciones uterinas. El mecanismo mediante el cual se realiza esto todavía no se conoce todo el mecanismo pero se ha descrito la presencia de receptores a la progesterona en las células de la decidua, estos receptores se han asociado con complejos multiproteicos que se unen con genes que responden a la presencia de la progesterona (Hertelendy 2007).

La entrada de K⁺ a las mitocondrias va acompañada de un aumento en su volumen, favoreciendo la formación de sitios de contacto tanto en las mitocondrias de hígado, como en las glándulas suprarrenales (Brdiczka, 1991; Stocco, 2000; Thomson, 1998 Halestrap et al., 2003).

Los cambios en la concentración mitocondrial de K⁺ estimulan la respiración, esto se ha descrito en mitocondrias de hígado de rata, en las que tanto el estado 3 o el estado desacoplado es mayor que en presencia de sacarosa, mientras que el estado 4 permanece constante (Devin et al., 1997). Al

analizar cómo se distribuye el control de flujo en la cadena de transporte de electrones se encontró que en un medio con sacarosa el acarreador de los adenín nucleótidos es quién ejerce el control, dando así el control al sistema fosforilante, mientras que en un medio con K^+ , es mayor el coeficiente de control de flujo de la citocromo c oxidasa, por lo que el control de la respiración lo tiene la cadena de transporte de electrones (Devin et al., 1997; Halestrap et al., 1986). Por lo que tanto el movimiento de K^+ a la mitocondria puede modular su función.

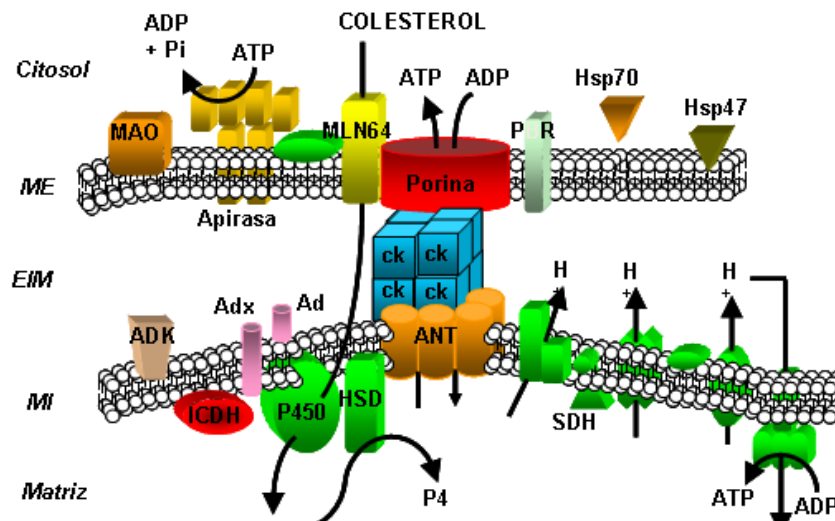


Figura 5. Modelo propuesto para los sitios de contacto de las mitocondrias de la placenta humana: Adrenodoxina reductasa (ADX), Adrenodoxina (Ad), Monoaminooxidasa (MAO), Translocador de los adenín nucleótidos (ANT), Creatina cinasa (ck), Succinato deshidrogenasa (SDH), Isocitrato deshidrogenasa (ICDH) (Uribe et al; 2003).

El grupo de Kawato describió en mitocondrias de las glándulas suprarrenales de bovino que el 33% del citocromo P450_{scc} se asocia con otras proteínas de la membrana interna mitocondrial que no son esteroideogénicas y que en presencia de 100 mM K^+ , la asociación con la adrenodoxina y la adrenodoxina reductasa aumenta en un 88% y que esta asociación se pierde conforme disminuye la concentración de K^+ (Ohta et al., 1991).

Transporte de K^+

La célula cuenta con diferentes tipos de canales para poder llevar a cabo el transporte de iones, entre los canales que más se han estudiado se encuentran los canales de K^+ . Para poder conocer cómo funcionan y las subunidades que

componen estos canales se realizan estudios de mutaciones, mediante los cuales se puede conocer la región de la proteína en donde se encuentra el poro que permite el transporte del ión. En la actualidad, en mamíferos se ha descrito la presencia de 75 genes que codifican para canales de K^+ . La diversidad entre los diferentes canales se explica debido al corte y empalme alternativo que existe en el procesamiento del RNA mensajero, otra de las explicaciones del porque existen tantos canales de K^+ en la membrana plasmática es la forma en que se ensamblan las diferentes subunidades que conforman los canales (Fig. 6). (Jenkinson, 2006). También se han realizados varios estudios tanto de hibridación *in situ* como de inmunohistoquímica, pero estos estudios solamente permiten conocer la localización subcelular del canal, así que para poder entender el funcionamiento y regulación de los canales se realizan estudios de electrofisiología y farmacología. En su conjunto estos estudios permiten conocer cómo es la expresión, localización y funcionamiento del canal (Olson, 2010).

Como criterio principal de la clasificación de los canales de K^+ se emplea el número de cruces transmembranales, con base en esta clasificación los canales se dividen en tres familias principalmente de dos, cuatro y seis cruces membranales (Doyle, 1998).

Una de las funciones asociada con los canales de K^+ es el transporte del ion entre la célula y su medio ambiente, así como entre los diferentes compartimentos celulares. Así pues, en la membrana interna mitocondrial se han descrito canales de K^+ parecidos a los que se encuentran en la membrana plasmática, los siguientes canales han sido descritos en la membrana interna mitocondrial: el canal de K^+ regulado por la presencia de ATP (mitoK_{ATP}); un canal de K^+ activado por Ca^{2+} (mitoBKCa), el canal de K^+ dependiente de voltaje (mitoKv1.3) y el canal TASK-3. Las subunidades que componen a los canales mitocondriales son de la misma familia de los están componiendo a los canales de K^+ presentes en la membrana plasmática y por lo mismo aparentemente comparten los mismos mecanismos de regulación (Szewczyk et al., 2009).

El canal de K^+ regulado por Ca^{2+} (BK_{Ca}) se encuentra ampliamente distribuido en la membrana plasmática tanto de células excitables como de no

excitables. Por primera vez, se identificó a este canal en músculo liso y cerebro. El BK_{Ca} es un tetrámero constituido por subunidades alfa y beta, hasta la fecha se han clonado 4 subunidades beta. El tipo de subunidad beta que constituye al canal es dependiente del tejido en donde se exprese el canal, por ejemplo el canal que se encuentra en las neuronas está conformado por las subunidades ($\beta 2$ y $\beta 4$). (Wallner, 1999).

El canal BK_{Ca} se identificó en mitocondrias de cerebro de rata, así como en la línea celular LN229 que deriva de un glioma humano (Siemen 1999); la apertura del canal se da por la presencia de Ca²⁺ o por el compuesto NS1619, esto permite la entrada de K⁺ el canal se bloquea en presencia de la carbadotoxina (ChTX) (Kulawiak & Bednarczyk, 2005).

En el corazón, el canal mitoBK_{Ca} funciona como cardioprotector ya que al abrirse permite la entrada de K⁺ a la mitocondria a favor de su gradiente electroquímico, lo que produce una despolarización de la membrana y aumenta la oxidación de la flavoproteínas, lo que se interpreta como una mayor actividad de la cadena de transporte de electrones (Sato et al 2005, Hannson et al 2010). Pero también al despolarizar a la membrana mitocondrial se impide que ésta se sobrecargue de Ca²⁺, ya que el transporte de este ión depende del potencial de membrana y con ello el daño y la muerte celular.

Los canales tipo TASK-3 se encuentran unidos a la membrana a través de 4 cruces transmembranales y su forma activa es dimérica, el canal que se ubica en la membrana plasmática participa en mantener el volumen celular y la homeostasis de K⁺; también se ha descrito que estos canales participan en la secreción hormonal y la liberación de neurotransmisores al participar en los cambios del potencial de membrana (Lesage and Lazdunski 2000). Pero aunque se ha localizado este canal en mitocondrias de keratinocitos así como en células de meloma, no se sabe que función tiene el canal TASK-3 en la mitocondria (Bednarczyk, 2009).

Presentes en el cerebro

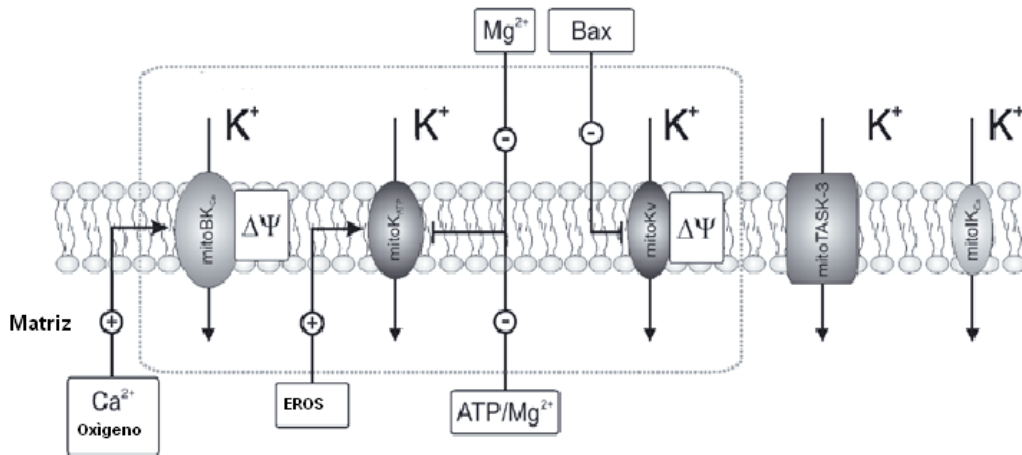


Figura 6. Canales mitocondriales de potasio. En la figura se muestran el canal mitoK_{ATP}, el canal de potasio regulado por calcio (mitoBK_{Ca}), canal de potasio de conductancia intermedia mediado por Ca²⁺ (mitoK_{Ca}), canal de potasio dependiente de voltaje (mitoK_v1.3) y el canal de potasio de dos poros (mito TASK-3) (Bdnarczyk, 2009).

Se ha descrito la participación de los canales de K⁺ en el mecanismo tanto de la cardio como de la neuroprotección (O' Rourke 2004, Ardehali 2005), previniendo la sobrecarga de Ca²⁺ en la mitocondria, pero en la actualidad no se conoce el mecanismo completo mediante el cual se protege la integridad mitocondrial y tampoco cual de los canales de K⁺ está involucrado en este proceso. Debido a la importancia que tienen los canales de K⁺ en mantener la homeostasis de iones y el volumen mitocondrial, uno de los canales que más se ha estudiado es el mitoK_{ATP}, la presencia de este canal se identificó por primera vez en mitocondrias del hígado y corazón (Paucek et al., 1992).

La activación del canal mitoK_{ATP} permite mantener el intercambio energético entre la mitocondria y el citosol durante condiciones de estrés (Garlid, 2006). Durante el estrés en la mitocondria se generan especies reactivas de oxígeno, que a su vez activan una serie de cinasas que pueden estar participando en el mecanismo de protección celular (Costa, 2008).

Durante la respiración mitocondrial, el cambio en el potencial transmembranal permite que el K⁺ se transporte hacia la matriz, la entrada y salida

de K^+ se mantiene en el estado estacionario mediante la salida de éste por el antiportador K^+/H^+ (Garlid and Paucek 2003). La entrada de K^+ por el canal mitoK_{ATP} trae consigo la entrada de agua así como el transporte de otros iones como el fosfato, dando lugar a un nuevo estado mitocondrial, que se caracteriza por tres cambios: un cambio en el volumen mitocondrial, una alcalinización de la matriz y por último, una aceleración en la respiración (Costa et al., 2006, Kowaltowski et al., 2001). La apertura del canal mitoK_{ATP} se encuentra regulada a nivel mitocondrial por una disminución en la concentración de ATP que es el inhibidor de canal. Una apertura prolongada del canal genera un mayor alcalinización de la mitocondria y una inhibición parcial del complejo I, lo que favorece la producción de especies reactivas de oxígeno (Andrukhiv, 2006).

Muchos grupos de investigación se han enfocado al estudio del proceso de isquemia–reperusión cardiaca y a la prevención del daño generado durante la patología. En el mecanismo de protección se ha sugerido que el transporte de K^+ a la mitocondria tiene un papel importante, por lo cuál se ha estudiado al canal responsable de este transporte al canal mitoK_{ATP} (Brierley et al., 1994; Inoue et al., 1991; Noma, 1983; Garlid, 1996). Se ha descrito que el canal MitoK_{ATP} está constituido por el receptor a sulfonilurea y una subunidad Kir 6.1 en una estequiometría 4:4 formando un hetero-octámero. Este canal se abre en presencia de ADP o GDP y se cierra por ATP-Mg (Noma, 1983). Sin embargo, el grupo de Marbán (1994) describió que el transporte de K^+ se lleva a cabo a través de un complejo multiproteico constituido por el translocador de los adenín nucleótidos, la succinato deshidrogenasa, el acarreador de fosfatos, un cassette mitocondrial de unión a ATP, la ATP sintetasa (α -subunidad). Al reconstituir el complejo multiproteico en liposomas, el transporte de K^+ fue similar a lo reportado por el canal mitoK_{ATP}, ya que puede inhibirse por glibenclamida. Al emplear malonato que es un inhibidor de la succinato deshidrogenasa pero en el complejo para el transporte de K^+ descrito por Marbán, aumenta la probabilidad de que el canal esté abierto permitiendo el flujo de K^+ (Marbán et al., 1994 Foster et al., 2008). Se ha descrito que el movimiento de K^+ en las mitocondrias del corazón está asociado con el fenómeno del preacondicionamiento y en la protección por el

daño en el infarto en este proceso se encuentra involucrado el canal mitoK_{ATP}, no se conoce en qué otros procesos fisiológicos participan los canales de K⁺.

En varios de los procesos celulares existe el movimiento de iones, mismos que pueden funcionar como segundos mensajeros en la célula, debido a que los mecanismos mediante los cuales se regula la síntesis de progesterona en las mitocondrias de la placenta humana (MPH) no se conocen, en este trabajo estudiamos el efecto que tiene el K⁺ en la esteroidogénesis de MPH.

Planteamiento del Problema

En las mitocondrias de la placenta humana no se conocen a los moduladores de la esteroidogénesis pero se ha descrito que el K^+ es capaz de modificar la morfología mitocondrial y ciertas actividades de la misma, entonces el K^+ bien puede funcionar como un modulador de la esteroidogénesis placentaria.

HIPÓTESIS

Los cambios en la concentración K^+ pueden facilitar la incorporación de colesterol y la síntesis de progesterona, entonces el K^+ podría modular la actividad mitocondrial y por lo tanto, la esteroidogénesis.

Objetivo General

Determinar el papel que tiene el K^+ sobre la síntesis de progesterona en las mitocondrias de la placenta humana.

Objetivos Particulares

- Determinar el mecanismo mediante el cual el K^+ modifica la síntesis de progesterona.
- Identificar el sistema de transporte mediante el cual se transporta el K^+ en las MPH.

Materiales y Métodos

Aislamiento de mitocondrias. La placenta humana se obtuvo de acuerdo al protocolo aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina. Las MPH del sinciotrofoblasto fueron aisladas de acuerdo a lo reportado por Martínez et al., (1997). La proteína mitocondrial fue cuantificada de acuerdo al método de Bradford (1976), usando suero de albúmina bovino como estándar. Para los estudios solamente se utilizaron MPH que tuvieran un control respiratorio superior a 4 con lo cual se aseguró que las MPH estuvieran integras y funcionales (Martínez et al., 1993).

Incorporación de colesterol. La incorporación de colesterol se llevó a cabo en las MPH de acuerdo a lo descrito por Martínez et al. (1988) usando un complejo albúmina-colesterol-albúmina. En todos los experimentos la osmolaridad se mantuvo constante en 240 mOsm, variando la concentración de sacarosa presente en el medio de reacción. La incorporación de colesterol se detuvo al diluir 1:5 (V:V) las MPH con una solución fría de 250 mM sacarosa, 1 mM EDTA, pH 7.4, seguida de una centrifugación para remover todo el colesterol que no estuviera incorporado a las MPH. El pellet mitocondrial fue suspendido con la solución de sacarosa-EDTA, este procedimiento se repitió tres veces. Se les determinó nuevamente la concentración de proteína y después el colesterol presente en las MPH mediante el uso de un estuche comercial (Spinreact, S.A. Ctra. Santa Coloma, España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

A las mitocondrias enriquecidas con colesterol se les determinó la síntesis de progesterona en un medio con 100 mM K^+ , tanto en presencia o ausencia de ATP.

Síntesis de progesterona. Las MPH así como las MPH-enriquecidas con colesterol se incubaron a 37 °C en un medio que contiene 10 mM malato como sustrato oxidable, en presencia y ausencia de ATP o ADP. Después de la incubación, la reacción se detuvo con 1.5 volúmenes de metanol frío. En experimentos posteriores, las MPH se incubaron en el medio denominado medio de síntesis de progesterona que contiene 5 mM isocitrato, 10 mM MOPS, 0.5 mM EGTA, 120 mM KCl e inhibidores de proteasas y se ajustó el pH 7.4 (García-Pérez

et al., 2002). La determinación de progesterona se realizó por radioinmunoensayo usando un estuche comercial (Diagnostic Products, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Fosforilación de Proteínas MPH. La fosforilación de las proteínas se llevó a cabo mediante la incubación de las MPH en presencia de ATP radioactivo ($\text{ADP-}\gamma\text{-}^{32}\text{P}$) con una actividad específica de 3,000 Ci/mmol en el medio de síntesis de progesterona. A los tiempos que se indican en cada figura, se tomó una alícuota y se le adicionó 1.5 volúmenes de metanol frío para detener la reacción. Las proteínas mitocondriales (10 μg por carril) se separaron en un gel al 10% de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes usando SDS-PAGE de acuerdo a lo reportado por Laemmli (1970). Los geles se expusieron a placas radiográficas y se revelaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Potencial de Membrana. Los cambios en el potencial de membrana en presencia de K^+ se determinaron en el medio de síntesis de progesterona con 1 mg de proteína mitocondrial/ml en un volumen final de 2.5 ml y se cuantificaron los cambios en la densidad óptica a 511 nm de Safranina O (2.5 μM) usando 533 nm como punto isobéptico, esto se realizó en un espectrofotómetro DW 2000 Aminco, como fue descrito por Åkerman and Wikström (1976). Como control, el potencial mitocondrial generado se abatió añadiendo 0.1 mM valinomicina.

Western blot. Las MPH se separaron por electroforesis de acuerdo a lo reportado por Laemmli (1970) en un gel al 10% SDS-poliacrilamida y se transfirieron a la membrana de polivinilideno fluoruro (PVDF). Después de bloquear con 10% de leche libre de ácidos grasos, se incubaron con el anticuerpo primario en contra con de la subunidad Kir 6.1 del canal K_{ATP} en una dilución 1:500. Se incubaron las membranas a 4°C durante 12 h y después se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado con peroxidasa de rábano en una dilución 1:15000 (Towbin 1979). Se empleó quimioluminiscencia para visualizar las bandas, como control positivo se utilizaron membranas plasmáticas de corazón de rata.

Aislamiento de sitios de contacto. Los sitios de contacto de las MPH se aislaron de acuerdo a lo descrito por Uribe et al., (2003). Brevemente, 20 – 25 mg MHP se incubaron en el medio denominado de síntesis de progesterona (García-Pérez et

al., 2002) por 20 min a 37°C complementado con 240 mM sacarosa o 120 mM KCl. Después se incubaron estas mitocondrias en un baño de hielo con 10 mM H₃PO₄, pH 7.3 ajustado con Tris base, después se volvieron a incubar por otros 20 min en el baño de hielo añadiendo sacarosa hasta una concentración final de 382 mM. Se centrifugó a 25,500 g x 10 min. En el botón se encuentran los mitoplastos y en el sobrenadante la membrana externa mitocondrial. Los mitoplastos se incubaron por 20 min en un baño de hielo con 1 mM H₃PO₄, pH 7.3 ajustado con Tris base, después de la incubación se adicionó sacarosa a una concentración final de 382 mM. Las dos fracciones mitocondriales se centrifugaron a 102,000 g por 1 h, después de lo cual cada fracción se sonicó 4 veces en un baño de hielo por 5 s, en un sonicador MSE Soniprep a una salida máxima de 150. Tanto las preparaciones de membrana interna como de la externa se colocaron en un gradiente discontinuo de sacarosa (1.06 a 1.29 g/ml densidad) y se centrifugaron a 96,000 g por 20 h a 4°C. Se colectaron las fracciones y se lavaron 3 veces con 250 mM sacarosa, 1mM EDTA a pH 7.4 ajustado con Tris base y se recuperaron por centrifugación a 137,000 g por 30 min a 4°C. Las proteínas mitocondriales (20 µg por carril) se separaron mediante un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE de acuerdo a lo reportado por Laemmli (1970).

Transporte de K⁺. El transporte de K⁺ al interior de la matriz mitocondrial en las MPH se realizó al incubarlas con 20 µM del indicador fluorescente acetoximetil éster (PBF1 AM) con agitación constante por 10 min a 25°C. Previamente se disolvió el PBF1 AM en DMSO en la relación 2:1 (vol/vol) con el surfactante no iónico ácido plurónico F-127 (Costa AD et al., 2006). La suspensión mitocondrial se diluyó con una solución fría de 250 mM sacarosa, 1 mM EDTA, pH 7.4 y se centrifugó 2 veces a 8,000 g r 3 min. Las MPH se resuspendieron en la solución de sacarosa y se mantuvieron en hielo hasta el momento de llevar a cabo la determinación del transporte de K⁺, realizada a temperatura ambiente, en la misma celda del espectro en la cual se fijaron las longitudes de onda de excitación en 340/380 nm y se determinó la fluorescencia a 500 nm.

Materiales. Sacarosa, KCl, colesterol, albúmina bovina (BSA) e inhibidores de proteasas se compraron de Sigma-Chemical, México. El estuche comercial para el radioinmunoensayo de progesterona fue comprado de Diagnostic, Products Corporation, Los Angeles, CA, USA. El ATP radioactivo ($ADP\gamma^{32}P$) se obtuvo de NEN, USA. El estuche comercial para la determinación de colesterol se compró a Spinreact, S.A. Ctra. Santa Coloma, España. Los otros reactivos utilizados fueron de grado analítico. El anticuerpo anti Kir6.1 se compró de Santa Cruz y GR Healthcare Life Sciences.

Análisis de datos. Por lo menos se realizaron tres experimentos de manera independiente por triplicado. Se muestran las medias de los datos \pm desviación estándar (DS), para el análisis estadístico se realizaron las siguientes pruebas de Tuckey, *t* Student, Anova de un factor con una prueba de Dunnett así como una Bonferroni y el análisis utilizado se muestra al pie de cada figura y tabla.

RESULTADOS

Esteroidogénesis mitocondrial

Las MPH presentan un alto contenido de colesterol que les permite llevar a cabo la síntesis de progesterona, sin embargo todavía pueden almacenar colesterol al incubarlas en presencia del complejo albúmina-colesterol-albúmina. La concentración de colesterol se incrementó de 35.6 a 61.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en presencia de 100 mM K^+ y hasta 102.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ cuando se adicionaron 2 mM ATP mas K^+ (Tabla 1) ($p < 0.05$). Con sacarosa el contenido de colesterol en las MPH fue de 48.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ y con 2 mM ATP fue de 89.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Tabla 1) ($p < 0.05$). Las mitocondrias con un exceso de colesterol se denominaron MPH-enriquecidas.

La síntesis de progesterona se cuantificó tanto en las MPH como en las MPH-enriquecidas, siendo la síntesis de progesterona mayor en aquellas mitocondrias que fueron incubadas en un medio con K^+ (Tabla 1).

	Colesterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	ng P4/ mg/min	
			+ 2 mM ATP
Mitocondrias control	35.6 \pm 8.4 ^a	10.74 \pm 1.15 ^c	16.61 \pm 1.94
Sacarosa	48.2 \pm 9.8	12.16 \pm 1.47	24.78 \pm 1.15
KCl	61.1 \pm 16.4 ^b	16.55 \pm 2.98 ^d	20.94 \pm 1.49
Sacarosa + ATP	89.1 \pm 9.5 ^b	15.72 \pm 0.87 ^d	19.9 \pm 2.81
KCl + ATP	102.5 \pm 14.9 ^b	22.24 \pm 3.2 ^d	28.29 \pm 2.45
	n = 4	n = 4	n = 4

Tabla 1. Incorporación de colesterol en mitocondrias de la placenta humana y su transformación en progesterona. Las mitocondrias de la placenta fueron enriquecidas con colesterol como se describe en la sección de Materiales y Métodos. En un medio de incubación 120 mM K^+ o sacarosa 240 mM y 30 μg complejo albúmina-colesterol-albúmina. Se utilizaron 2 mM de ATP. Se muestra la media \pm DS. El número de experimentos realizados de manera independiente se indica como n. Los resultados muestran una diferencia estadística en la incorporación de colesterol “a” vs “b”, en la síntesis de progesterona son estadísticamente diferentes “c” vs “d”. Con 2 mM ATP hay diferencia estadística entre todos los grupos. Los resultados se analizaron mediante una prueba de Tuckey ($p < 0.05$).

La incorporación de colesterol aumentó de una manera dosis dependiente en presencia de K^+ , y se ve favorecida por la presencia de ATP o ADP ($p < 0.05$), pero no hubo una diferencia estadística en cuanto al uso del nucleótido en ambos casos las mitocondrias incorporaron un 20% más de colesterol (Fig. 7).

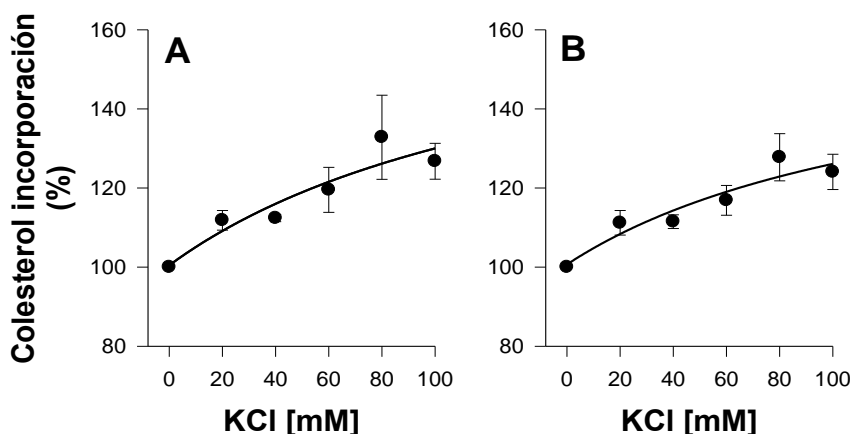


Figura 7. Incorporación de colesterol exógeno en la presencia de K^+ y nucleótidos. Las MPH se incubaron por 10 min a $37^{\circ}C$ en presencia de concentraciones crecientes de K^+ y $30 \mu g$ colesterol/mg BSA in $200 \mu l$ del medio que contiene 10 mM malato, 0.2% BSA, 1mM EDTA, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4. La osmolaridad se mantuvo en 250 mOSM con sacarosa. Al medio se le adicionó 2 mM ATP(A) o ADP (B). Los datos son la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los resultados se analizaron mediante una *t* Student y no hay diferencia significativa. Las barras indican la DS.

La síntesis de progesterona en las MPH con K^+ presentó un comportamiento dosis respuesta (Fig. 8). Se observó un aumento de 7.82 ± 1.14 ng P4/mg/min a 10.05 ± 1.7 ng P4/mg/min con 100 mM K^+ . En presencia de 2 mM ATP la síntesis de progesterona aumentó de 8.96 ± 2.25 ng P4/mg/min a 14.93 ± 5.13 ng P4/mg/min con 100 mM K^+ , siendo éste un incremento estadísticamente significativo con respecto al control o en presencia de ADP ($p < 0.05$).

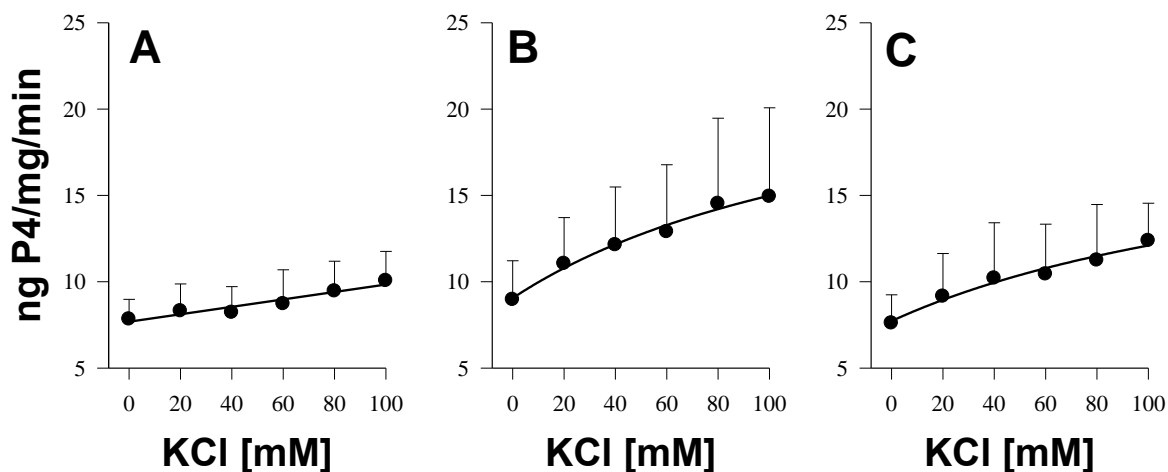


Figura 8. Síntesis de progesterona en presencia de ATP o ADP y concentraciones crecientes de K⁺. La síntesis de progesterona se determinó a 37°C en presencia de concentraciones crecientes de (A) K⁺ (n= 5); más 2 mM ATP (B) (n= 10) o más 2 mM ADP (C) (n = 9). Los resultados son la media de experimentos realizados de manera independiente. Mediante un análisis estadístico de un Anova de un factor posteriormente se realizó una prueba de Dunnett hay diferencia estadística entre el control vs ATP (p<0.05) y ATP vs ADP (p<0.05). Las barras indican DS.

Al aumentar la concentración de K⁺ se estimuló la síntesis de progesterona, lo cual podría estar relacionado con el transporte de K⁺ al interior de la mitocondria, por lo que se estudió el efecto de diversos inhibidores del canal mitoK_{ATP} en la síntesis de progesterona. En la tabla 2 se muestra la síntesis de progesterona en presencia de glibenclamida y quinina que se unen a la subunidad SUR del canal y tetrafenilfosfonio (TPP) que se une a la subunidad Kir del canal mitoK_{ATP}. La síntesis de progesterona se estimuló en presencia de glibenclamida y TPP siendo estadísticamente diferente con respecto al control. Al emplearse malonato para aumentar la probabilidad de que el canal permanezca abierto de acuerdo a lo reportado por Aedeali (2004), la síntesis de progesterona no cambió con respecto al control. Los datos sugieren que no se requiere del transporte de K⁺ a la mitocondria para que la síntesis de progesterona se vea favorecida.

	Control ^a	Glibenclamida ^b (50 μ M)	Quinina (1 mM)	TPP ^b (100 nM)	Malonato (10 mM)
	11.72 \pm 3.2	16.29 \pm 2.24	10.48 \pm 3.6	17.33 \pm 3.5	12.52 \pm 2.51
n	15	7	4	5	6

Tabla 2. Efecto de los inhibidores del canal de K⁺ en la síntesis de progesterona en MPH. El medio de incubación contiene: 5 mM isocitrato, 0.5 mM EGTA, 10 mM MOPS, 120 mM KCl, 1 μ g/mg leupeptina and 4 μ g/mg aprotinina. Los resultados se expresan en ng progesterona-min-mg MPH y son la media de experimentos independientes \pm DS. El número de experimentos independientes se expresan como n. Los datos se analizaron mediante una prueba estadística de Tuckey. Son estadísticamente diferentes entre el control (a) y glibenclamida (b) o TPP (b) con una p<0.05.

Al cuantificar la síntesis de progesterona en una curva dosis respuesta de [K⁺] con o sin quinina presente en el medio (Fig. 9), en ausencia de K⁺ la síntesis de progesterona se estimula en un 300%, alcanzando un máximo de estimulación con 80 mM KCl (600%) siendo la diferencia estadísticamente significativa (p<0.05), y después de 80 mM no hay cambio en la síntesis de progesterona al aumentar la [K⁺].

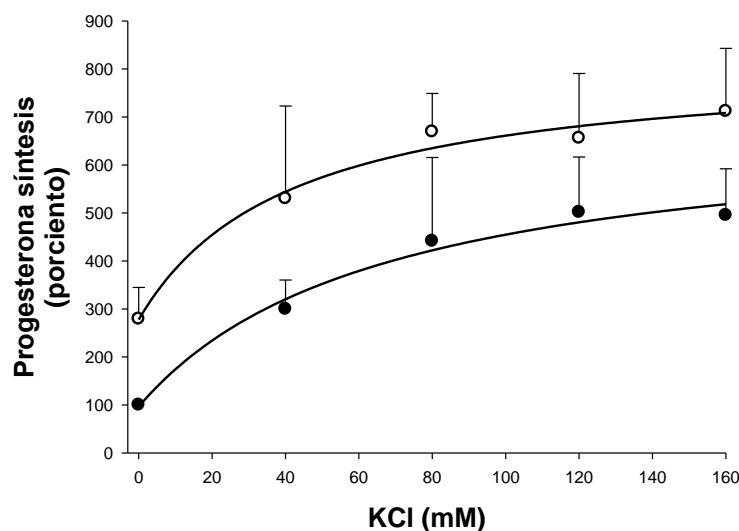


Figura 9. Síntesis de progesterona en MPH. Se determinó la síntesis de progesterona en el medio de síntesis de progesterona a 37°C en ausencia (●) o presencia (○) de 1 mM quinina. Los resultados son la media de cuatro experimentos realizados de manera independiente. Mediante un análisis de Bonferroni se encontró diferencia estadística entre 0- 80 mM KCl en ambos casos (p<0.05). Las barras indican DS.

Los datos sugieren que en presencia de los inhibidores del canal que no es necesario que el K^+ entre a la mitocondria para estimular la síntesis de progesterona. Para demostrar lo anterior se cuantificó la síntesis de progesterona en presencia de valinomicina, que es un ionóforo del K^+ , permitiendo equilibrar la concentración de K^+ tanto en el interior como en el exterior de la mitocondria. Aunque hubo una disminución en la síntesis de progesterona con respecto al control en ausencia de K^+ y valinomicina, esta disminución no fue estadísticamente significativa. Sin embargo la estimulación en presencia de quinina y ausencia de K^+ se mantuvo. En presencia de quinina hubo una diferencia estadística con respecto al control, malonato y el control con valinomicina ($p < 0.05$). En presencia de 120 mM y 160 mM K^+ no hubo una diferencia entre el control y con ninguna de las condiciones.

A. Sin valinomicina				B. Con valinomicina		
KCl (mM)	Control	Quinina (1 mM)	Malonato (10 mM)	Control	Quinina (1 mM)	Malonato (10 mM)
0	2.87 ± 0.58 ^b	7.75 ± 2.29 ^a	5.93 ± 0.99 ^c	1.58 ± 0.41 ^d	5.21 ± 1.14	5.91 ± 0.98
120	12.72 ± 1.3	17.07 ± 0.97	11.92 ± 0.08	13.18 ± 3.6	13.92 ± 1.29	13.01 ± 2.42
160	13.11 ± 1.04	19.44 ± 0.85	13.02 ± 0.83	13.12 ± 3.6	14.03 ± 2.43	14.47 ± 0.86

Tabla 3. Efecto de la valinomicina en la síntesis de progesterona de las MPH en presencia de diferentes concentraciones de K^+ y los inhibidores del canal. Síntesis de progesterona con diferentes concentraciones de K^+ y 1 mM quinina como inhibidor del canal o 10 mM malonato como un activador del canal. Se añadió 0.1 mM valinomicina al medio de síntesis de progesterona. Los resultados se expresan en ng de progesterona/min/mg MPH y son la media de experimentos independientes realizados por triplicado ± DS. Estos datos se analizaron mediante una prueba de Bonferroni. Se observa una diferencia estadística cuando se compara "a" vs "b", "c", "d" ($p < 0.05$).

Transporte de K^+

Para llevar a cabo el transporte de K^+ se requiere que la mitocondria genere un potencial de membrana, el cual en presencia de 0.1 mM valinomicina se colapsa (Fig. 10) y por lo tanto no hubo transporte de K^+ . Sin embargo la síntesis de progesterona permaneció con 0.1 mM valinomicina, lo que sugiere que el sistema esteroideogénico en las MPH es independiente de la presencia del potencial de membrana.

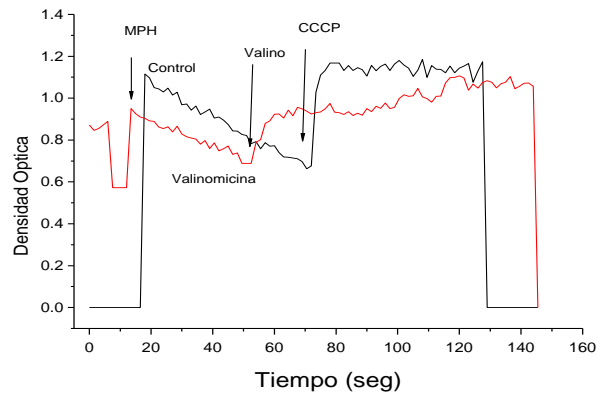


Figura 10. Potencial de membrana. En las MPH se determinó el potencial de la membrana en el medio de síntesis de progesterona al que se le adicionó Safranina O ($2.5 \mu\text{M}$) en un volumen final de 2.5 ml a una concentración final de proteína de 1 mg/ml, se determinó los cambios en la densidad óptica a 511 nm y como punto isosbestico 533 nm. Como un control el potencial de membrana generado se abatió adicionando 0.1 mM valinomicina y $5 \mu\text{M}$ CCCP.

En las mitocondrias el transporte de K^+ puede llevarse a través del canal mito K_{ATP} descrito por Garlid (1996) o bien por el complejo multiproteico descrito por Marbán (Alderhali et al., 2004). Ambos se inhiben por la presencia de los mismos compuestos. Al determinar el transporte de K^+ mediante el uso de la prueba fluorescente PBF1, se encontró que éste era inhibido por quinina (Fig. 11) y que no se aumentó el flujo de K^+ en presencia de malonato, ya que en este caso funciona aumentando la probabilidad de que el canal permanezca abierto como sugiere el grupo de Marbán (Fig. 12).

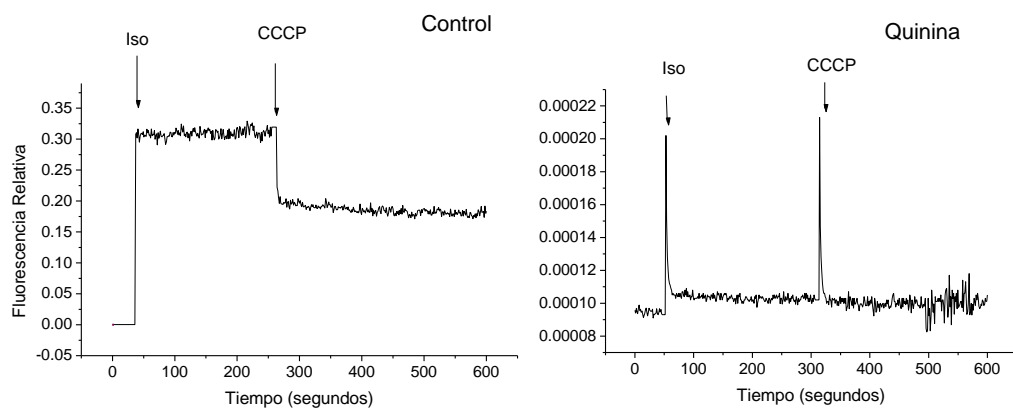


Figura 11. Transporte de potasio. El espectro de emisión de la prueba fluorescente PBF1 de las MPH se determinó en el medio de síntesis de progesterona sin sustrato oxidativo presente en el medio en un volumen final de 2.5 ml con 1 mg proteína/ml, el punto de excitación se fijó en 343 nm y la emisión a 500 nm. Se adicionó 1 mM de quinina. En el trazo se indica con una flecha la adición de 10 mM isocitrato, el transporte de K^+ se detuvo con 5 μ M CCCP.

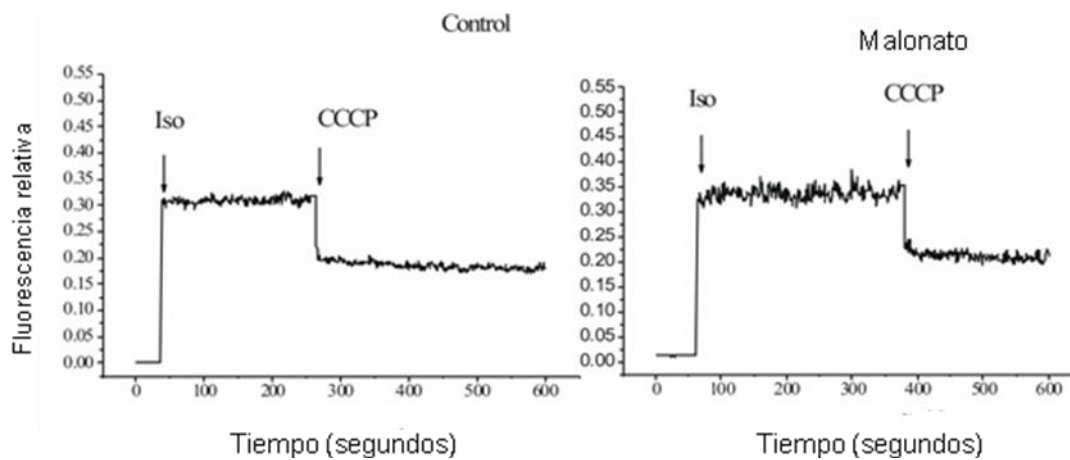


Figura 12. Transporte de potasio. El espectro de emisión de la prueba fluorescente PBF1 de las MPH se determinó en el medio de síntesis de progesterona sin sustrato oxidativo presente en el medio en un volumen final de 2.5 ml con 1 mg proteína/ml, el punto de excitación se fijó en 343 nm y la emisión a 500 nm. Se adicionó 10 mM de malonato. En el trazo se indica con una flecha la adición de 10 mM isocitrato, el transporte de K^+ se detuvo con 5 μ M CCCP.

Localización de la subunidad Kir 6.1

La composición del canal de K^+ mitocondrial no se conoce, en la actualidad se han propuesto dos modelos. El primero descrito por Garlid, que sugiere que el canal está constituido por las subunidades SUR y Kir 6.1 (Garlid, 1996). El otro modelo, descrito por Marbán (Alderhali et al., 2004) describe que el canal es un complejo multiproteico conformado por la succinato deshidrogenasa, el translocador de los adenín nucleótidos, la porina entre otras proteínas. Los resultados muestran que la subunidad Kir 6.1 se encuentra presente en las MPH así como en la membrana plasmática del corazón de rata (Fig. 13), que se utilizó como un control positivo, ya que en este sistema se había descrito la presencia de la subunidad Kir 6.1 (Garlid, 1996). Los datos sugieren que en las MPH el transporte de K^+ es a través del canal mito K_{ATP} .

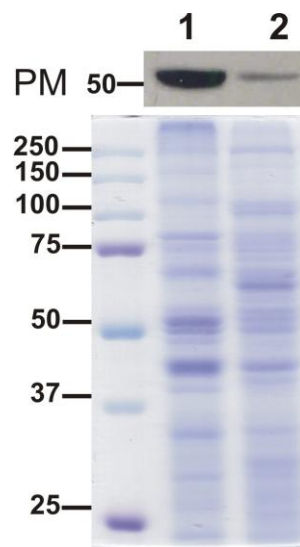


Figura 13. Análisis por Western blot de la subunidad Kir 6.1. Las proteínas (20 μ g de cada una) de la membrana plasmática de corazón de rata (carril 1) y MPH (carril 2) se procesaron por SDS- PAGE y se electrotransfirieron a una membrana de PVDF o se tiñó con azul de Coomassie.

Fosforilación de proteínas mitocondriales

Durante la fase aguda de la esteroidogénesis en las glándulas suprarrenales, la fosforilación dada por la proteína cinasa A (PKA) sobre la proteína StAR aumenta (Strauss et al., 1997). En la placenta humana no hay estimulación de la esteroidogénesis de manera aguda; sin embargo, existe

actividad de PKA y se encuentra relacionada con la esteroidogénesis (Poderoso et al., 2008, Maldonado-Mercado et al., 2008). Al incubar a las MPH en presencia de ATP radioactivo se detectó la fosforilación de varias proteínas (Fig. 14A), habiendo un cambio en la intensidad de la fosforilación entre la bandas de 30 a 66 kDa en presencia de K^+ durante los primeros segundos de la incubación (Fig. 14B).

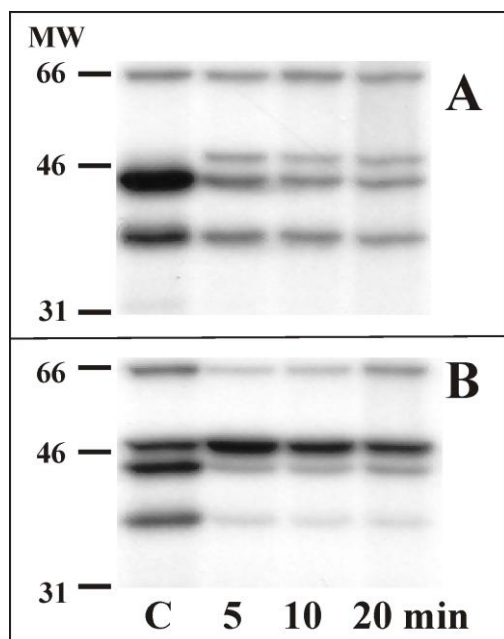


Figura 14. Fosforilación de proteínas en MPH incubadas con ATP radioactivo en presencia de sacarosa (A) o K^+ (B). Las MPH se incubaron en el medio de síntesis de progesterona en presencia de $ADP-\gamma^{32}P$ y sacarosa o K^+ ; a los tiempos de reacción que se indican la reacción se detiene con metanol frío a un volumen de 1.5 veces. Después de centrifugar, el precipitado se procesa en un SDS-PAGE y los geles se exponen a una placa de radiografía como se describe en materiales y métodos. Se muestra un experimento representativo.

Sitios de Contacto

El paso limitante tanto en las MPH como en otros tejidos esteroidogénicos es el transporte de colesterol hacia la mitocondria, para lo cual se forman sitios de contacto entre las membranas mitocondriales, siendo su formación un proceso dinámico y dependiente de las necesidades de la mitocondria. Cuando se aislaron los sitios en contacto de MPH que fueron previamente incubadas en el medio de síntesis de progesterona en presencia o ausencia de K^+ , se encontraron diferencias en cuanto al patrón electroforético. Mientras que los sitios de contacto aislados en K^+ no presentaron diferencias electroforéticas en su patrón, tanto de la

membrana interna como de la externa mitocondrial, esto no sucede en los que fueron aislados en presencia de sacarosa, que mostraron un patrón electroforético diferente tanto en las fracciones de membrana interna como la externa (Fig. 15). Lo que sugiere que en presencia de K^+ se puede estar aislando una sola población de sitios de contacto, siendo éstos principalmente esteroidogénicos, ya que con K^+ en el medio esta vía se ve favorecida.

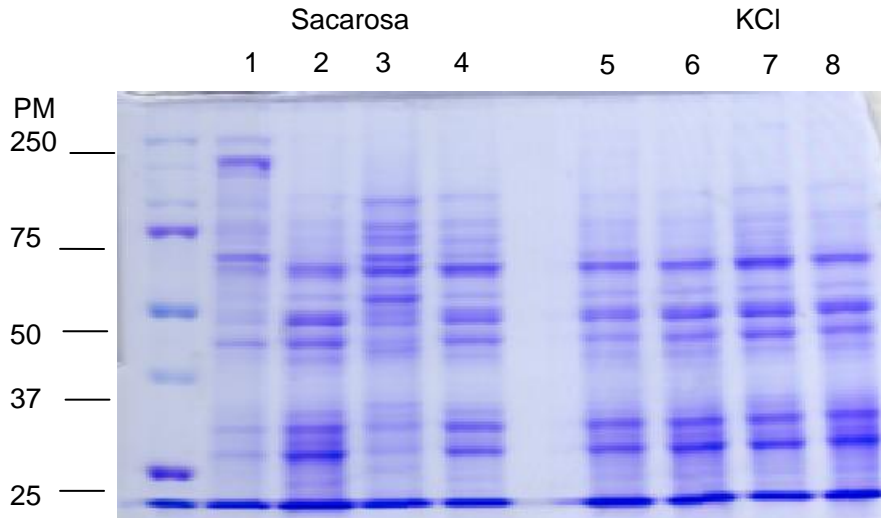


Figura 15. Sitios de contacto de la membrana interna se observan 4 sitios contacto denominado MI1, MI2, MI3, y MI4, y de la membrana externa se obtuvieron tres bandas denominadas ME1, ME2 y ME3. Los carriles de 1-4 corresponden a los sitios de contacto aislados en sacarosa son 1 = MI1, 2= MI2, 3 = ME1, 4 = ME2. Carriles 5-8 corresponden a los sitios de contacto aislados en KCl son 5 = MI2, 6 = MI3, 7 = ME1, 8 = ME3.

Discusión y Conclusión

El K^+ tiene diversas funciones en las células, no solamente se encarga de mantener la osmolaridad sino que también participa en mantener la homeostasis hormonal, o la actividad enzimática (Orlov et al., 2009). Los datos sugieren que el K^+ modula la esteroidogénesis en las MPH, descartándose que se trate de un efecto debido a la osmolaridad ya que se mantuvo constante con sacarosa cuando se variaron las concentraciones de K^+ . El papel de la osmolaridad en las MPH ya se había descrito se describió que con la misma osmolaridad dada por K^+ o sacarosa, hay cambios en la actividad de las MPH siendo diferentes el transporte de Ca^{2+} y el consumo de oxígeno entre otros parámetros mitocondriales. También se observaron cambios morfológicos cuando se aislaron a las mitocondrias en un medio con sacarosa o K^+ como agente isosmótico (Martínez et al., 1995).

Los cambios en la concentración de K^+ tanto en la célula como en la mitocondria son pequeños, se ha reportado que cambios de hasta 0.1 mM de K^+ son capaces de inducir un cambio en la actividad en las células de glomerulosa (Spät et al., 2004), dando como resultado un aumento en la síntesis de aldosterona. En las MPH se modificó la concentración de K^+ en una mayor magnitud a lo que sucede *in vivo*, esto permitiría entender cómo el K^+ modula la esteroidogénesis en las mitocondrias. En las mitocondrias de la glomerulosa se encontró que cuando se aumenta la concentración de K^+ hasta 1 M, se favorece la asociación del citocromo P450_{scc} con las adrenodoxinas, desplazando la unión del citocromo con otras proteínas mitocondriales (Ohta et al., 1991).

Los cambios en la actividad mitocondrial por efecto de K^+ no se deben a un efecto de la carga, ya que cuando se determinó la síntesis de progesterona en presencia de 120 mM Na^+ las MPH sintetizaron 5.31 ± 3.51 ngP4/mg/min, siendo este valor cercano a la síntesis de progesterona en ausencia de K^+ .

Las MPH contienen suficiente colesterol para llevar a cabo la síntesis de progesterona sin embargo, la velocidad de síntesis es muy baja, lo cual puede deberse a que no se han formado los sitios de contacto para llevar a cabo el transporte de colesterol. La formación de los sitios de contacto es un proceso dinámico que se lleva a cabo de acuerdo a las necesidades de la mitocondria

(Bridiczka et al., 1991). Para que se favorezca la formación de los sitios de contacto esteroideogénicos se requiere de un estímulo que en la placenta humana no se ha determinado, por lo cual un buen sistema para estudiar el transporte de colesterol y la formación de sitios de contacto es el de las MPH aisladas.

En presencia de K^+ y ATP se estimula tanto el transporte de colesterol como la síntesis de progesterona, por lo que tanto el K^+ y/o ATP se relacionan con la esteroideogénesis de la placenta. Las MPH que fueron incubadas con el complejo albumina colesterol incorporaron casi el doble de colesterol cuando en el medio de incubación se encontró presente el K^+ , al compararlas con las que contienen sacarosa en el medio (Tabla 1). La incorporación de colesterol es el doble con ATP en el medio con K^+ o sacarosa (Tabla 1), lo que sugiere que el transporte de colesterol hacia la mitocondria requiere de energía.

En las MPH se describió la presencia de una apirasa que se encarga de hidrolizar tanto al ATP o ADP (Flores-Herrera et al., 2002), proporcionando la energía para que se lleve a cabo la incorporación de un 20% de colesterol en presencia de cualquiera de los nucleótidos (Fig. 7), como sucede con la GTPasa que se encuentra en las mitocondrias de las suprarrenales de la rata (Xu et al., 1991).

Las membranas de las MPH presentan un alto contenido de colesterol, aun así tienen la capacidad de incorporar colesterol en ausencia de K^+ o ATP, esto es debido al coeficiente de partición del colesterol (Navarrete et al., 1999). En presencia de K^+ , ATP o ambos existe un aumento significativo en la incorporación de colesterol (Tabla 1 y Fig. 7A). En las MPH enriquecidas con colesterol hay una mayor síntesis de progesterona. Aparentemente la cadena de transporte de electrones del citocromo P450_{scc} no es el paso limitante en la esteroideogénesis de la placenta, ya que la síntesis de progesterona se puede estimular en presencia de 22-hidroxicolesterol y 100 mM K^+ , siendo su valor de 31.42 ± 5.09 ng P4/mg/min que es 2.6 veces más que solamente en presencia de 100 mM K^+ cuyo valor es de 11.72 ngP4/mg/min. Debido a que el 22-hidroxicolesterol no requiere de una proteína que lo transporte se puede establecer la máxima capacidad esteroideogénica de las MPH y esta no se observa solamente con el K^+ en el

medio. Por lo cual al igual que en otros tejidos esteroidogénicos el paso limitante en la vía en la esteroidogénesis en la placenta humana es el transporte de colesterol.

El transporte de colesterol a la mitocondria requiere de la formación de los sitios de contacto así como de la proteína StAR (Bridiczka et al., 1991, Pollack et al., 1987, Uribe et al., 2003). Diversos tipos de sitios de contacto se pueden formar en la mitocondria esto se asocia con la actividad y el tipo mitocondrial. La formación de los sitios para la fosforilación oxidativa se ve favorecida con un cambio en el volumen mitocondrial asociado con transporte de K^+ a la mitocondria que conlleva la entrada de agua y por lo tanto hinchamiento mitocondrial (Halestrap et al., 1986). En las MPH se aislaron los sitios de contacto con capacidad esteroidogénica (Uribe et al., 2003) y se encontró que en presencia de sacarosa los sitios de contacto presentan patrones electroforéticos distintos, mientras que aquellos sitios de contacto que se aislaron con K^+ en el medio tienen el mismo patrón, lo que sugiere que podrían tener la misma composición proteica (Fig. 15) y de esta forma en presencia de K^+ se favorece la formación de sitios de contacto esteroidogénicos y por lo tanto el transporte de colesterol y la síntesis de progesterona.

El transporte de colesterol entre las membranas mitocondriales está mediado por proteínas que lo transportan hacia la mitocondria, siendo indispensable para este proceso la proteína StAR que al ser fosforilada incrementa su capacidad para llevar a cabo el transporte de colesterol y por lo tanto la esteroidogénesis (Poderoso et al., 2008). Si bien la placenta humana no expresa la proteína StAR (Pollack et al., 1987), si hay fosforilación de proteínas dada por una PKA que podría estar modulando la esteroidogénesis (Poderoso et al., 2008, Maldonado-Mercado et al., 2008). En las MPH en presencia de K^+ hay un incremento en la fosforilación de la proteína de 46 kDa (Fig. 14B) cuando se compara con la que tienen sacarosa en el medio (Fig. 14A). Por lo cual la actividad de la cinasa o la fosforilación de las proteínas está estimulada por la presencia de K^+ dando como resultado la estimulación de la esteroidogénesis.

El movimiento de K^+ es un proceso dinámico en la célula entre el citosol y la mitocondria, el canal que transporta el K^+ en la mitocondria no se conoce, aunque se han propuesto dos modelos que responden al efecto de los inhibidores del canal K_{ATP} situado en la membrana plasmática. Mediante el uso de anticuerpo se ha identificado en mitocondrias de diversos tejidos la presencia de la subunidad Kir 6.1 (Garlid 1996), por lo cual no se descarta que exista también la subunidad SUR. El otro modelo propuesto por Marbán describe que el canal puede tratarse de un complejo multiproteico cuya probabilidad de permanecer abierto se da en presencia de malonato. Al determinar el efecto del malonato en la síntesis de progesterona se mantiene como el control (Tabla 2) y el transporte de K^+ permanece sin cambio (Fig. 12). En presencia de quinina no hay transporte de K^+ (Fig. 11) y se estimula la síntesis de progesterona (Fig. 9) siendo estadísticamente diferente con respecto al control a la concentración de 0 – 80 mM K^+ . Con los otros inhibidores del canal también hay una estimulación en la síntesis de progesterona, lo que sugiere que la estimulación de la esteroidogénesis es independiente del transporte de K^+ hacia la mitocondria.

La formación de los sitios de contacto para la fosforilación oxidativa se favorece con el hinchamiento mitocondrial, la entrada de K^+ que va acompañado con agua genera que las mitocondrias de hígado de rata se hinchen. En presencia de valinomicina que es un ionóforo que equilibra la concentración de K^+ lo que provoca que las mitocondrias se hinchen, aunque también en presencia de la valinomicina se abate el potencial de membrana. En otros tejidos esteroidogénicos se requiere del potencial de membrana para el procesamiento de la proteína StAR hacia su forma de 30 kDa que es su forma activa y se lleve a cabo el transporte de colesterol a la mitocondria (Cherradi et al., 1997). Al emplear valinomicina en las mitocondrias de la placenta humana estas no se hinchan y la síntesis de progesterona sin K^+ en el medio disminuye de 1.7 ± 0.7 a 0.9 ± 0.3 (Tabla 3), En las MPH el potencial de membrana se abate con la valinomicina (Fig. 10) pero la síntesis de progesterona permanece, lo cual nos indica que no se requiere del potencial para la esteroidogénesis en las MPH. Lo mismo sucede cuando se

aislaron los sitios de contacto los cuales carecen de potencial de membrana pero pueden sintetizar progesterona (Uribe et al., 2003).

El papel que tiene el K^+ en las mitocondrias ya se ha descrito en las mitocondrias de hígado de rata en donde hay un aumento en la respiración estimulando el estado 3 de la respiración mitocondrial (Halestrap et al., 1987). En las MPH Martínez et al., (1995) reportaron que el potencial de membrana no se modifica por los cambios en la osmolaridad, pero si existen cambios morfológicos en las mitocondrias cuando estas se aíslan en un medio con K^+ , esto se puede deber a que se induce la formación de los sitios de contacto (Uribe et al., 2003).

En conclusión la presencia de K^+ modifica varios procesos relacionados con la esteroidogénesis como son la fosforilación de proteínas, la incorporación de colesterol y la síntesis de progesterona, por lo cual es difícil establecer sobre qué proteína o proteínas asociadas con la esteroidogénesis pudiera estar ejerciendo el K^+ su efecto, sino que al parecer es global sobre la mitocondria que conlleva a una estimulación de la síntesis de progesterona en las MPH.

Uno de los posibles efectos del K^+ en las MPH es en la formación de los sitios de contacto que tienen diferencias en los patrones electroforéticos cuando se aíslan los sitios de contacto al incubarse las MPH en un medio con sacarosa o K^+ , ya que en presencia de K^+ se estimula la síntesis de progesterona, pudiera ser que los sitios de contacto formados en el medio con K^+ son esteroidogénicos lo que favorece el transporte de colesterol y por lo tanto la esteroidogénesis. Aunque aún faltan por conocer la asociación de las proteínas que conforman a los sitios de contacto con K^+ y su diferencia con los de sacarosa. Pero todos los datos sugieren que el K^+ participa como modulador de la esteroidogénesis.



Contribution of Potassium in Human Placental Steroidogenesis

R. Milan, O. Flores-Herrera, M.T. Espinosa-Garcia, S. Olvera-Sanchez, F. Martinez*

Department of Biochemistry, School of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 17 July 2010

Keywords:

Human placental mitochondria
Potassium
Cholesterol transport
Progesterone synthesis

ABSTRACT

The role of K^+ on steroidogenesis in isolated mitochondria from the human placenta was explored. Cholesterol uptake and progesterone synthesis were stimulated by K^+ , and by the further addition of ATP. In the presence of glibenclamide or quinine (inhibitors of the K^+ channel mito- K_{ATP}), the synthesis of progesterone was improved, indicating that K^+ acts outside the mitochondria. Valinomycin, a K^+ -ionophore, inhibited mitochondrial steroidogenesis only in the absence of K^+ . The mitochondrial K^+ channel in human placental mitochondria is formed by the subunit Kir 6.1 which was detected by Western blot with polyclonal antibodies. These results suggest that K^+ contributes placental mitochondrial steroidogenesis facilitating cholesterol uptake and intermembrane translocation through a mechanism non-dependent of the transport of K^+ inside the mitochondria.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Monovalent cations contribute to maintain some physiological functions in cells such as the resting and action membrane potential, accumulation of glucose, amino acids and nucleotides, as well as keeping the cell volume and osmolarity [1]. While the K^+ concentration in the cytoplasm is around 120 mM [2–4] in mitochondria, it is between 140 and 180 mM [5].

An increase of the matrix volume in rat liver mitochondria after a hormonal stimulus by glucagon was described to be associated to net transport of K^+ [6] favoring contact sites. Similarly, an increase in extracellular $[K^+]$ associated with a reduction of mitochondrial pyridine nucleotides was observed in rat adrenal glomerulosa cells. An increase of $[K^+]$ as little as 0.5 mM stimulated steroid hormone production [7]. Although the $[K^+]$ in cytoplasm is above 100 mM, only small amounts of K^+ transport are evidently needed to exert specific effects on the mitochondrial metabolism.

Steroidogenesis takes place in mitochondria and requires the movement of cholesterol between mitochondrial membranes. In the human placenta the transport of cholesterol between mitochondrial membranes is carried out by the protein MLN64 [8,9], since the protein StAR is not expressed [10].

Mitochondrial contact sites participate in the transport of several metabolites [11] including cholesterol [12]. In the human placental mitochondria these contact sites were isolated and

several proteins were identified [13], including a novel porin-like protein [14].

Cytochrome P450 side chain cleavage (P450scc) is associated to the inner mitochondrial membrane with adrenodoxin and adrenodoxin reductase. This electron transport chain is responsible to transform cholesterol into pregnenolone. In acute steroidogenic tissues like bovine adrenocortical mitochondria, in the absence of hormonal stimulus, cytochrome P450scc is associated to proteins unrelated to steroidogenesis, but when $[K^+]$ is increased the cytochrome P450scc is released favoring its interaction with adrenodoxin and adrenodoxin reductase, thus increasing pregnenolone synthesis. A reverse effect is observed when K^+ is removed from the medium [15].

The positive effect of K^+ on the association of steroidogenic proteins is also closely related to the formation of contact sites to transport cholesterol into mitochondria [16,17]. Morphological changes were also observed in human placental mitochondria isolated in the presence of K^+ as opposed to the ones isolated in sucrose showing close approximations between mitochondrial membranes [18].

It has been proposed that K^+ uptake is performed by a mitochondrial ATP-regulated potassium channel (mito- K_{ATP}) modulated by nucleotides and composed of a Kir-SUR (sulfonylurea receptor) subunits [2–5]. However, its presence apparently is not universal. Recently it was described a mitochondrial multi-protein complex reconstituted in liposomes containing the phosphate carrier, adenine nucleotide translocator, mitochondrial ATP-binding cassette protein 1, succinate dehydrogenase and ATP synthase (α -subunit) that transports K^+ in a way similar to that of mito- K_{ATP} , which was inhibited by glibenclamide and open with malonate, an inhibitor of succinate dehydrogenase [19,20].

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Apdo. Postal 70-159, 04510, Mexico City, Mexico. Tel.: +52 55 5623 2168; fax: +52 55 5616 2419.

E-mail address: fedem@bq.unam.mx (F. Martinez).

As mentioned before, the influx of K^+ increases the volume of the mitochondrial matrix producing contact sites stimulating oxidative phosphorylation in the rat liver [6]. However, the role of K^+ in the metabolism of cholesterol during steroidogenesis in the human placenta has not been evaluated. In this study, we show that steroidogenesis increases in the presence of K^+ suggesting its role in the endocrine functions of the human placenta.

2. Materials and methods

2.1. Isolation of mitochondria

Human placentas were obtained according the Ethical Committee of the School of Medicine. Human placental mitochondria (HPM) from syncytiotrophoblast were isolated as reported by Martinez et al. [21]. Mitochondrial proteins were quantified as described by Bradford [22], using bovine serum albumin (BSA) as standard. Only mitochondria with a respiratory control upper than 4 were used assuring their integrity and intactness [23].

2.2. Cholesterol incorporation

The incorporation of cholesterol into placental mitochondria was performed as described by Martinez et al. [24] by using a cholesterol-BSA-complex. In all the experiments the osmolarity was kept constant with sucrose. Progesterone synthesis was examined in the cholesterol-enriched-HPM with 100 mM K^+ in the presence or absence of ATP. Cholesterol incorporation was stopped by 5-fold dilution with cold 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, pH 7.4, followed by centrifugation to remove free cholesterol. The mitochondrial pellet was washed three times with a fresh cold solution of 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, pH 7.4. After protein determination, cholesterol concentration was quantified with a commercial kit (Spinreact, S.A. Ctra Santa Coloma, Spain), following the manufacturer's instructions.

2.3. Progesterone synthesis

Both intact HPM and cholesterol-enriched-HPM were incubated at 37 °C in a medium with malate 10 mM as oxidative substrate in the presence or absence of ATP or ADP. After incubation, the reactions were stopped with 1.5 volumes of cold methanol. In further experiments, HPM were incubated in a medium named progesterone synthesis medium, containing 5 mM isocitrate, 10 mM MOPS, 0.5 mM EGTA, 120 mM KCl and protease inhibitors, adjusted to pH 7.4 [25]. Progesterone determinations were made by radioimmunoassay using a commercial kit (Diagnostic Products, USA), according to the manufacturer's specifications.

2.4. Protein phosphorylation by HPM

Mitochondrial protein phosphorylation was performed by incubating the HPM in the presence of radioactive ATP ($ADP\gamma^{32}P$) with a specific activity 3000 Ci/mmol in the progesterone synthesis medium. At the times indicated in each figure, an aliquot was taken and 1.5 volumes of cold methanol were added to stop the reaction. Mitochondrial proteins (10 μ g per lane) were separated on a 10% polyacrylamide gel under denaturing conditions by SDS-PAGE according to Laemmli [26]. The gels were exposed to autoradiography film and developed according to the manufacturer's instructions.

2.5. Membrane potential

The contribution of K^+ to the mitochondrial membrane potential was determined in the progesterone synthesis medium in a final volume of 2.5 ml containing 1 mg of protein/ml, measuring the Safranin O (2.5 μ M) optical density changes at 511 nm and using 533 nm as an isosbestic point in a DW 2000 Aminco spectrophotometer, as described by Åkerman and Wikström [27]. As a control, the mitochondrial potential generated was depleted by adding 0.1 mM valinomycin.

2.6. Western blots

Whole mitochondrial proteins (10 μ g per lane) were separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel using electrophoresis according to Laemmli [26] and transferred to polyvinylidene fluoride membrane (PVDF). After blocking with 10% fat free milk, the primary antibody against the K_{ATP} -receptor subunit Kir 6.1 was added at a dilution 1:500. Membranes were incubated at 4 °C on ice during 12 h and then incubated with horseradish peroxidase conjugated with the secondary antibody at a dilution 1:15000 [28]. Chemiluminescence was used to visualize the bands. Plasma membrane of rat heart was used as positive control.

2.7. Materials

Sucrose, KCl, cholesterol, bovine serum albumin (BSA) and protease inhibitors were purchased from Sigma-Chemical, Mexico. The radioimmunoassay kit for progesterone was purchased from Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA. Radioactive ATP ($ADP\gamma^{32}P$) was obtained from NEN, USA. The kit for cholesterol determination was purchased from Spinreact, S.A. Ctra Santa Coloma, Spain. Other reagents were analytical grade. Antibody anti Kir 6.1 was purchased from Santa Cruz and GR Healthcare Life Sciences.

2.8. Data analysis

At least three independent experiments were performed by triplicate. Data are expressed as mean \pm standard deviations (SD) and, according to the experimental characteristics; an appropriate statistical analysis was performed as indicated in each figure or table legend.

3. Results

3.1. Mitochondrial steroidogenesis

Although HPM has a high content of cholesterol, their incubation with exogenous cholesterol increased from 35.6 to 61.1 μ g cholesterol/mg protein with 100 mM K^+ to 102.5 μ g cholesterol/mg protein when 2 mM ATP plus K^+ were added (Table 1) ($p < 0.05$). In the absence of K^+ , the incorporation was 48.2 μ g cholesterol/mg protein and 89.1 μ g cholesterol/mg protein in the presence of sucrose plus 2 mM ATP (Table 1) ($p < 0.05$). HPM with an excess of cholesterol after the incorporation were named cholesterol-enriched-HPM.

Steroidogenesis was performed in both HPM and cholesterol-enriched-HPM. The results showed that the synthesis of progesterone was consistently high in the presence of K^+ . When ATP was added to the incubation media, the amount of progesterone increased, being higher in mitochondria previously incubated with K^+ plus ATP (Table 1) ($p < 0.05$).

The incubation of HPM with exogenous cholesterol in the presence of increasing concentrations of K^+ plus a constant concentration of ATP or ADP showed a raise of cholesterol mitochondrial contents in a dose-response behavior (Fig. 1A), suggesting that this process was favored by K^+ and required the presence of ATP or ADP. Although there was not statistical difference between the nucleotide used, the results strongly suggest that to incorporation of cholesterol into the HPM in the presence of ADP or ATP is required (Fig. 1A).

Table 1

Cholesterol incorporation in human placental mitochondria and its further transformation into progesterone.

	Cholesterol (μ g/mg)	ng P4/mg/min	
Incubation condition			+ 2 mM ATP
Untreated mitochondria	35.6 \pm 8.4 ^a	10.74 \pm 1.15 ^c	16.61 \pm 1.94
Sucrose	48.2 \pm 9.8	12.16 \pm 1.47	24.78 \pm 1.15
KCl	61.1 \pm 16.4 ^b	16.55 \pm 2.98 ^d	20.94 \pm 1.49
Sucrose + ATP	89.1 \pm 9.5 ^b	15.72 \pm 0.87 ^d	19.9 \pm 2.81
KCl + ATP	102.5 \pm 14.9 ^b	22.24 \pm 3.2 ^d	28.29 \pm 2.45
	n = 4	n = 4	n = 4

Human placental mitochondria were enriched with cholesterol as mentioned in the Materials and Methods section. In the medium the concentration was K^+ 120 mM or sucrose 240 mM with 30 μ g cholesterol-BSA-complex. When ATP was present, it is concentration 2 mM. The results are the mean \pm SD. The numbers of independent experiments made are indicated as n. The results present statistical difference in the cholesterol incorporation when was compared "a" vs "b" ($p < 0.05$). For the progesterone synthesis the statistical differences were between "c" vs "d" ($p < 0.05$). In the presence of 2 mM ATP there was statistical difference for progesterone synthesis between untreated mitochondria vs all groups, which was analyzed by Tukey test ($p < 0.05$).

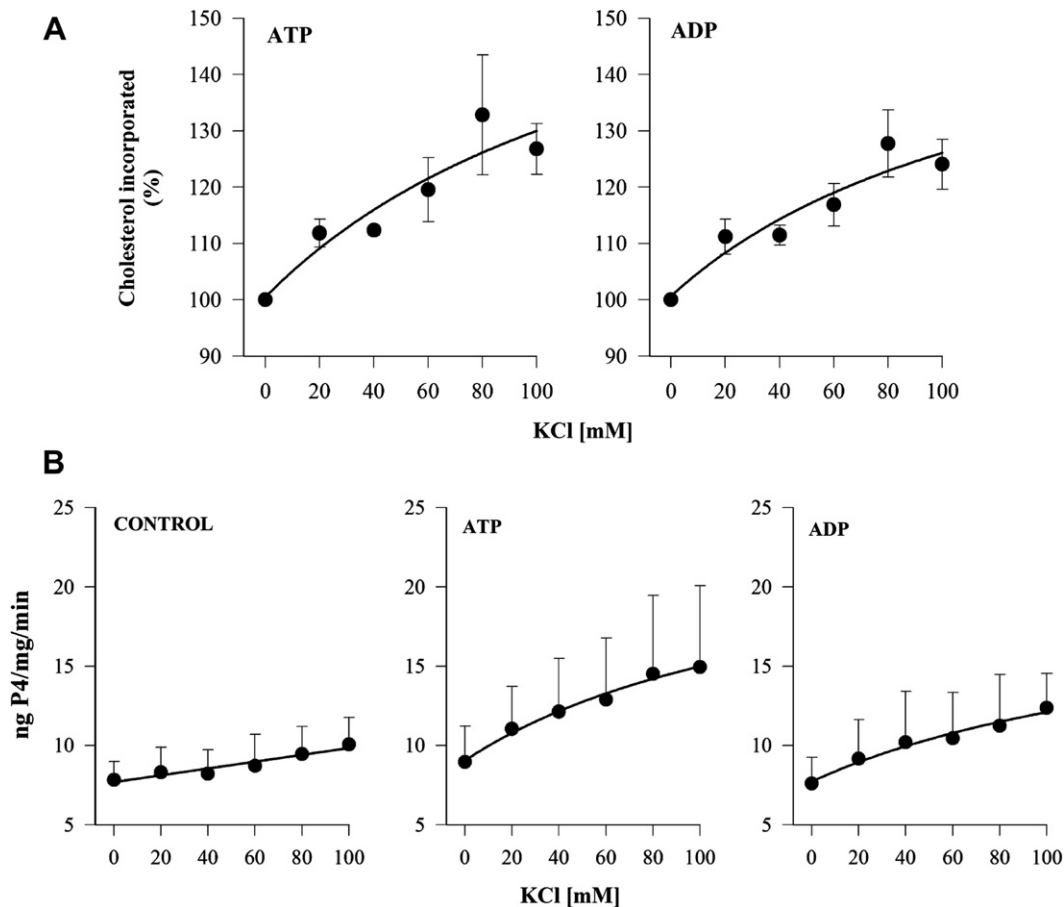


Fig. 1. A. Incorporation of exogenous cholesterol in the presence of K^+ and nucleotides. HPM were incubated for 10 min at 37°C in the presence of increasing concentrations of K^+ and $30\ \mu\text{g}$ cholesterol/mg BSA in $200\ \mu\text{l}$ of the medium containing $10\ \text{mM}$ malate, 0.2% BSA, $1\ \text{mM}$ EDTA, $1\ \text{mM}$ MgCl_2 , $10\ \text{mM}$ Tris-HCl, pH 7.4. The osmolarity was maintained at $250\ \text{mOSM}$ with sucrose. ATP or ADP were $2\ \text{mM}$. The results are the mean of independent experiments made in triplicate. By *t* student analysis there is not significant difference. The bars indicate the SD. B. Synthesis of progesterone in the presence of ATP or ADP and increasing K^+ concentrations. Progesterone synthesis was determined at 37°C in the presence of increasing concentrations of K^+ ($n = 5$); plus $2\ \text{mM}$ ATP ($n = 10$) or plus $2\ \text{mM}$ ADP ($n = 9$). The results are the mean of at least three independent experiments made in triplicate. The one-factor ANOVA analysis shows statistical differences between control vs ATP ($p < 0.05$) and ATP vs ADP ($p < 0.05$). The bars indicate the SD.

Fig. 1B shows that the steroidogenic activity of HPM was $7.82 \pm 1.14\ \text{ng P4/mg/min}$ in the absence of K^+ and increased to $10.05 \pm 1.7\ \text{ng P4/mg/min}$ in the presence of $100\ \text{mM K}^+$, following a dose-dependent curve. Similar results were observed when the incubation medium was supplemented with ATP, but the synthesis of progesterone increased to $14.93 \pm 5.13\ \text{ng P4/mg/min}$ at $100\ \text{mM K}^+$. Despite the dispersion of the data, the results showed statistical differences between control and ATP ($p < 0.05$) at $100\ \text{mM K}^+$; and there is also statistical difference in progesterone synthesis with ATP or ADP ($p < 0.05$).

In order to further analyze the role of K^+ on the transformation of cholesterol into progesterone, the effect of several inhibitors of mitochondrial K^+ uptake were tested. Glibenclamide is a mito- K_{ATP} inhibitor that binds the SUR subunit, while tetraphenylphosphonium (TPP) associates to the Kir subunit; both close the channel and therefore stop the influx of K^+ into the mitochondrial matrix. In the presence of glibenclamide or TPP the steroidogenesis of HPM was stimulated ($p < 0.05$), suggesting that the effect of K^+ was outside the mitochondria (Table 2). Quinine is an inhibitor of the SUR subunit of the K^+ channel; however progesterone synthesis did not show differences between control and inhibitor at $120\ \text{mM K}^+$. Interestingly, in the absence of K^+ quinine increased 300% the progesterone production (Fig. 2A) and raising the concentration of K^+ support the steroidogenesis reaching a plateau at $80\ \text{mM}$ ($p < 0.05$). It has been proposed that the mitochondrial K^+ channel

can be a multi-protein complex with the same sensibility to channel inhibitors and opened by malonate [19]. Then, the effect of malonate in progesterone synthesis was determined, and the results showed no differences with the control (Table 2).

Additional evidence of the effect of K^+ outside HPM was obtained with valinomycin, a natural ionophore for K^+ which decreased progesterone synthesis (Table 3). Unexpectedly, in the presence of K^+ plus quinine and valinomycin the steroidogenesis was not inhibited, but in the presence of $120\ \text{mM}$ or $160\ \text{mM K}^+$ the progesterone synthesis remains without any change between the

Table 2
Progesterone synthesis by HPM in the presence of inhibitors of mitochondrial K^+ uptake.

Control ^a	Glibenclamide ^b ($50\ \mu\text{M}$)	Quinine ($1\ \text{mM}$)	TPP ^b ($100\ \text{nM}$)	Malonate ($10\ \text{mM}$)
11.72 ± 3.2	16.29 ± 2.24	10.48 ± 3.6	17.33 ± 3.5	12.52 ± 2.51
n 15	7	4	5	6

Effect of the inhibitors of the channel of K^+ in the progesterone synthesis from HPM. The incubation medium contained: $5\ \text{mM}$ isocitrate, $0.5\ \text{mM}$ EGTA, $10\ \text{mM}$ MOPS, $120\ \text{mM}$ KCl, $1\ \mu\text{g/mg}$ leupeptine and $4\ \mu\text{g/mg}$ aprotinin. The results are expressed in ng progesterone- min-mg of HPM and are the mean from independent experiments \pm SD. The numbers of independent experiments made are indicated as n. The results were analyzed by Tukey test. Statistical differences between control (a) and glibenclamide (b) or TPP (b) was $p < 0.05$.

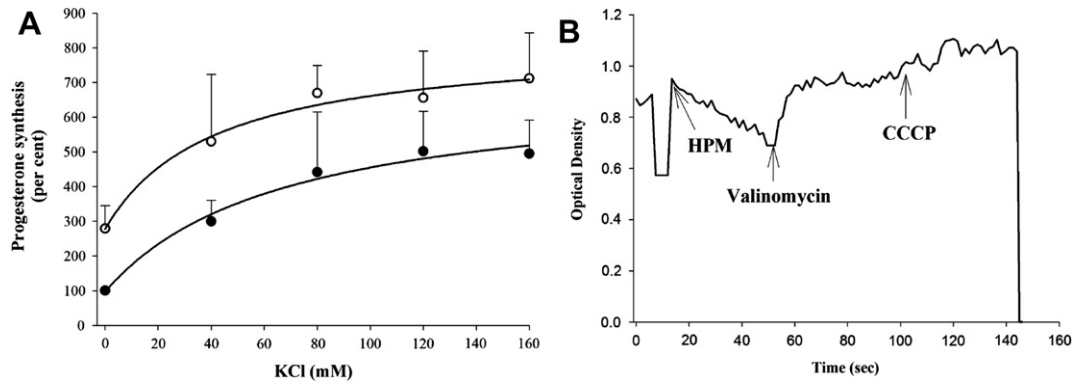


Fig. 2. A. Quinine increases progesterone synthesis in HPM. The synthesis of progesterone was determined at 37 °C in the medium of progesterone synthesis in the absence (●) or presence (○) of 1 mM quinine. The results are the mean of four independent experiments. Bonferroni analysis showed statistical differences between 0 and 80 mM KCl in both cases ($p < 0.05$). The bars indicate the SD. B. Mitochondrial membrane potential. The membrane potential of HPM was determined in the progesterone synthesis medium supplemented with Safranin O (2.5 μM) in a final volume of 2.5 ml containing 1 mg of protein/ml, measuring the optical density changes at 511 nm and using 533 nm as an isosbestic point. As a control, the mitochondrial potential generated was depleted by adding 0.1 mM valinomycin and 5 μM CCCP.

control and any other experimental condition. In the presence of malonate as an opener of the channel progesterone synthesis remain the same as the control (Table 2).

It is important to note that the mitochondrial membrane potential measured with Safranin O collapsed with valinomycin at the same concentration used for progesterone synthesis, whereas steroidogenesis remained unchanged (Fig. 2B).

3.2. Localization of the Kir 6.1 subunit

The composition of the mitochondrial K^+ channel remains unclear and at least two models to explain the K^+ transport into mitochondria have been suggested. One model is the mito- K_{ATP} composed of the SUR and Kir 6.1 subunits [2–5]. The other one is a multi-protein complex described by Marban et al. [19]. The results showed that Kir 6.1 is present in HPM and in the plasma membrane of rat heart (Fig. 3A), which was used as a positive control since the presence of the Kir 6.1 subunit has been described [5]. Then, our results support the assumption that mito- K_{ATP} is the mechanism through which K^+ is transported in the HPM.

3.3. Phosphorylation of mitochondrial proteins

During acute hormonally induced steroidogenesis in adrenal glands, StAR enhances its activity by phosphorylation mediated by a protein kinase A (PKA) [29]. Although the human placenta is not a hormonal induced-acute steroidogenesis tissue, the PKA activity is present and is related to steroidogenesis [30,31]. The incubation of HPM with radioactive ATP showed protein phosphorylation (Fig. 3B). Although four proteins between 30 and 66 kDa were detected, their intensity changed notably in the presence of K^+ , mainly in the first seconds of incubation (Fig. 3C).

4. Discussion

Potassium participates in several biological functions, including modulation of hormonal homeostasis [6] or enzyme activity [15,32,33]. Our results show that K^+ participates in the steroidogenic functions of HPM as a cofactor and not just through a simple osmotic effect, since in all experiments the osmolarity was maintained constant and the effect of the osmolarity on the HPM has been previously evaluated [17].

In cells, variations of $[K^+]$ in the cytoplasm are related to metabolic changes. *In vivo*, $[K^+]$ did not change in magnitude as in our experimental assays, but they allowed us to understand how K^+ modifies steroidogenesis. Even more, it has been reported that changes in $[K^+]$ as small as 0.1 mM have an important physiological repercussion [7], i.e. it was reported that the rotational diffusion of mitochondrial cytochrome P450_{scc} was significantly dependent on K^+ concentration [15]. The effect of K^+ on placental steroidogenesis could not be explained by a charge effect because in the presence of 120 mM Na^+ progesterone synthesis was 5.31 ± 3.51 ng P4/mg/min, this value is near to that of progesterone synthesis in the absence of K^+ .

Although HPM have enough endogenous cholesterol to support progesterone synthesis, steroidogenesis occurs at a very low rate probably because no contact sites are formed [34]. Therefore, to initiate steroidogenesis, HPM require a stimulus, and in this sense, isolated HPM are a good model to study cholesterol transport and steroidogenesis.

In the presence of K^+ and ATP both cholesterol transport and steroidogenesis increased, suggesting that K^+ and/or ATP are related to placental steroidogenesis. This assumption is based first on the results from the incorporation of cholesterol into the mitochondria in the presence of K^+ , which was higher than in the

Table 3
Progesterone synthesis in the presence of channel inhibitors and valinomycin.

A. Without valinomycin				B. With valinomycin		
KCl (mM)	Control	Quinine (1 mM)	Malonate (10 mM)	Control	Quinine (1 mM)	Malonate (10 mM)
0	2.87 ± 0.58 ^b	7.75 ± 2.29 ^a	5.93 ± 0.99 ^c	1.58 ± 0.41 ^d	5.21 ± 1.14	5.91 ± 0.98
120	12.72 ± 1.3	17.07 ± 0.97	11.92 ± 0.08	13.18 ± 3.6	13.92 ± 1.29	13.01 ± 2.42
160	13.11 ± 1.04	19.44 ± 0.85	13.02 ± 0.83	13.12 ± 3.6	14.03 ± 2.43	14.47 ± 0.86

Effect of valinomycin on the progesterone synthesis from HPM with different K^+ concentrations and K^+ channel inhibitors. Synthesis of progesterone with different K^+ concentrations and 1 mM quinine as potassium channel inhibitor or 10 mM malonate as opener of the channel. Valinomycin (0.1 mM) was added to the reaction medium. The results are expressed in ng of progesterone/min/mg of HPM and are the mean from independent experiments made in triplicate ± SD. The data were analyzed by a Bonferroni test. Statistical difference were observed as compared “a” vs “b”, “c”, “d” ($p < 0.05$).

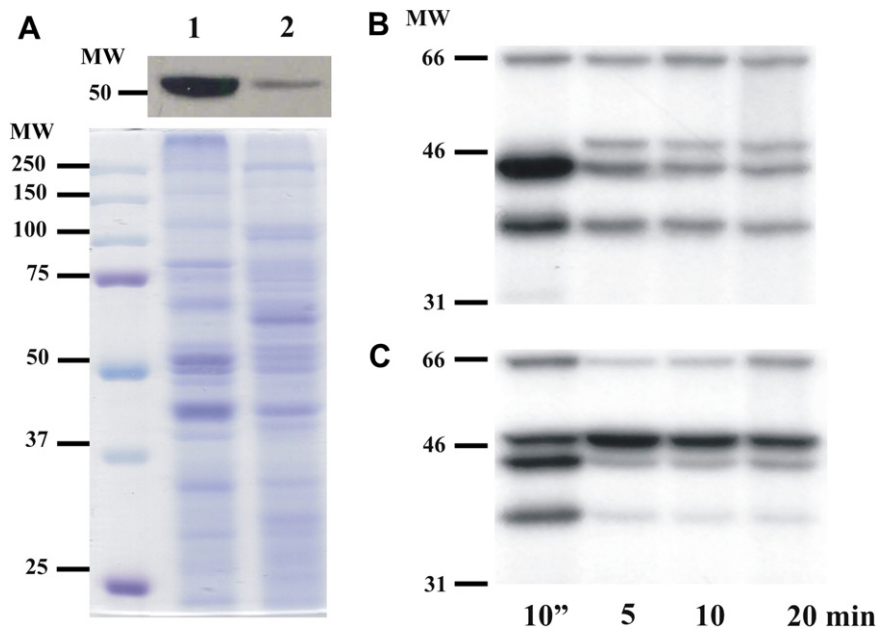


Fig. 3. A. Western blot analysis of Kir 6.1 subunit. The proteins (20 μ g each) from the plasma cellular membrane of rat heart (lane 1) and HPM (lane 2) were processed by SDS-PAGE and electrotansferred to PVDF membrane or stained with Coomassie. Protein phosphorylation of HPM by radiolabel ATP incubated in the presence of sucrose (B) or K^+ (C). HPM were incubated in the progesterone synthesis media in the presence of ADP- $\gamma^{32}P$ and sucrose or K^+ ; at the times indicated the reaction was stopped with 1.5 volumes of cold methanol. After centrifugation, the pellet was processed to SDS-PAGE and the gels were exposed to autoradiography film as described in Materials and Methods. This is a representative experiment.

presence of sucrose. Second, because in the presence of ATP the increase was two-fold, even when the mitochondria were incubated in the presence of sucrose (Table 1), suggesting that this transport requires energy, probably provided by ATP hydrolysis catalyzed by apyrase [35], similar to the GTPase observed in rat adrenal mitochondria [36].

HPM membranes incorporate cholesterol even in the absence of K^+ or ATP in part due to the partition coefficient of cholesterol. Despite the high contents of endogenous cholesterol [37], in the presence of K^+ , ATP or both a significant increase in the transport of cholesterol into HPM was observed (Fig. 1A and Table 1). However, the electron transport chain of cytochrome P450_{scc} is not the rate limiting step in placental steroidogenesis since progesterone synthesis could be stimulated in the presence of 22-hydroxycholesterol plus K^+ reaching a value of 31.42 ± 5.09 ng P4/mg/min that is 2.6 times more than only with K^+ that was 11.72 ng/P4/mg/min. Then, like in other steroidogenic tissues, in HPM the transport of cholesterol between mitochondrial membranes is the rate limiting step of placental steroidogenesis.

Mitochondrial cholesterol transport requires contact sites and proteins such StAR [10,36,38–42]. It has been reported that mitochondrial K^+ uptake is associated to water transport producing swelling of mitochondria [6], changing the volume of mitochondrial matrix and favoring contact sites formation for oxidative phosphorylation [11]. In HPM the isolation of contact sites with steroidogenic capacity has been previously reported [13]. Proteins from contact sites isolated in the presence of sucrose showed a different electrophoretic pattern when compared to the contact sites isolated in the presence of K^+ (Fig. S1). Uniform contact sites were observed in the presence of K^+ , suggesting a homogeneous protein composition. Then, it is possible that proteins in these membrane structures increased their activity under the influence of K^+ which in turn induces mitochondrial morphological changes [18].

Our results show that progesterone synthesis increased in the presence of K^+ over the control containing sucrose. There are two ways to increase progesterone synthesis; one is by increasing

cholesterol transport between mitochondrial membranes and the other is by supplying 22-hydroxycholesterol that freely cross mitochondrial membranes without requirements of a protein transport. The first one is the physiological and the second is the artificial way. Then, it is reasonable to suggest that K^+ contributes to the transport of cholesterol from the outer to the inner mitochondrial membranes. Besides, although HPM have a high content of cholesterol in the outer membrane [34] the concentration of progesterone is low in the presence of sucrose at the same osmolality as our results show.

Steroidogenesis and protein phosphorylation are linked in certain steroidogenic cells, with StAR being one of the key phosphoproteins [30]. Although the human placenta does not contain StAR [10], the phosphorylation of proteins in HPM by PKA activity could modulate steroidogenesis [31]. Our results show that the phosphorylation of a 46 kDa protein increases in the presence of K^+ (Fig. 3C) compared to sucrose (Fig. 3B). Thus kinase activity or specific protein phosphorylation induced by the presence of K^+ could also be a contributor to the changes observed in steroid biosynthesis.

When mito- K^+_{ATP} was maintained open by the presence of malonate, progesterone synthesis remained as in the control (Table 2), and the influx of K^+ was unchanged (Fig. S2).

The increase of steroidogenesis observed with the inhibitors of K^+ uptake suggests that K^+ has a relevant role outside the mitochondria to modulate the synthesis of progesterone. Under physiological conditions, K^+ is moving dynamically between the cytoplasm and the mitochondria, but in the absence of K^+ in the incubation media, mitochondria release K^+ from matrix to cytoplasm. Quinine blocks the uptake of K^+ which remains outside the mitochondria stimulating progesterone production (Fig. S3). Statistical differences were observed for progesterone synthesis in the presence of quinine at concentrations between 0 and 80 mM of K^+ , where the stimulation by the presence of K^+ and the inhibitor were in the same magnitude (Fig. 2A), which correlates with the results of Table 3 where there are statistical differences between the control without K^+ and the presence of the inhibitors.

The Kir subunit from mito- K_{ATP} channel was identified in HPM by Western blot using an affinity purified goat polyclonal antibody against human C-terminal Kir 6.1 (Fig. 3A). In the presence of valinomycin, which equilibrates the $[K^+]$ across mitochondrial membranes, the synthesis of progesterone was reduced from 1.7 ± 0.7 to 0.9 ± 0.3 (Table 3). Interestingly, the presence of valinomycin did not swell the HPM as compared to yeast mitochondria (data not shown). Under these experimental conditions, in the presence of 120 mM K^+ the HPM membrane potential was lost, but not the synthesis of progesterone. It has been reported that the mitochondrial membrane potential is necessary for the processing of StAR to the active form of 30 kDa, and therefore for the transport of cholesterol [43]. However, our data suggest that the membrane potential is not necessary for steroidogenesis in HPM. Even more, progesterone synthesis has been observed in isolated contact sites of HPM where there is no membrane potential [13]. Thus, the effects observed could be explained if it is proposed that K^+ is a cofactor in the mechanism responsible for cholesterol transport between mitochondrial membranes.

The relevance of K^+ in mitochondria has been described previously. It was reported an increase of respiration in rat liver mitochondria promoted by K^+ and due to an increase in state 3 of respiration [32]. Martinez et al. [18] reported that in HPM the mitochondrial membrane potential was not modified by osmolarity, but morphological changes were induced when HPM were isolated in K^+ probably because it induces the formation new contact sites [20].

An apyrase activity associated to progesterone synthesis in HPM has been reported [35]. Interestingly, K^+ -channel inhibitors glibenclamide, quinine or TPP did not modify the apyrase activity (data not shown). These inhibitors bind to the same place of ATP [4,5]. Indeed, ATP is the physiological inhibitor of the channel [3]. Because the activity of apyrase is so high in HPM [44], these inhibitors associate to ATP-binding site producing a partial inhibition of ATP hydrolysis (data not shown). This data suggests that the basal activity of apyrase is enough for progesterone synthesis supporting the assumption that apyrase participates in placental steroidogenesis [35], similar to GTPase from rat adrenal mitochondria [36].

In conclusion, the data presented suggest that K^+ contributes to placental steroidogenesis by modulating the formation of mitochondrial contact sites and therefore promoting the transport of cholesterol and its transformation into progesterone.

Acknowledgements

This work was partially supported by Grant IN217609 and IN203006 from Dirección General de Apoyo al Personal Académico de la UNAM, and 37263M from the National Council of Science and Technology (CONACyT). R. Milan is a student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas from the Universidad Nacional Autónoma de México and this work is part of her thesis dissertation. The authors thank Dr. J.F. Strauss 3rd for his suggestions and the critical revision of the manuscript and Esther Urrutia M.Sc. for the statistical support and analysis; and also to Dr. José Luis Pérez-García for his in the reviewing the usage of English in this text.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.placenta.2010.07.008

References

- [1] Orlov SN, Hamet P. Intracellular monovalent ions as second messengers. *J Membr Biol* 2006;210:161–72.
- [2] Brierley GP, Baysal K, Jung DW. Cation transport systems in mitochondria: Na^+ and K^+ uniports and exchangers. *J Bioenerg Biomembr* 1994;26:519–26.
- [3] Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T. ATP-sensitive K^+ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 1991;352:244–7.
- [4] Noma A. ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature* 1983;305:147–8.
- [5] Garlid KD. Cation transport in mitochondria—the potassium cycle. *Biochim Biophys Acta* 1996;1275:123–6.
- [6] Halestrap AP. Glucagon treatment of rats activates the respiratory chain of liver mitochondria at more than one site. *Biochim Biophys Acta* 1987;927:280–90.
- [7] Spät A, Pitter JG. The effect of cytoplasmic Ca^{2+} signal on the redox state of mitochondrial pyridine nucleotides. *Mol Cell Endocrinol* 2004;215:115–8.
- [8] Sugawara T, Holt JA, Driscoll D, Strauss 3rd JF, Lin D, Miller WL, et al. Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and pseudogene to chromosome 13. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4778–82.
- [9] Bose HS, Whittall RM, Huang MC, Baldwin MA, Miller WL. N-218 MLN64 a protein with StAR-like steroidogenic activity is folded and cleaved similarly to StAR. *Biochemistry* 2000;39:11722–31.
- [10] Pollack SE, Furth EE, Kallen CB, Arakane F, Kiriakidou M, Kozarsky KF, et al. Localization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene are required for transcription in protein in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;82:4243–51.
- [11] Bridiczka D. Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy- and protein-transfer. *Biochim Biophys Acta* 1991;1071:291–312.
- [12] Thomsom M. Molecular and cellular mechanisms used in the acute phase of stimulated steroidogenesis. *Horm Metab Res* 1998;30:16–8.
- [13] Uribe A, Strauss 3rd JF, Martinez F. Contact sites from human placental mitochondria: characterization and role in progesterone synthesis. *Arch Biochem Biophys* 2003;413:172–81.
- [14] Espinosa-Garcia MT, Martinez F. Presence of an NAD(P)H dehydrogenase and a b-type cytochrome different from the respiratory chain in submitochondrial particles from human placenta. *Biochem Mol Biol Int* 1996;38:205–14.
- [15] Ohta Y, Yanagibashi K, Hara T, Kawamura M, Kawato S. Protein rotation study of cytochrome P-450 in submitochondrial particles: effect of KCl and intermolecular interactions with redox partners. *J Biochem* 1991;109:594–9.
- [16] Stocco DM. Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim Biophys Acta* 2000;1486:184–97.
- [17] Thomas JL, Myers RP, Strickler RC. Human placental 3 beta-hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase and steroid $\Delta^5-\Delta^4$ -ene-isomerase: purification from mitochondria and kinetic profiles, biophysical characterization of the purified mitochondrial and microsomal enzymes. *J Steroid Biochem* 1989;33:209–17.
- [18] Martinez F, Pardo JP, Flores-Herrera O, Espinosa-Garcia MT. The effect of osmolarity on human placental mitochondria function. *Int J Biochem Cell Biol* 1995;27:795–803.
- [19] Ardehali H, Chen Z, Ko Y, Mejia-Alvarez R, Marban E. Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:11880–5.
- [20] Foster DB, Rucker JJ, Marban E. Is Kir6.1 a subunit of mito- K_{ATP} ? *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366:649–56.
- [21] Martinez F, Kiriakidou M, Strauss 3rd JF. Structural and functional changes in mitochondria associated with trophoblast differentiation: methods to isolate enriched preparations of syncytiotrophoblast mitochondria. *Endocrinology* 1997;138:2172–83.
- [22] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [23] Martinez F, Espinosa-Garcia T, Flores-Herrera O, Pardo JP. Respiratory control induced by ATP in human term placental mitochondria. *Placenta* 1993;14:321–31.
- [24] Martinez F, Eschegoyen S, Briones R, Cuellar A. Cholesterol increase in mitochondria: a new method of cholesterol incorporation. *J Lipid Res* 1988;29:1005–11.
- [25] Garcia-Perez C, Pardo JP, Martinez F. Ca^{2+} modulates respiratory and steroidogenic activities of human term placental mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 2002;405:104–11.
- [26] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- [27] Åkerman KE, Wikström MK. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett* 1976;68:191–7.
- [28] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350–4.
- [29] Arakane F, Kallen CB, Watari H, Stayrook SE, Lewis M, Strauss 3rd JF. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) acts on the outside of mitochondria to stimulate steroidogenesis. *Endocr Res* 1998;24:463–8.
- [30] Poderoso C, Converso DP, Maloberti P, Duarte A, Neuman I, Galli S, et al. A mitochondrial kinase complex is essential to mediate an ERK1/2-dependent

- phosphorylation of a key regulatory protein in steroid biosynthesis. *PLoS One* 2008;3:e1443.
- [31] Maldonado-Mercado MG, Espinosa-Garcia MT, Gomez-Concha C, Monreal-Flores J, Martinez F. Steroidogenesis in BeWo cells: role of protein kinase A and benzodiazepines. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:901–8.
- [32] Devin A, Guerin B, Rigoulet MJ. Response of isolated rat liver mitochondria to variation of external osmolarity in KCl medium: regulation of matrix volume and oxidative phosphorylation. *Bioenerg Biomembr* 1987;29:579–90.
- [33] Halestrap AP, Quinlan PT, Whipps DE, Armston AE. Regulation of the mitochondrial matrix volume in vivo and in vitro. The role of calcium. *Biochem J* 1986;236:779–87.
- [34] Martinez F, Meaney A, Espinosa-Garcia MT, Pardo JP, Uribe A, Flores-Herrera O. Characterization of the F1F0-ATPase and the tightly-bound ATPase activities in submitochondrial particles from human term placenta. *Placenta* 1996;17:345–50.
- [35] Flores-Herrera O, Uribe A, Garcia-Perez C, Milan R, Martinez F. 5'-p-Fluorosulfonylbenzoyl adenosine inhibits progesterone synthesis in human placental mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2002;1585:11–8.
- [36] Xu XS, Xu TS, Robertson DG, Lambeth JD. GTP stimulates pregnenolone generation in isolated rat adrenal mitochondria. *J Biol Chem* 1989;264:17674–80.
- [37] Navarrete J, Flores-Herrera O, Uribe A, Martinez F. Differences in cholesterol incorporation into mitochondria from hepatoma AS-30D and human term placenta. *Placenta* 1999;20:285–91.
- [38] Christenson LK, Strauss 3rd JF. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:175–87.
- [39] Yamazaki T, Kowluru R, McNamara BC, Jefcoate CR. P450scc-dependent cholesterol metabolism in rat adrenal mitochondria is inhibited by low concentrations of matrix Ca^{2+} . *Arch Biochem Biophys* 1995;318:131–9.
- [40] Stocco DM, Clark BJ, Reinhart AJ, Williams SC, Dyson M, Dassi B, et al. Elements involved in the regulation of the StAR gene. *J Mol Cell Endocrinol* 2001;177:55–9.
- [41] Fujieda K, Okuhara K, Abe S, Tajima T, Mukai T, Nakae J. Molecular pathogenesis of lipoid adrenal hyperplasia and adrenal hypoplasia congenita. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;85:483–9.
- [42] Strauss 3rd JF, Christenson LK, Devoto L, Martinez F. Providing progesterone for pregnancy: control of cholesterol flux to the side-chain cleavage system. *J Reprod Fertil Suppl* 2000;55:3–12.
- [43] Cherradi N, Rossier MF, Vallotton MB, Timberg R, Friedberg I, Orly J, et al. Submitochondrial distribution of three key steroidogenic proteins (steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome p450scc and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase enzymes) upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem* 1997;272:7899–907.
- [44] Martinez F, Espinosa-Garcia MT, Flores-Herrera O, Pardo JP. Respiratory control induced by ATP in human term placental mitochondria. *Placenta* 1993;14:321–31.

Referencias

Åkerman KE, Wikström MK. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett* 1976;68:191-197.

Alpy F, Stoeckel ME, Dierich A, Escola JM, Wendling C, Chenardi MP, Vanier MT, Gruenberg J, Tomasetto C, Rio MC. The steroidogenic acute regulatory protein homolog MLN64, a late endosomal cholesterol-binding protein. *J Biol Chem* 2001; 276:4261–4269.

Andrukhiv A, Costa AD, West IC, Garlid KD. Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *Am J Physiol* 2006;291:H2067-74.

Arakane F, Kallen CB, Watari H, Stayrook SE, Lewis M, Strauss JF 3rd. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) acts on the outside of mitochondria to stimulate steroidogenesis. *Endocr Res* 1998;24:463-68.

Ardehali H, Chen Z, Ko Y, Mejia-Alvarez R, Marban E. Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:11880-85.

Bednarczyk P. Potassium channels in brain mitochondria. *Acta Biochem Pol* 2009; 56:385-92.

Bose HS, Whittal RM, Huang MC, Baldwin MA, Miller WL. N-218 MLN64 a protein with StAR-like steroidogenic activity is folded and cleaved similarly to StAR. *Biochemistry* 2000;39:11722-31.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.

Bridiczka D. Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy- and protein-transfer. *Biochim Biophys Acta* 1991;1071:291-12.

Brierley GP, Baysal K, Jung DW. Cation transport systems in mitochondria: Na⁺ and K⁺ uniports and exchangers. *J Bioenerg Biomembr* 1994;26:519-26.

Castillo-Romero ME, Hofmann PG, Martínez A y Tomasini P. Anexos Embrionarios en Embriología – Biología del Desarrollo 2002 1a. Ed. Masson-Doyma 66-79.

Cherradi N, Rossier MF, Vallotton MB, Timberg R, Friedberg I, Orly J, et al. Submitochondrial distribution of three key steroidogenic proteins (steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome p450_{scc} and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase enzymes) upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem* 1997;272:7899-07.

Christenson LK, Strauss JF 3rd. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:175-87.

Costa AD, Jakob R, Costa CL, Andrukhiv K, West IC, Garlid KD. The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 2006; 281:20801-08.

Costa AD, Pierre SV, Cohen MV, Downey JMZ, Garlid KD. cGMP signalling in pre- and post-conditioning: the role of mitochondria. *Cardiovasc. Res* 2008: 344-352.

Devin A, Guerin B, Rigoulet MJ. Response of isolated rat liver mitochondria to variation of external osmolarity in KCl medium: regulation of matrix volume and oxidative phosphorylation. *J Bioenerg Biomembr* 1987;29:579-90.

Doyle DA., Cabral JM., Pfuetzner RA., Kuo AL., Gulbs JM., Chait BT and Mackinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 1998; 280:69-77.

Espinosa-Garcia MT, Martinez F. Presence of an NAD(P)H dehydrogenase and a b-type cytochrome different from the respiratory chain in submitochondrial particles from human placenta. *Biochem Mol Biol Int* 1996;38:205-14.

Feldeman JD, Vician L, Crispino , Hoe , Baudry M, Herschman HR. The Salt-Inducible kinase, SIK, is induced by depolarization in brain. *J Neurochem* 2000;74: 2227–38

Flores-Herrera O, Uribe A, Garcia-Perez C, Milan R, Martinez F: 5'-p-Fluorosulfonylbenzoyl adenosine inhibits progesterone synthesis in human placental mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2002;1585:11-8.

Foster DB, Rucker JJ, Marban E. Is Kir6.1 a subunit of mitoK_{ATP}? *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366:649-56.

Fujieda K, Okuhara K, Abe S, Tajima T, Mukai T, Nakae J. Molecular pathogenesis of lipoid adrenal hyperplasia and adrenal hypoplasia congenita. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;85:483-89.

Garcia-Perez C, Pardo JP, Martinez, F. Ca²⁺ modulates respiratory and steroidogenic activities of human term placental mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 2002;405:104-11.

Garlid KD. Cation transport in mitochondria-the potassium cycle. *Biochim Biophys Acta* 1996;1275:123-26.

Garlid KD., Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the K⁺ cycle. *Biochem Biophys Acta* 2003;1606:23-4.

Halestrap AP, Quinlan PT, Whipps DE, Armston, AE. Regulation of the mitochondrial matrix volume in vivo and in vitro. The role of calcium. *Biochem J* 1986;236:779-87.

Halestrap AP. Glucagon treatment of rats activates the respiratory chain of liver mitochondria at more than one site. *Biochim Biophys Acta* 1987;927:280-90.

Halestrap AP, Brenner C. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem* 2003;10:1507-25.

Hall PF, Chen S, Nakajin S, Shinoda M, Shively JE. Purification and characterization of aromatase from human placenta. *Steroids*. 1987;50:37-50.

Hansson MJ, Morota S, Teilum M, Mattiasson G, Uchino H, Elmér E. Increased potassium conductance of brain mitochondria induces resistance to permeability transition by enhancing matrix volume. *J Biol Chem* 2010;285:741-750.

Hertelendy F, Zakar T Progesterone withdrawal: key to parturition. *A JOG* 2007;289-296.

Horike N, Takemori H, Katoh Y, Doi J, Min L, Asano T, Sun XJS, Yamamoto H, Kasayama S, Muraoka M, Nonakai Y, Okamoto M. Adipose-specific expression, phosphorylation of Ser794 in insulin receptor substrate-1, and activation in diabetic animals of salt-inducible kinase-2. *J Biol Chem* 2003;278:18440–18447.

Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T. ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 1991;352:244-47.

Jefcoate CR, Brake PB. Regulation of cytochrome P4501B1 in cultured rat adrenocortical cells by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Endocrinology* 1995;136:5034-41

Jenkinson DH. Potassium channels – multiplicity and challenges. *Brit J Pharma* 2006;147:S63-S71.

Kriska T, Pilat A, Schmitt JC, Girotti AW. Sterol carrier protein-2 (SCP-2) involvement in cholesterol hydroperoxide cytotoxicity as revealed by SCP-2 inhibitor effects. *J Lipid Res* 2010; 51:3174-84.

Kozoriz MG, Church J, Ozog MA, Naus CC, Krebs C. Temporary sequestration of potassium by mitochondria in astrocytes. *J Biol Chem* 2010; 285:31107-19

Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K⁺ channel of heart mitochondria *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H649-57.

Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an overview. *Biochem Soc Symp* 1999;66:1-15.

Kulawiak B, Bednarczyk P. Reconstitution of brain mitochondria inner membrane into planar lipid bilayer. *Acta Neurobiol Exp* 2005;65:271-76.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-85.

Lesage F, Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279:F793-F01.

Maldonado-Mercado MG, Espinosa-Garcia MT, Gomez-Concha C, Monreal-Flores J, Martinez F. Steroidogenesis in BeWo cells: role of protein kinase A and benzodiazepines. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:901-08.

Martinez F, Eschegoyen S, Briones R, Cuellar A. Cholesterol increase in mitochondria: a new method of cholesterol incorporation. *J Lipid Res* 1988;29:1005-11.

Martinez F, Espinosa-Garcia MT, Flores-Herrera O, Pardo JP. Respiratory control induced by ATP in human term placental mitochondria. *Placenta* 1993;14:321-31.

Martinez F, Espinosa-Garcia T, Flores-Herrera O, Pardo JP. Respiratory control induced by ATP in human term placental mitochondria. *Placenta* 1993;14:321-31.

Martinez F, Kiriakidou M, Strauss JF 3rd. Structural and functional changes in mitochondria associated with trophoblast differentiation: methods to isolate enriched preparations of syncytiotrophoblast mitochondria. *Endocrinology* 1997;138:2172-83.

Martinez F, Meaney A, Espinosa-Garcia MT, Pardo JP, Uribe A, Flores-Herrera O. Characterization of the F1F0-ATPase and the tightly-bound ATPase activities in submitochondrial particles from human term placenta. *Placenta* 1996;17:345-50.

Martinez F, Pardo JP, Flores-Herrera O, Espinosa-Garcia MT. The effect of osmolarity on human placental mitochondria function. *Int J Biochem Cell Biol* 1995;27:795-3.

Navarrete J, Flores-Herrera O, Uribe A, Martinez F. Differences in cholesterol incorporation into mitochondria from hepatoma AS-30D and human term placenta. *Placenta* 1999;20:285-91.

Neufeld EB, Wastney M, Patel S, Suresh S, Adele M. Cooney AM, Dwyer NK, Roff CF, Ohno K, Morris JA, Carstea ED, Incardona JP, Strauss JFIII, Vanier MT, Patterson MC, Brady RO, Pentchev PG, Blanchette-Mackiea EJ. The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *J Biol Chem* 1999;274:9627-9635.

Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 1983;305:147-48.

Ohta Y, Yanagibashi K, Hara T, Kawamura M, Kawato S. Protein rotation study of cytochrome P-450 in submitochondrial particles: effect of KCl and intermolecular interactions with redox partners. *J Biochem* 1991;109:594-99.

Oria- Hernández J, Cabrera N, Pérez-Montfort R, Ramírez-Silva L. Pyruvate kinase revisited: the activating effect of K⁺. *J Biol Chem* 2005; 280: 37924–37929.

Olson TM, Terzic A. Human K_{ATP} channelopathies: Diseases of metabolic homeostasis. *Eur J Physiol* 2010;460:295-306.

Orlov SN, Hamet P. Intracellular Monovalent Ions as Second Messengers. *J Membrane Biol* 2006;210:161-172.

Orme-Johnson. Distinctive properties of adrenal cortex mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1990;1020:213-31.

O'Rourke B. Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circ Res* 2004;94:420–32.

Paucek P., Mironova G., Mahdi F., Beavis AD., Woldegiorgis G., Garlid KD. Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem* 1992; 267:26062-69.

Perdersen RC, Brownie AC Cholesterol side-chain cleavage in the rat adrenal cortex: Isolation of a cycloheximide-sensitive activator peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:1882-1886.

Poderoso C, Converso DP, Maloberti P, Duarte A, Neuman I, Galli S, et al. A mitochondrial kinase complex is essential to mediate an ERK1/2-dependent phosphorylation of a key regulatory protein in steroid biosynthesis. *PLoS One* 2008;3:e1443.

Pollack SE, Furth EE, Kallen CB, Arakane F, Kiriakidou M, Kozarsky KF, et al. Localization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene are required for transcription in protein in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;82:4243-51.

Sato T, Saito T, Saegusa N, Nakaya H. Mitochondrial Ca^{2+} -activated K^+ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation* 2005;111:198-203.

Spät A, Pitter JG. The effect of cytoplasmic Ca^{2+} signal on the redox state of mitochondrial pyridine nucleotides. *Mol Cell Endocrinol* 2004;215:115-18.

Stocco DM, Clark, BJ, Reinhart AJ, Williams SC, Dyson M, Dassi B, et al. Elements involved in the regulation of the StAR gene. *J Mol Cell Endocrinol* 2001;177:55-9.

Stocco DM. Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim Biophys Acta* 2000;1486:184-97.

Strauss JF 3rd, Christenson LK, Devoto L, Martinez F. Providing progesterone for pregnancy: control of cholesterol flux to the side-chain cleavage system. *J Reprod Fertil Suppl* 2000;55:3-12.

Strauss JF 3rd, Kishida T, Christenson LK, Fujimoto T, Hiroi H. START domain proteins and the intracellular trafficking of cholesterol in steroidogenic cells. *Mol Cell Endo* 2004;202:59-5.

Sugawara T, Holt JA, Driscoll D, Strauss JF 3rd, Lin D, Miller WL, et al. Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and pseudogene to chromosome 13. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4778-82.

Szewczyk A, Jarnuszkiewicz W, Kunz WS. Mitochondrial potassium channels. *IUMBMB Life* 2009 61:134-43.

Takemori H, Kato Y, Horike N, Junko D, Okamoto M. ACTH-induced Nucleocytoplasmic Translocation of Salt-inducible Kinase . *J Bio Chem* 2002; 44:42334–42343, 2002

Thomas JL, Myers RP, Strickler RC. Human placental 3 beta-hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase and steroid Δ^5 - Δ^4 -ene-isomerase: purification from mitochondria and kinetic profiles, biophysical characterization of the purified mitochondrial and microsomal enzymes. *J Steroid Biochem* 1989;33:209-17.

Thomsom M. Molecular and cellular mechanisms used in the acute phase of stimulated steroidogenesis. *Horm Metab Res* 1998;30:16-8.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-54.

Uribe A, Strauss JF 3rd, Martinez F. Contact sites from human placental mitochondria: characterization and role in progesterone synthesis. Arch Biochem Biophys 2003;413:172-81.

Vahouny V, Chanderbhan R, Noland BJ, Irwin D, Dennis P, Lambeth JD, Scallen TJ. Sterol Carrier Proteina. Identification of adrenal sterol carrier protein 2 and site of action for mitochondrial cholesterol utilization. J Biol Chem 1983;258:11731–11737.

Wallner M., Meera P., Toro L. Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channels: A transmembrane beta-subunit homolog. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 4137–4142.

Watari H, Arakane F, Moog-Lutz, Kallen CB, Tomasetto C, Gerton GL, Rio MC, Bakers ME, Strasus JFIII. MLN64 contains a domain with homology to the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that stimulates steroidogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 8462–8467.

Xu XS, Xu TS, Robertson DG, Lambeth JD. GTP stimulates pregnenolone generation in isolated rat adrenal mitochondria. J Biol Chem 1989;264:17674-80.

Yamazaki T, Kowluru R, McNamara BC, Jefcoate CR. P450_{scc}-dependent cholesterol metabolism in rat adrenal mitochondria is inhibited by low concentrations of matrix Ca²⁺. Arch Biochem Biophys 1995;318:131-39.