



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**MECANISMO DE REGULACIÓN DE LA ESTEROIDOGÉNESIS PLACENTARIA
MEDIADA POR PKA**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
MED. CIR. ERIKA GÓMEZ CHANG**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ TUTOR
DRA. MARINA MACÍAS SILVA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO
FACULTAD DE MEDICINA**

MÉXICO, D. F. OCTUBRE DE 2014.



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.

ÍNDICE

Contenido	Página
Agradecimientos	i
Dedicatoria	ii
Lista de abreviaturas	iii
Lista de figuras y tablas	v
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Antecedentes	5
2.1 Generalidades de la placenta	5
2.2 Esteroidogénesis	7
2.3 Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis	9
2.4 Modulación de la esteroidogénesis dependiente de AMPc	10
2.5 Modulación de la esteroidogénesis independiente de AMPc	14
2.6 Placenta Humana	16
2.7 Inhibidores de la PKA	18
2.7.1 Péptido inhibidor de la proteína cinasa (PKI)	18
2.7.2 H89	19
2.7.3 RpcAMP	20
3. Justificación	21
4. Hipótesis	22
5. Objetivos	23
6. Estrategia experimental	24
6.1 Aislamiento de mitocondrias del sinciotrofoblasto de la placenta humana	24
6.2 Consumo de oxígeno mitocondrial	24
6.3 Preparación de las fracciones submitocondriales	24
6.4 Determinación de la actividad de los complejos I y II en MPH y membranas	25
6.5 Síntesis de progesterona	26
6.6 Determinación de proteína	26
6.7 Electroforesis, inmunoelectrotransferencia y autorradiografía	26

6.8 Fosforilación de proteínas mitocondriales	27
6.9 Determinación de la actividad de la PKA en MPH y fracciones submitocondriales	27
6.10 Ensayo de fosforilación <i>in vitro</i>	28
6.11 Análisis estadístico	28
7. Resultados	29
7.1 Evaluación de la pureza de las fracciones submitocondriales	29
7.2 Identificación de la isoforma de la PKA y distribución de la subunidad C α y R β II en las fracciones submitocondriales	32
7.3 Actividad de la PKA en MPH intactas y en las fracciones submitocondriales	36
7.4 Efecto de los activadores de la PKA en la esteroidogénesis y la fosforilación de proteínas de MPH	38
7.5 Efecto del db-AMPC en la disociación de las subunidades C α de las MPH	43
7.6 Efecto de los inhibidores de la PKA en la esteroidogénesis y en la fosforilación de proteínas mitocondriales	45
7.7 Efecto del H89 en la fosforilación de proteínas de MPH	49
7.8 Fosforilación <i>in vitro</i> de proteínas de las fracciones submitocondriales	52
7.9 Efecto del HCO $_3^-$ en la síntesis de progesterona	54
8. Discusión y Conclusiones	55
Referencias	65
Publicaciones	71

AGRADECIMIENTOS

El trabajo realizado para esta tesis de Doctorado se llevó a cabo en el laboratorio 5 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Federico Martínez Montes, con los siguientes apoyos:

Beca CONACyT para estudiantes nacionales de posgrado número 215670.

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM (IN211912, IN217609) y del CONACyT (168025).

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mi Tutor, el Dr. Federico Martínez Montes, por haberme aceptado en su laboratorio permitiéndome ser parte de su equipo. Gracias por sus enseñanzas y por todo su apoyo a lo largo de estos años.

A mi Comité Tutor, conformado por la Dra. Marina Macías Silva y el Dr. Ignacio Camacho Arroyo, por sus valiosas aportaciones y por todo su apoyo y disposición a lo largo del proyecto.

A los miembros del Jurado por todas sus opiniones y sugerencias que permitieron mejorar esta Tesis.

A la Dra. María Esther Urrutia Aguilar por el análisis estadístico.

DEDICATORIA

A mi Madre, por enseñarme el valor de la tenacidad y por mostrarme con su ejemplo que en esta vida y ante todas las circunstancias, sean adversas o favorables, se debe ser de “una sola pieza”. Gracias por apoyarme y por impulsarme de todas las formas posibles.

A mi Padre, “La enciclopedia con pies”, por enseñarme la importancia del estudio y del compromiso y por mostrarme lo valioso que es el conocimiento. Gracias por todo el apoyo que me ha permitido llegar hasta aquí.

A mis 4 abuelos, porque sé que dondequiera que se encuentren, siempre me están cuidando y ayudando.

A mis sobrinos, E. Augusto y T. Emilio, por hacerme sonreír desde el día en que nacieron.

A la Dra. Irma Romero Álvarez, por ser todos los días desde que la conozco, un ejemplo de esfuerzo, tenacidad y compromiso. Por mostrarme que “las cosas se hacen bien... y además se concluyen, o mejor no se hacen”. Gracias por la gran amistad, el cariño, la confianza, el tiempo compartido y sobre todo, por ser un gran apoyo en todo momento y de muy diversas formas para que pudiera concluir este trabajo.

.... y por supuesto, a Chester y a Minky!

¡Gracias a todos por ser una parte fundamental en mi formación personal y profesional!

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
A	
ACS4	AA-preferring acyl-CoA synthase
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
Adx	Adrenodoxina
AKAP	A-Kinase Anchoring Protein
Akt/PKB	Proteína cinasa B
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANT	Translocador de nucleótidos de adenina
AR	Adrenodoxina reductasa
ARTISt	Arachidonic Acid Related Thioesterase Involved in Steroidogenesis
ATF-1	Factor activador de la transcripción
ATP	Adenosín trifosfato
C	
CREB	Proteína fijadora de los elementos de respuesta a AMPc
CYP P450 _{scc}	Cholesterol side chain cleavage enzyme
Cyt b	Citocromo b
D	
DAG	Diacilglicerol
db-AMPc	Dibutiril AMPc
E	
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EPAC	Proteínas de intercambio de nucleótidos
F	
FS	Fracción soluble
G	
GMPC	Guanosín monofosfato cíclico
H	
H89	N-[2-bromocinamilamino etil]-5-isoquinolina sulfonamida Inhibidor de la subunidad catalítica de PKA
hCG	Hormona gonadotropina coriónica humana
HEPG2	Línea celular derivada de coriocarcinoma hepatocelular
I	
I-1	Inhibidor de fosfatasa 1
IGF-1	Factor de crecimiento semejante a insulina 1
Il-1	Interleucina 1
IRS	Proteínas sustrato del receptor de insulina
L	
LH	Hormona luteinizante
M	
MAO B	Monoamino oxidasa B
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógeno
ME	Membrana mitocondrial externa
MI	Membrana mitocondrial interna

MLN64	Metastatic Lymph Node 64
MPH	Mitocondrias del sinciciotrofoblasto de la placenta humana
P	
PDE	Fosfodiesterasa
PKA	Proteína cinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico
PKC	Proteína cinasa C
PKI	Péptido inhibidor de la PKA
PMA	Éster de forbol (Forbol-12-miristato-13-acetato)
PP1	Proteína fosfatasa 1
PS	Fosfatidilserina
P-Ser	Serinas fosforiladas
P-Thr	Treoninas fosforiladas
PTPD1	Fosfatasa de tirosina 1
R	
RpcAMP	Adenosín-3'5'-monofosforotioato cíclico. Análogo del AMPc
S	
SB	Sustrato de PKA biotinilado (Kemptido biotinilado)
SF-1	Factor esteroideogénico 1
SKIP	Sphingosine Kinase Interacting Protein
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory protein
START	StAR-related Transfer domain
Subunidad C	Subunidad catalítica de PKA
Subunidad R	Subunidad reguladora de PKA
T	
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
3 β -HSD	1,3b-hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ^{4-5} isomerasa
8Br-AMPc	8-Bromoadenosín 3'5'-monofosfato cíclico

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Contenido	Página
Figura 1 Esquema de la segmentación del cigoto y formación del blastocisto	5
Figura 2 Esquema de la fijación del blastocisto al epitelio endometrial	6
Figura 3 Esquema de la síntesis de progesterona por las mitocondrias de la placenta humana	9
Figura 4 Modulación de la esteroidogénesis. Activación de receptores acoplados a proteínas G y vía mediada por AMPc-PKA	12
Figura 5 Modulación de la esteroidogénesis. Fosforilación de factores de transcripción asociados a la esteroidogénesis	13
Figura 6 Participación de PKC en la modulación de la esteroidogénesis	15
Figura 7 Participación de MAPK en la modulación de la esteroidogénesis	15
Figura 8 Inmunodetección de la monoamino oxidasa y del citocromo b en las mitocondrias aisladas del sinciotrofoblasto y en las fracciones submitocondriales	30
Figura 9 Inmunodetección de la PKA	33
Figura 10 Identificación de la isoforma de la PKA	34
Figura 11 Inmunodetección de PKA C α y R β II en mitocondrias intactas y fracciones submitocondriales lavadas con 2 M KCl	35
Figura 12 Actividad de la PKA en las mitocondrias intactas y en las fracciones submitocondriales	37
Figura 13 Efecto de los activadores de la PKA en la síntesis de progesterona	39
Figura 14 Efecto del AMPc en la fosforilación de proteínas de mitocondrias intactas	40
Figura 15 Efecto del db-AMPc en la fosforilación de proteínas de mitocondrias intactas	41
Figura 16 Efecto del 8Br-AMPc en la fosforilación de proteínas de mitocondrias intactas	42
Figura 17 Inmunodetección de PKA C α en mitocondrias pre incubadas con 0.5 mM db-AMPc	44
Figura 18 Efecto de los inhibidores de la PKA en la síntesis de progesterona.	46
Figura 19 Efecto de los inhibidores de la PKA en la fosforilación de proteínas de mitocondrias intactas	47
Figura 20 Efecto del RpcAMP en la síntesis de progesterona y en la fosforilación de proteínas de mitocondrias intactas	48
Figura 21 Inmunodetección de fosfoproteínas	50
Figura 22 Inmunodetección de sustratos fosforilados por la AKT	51
Figura 23 Fosforilación <i>in vitro</i> por la PKA	53
Figura 24 Efecto del HCO $_3^-$ en la síntesis de progesterona	54
Figura 25 Modelo propuesto sobre la participación de la PKA en la fosforilación y en la síntesis de progesterona	60
Tabla I Actividad de los complejos respiratorios I y II	31

RESUMEN

La síntesis de progesterona por la placenta humana es esencial para el mantenimiento del embarazo; sin embargo, no se conocen por completo los estímulos endocrinos, paracrinos o intracrinos, así como las cascadas de transducción que regulan la esteroidogénesis placentaria. No obstante, la vía de señalización más estudiada es la que está mediada por AMPc/PKA, la cual ha sido implicada en la fosforilación de factores de transcripción y proteínas relacionadas con la esteroidogénesis.

Con la finalidad de evaluar la contribución de la PKA en la síntesis de progesterona y en la fosforilación de proteínas en las mitocondrias del sinciotrofoblasto de la placenta humana (MPH), se buscó la isoforma de la PKA, su distribución en las diferentes fracciones submitocondriales y la respuesta frente a inhibidores y activadores específicos de la PKA en el contexto de la esteroidogénesis. Los resultados muestran que la subunidad catalítica α de la PKA se distribuye en todas las fracciones submitocondriales, y la subunidad reguladora β II es la principal isoforma identificada tanto en la membrana interna como en la externa. La PKA localizada en la membrana interna muestra la mayor actividad *in vitro*. Aunado a esto, la PKA parece estar fuertemente asociada a la fracción membranal de las mitocondrias y no se favorece su disociación por efecto de los activadores conocidos de la holoenzima (AMPc o db-AMPc), como ocurre en el modelo clásico de activación de la PKA. Con respecto a la síntesis de progesterona y a la fosforilación de proteínas, ambos eventos son claramente modificados por los inhibidores de la subunidad catalítica de PKA (H89), pero son insensibles tanto a los inhibidores de la subunidad reguladora (RpcAMP) como a los activadores de la holoenzima (AMPc, db-AMPc). La ausencia de respuesta frente a los activadores clásicos de la PKA sugiere que la PKA localizada en las MPH no puede ser activada y únicamente es susceptible de ser inhibida. Aunado a esto, la falta de disociación de la subunidad catalítica en presencia de db-AMPc sugiere que la activación de la PKA no necesariamente se traduce en su disociación. En su conjunto, los datos sugieren que una PKA intramitocondrial podría ser un componente esencial de una compleja cascada de transducción relacionada con la esteroidogénesis en la placenta humana. Sin embargo, la activación de la PKA y su repercusión en la esteroidogénesis para la producción de progesterona durante el embarazo podría lograrse a través de un mecanismo diferente al que se observa con la PKA de localización citosólica.

ABSTRACT

Progesterone synthesis by the human placenta is essential for the maintenance of pregnancy, but the signal transduction cascades as well as the endocrine, paracrine or intracrine stimulus that regulate placental steroidogenesis are not completely understood. However, the most studied signaling pathway is the one mediated by cAMP/PKA, since PKA has been implicated in the phosphorylation of transcription factors and proteins related to steroidogenesis. In order to assess the overall contribution of PKA in progesterone synthesis and protein phosphorylation in syncytiotrophoblast mitochondria of human placenta (HPM), we studied the PKA isoforms, their distribution in different submitochondrial fractions and their response to specific inhibitors or activators in the context of steroidogenesis. The results show that PKA α catalytic subunit is distributed in all the submitochondrial fractions, whereas the β II regulatory subunit is the main isoform identified in both the outer and inner membranes. The PKA located in the inner membrane shows the highest *in vitro* activity. Moreover, PKA seems to be tightly associated to the mitochondrial membrane fraction, but most importantly, its dissociation cannot be promoted by the known holoenzyme activators (cAMP or db-cAMP), as occurs in the classical model of PKA activation. With respect to progesterone synthesis and protein phosphorylation, both events are clearly modified by inhibitors of the PKA catalytic subunit (H89) but are neither sensitive to inhibitors of the regulatory subunit (RpcAMP) nor to activators of the holoenzyme (cAMP, db-cAMP). The unresponsiveness to the classical holoenzyme activators prompts us to consider that PKA of HPM could already be active and it is only sensitive to inhibitors but probably not to activators. Moreover, the lack of catalytic subunit release in the presence of db-cAMP, suggests that the activation of PKA does not necessarily means dissociation.

Our results suggest that an intramitochondrial PKA could be an essential component as part of a complex transduction cascade related to placental steroidogenesis. However, PKA activation and its repercussion on steroidogenesis, producing progesterone in pregnancy, could be reached by a mechanism different from that observed with the cytosolic PKA.

1.- INTRODUCCIÓN

La biosíntesis de hormonas esteroideas es un proceso que puede estar regulado en forma aguda o crónica dependiendo del tejido donde se lleve a cabo. De manera general, la respuesta aguda, en tejidos como gónadas y glándulas suprarrenales, se caracteriza por iniciarse en el transcurso de minutos posterior al estímulo e involucra la movilización y translocación del colesterol hacia la membrana mitocondrial interna por la proteína StAR (por sus siglas en inglés *Steroidogenic Acute Regulatory protein*). La respuesta crónica, en tejidos como la placenta o cerebro, se inicia en el curso de horas e implica una serie de eventos genómicos que favorecen el incremento de la expresión de genes que codifican para enzimas que participan en la esteroidogénesis (Stocco *et al.*, 2005). Diversos factores y hormonas modulan positiva o negativamente la esteroidogénesis a través de la activación de diferentes cascadas de señalización, mediante las cuales ocurren importantes eventos de fosforilación y desfosforilación de proteínas que son necesarias para la biosíntesis de esteroideas (Thomson, 2002; Gorostizaga *et al.*, 2007).

Por medio de un mecanismo de regulación crónica, la placenta humana se encarga de sintetizar a la progesterona, hormona indispensable para el mantenimiento del embarazo. Tanto en la placenta como en otros tejidos esteroidogénicos, la vía de señalización mediada por PKA (proteína cinasa dependiente de AMPc) ha sido la más estudiada. En tejidos como las gónadas y las glándulas suprarrenales se sabe que la fosforilación catalizada por esta cinasa es de gran relevancia en la modulación de la actividad de proteínas como la StAR o de factores de transcripción asociados a la esteroidogénesis.

En el caso de la placenta humana, no se sabe con exactitud cuáles son las vías de señalización o la identidad de los estímulos intracrinos, paracrinos o endocrinos que regulan la síntesis de progesterona. Sin embargo, datos obtenidos en mitocondrias aisladas de la placenta humana (MPH) y en líneas celulares de coriocarcinoma (BeWo) han mostrado que la PKA está asociada a la síntesis de progesterona (Maldonado-Mercado *et al.*, 2008; Gomez-Concha *et al.*, 2011). En este sentido, el conocimiento de los mecanismos que se encargan de activar o modular la síntesis de progesterona ayudaría a comprender el fino control de este proceso biosintético que permite que la placenta sintetice y libere concentraciones crecientes de progesterona a lo largo del embarazo.

En el presente trabajo, se utilizaron las mitocondrias aisladas a partir del sinciotrofoblasto de la placenta humana, las cuales constituyen un modelo útil para cuantificar la síntesis de progesterona y en forma concomitante observar en el contexto de la esteroidogénesis, cambios en la fosforilación y desfosforilación de proteínas asociados a la actividad de la PKA.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Generalidades de la placenta humana

La placenta humana es un órgano feto-materno transitorio que funge como interfase entre la madre y el feto. Las principales funciones de la placenta son: metabolismo, transporte, nutrición, respiración y producción de hormonas; actividades que son esenciales para el desarrollo normal del feto y para el mantenimiento del embarazo.

A partir del cigoto, no sólo se desarrolla el embrión, sino también las membranas fetales y la mayor parte de la placenta. A su paso por la trompa uterina, el cigoto se segmenta y aproximadamente 4 días después de la fecundación, constituye una estructura denominada blastocisto, la cual está conformada por:

- a) una masa interna de células o embrioblasto, que darán origen al embrión
- b) una capa delgada externa de células, el trofoblasto, que formará parte de la placenta; y
- c) la cavidad del blastocisto (Moore y Persaud 1995) (Figura 1).

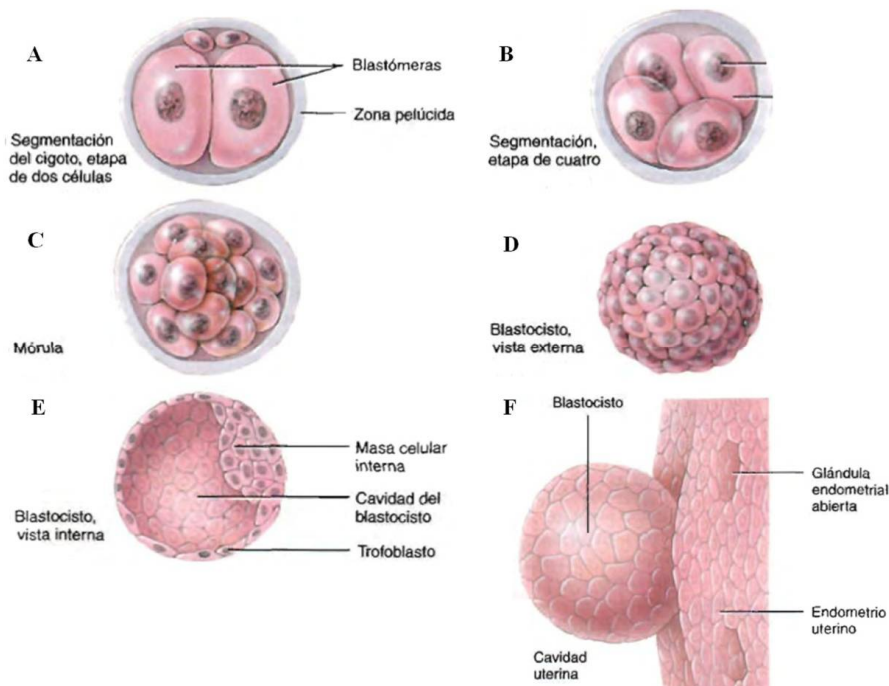


Figura 1. Esquema de la segmentación del cigoto y formación del blastocisto. Tomado de la página <http://congorosa.blogspot.mx/2012/06/segmentacion-del-cigoto-formacion-del.html>, visitada en Junio de 2014.

Aproximadamente a los seis días de la fecundación, el blastocisto se fija en el epitelio endometrial y el trofoblasto comienza a proliferar y gradualmente se diferencia en dos capas: citotrofoblasto (trofoblasto celular) y sinciotrofoblasto (trofoblasto sincicial) (Figura 2). Hacia el final de la primera semana de gestación, el blastocisto se encuentra implantado en forma superficial en la capa compacta del endometrio (Figura 1). El tejido trofoblástico forma parte de la porción fetal que constituye a la placenta. La porción materna, se deriva del endometrio uterino.

El sinciotrofoblasto consiste en una masa protoplásmica multinucleada en la que no se observan límites intercelulares. Esta masa celular extiende procesos filiformes que erosionan el epitelio endometrial e invaden su tejido conectivo (estroma endometrial) (Moore y Persaud 1995).

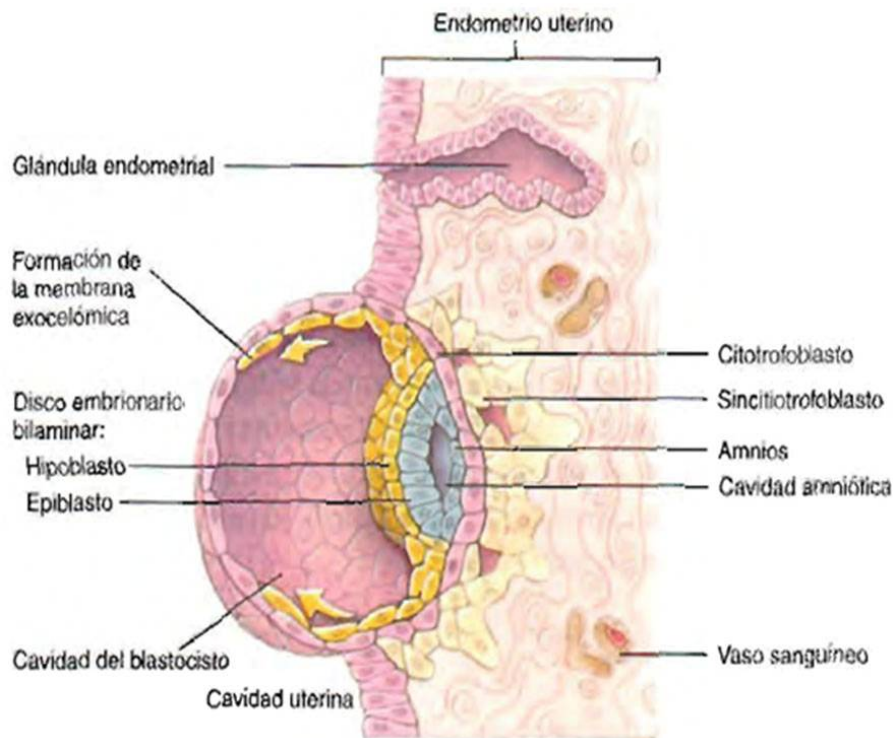


Figura 2. Esquema de la fijación del blastocisto al epitelio endometrial. El sinciotrofoblasto penetra el epitelio e invade el estroma endometrial. Tomado de la página <http://congorosa.blogspot.mx/2012/06/segmentacion-del-cigoto-formacion-del.html>, visitada en Junio de 2014.

El sinciotrofoblasto se encarga de producir la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG), la cual pasa a la sangre materna y es requerida para el mantenimiento y la adaptación inmunológica del embarazo (Bansal *et al.*, 2012).

El mantenimiento del embarazo durante el primer trimestre depende de la síntesis de hCG, la cual previene la degeneración del cuerpo lúteo (Handschuh *et al.*, 2007). A su vez, el cuerpo lúteo es el encargado de la secreción de progesterona bajo el estímulo trófico de la hCG. Entre la 6ª y la 8ª semana del embarazo, disminuye la síntesis de progesterona por el cuerpo lúteo y el tejido trofoblástico de la placenta toma el control como la principal fuente de producción de esta hormona (Tuckey, 2005).

2.2 Esteroidogénesis

La síntesis de hormonas esteroides es un proceso indispensable para el mantenimiento de la función reproductiva y de la homeostasis corporal. Las hormonas esteroides tienen como precursor al colesterol y se clasifican en esteroides sexuales (andrógenos, estrógenos y progestinas), glucocorticoides (cortisol) y mineralocorticoides (aldosterona) y se sintetizan principalmente en glándulas suprarrenales, gónadas, placenta y sistema nervioso central. Dependiendo del tejido, la esteroidogénesis puede estar sujeta a regulación aguda o crónica (Stocco *et al.*, 2005). En los tejidos de regulación aguda como las gónadas, la respuesta bajo el control de hormonas tróficas se inicia en el orden de minutos e implica la movilización y el transporte de colesterol desde la membrana mitocondrial externa hacia la membrana interna (Miller, 1988). En tejidos como el cerebro y la placenta, la respuesta crónica involucra eventos genómicos que se inician en el transcurso de horas posterior al estímulo y que resultan en un incremento en la expresión de enzimas que participan en la esteroidogénesis (Moore *et al.*, 1992). En el caso de las glándulas suprarrenales, la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) promueve la esteroidogénesis en el transcurso de días al incrementar la transcripción de genes que codifican para enzimas esteroidogénicas. Asimismo, en un lapso de 15 a 60 minutos, la misma hormona estimula la fosforilación de proteínas como la StAR, la cual es necesaria

para translocar al colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la membrana interna (Roostae *et al.*, 2009; Miller, 2013).

La placenta humana es considerada como un tejido de regulación crónica debido a que durante el embarazo no se producen fluctuaciones sustanciales en las concentraciones de progesterona (Darne *et al.*, 1989). Por otro lado, la placenta humana no tiene a la proteína StAR, en su lugar, expresa otras proteínas como la MLN64 (por sus siglas en inglés *Metastatic Lymph Node 64*), la cual comparte homología con respecto al dominio START (por sus siglas en inglés *StAR-related Transfer domain*) de la proteínas StAR, por lo que se ha sugerido que la proteína MLN64 podría ser la encargada de movilizar el colesterol requerido para la síntesis de progesterona (Sugawara *et al.*, 1995; Watari *et al.*, 1997; Bose *et al.*, 2000; Strauss *et al.*, 2000).

Tanto en la placenta humana como en otros tejidos esteroidogénicos, la síntesis de hormonas esteroides inicia con la conversión del colesterol a pregnenolona por la enzima P450_{scc} (CYP11A1; por sus siglas en inglés *Cholesterol side chain cleavage enzyme*), localizada en la membrana mitocondrial interna (Sanderson, 2006). La adrenodoxina y la adrenodoxina reductasa constituyen una pequeña cadena que transporta electrones hacia el P450_{scc} desde el NADPH. En el caso de la placenta, las mitocondrias del sinciciotrofoblasto expresan la enzima 1,3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ^{4-5} isomerasa (3 β -HSD), la cual cataliza la biotransformación de pregnenolona a progesterona (Figura 3). La actividad de P450_{scc} y por ende la esteroidogénesis, están limitados por la velocidad de transporte del colesterol hacia la membrana mitocondrial interna (Tuckey, 2005).

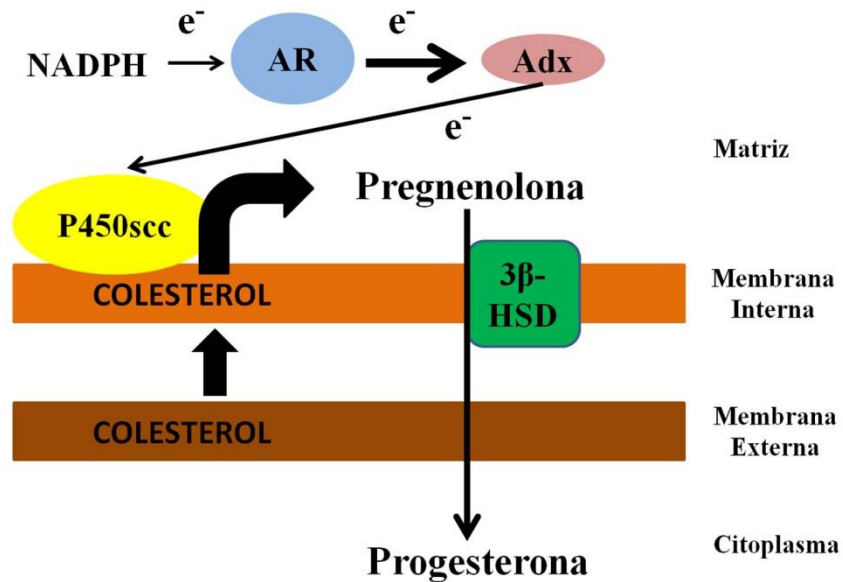


Figura 3. Esquema de la síntesis de progesterona por las mitocondrias de la placenta humana. P450scc: *Cholesterol side chain cleavage enzyme*; 3 β -HSD: 1,3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ^{4-5} isomerasa; AR: adrenodoxina reductasa; Adx: Adrenodoxina. Modificado de Tuckey 2005.

2.3.- Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis

La cascada de transducción más estudiada en el contexto de la esteroidogénesis es la que está mediada por la cinasa de proteínas dependiente de AMPc (PKA); sin embargo, existe evidencia sobre la participación de otras vías de señalización activadas tanto por hormonas como por factores derivados de macrófagos y factores de crecimiento que actúan independientemente del AMPc y que pueden estar mediadas por la proteína cinasa C (PKC), calcio, metabolitos derivados del ácido araquidónico o proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) (Stocco *et al.*, 2005). No obstante, en el contexto de la esteroidogénesis, se ha visto que las respuestas generadas independientemente de las concentraciones del AMPc, suelen ser poco potentes comparadas con las que están mediadas por AMPc/PKA, por lo que su efecto se ha relacionado con la modulación o incluso la potenciación de la esteroidogénesis actuando en forma sinérgica con la PKA (Thomson, 2002; Stocco *et al.*, 2005; Gorostizaga *et al.*, 2007).

2.4.- Modulación de la esteroidogénesis dependiente de AMPc

Ya sea en los tejidos que están sujetos a regulación aguda o crónica, la síntesis de hormonas esteroides inicia por el estímulo de moléculas que funcionan como mensajeros primarios, los cuales pueden ser de naturaleza hormonal. Estos mensajeros primarios interactúan con receptores que poseen siete dominios transmembranales que se encuentran acoplados a las proteínas Gs, las cuales, a su vez, activan a la adenilato ciclasa, la cual cataliza la formación de AMPc a partir del ATP. El AMPc funge como segundo mensajero activando a la PKA. Cabe mencionar que existen otras proteínas que también pueden ser activadas por AMPc, tales como canales iónicos, fosfodiesterasas, proteínas de intercambio de nucleótidos (EPAC) y proteínas dependientes de GMPc (Dremier *et al.*, 2003; Dodge-Kafka y Kapiloff, 2006; Aye *et al.*, 2009).

La cascada de señalización mediada por PKA es universal, pero muestra diferencias en cuanto a los factores que la estimulan y los efectos finales. Estructuralmente, la PKA consiste en un tetrámero constituido por dos subunidades catalíticas (C) y dos subunidades reguladoras (R) (Taylor *et al.*, 2008). Existen 4 tipos de subunidades reguladoras (RI α , RII α , RI β y RII β), todas codificadas por genes separados; y 3 tipos de subunidades catalíticas (C α , C β y C γ) (Skálhegg y Taskén, 1997). El tipo de subunidad reguladora define a las isoformas de PKA como tipo I (α y β) y tipo II (α y β). Las isoformas RI α y RII α son ubicuas, en tanto que las isoformas RI β y RII β se expresan predominantemente en cerebro y tejido adiposo, entre otros órganos endocrinos (McKnight *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2008). Las isoformas de PKA no solo difieren en cuanto a su distribución tisular y subcelular, también muestran notables diferencias en cuanto a sus propiedades físicas y químicas, como es el caso de la afinidad por el AMPc. Cuando la PKA está inactiva, la holoenzima constituye un tetrámero de dos subunidades C unidas a dos subunidades R. Típicamente, las subunidades R se han descrito como proteínas de anclaje, sin embargo también funcionan como inhibidoras de la activación de las subunidades C (Brown *et al.*, 2009), ya que ambas subunidades catalíticas se disocian y quedan activas cuando se unen dos moléculas de AMPc por cada subunidad reguladora. Las diferencias en la afinidad por el AMPc dependiendo de la isoforma de PKA ha sugerido que la holoenzima puede

decodificar señales dependiendo de la tasa de activación, duración y magnitud de la señal generada por el AMPc (Taylor *et al.*, 2008).

Las subunidades R también muestran diferencias en la afinidad con la que se unen a las proteínas AKAP (por sus siglas en inglés A-kinase anchoring proteins) (Aye *et al.*, 2009). Las AKAPs son una familia de proteínas funcionalmente relacionadas y conformadas por más de 50 miembros, las cuales resultan del procesamiento y empalme alternativo del ARNm. Estas proteínas funcionan como sitios de andamiaje que anclan a la PKA, a través de sus subunidades reguladoras, en localizaciones subcelulares específicas. La asociación específica de ciertas AKAPs con las isoformas de PKA constituye un mecanismo de regulación de esta cinasa, asegurando que ésta se ubique cerca del sitio donde se genera el AMPc que la activa y de los sustratos que serán fosforilados. En el caso de la mitocondria, la proteína AKAP-121 fija a la isoforma II de la PKA a la membrana mitocondrial externa; sin embargo, también se ha observado que puede fijar ARNm e incluso una fosfatasa modulada por PKA denominada PTPD1 (por sus siglas en inglés *protein tyrosine phosphatase*) (Felicello *et al.*, 2005; Livigni *et al.*, 2006; Gomez-Concha *et al.*, 2011). El anclaje de cinasas y fosfatasas por las AKAPs sugiere que los eventos de fosforilación y desfosforilación asociados a diversos eventos celulares podrían ser más eficientes al compartamentalizar las vías de transducción de señales. (Livigni *et al.*, 2006; Pidoux y Taskén, 2010).

La principal vía de señalización estudiada en los tejidos esteroideogénicos es la que involucra la activación de los receptores acoplados a proteínas G con la subsecuente estimulación de la adenilato ciclasa y el incremento en las concentraciones intracelulares de AMPc. En las gónadas y en las glándulas suprarrenales, la respuesta aguda mediada por AMPc-PKA produce la fosforilación de enzimas como la hidrolasa de ésteres de colesterol o de proteínas que participan en el transporte del colesterol como la StAR (Figura 4). En este sentido, diversos reportes en la literatura han demostrado la importancia de la participación de PKA modulando la actividad de la proteína StAR al fosforilarla en los residuos de Ser 194/195 y Ser 56/57 en el humano y en el modelo murino, respectivamente (Arakane *et al.*, 1997; Fleury *et al.*, 2004). Por otro lado, en tejidos de regulación crónica como la placenta humana y el sistema nervioso central, los procesos de fosforilación y

desfosforilación ocurren principalmente en los factores de transcripción como el esteroideogénico 1 (SF-1), GATA-4 y la proteína fijadora de los elementos de respuesta a AMPc (CREB) e incluso en aquellos factores que modulan la transcripción de genes que codifican para enzimas esteroideogénicas o de proteínas que participan en el transporte de colesterol (Manna *et al.*, 2009) (Figura 5).

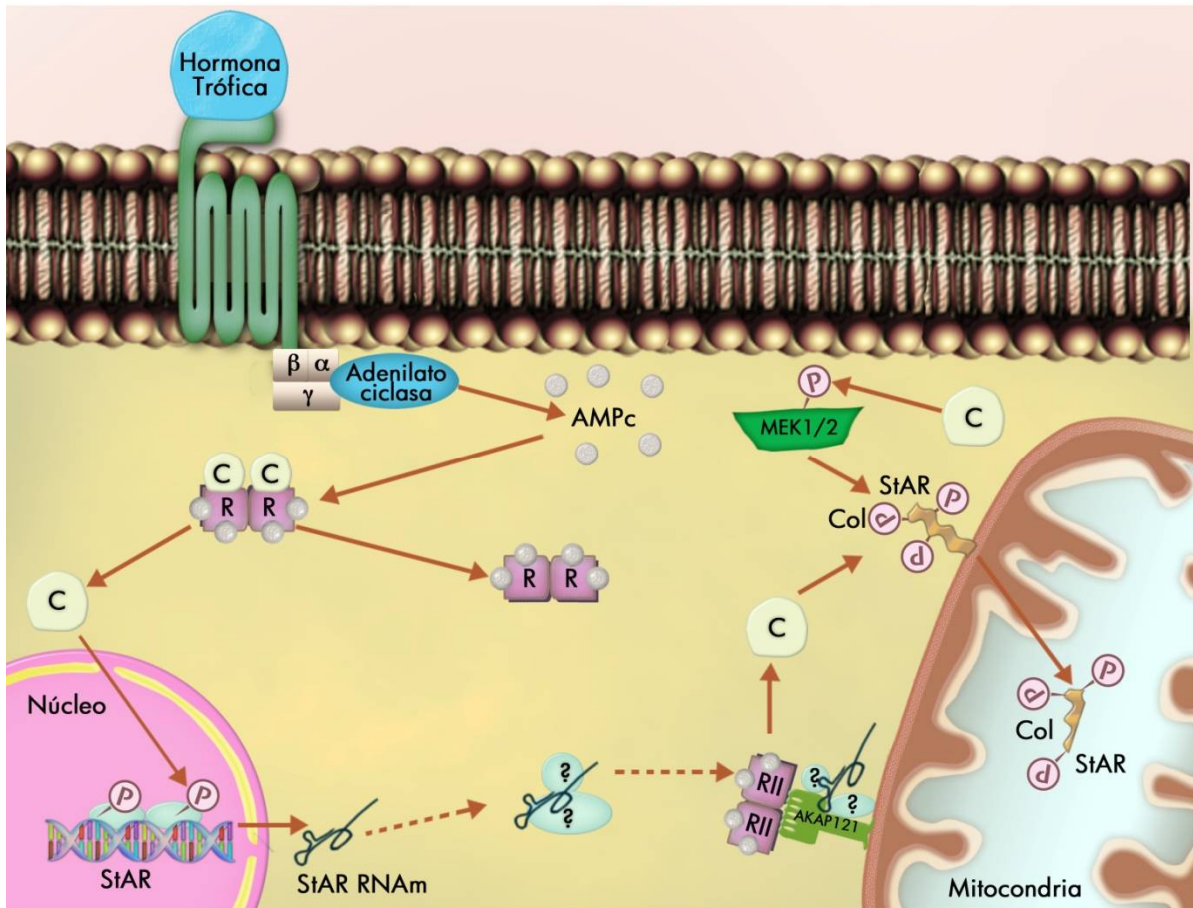


Figura 4. Modulación de la esteroidogénesis. Activación de receptores acoplados a proteínas G y vía mediada por AMPc-PKA. Tomado de Gómez-Chang *et al.*, 2012.

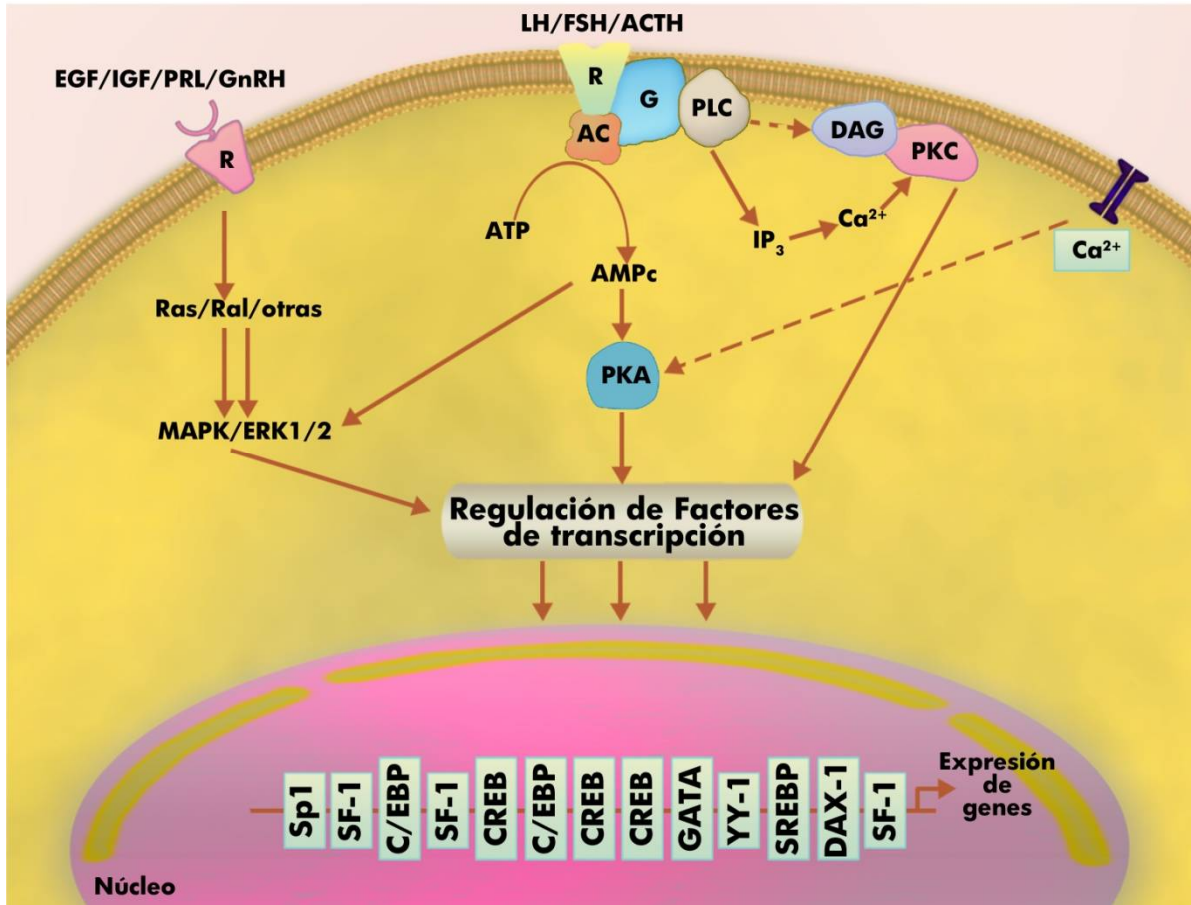


Figura 5. Modulación de la esteroidogénesis. Fosforilación de factores de transcripción asociados a la esteroidogénesis. Tomado de Gómez-Chang *et al.*, 2012.

2.5.- Modulación de la esteroidogénesis independiente de AMPc

Como se mencionó previamente, existe evidencia de la participación de cascadas de transducción independientes de AMPc que participan en la regulación de la esteroidogénesis. En este sentido, destacan las vías de señalización mediadas por PKC, MAPK y metabolitos derivados del ácido araquidónico.

PKC pertenece a una familia de cinasas de serina y treonina con al menos 12 isoformas descritas en mamíferos. Se han subdividido en distintas familias dependiendo del tipo de activadores que requieren: convencionales (α , β I, β II, γ), que requieren fosfatidilserina (PS), diacilglicerol (DAG) y calcio; nuevas (δ , ϵ , η , θ), requieren PS y DAG pero no calcio; y atípicas (λ /I, ζ), que son insensibles tanto a calcio como a DAG. Las isoformas difieren en varios aspectos como son su estructura primaria, su distribución tisular y subcelular, su mecanismo de acción *in vitro*, la respuesta a señales extracelulares y la especificidad del sustrato (Mehta, 2014). La actividad de PKC no sólo es regulada en función del segundo mensajero, sino que también depende de su asociación a proteínas como PRKCA-binding protein, que ancla a la PKC α a la mitocondria (Horbinski y Chu, 2005).

Los reportes en relación a la participación de PKC en la esteroidogénesis han sido motivo de controversia. En algunos casos, la fosforilación mediada por esta cinasa se ha asociado al incremento en la síntesis de hormonas esteroideas, en tanto que en otros casos, se ha observado inhibición de la esteroidogénesis o incluso no se observa efecto alguno. Para inducir la activación de PKC, se ha empleado PMA, un éster de forbol que funciona como análogo del DAG; sin embargo, su efecto puede ser únicamente a nivel transcripcional, sin alterar la tasa de fosforilación. Por otra parte, la activación de PKC con PMA induce a su vez la activación de cinasas efectoras de MAPK como ERK1/2, las cuales fosforilan factores de transcripción como CREB (Stocco *et al.*, 2005). Estos datos han sugerido que PKC y sus activadores podrían participar en la modulación de la esteroidogénesis a través de efectos transcripcionales y postraduccionales (Figura 6).

En el contexto de la esteroidogénesis, en la vía mediada por las MAPK, destacan como primeros mensajeros las citocinas como IL-1 (Interleucina 1) y los factores como

EGF (factor de crecimiento epidérmico) e IGF-1 (factor de crecimiento semejante a insulina), cuyos receptores pueden activar de forma secuencial a otras cinasas efectoras como MEK-ERK1/2.

Se ha visto que la respuesta esteroidogénica mediada por vías como la de MAPK es moderada (menos del 1%) comparada con la que se induce a través de AMPc-PKA. La función de MAPK implica la fosforilación de diversos factores de transcripción como CREB, ATF-1 (factor activador de la transcripción) y cJun/cJunD, asociados a la biosíntesis de esteroides; lo que incluso puede resultar en la regulación de la expresión de la proteína StAR (Stocco *et al.*, 2005) (Figura 7).

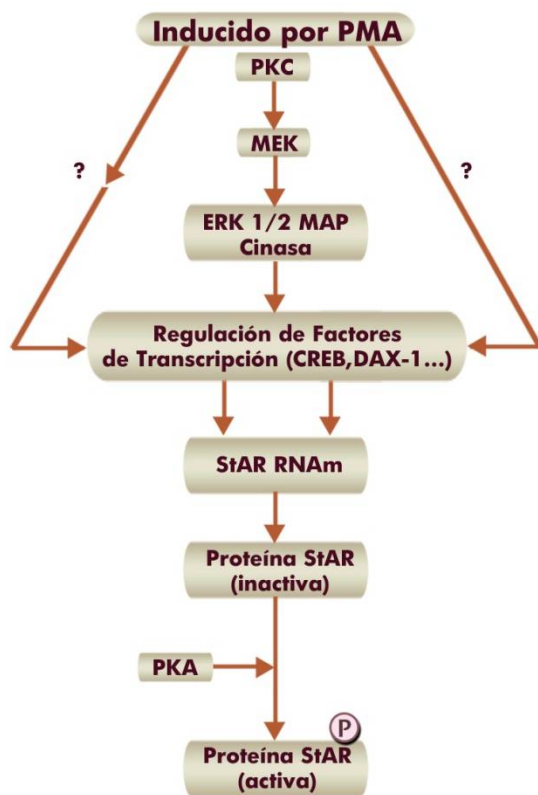


Figura 6. Participación de PKC en la modulación de la esteroidogénesis. Tomado de Gómez-Chang *et al.*, 2012.

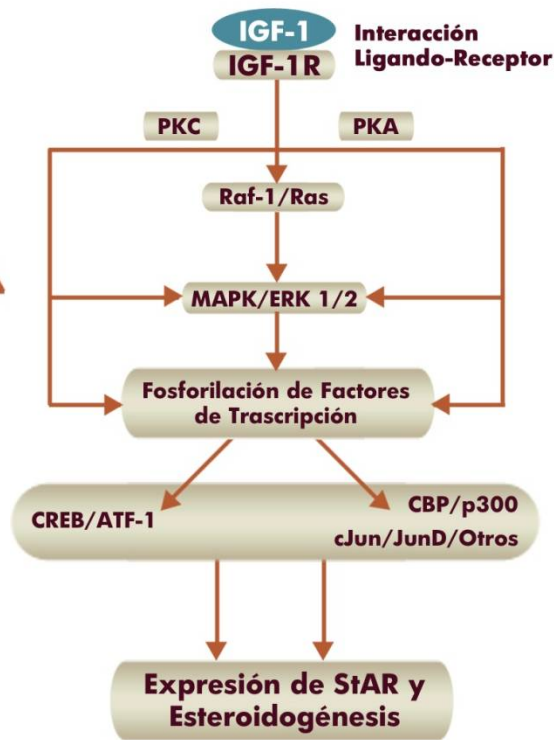


Figura 7. Participación de MAPK en la modulación de la esteroidogénesis. Tomado de Gómez-Chang *et al.*, 2012.

En algunas células esteroideogénicas, hormonas como LH (hormona luteinizante) y hCG inducen la liberación del ácido araquidónico por acción de la fosfolipasa A2. La importancia del ácido araquidónico radica en que sus metabolitos pueden participar en la regulación de la transcripción y la expresión de la proteína StAR. Por otro lado, en células suprarrenales también se ha descrito la participación de la acil-CoA tioesterasa mitocondrial (ARTIS por sus siglas en inglés *Arachidonic Acid Related Thioesterase Involved in Steroidogenesis*) y de la ACS4 (*AA-preferring acyl-CoA synthase*), ambas enzimas indispensables para proveer del ácido araquidónico necesario para la expresión de la proteína StAR (Wang *et al.*, 2000; Maloberti *et al.*, 2005).

2.6.- Placenta humana

Durante la fase secretoria del ciclo menstrual el cuerpo lúteo produce la progesterona necesaria para mantener el embarazo y continúa secretándola hasta las etapas tempranas de la gestación bajo la acción de la hCG. En las células del trofoblasto, la hCG se une a los receptores de la hormona luteinizante/hCG acoplados a proteínas G, activando la vía mediada por AMPc-PKA, con lo cual el tejido trofoblástico toma el control de la síntesis de progesterona.

La cascada de señalización más estudiada en relación a la esteroideogénesis placentaria es la que está mediada por AMPc-PKA. En este sentido, existe suficiente evidencia en cultivos primarios de células de trofoblasto donde el uso de análogos del AMPc no sólo aumenta la síntesis de progesterona, sino que también incrementa la expresión de enzimas como P450_{scc} y adrenodoxina (Nulsen *et al.*, 1989; Tuckey, 2005). Por otro lado, en cultivos de células inmortalizadas de coriocarcinoma (BeWo), la estimulación con AMPc induce la acumulación de P450_{scc} (Ringler y Strauss, 1990).

A pesar de que existen numerosos reportes que indican que la esteroideogénesis placentaria puede estar regulada por LH y hCG, aún no se conoce por completo el papel de otras hormonas en el control de las concentraciones intracelulares de AMPc, así como tampoco se conoce la manera en la que podría interactuar la vía de señalización mediada por PKA de localización citosólica con una cascada de transducción de localización mitocondrial, probablemente también mediada por PKA o incluso por otras cinasas.

Además de la LH y la hCG, se ha propuesto que la producción de AMPc podría estar asociada a la estimulación de receptores adrenérgicos β_2 , pero no de los α_1 en placentas a término. En contraste, se ha reportado que la norepinefrina puede incrementar las concentraciones de AMPc a través de los receptores adrenérgicos α_1 en placentas del primer trimestre. Por otro lado, también se ha propuesto la participación de otras hormonas que estimulan la síntesis de progesterona independientemente del AMPc, como es el caso de los estrógenos, la insulina, el factor de crecimiento semejante a insulina y el factor de crecimiento epidérmico (Ritvos, 1988; Shanker y Rao, 1997; Tuckey, 2005).

La importancia de la vía mediada por AMPc-PKA también ha sido demostrada en células BeWo y en mitocondrias aisladas de la placenta humana, donde en presencia de H89 (un inhibidor de cinasas), se observa la disminución en la síntesis de progesterona. Aunado a esto, en las mitocondrias aisladas de la placenta humana se han identificado numerosas proteínas fosforiladas en residuos de serina y treonina, y además se demostró que existe una interacción directa entre PKA, AKAP-121 y la fosfatasa PTPD1 (Maldonado-Mercado *et al.*, 2008; Gomez-Concha *et al.*, 2011). Todos estos hallazgos han sugerido la participación de PKA en la esteroidogénesis placentaria, aunque de ninguna manera se descarta la potencial participación de otras cinasas. Asimismo, tampoco se descarta la presencia de un sistema completo de señalización dentro de la mitocondria que module la síntesis de progesterona mediante la fosforilación dinámica de proteínas asociadas a la biosíntesis de esteroides.

2.7.- Inhibidores de la PKA

En el estudio de una vía de transducción de señales, se ha vuelto imprescindible el uso de inhibidores que permitan analizar la participación de una o varias cinasas. En el análisis de la actividad de la PKA se han empleado inhibidores endógenos (PKI) o sintéticos (H89, RpcAMP), que principalmente regulan a ésta cinasa a través de 2 mecanismos:

- 1) Inhibición de la actividad de la PKA.
- 2) Regulación de la localización intracelular de la PKA.

Las subunidades reguladoras de la propia PKA tienen la capacidad de modular la actividad de la cinasa a través de los 2 mecanismos mencionados. Con respecto al primer mecanismo, en la forma inactiva de la PKA, dos subunidades reguladoras se unen e inhiben a dos subunidades catalíticas, conformando un tetrámero (Beebe y Corbin, 1986). Después de la unión de dos moléculas de AMPc a cada subunidad reguladora, la holoenzima se disocia y deja libres dos subunidades catalíticas que pueden fosforilar sustratos proteicos. En cuanto al segundo mecanismo, las subunidades reguladoras se unen a las AKAPs, las cuales a su vez anclan a la holoenzima de PKA en estructuras subcelulares específicas (Colledge y Scott, 1999).

La ubicuidad y la importancia de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) en diversos procesos celulares, ha favorecido el desarrollo y uso de diferentes moléculas que inhiben selectivamente a esta cinasa. En los siguientes párrafos se mencionarán los tres inhibidores de la actividad de PKA que fueron empleados en el presente trabajo.

2.7.1.- Péptido inhibidor de la proteína cinasa (PKI)

El PKI (por sus siglas en inglés *Protein Kinase Inhibitor peptide*) es un péptido endógeno termoestable que modula la función de la PKA (Dalton y Dewey, 2006). Inicialmente fue identificado en extractos de músculo esquelético como una sustancia inhibidora que prevenía la activación de la enzima glucógeno fosforilasa (Posner *et al.*,

1964). Posteriormente se demostró que el péptido inhibía selectivamente la actividad de la subunidad catalítica libre de la PKA (Ashby y Walsh, 1972).

El PKI es similar a la subunidad reguladora en cuanto a que modula la actividad de la PKA, por un lado inhibiéndola potente y específicamente y por el otro, influyendo en su localización sub-celular. El PKI funciona como un potente inhibidor (K_i 2 nM) de las subunidades catalíticas de PKA una vez que éstas se encuentran disociadas de las subunidades reguladoras. Aunado a esto, se sabe que el PKI puede regular la localización de las subunidades catalíticas al transportarlas desde el núcleo celular hacia el citoplasma, donde pueden re-asociarse con las subunidades reguladoras para conformar nuevamente la holoenzima inactiva (Dalton y Dewey, 2006). Tomando en cuenta su mecanismo de acción, el PKI es considerado como un inhibidor más específico comparado con otros como el H89 (Murray, 2008).

2.7.2.- H89

El H89 (N-[2-bromocinamilamino etil]-5-isoquinolina sulfonamida) es un derivado de isoquinolina que ha sido ampliamente utilizado como un potente inhibidor de la PKA (K_i 0.05 μ M). Funciona como un inhibidor competitivo del ATP, en el sitio de unión del ATP a la subunidad catalítica de la PKA. Considerando que las subunidades catalíticas deben fijar ATP para llevar a cabo la fosforilación de serinas y treoninas en las proteínas blanco, el bloqueo con H89 previene la fosforilación mediada por la PKA (Murray, 2008). Es importante tomar en cuenta que para este tipo de inhibidores como el H89, el valor de IC_{50} varía en función de las concentraciones celulares de ATP en un momento dado. Asimismo, considerando la abundancia de ATP y de receptores de ATP que pueden existir en una célula o en una estructura subcelular, este tipo de inhibidores puede tener efectos inespecíficos, como sería la inhibición de otras cinasas además de la PKA (Lochner y Moolman, 2006). En este sentido, se ha sugerido que durante el estudio de la actividad de PKA, el H89 sea utilizado junto con otros inhibidores como son el PKI o el RpcAMP.

2.7.3.- RpcAMP

Debido a la composición tetramérica de la PKA, es posible inhibir su actividad mediante el uso de análogos del AMPc, los cuales, al unirse a las subunidades reguladoras, previenen la disociación de la holoenzima y en consecuencia la liberación de las subunidades catalíticas activas (Lochner y Moolmar, 2006).

El RpcAMP es un análogo permeable del AMPc que funciona como un antagonista competitivo de la activación de las isoformas I y II de la PKA medida por AMPc. El RpcAMP se une a las subunidades reguladoras favoreciendo una conformación que tiene alta afinidad por las subunidades catalíticas, con lo que previene la disociación y la activación de la PKA (Yokozaki *et al.*, 1992). Aunado a esto, el RpcAMP es más resistente que el AMPc a la hidrólisis por las fosfodiesterasas. El efecto inhibitorio de este análogo depende tanto de las concentraciones de la cinasa como de las concentraciones del AMPc (Lochner y Moolmar, 2006; Murray, 2008).

3.- JUSTIFICACIÓN

La progesterona mantiene el embarazo y su disminución plasmática durante la gestación se asocia con una mayor probabilidad de aborto o incluso de partos prematuros.

Dada la importancia de la función esteroidogénica de la placenta humana, es relevante elucidar las vías de señalización que participan en la modulación de la síntesis de progesterona en las mitocondrias del sinciciotrofoblasto.

Se sabe que en la placenta las hormonas luteinizante y gonadotropina coriónica humana estimulan la síntesis de progesterona a través de la activación de la PKA medida por AMPc. Sin embargo, aún se desconoce el papel que desempeñan otras hormonas o factores en el control de la síntesis de progesterona a través de PKA.

En mitocondrias de otros tejidos, se ha reportado la presencia de una PKA localizada en la matriz mitocondrial, la cual participa en la regulación de la fosforilación oxidativa. Por otra parte, se ha demostrado que la PKA se asocia a las mitocondrias de la placenta humana y que la esteroidogénesis es sensible a la inhibición de esta cinasa. Estos antecedentes nos orientan a la búsqueda de un sistema completo de señalización en el interior de las mitocondrias del sinciciotrofoblasto mediado por PKA, el cual podría tener una participación importante en la regulación de la síntesis de progesterona.

4.- HIPÓTESIS

La proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) se localiza en las mitocondrias del sinciotrofoblasto y participa en la regulación de la síntesis de progesterona a través de la fosforilación de proteínas mitocondriales.

5.- OBJETIVOS

5.1.- Objetivo General

- Evaluar la participación de la PKA en la síntesis de progesterona en mitocondrias aisladas del sinciotrofoblasto de la placenta humana.

5.1.- Objetivos Particulares

- Identificar la isoforma de la PKA que se localiza en las mitocondrias del sinciotrofoblasto de la placenta humana así como su localización submitocondrial.
- Evaluar la participación de la PKA en la esteroidogénesis a través de su activación con análogos del AMPc.
- Evaluar la participación de la PKA en la esteroidogénesis a través de su inhibición con H89 y RpcAMP.
- Determinar la asociación entre la síntesis de progesterona y la fosforilación de proteínas en mitocondrias aisladas del sinciotrofoblasto.

6.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

6.1.- Aislamiento de mitocondrias del sinciotrofoblasto de la placenta humana

Las placentas humanas de embarazos normales a término se obtuvieron del Hospital de Gineco Obstetricia Núm. 4, “Luis Castelazo Ayala” del IMSS. Las placentas se colectaron inmediatamente después del parto y se procesaron en los siguientes 30 minutos. Las mitocondrias del sinciotrofoblasto se aislaron por el método reportado por Martínez y colaboradores (1997). El grado de contaminación de las mitocondrias con otras fracciones celulares, se determinó con la actividad de varios marcadores enzimáticos como se reportó previamente por Martínez y colaboradores (1992) y por la determinación de la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales.

6.2.- Consumo de oxígeno mitocondrial

La integridad mitocondrial se estimó determinando el consumo de oxígeno utilizando un electrodo de Clark. La mezcla de reacción contenía 1 mg/ml de proteína mitocondrial de sinciotrofoblasto, 250 mM de sacarosa, 10 mM de HEPES, 1 mM de EGTA, 1 mM de EDTA, 10 mM de succinato, 10 mM de K_2HPO_4 , 5 mM de $MgCl_2$ y 0.2% de albúmina de suero bovino a pH 7.4 en un volumen final de 1.2 ml a 37 ° C. El consumo de oxígeno se estimuló por la adición de 300-500 nmol de ADP (Navarrete *et al.*, 1999). Para todos los experimentos se utilizaron las mitocondrias con un control respiratorio superior a 4.

6.3.- Preparación de las fracciones submitocondriales

Con el objetivo de obtener las fracciones submitocondriales (membrana interna, membrana externa y fracción soluble), se empleó el método de choque osmótico reportado por Ardail y colaboradores (1990), con las siguientes modificaciones: se incubaron 20-25 mg de proteína mitocondrial en un baño de hielo con 10 mM de H_3PO_4 , ajustado a pH 7.3 con Tris base y en presencia de 10 mg/ml de aprotinina, 10 mg/ml de leupeptina y 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante 20 minutos. Después de la incubación, se añadió sacarosa para alcanzar una concentración de 0.382 M y la mezcla se incubó durante 20 minutos en un baño de hielo. La mezcla se centrifugó a 12,500 x g durante 10 min a 4°C. El sedimento contenía los mitoplastos y el sobrenadante contenía las

membranas mitocondriales externas. El sobrenadante se centrifugó a 137,000 x g durante 1 h para obtener las membranas externas en el sedimento y en el sobrenadante se mantuvieron las proteínas solubles del espacio intermembranal. Los mitoplastos se incubaron durante 20 minutos en un baño de hielo en 1 mM de H₃PO₄, ajustado a pH 7.3 con Tris base. Después, se añadió sacarosa hasta alcanzar una concentración de 0.31 M y la mezcla se incubó durante 20 minutos en un baño de hielo y se centrifugó a 102,000 x g durante 1 h. El sedimento contenía las membranas internas y el sobrenadante contenía las proteínas solubles de la matriz. Los sobrenadantes que contenían las proteínas solubles de la matriz y del espacio intermembranal se concentraron juntos utilizando un filtro para centrífuga Amicon® Ultra-15. Las fracciones submitocondriales se utilizaron inmediatamente o se mantuvieron a -70°C hasta que se utilizaron. Donde se indique, las fracciones submitocondriales se lavaron con una solución de KCl 2 M.

La pureza de las fracciones submitocondriales se evaluó determinando la actividad enzimática de los complejos I y II de la cadena respiratoria como se describe a continuación.

6.4.- Determinación de la actividad de los complejos I y II en MPH y membranas

Las actividades de los complejos I (NADH:DCPIP oxidorreductasa) y II (succinato:DCPIP oxidorreductasa) se determinaron espectrofotométricamente a 600 nm siguiendo la reducción del aceptor de electrones artificial 2,6 - diclorofenol-indofenol (DCPIP ; 50 μ M ; εDCPIP = 21 mM⁻¹ cm⁻¹). Las MPH, membranas internas o externas se permeabilizaron con 0.3 % de Zwittergent 3-14 y se incubaron en 30 mM de KH₂PO₄, 5 mM de MgCl₂, 1 mM de EGTA, 120 mM de KCl , pH 7.4, y 100 μM de NADH (complejo I) o bien, 10 mM de succinato (complejo II). El complejo II fue activado por la preincubación en presencia de 0.2 mM de fenacina-metanosulfato (PMS) durante 2 min a 25°C. La reacción se inició mediante la adición de NADH o succinato. La concentración final fue de 1 mg de proteína mitocondrial/ml.

6.5.- Síntesis de progesterona

La síntesis de progesterona se determinó en un medio que contiene 120 mM de KCl, 10 mM de MOPS pH de 7.4, 0.5 mM de EGTA, 10 mM de isocitrato, 4 µg de aprotinina/ml, 1 µM de leupeptina, 5 mM de K₂HPO₄ pH 7.4 y 1 mg /ml de proteína mitocondrial, en un volumen final de 50 µl. Después de 20 minutos de incubación a 37°C, la reacción se detuvo mediante la adición de 75 µl de metanol frío. Donde se indique, las mitocondrias se incubaron previamente durante 30 minutos a 4°C con 200 µM de H89, 0.5 mM de AMPc, 0.5 mM de db-AMPc, 20, 50, 100, 200, 300 µM de Rp- AMPc o 30 mM de HCO₃⁻ y la reacción se inició añadiendo el medio de síntesis de progesterona. La progesterona se determinó por radioinmunoanálisis como se describió previamente (Gómez-Concha *et al.*, 2011).

6.6.- Determinación de proteína

La cuantificación de proteína se realizó por el método de Bradford (1976) y se utilizó albúmina sérica de bovino como estándar.

6.7.- Electroforesis, inmunoelectrotransferencia y autorradiografía

Las proteínas mitocondriales se separaron por electroforesis en condiciones desnaturizantes de acuerdo con el método reportado por Laemmli (1970) empleando geles de poliacrilamida al 10% y utilizando 50 µg de proteína mitocondrial por carril. Las proteínas se tiñeron con Coomassie© o se electrotransfirieron a membranas de PVDF (Immobilon P; Millipore) en un sistema semi-seco de electrotransferencia (Bio-Rad) a 25 V durante 50 min.

Para la inmunodetección, se emplearon los anticuerpos dirigidos contra: PKA α cat; PKA β cat; PKA γ cat; PKA Iβ reg; PKA IIβ reg; PKAI α reg; PKAII α reg; citocromo b y monoamino oxidasa B (MAO B) (Santa Cruz Biotechnology). El anticuerpo dirigido contra los sustratos fosforilados por PKA (RRXS*/T*) y AKT (RXXS*/T*) se obtuvieron de Phospho-(Ser/Thr) Kinase Substrate Antibody Sampler Kit (Cell Signaling). Los anticuerpos contra fosfoserina y fosfotreonina se obtuvieron del kit de purificación de fosfoproteínas (PhosphoProtein Purification Kit-QIAGEN). Las inmunodetecciones se

llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante y se emplearon los anticuerpos secundarios apropiados acoplados a peroxidasa de rábano. Se empleó quimioluminiscencia (Amersham Life Science®) para visualizar las bandas de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las membranas de PVDF se expusieron a placas radiográficas BioMax® de Kodak® durante 1 hasta 5 minutos. Los resultados fueron cuantificados por densitometría utilizando un programa de Java para procesamiento de imágenes (ImageJ) desarrollado en el Instituto Nacional de Salud de EE.UU. (de libre acceso en <http://rsb.info.nih.gov/ni-image/>).

6.8.- Fosforilación de proteínas mitocondriales

Las mitocondrias del sinciciotrofoblasto (1mg/ml) se pre-incubaron a 4°C durante 30 minutos en presencia o ausencia de 200 µM de H89, 50 mM RpcAMP, 0,5 mM de 8-bromo adenosín-3',5'-monofosfato cíclico (8Br-AMPC), 0,5 mM de adenosín monofosfato-3',5'cíclico (AMPC) o 0,5 mM de di-butiril adenosín-3',5'-monofosfato cíclico (db-AMPC). La fosforilación de proteínas se inició añadiendo el medio de síntesis de progesterona complementado con 0,32 M $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (6000 Ci/mmol). En los tiempos indicados, la reacción se detuvo con 1,5 volúmenes de metanol frío. La muestra se centrifugó a 13,000 x g y las proteínas fosforiladas del sedimento se separaron por electroforesis en condiciones desnaturizantes. Las proteínas se electrotransfirieron a membranas de PVDF y se analizaron por inmunodetección o por autorradiografía. Las bandas radiactivas se visualizaron por exposición a placas radiográficas BioMax® de Kodak® durante 7 días.

6.9.- Determinación de la actividad de la PKA en MPH y fracciones submitocondriales

La actividad de la PKA se evaluó utilizando el kit comercial, Signa TECT® cAMP-Dependent Protein Kinase (PKA) Assay System, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las mitocondrias intactas o las fracciones submitocondriales se preincubaron a 4°C durante 30 min en presencia o ausencia de 200 µM de H89 o 50 y 200 µM de PKI; la reacción se inició mediante la adición de la mezcla de reacción que contenía amortiguador para el ensayo de PKA, 5 µM de AMPC, 100 µM de sustrato biotinilado de PKA y 0,1 mM

de ATP/ γ ³²P-ATP (6,000 Ci/mmol). Donde se indique, la actividad de PKA se evaluó en ausencia de AMPc. La radiactividad se determinó en un contador de centelleo Beckman Coulter. La actividad se reporta como el porcentaje de ³²P incorporado al sustrato biotinilado (Kemptido), que es altamente específico para la PKA. Cada experimento se realizó por triplicado con al menos tres placentas diferentes.

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico y se adquirieron de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA) E. Merck (Darmstadt , Germany), y BioRad (Hercules, CA, USA). γ ³²P - ATP se obtuvo de Perkin Elmer (USA).

6.10.- Ensayo de fosforilación *in vitro*

El ensayo de fosforilación *in vitro* se llevó a cabo mediante la incubación de 50 μ g de mitocondrias intactas, fracción soluble, membrana externa o interna a 37°C durante 20 minutos en un amortiguador de cinasas 1X, que contenía 12 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 60 mM de NaCl, 7.2 mM de MgCl₂ y 0.1 mM de ATP/ γ ³²P-ATP (6,000 Ci/mmol) en un volumen final de 50 μ l. Para iniciar la reacción, se agregó la subunidad catalítica de PKA recombinante (40 kDa cAMP-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit) (Promega). El sustrato biotinilado de PKA (Kemptido) se utilizó como control positivo.

6.11.- Análisis estadístico

Para la determinación de la actividad de PKA en las mitocondrias intactas y en las fracciones submitocondriales, se emplearon muestras frescas y congeladas. Por ello, se realizó una prueba t de muestras independientes la cual mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones. Los datos mostrados representan la media \pm desviación estándar de tres a cinco experimentos realizados en forma independiente y por triplicado. Puesto que el tamaño de los grupos eran desiguales, pero suponiendo una distribución normal y con igualdad de varianza, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) con una prueba de Tukey post hoc. Los datos obtenidos a partir del análisis densitométrico de las bandas observadas en las autorradiografías o en las inmunodetecciones de tres experimentos independientes se agruparon y los resultados se presentan como la media \pm desviación estándar. Los resultados se analizaron mediante una prueba t pareada. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

7.- RESULTADOS

7.1.- Evaluación de la pureza de las fracciones submitocondriales

Las mitocondrias aisladas del sincitiotrofoblasto de la placenta humana (MPH) se fraccionaron para obtener por separado membrana interna, membrana externa y la fracción soluble (matriz y espacio intermembrana). La pureza de estas fracciones submitocondriales se evaluó mediante la inmunodetección de dos proteínas marcadoras: citocromo b (Cyt b) para la membrana interna y la monoamino oxidasa B (MAO B) para la membrana externa.

Los resultados mostraron que Cyt b se identificó en la membrana interna (Figura 8A panel izquierdo) con una intensidad significativamente mayor que en la membrana externa (Figura 8B panel izquierdo). MAO B se encuentra en la membrana externa (Figura 8A, panel derecho) con una intensidad significativamente mayor que en la membrana interna (Figura 8B, panel derecho).

Por otro lado, se determinó la actividad enzimática de los complejos respiratorios I (NADH:DCPIP oxidoreductasa) y II (succinato:DCPIP oxidoreductasa). La actividad de los complejos I ($p = 0.02$) y II ($p = 0.01$) fue significativamente mayor en la membrana interna comparado con la membrana externa (Tabla I). La menor actividad del complejo I en la membrana mitocondrial interna comparado con las MPH intactas podría deberse a la congelación y descongelación de las membranas.

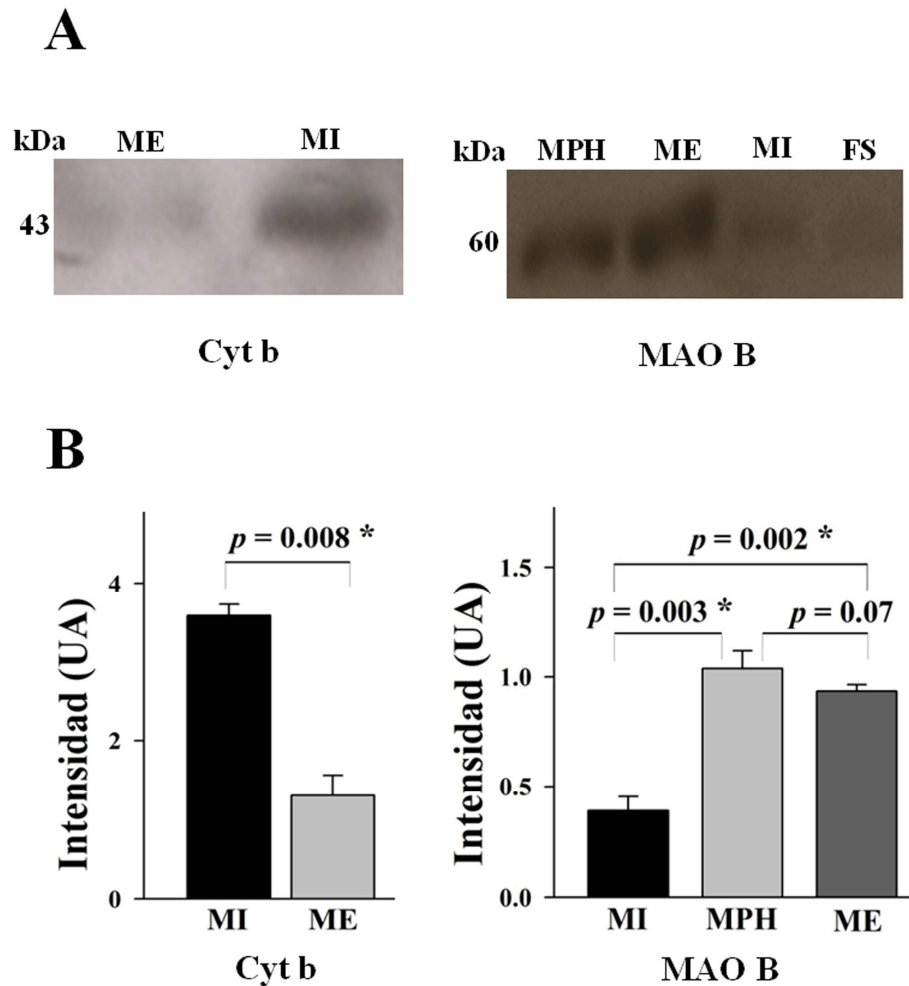


Figura 8. (A) Inmunodetección de la monoamino oxidasa (MAO B) y del citocromo b (Cyt b) en las mitocondrias aisladas del sincitiotrofoblasto y en las fracciones submitocondriales. (B) Intensidad de las bandas MAO B y Cyt b. Los datos representan el promedio \pm DE de experimentos realizados por triplicado con al menos tres placentas. * $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. MPH: mitocondrias del sincitiotrofoblasto de la placenta humana; ME: membrana mitocondrial externa; MI: membrana mitocondrial interna; FS: fracción soluble (matriz y espacio intermembrana). La cantidad de proteína fue de 50 μ g por carril.

Tabla I

Actividad de los complejos respiratorios I y II en las mitocondrias de la placenta y en las membranas interna y externa				
	Complejo I		Complejo II	
	NADH deshidrogenasa nmol/mg/min	n	Succinato deshidrogenasa nmol/mg/min	n
MPH	22.1 ± 3.1	3	2.57 ± 0.7	6
MI	3.48 ± 0.8*	11	13.5 ± 4.0*	3
ME	0.68 ± 0.2	5	1.62 ± 1.3	5

Tabla I. Las actividades enzimáticas se determinaron como se describió en la estrategia experimental. Los resultados se expresan como nmol DCPIP/mg/min. Los valores corresponden al promedio ± DE de experimentos realizados por triplicado con 3 a 11 placentas. La actividad de los complejos I y II fue significativamente mayor en la membrana interna comparado con la membrana externa; complejo I ($p = 0.02$), complejo II ($p = 0.01$). * $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. MPH: mitocondrias del sinciotrofoblasto de la placenta humana; ME: membrana mitocondrial externa; MI: membrana mitocondrial interna.

7.2.- Identificación de la isoforma de la PKA y distribución de las subunidades C α y R β II en las fracciones submitocondriales

Con el objetivo de identificar la presencia de la PKA en la fracción soluble (matriz y espacio intermembrana), esta última se concentró en el menor volumen posible.

Tanto en las MPH intactas como en todas las fracciones submitocondriales se inmunodetectaron dos bandas (Figura 9A): una de aproximadamente 40 kDa, la cual corresponde a la subunidad catalítica (C) α de PKA; y otra de 90 kDa, la cual podría tratarse de un precursor de alto peso molecular, el cual ya ha sido reportado previamente (Ma y Thomson, 2012), o bien podría tratarse de un reconocimiento inespecífico.

El análisis densitométrico mostró que la intensidad de la banda de 40 kDa fue significativamente mayor en la fracción soluble que en las membranas interna y externa. Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre las MPH intactas y el resto de las fracciones submitocondriales (Figura 9B). Las subunidades catalíticas β y γ no se inmunodetectaron.

Por otra parte, también se evaluó la presencia y la isoforma de la subunidad reguladora (R) de la PKA. Tanto en las MPH intactas como en las membranas externa e interna, se inmunodetectaron bandas de aproximadamente 50 kDa, las cuales corresponden a las subunidades R β I y R β II (Figura 10A, panel superior e inferior respectivamente), siendo más abundante la subunidad R β II. Al evaluar la presencia de la subunidad R β II, también se encontró una banda de aproximadamente 70 kDa, la cual, al igual que en el caso de la subunidad C α , podría tratarse de un precursor de mayor peso molecular o un reconocimiento inespecífico.

El análisis densitométrico mostró que la intensidad de la banda que corresponde a R β I fue significativamente mayor en las MPH intactas en comparación con las membranas externa e interna (Figura 10B, panel superior). En el caso de la subunidad R β II, no hubo diferencias significativas en la intensidad de las bandas entre las MPH intactas y las membranas interna y externa (Figura 10B, panel inferior). Tomando en cuenta que se obtuvo una baja inmunodetección de la subunidad R β I, únicamente se continuó evaluando la presencia de la subunidad R β II.

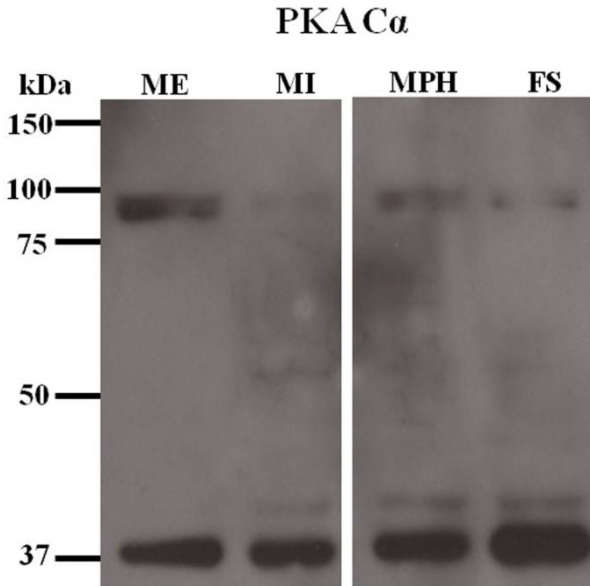
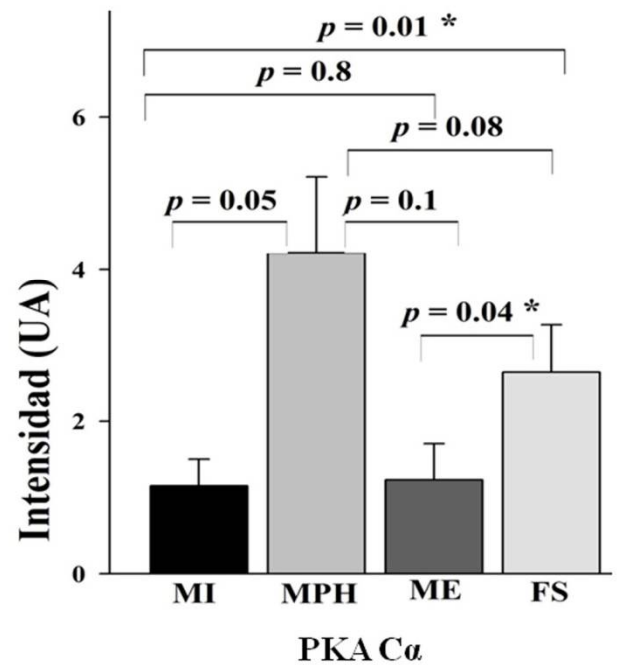
A**B**

Figura 9. Inmunodetección de la PKA. (A) Distribución de la subunidad $C\alpha$ en las fracciones submitocondriales. Con el anticuerpo dirigido contra la PKA- $C\alpha$ se inmunodetectaron dos bandas, una más intensa, de aproximadamente 40 kDa y otra de menor intensidad de aproximadamente 90 kDa. (B) Análisis densitométrico. * $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. MPH: mitocondrias del sinciotrofoblasto de la placenta humana; ME: membrana mitocondrial externa; MI: membrana mitocondrial interna; FS: fracción soluble (matriz y espacio intermembrana). La cantidad de proteína fue de 50 μ g por carril.

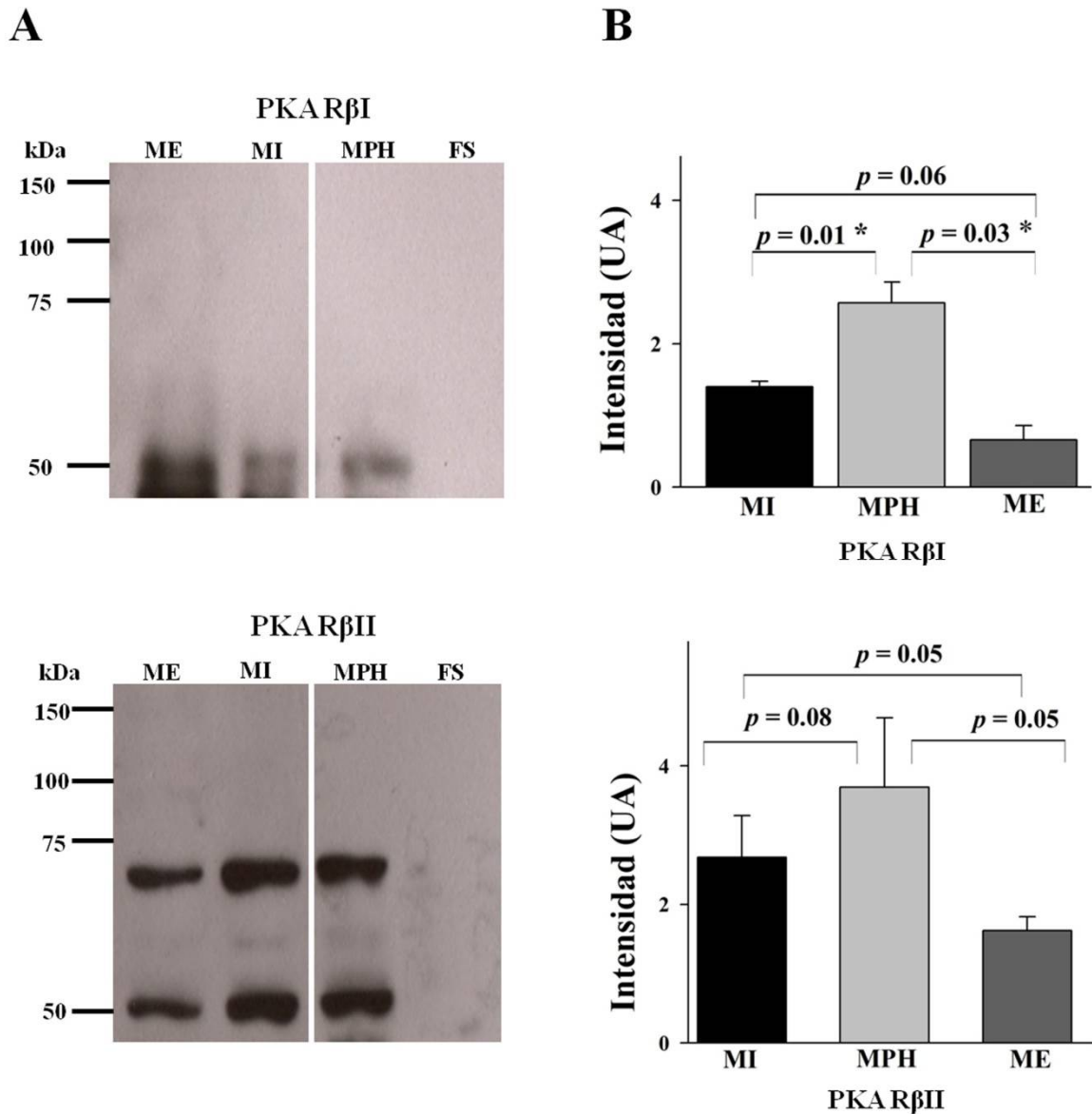


Figura 10. Identificación de la isoforma de la PKA. (A) Distribución de la subunidades R β I (50 kDa) y R β II (50 kDa) en las fracciones submitocondriales. Con el anticuerpo dirigido contra la PKA R β II se inmunodetectó otra banda de aproximadamente 70 kDa. (B) Análisis densitométrico. * $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. MPH: mitocondrias del sincitiotrofoblasto de la placenta humana; ME: membrana mitocondrial externa; MI: membrana mitocondrial interna; FS: fracción soluble (matriz y espacio intermembrana). La cantidad de proteína fue de 50 μ g por carril.

Con el objetivo de descartar la posibilidad de que las subunidades $C\alpha$ y $R\beta$ II pudieran estar asociadas a las fracciones submitocondriales a través de interacciones inespecíficas, tanto las MPH intactas como las fracciones submitocondriales se lavaron dos veces con una solución de KCl 2 M. El resultado mostró que ambas subunidades se inmunodetectan en las mismas fracciones submitocondriales (Figura 11A) y con una intensidad similar que sin el lavado con KCl (Figura 11B).

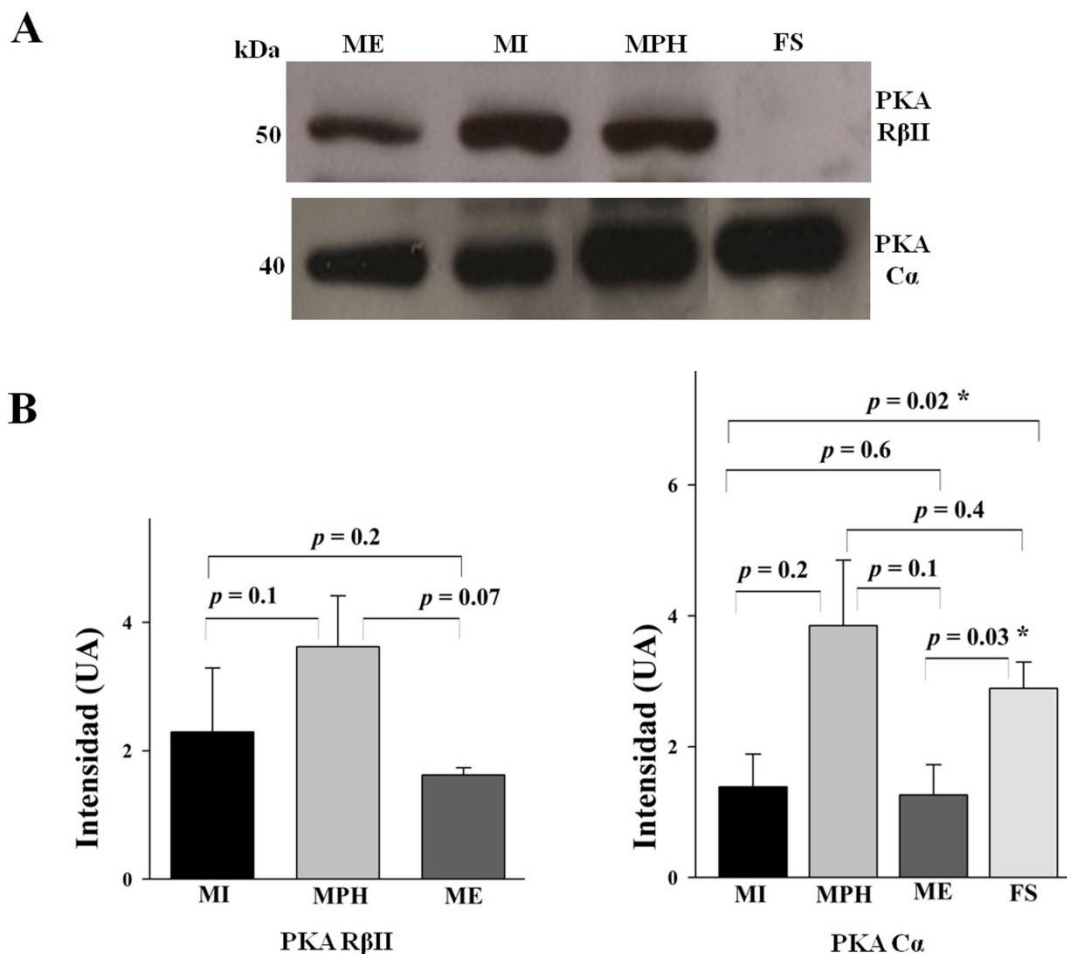


Figura 11. (A) Inmunodetección de PKA $C\alpha$ y $R\beta$ II en mitocondrias intactas y en fracciones submitocondriales lavadas con 2 M KCl. (B) Análisis densitométrico. * $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. MPH: mitocondrias del sincitiotrofoblasto de la placenta humana; ME: membrana mitocondrial externa; MI: membrana mitocondrial interna; FS: fracción soluble (matriz y espacio intermembrana). La cantidad de proteína fue de 50 μ g por carril.

7.3.- Actividad de la PKA en MPH intactas y en las fracciones submitocondriales

Para la determinación de la actividad de PKA en las MPH y en las diferentes fracciones submitocondriales, se empleó un kit comercial, como se describió en la estrategia experimental. La actividad se reporta como el porcentaje de ^{32}P incorporado.

Los resultados mostraron (Figura 12) que la mayor actividad de PKA se encuentra en la membrana interna, donde la incorporación de ^{32}P fue del 52%, mientras que la membrana externa y la fracción soluble mostraron la actividad más baja, 24.1% y 15.4%, respectivamente. La actividad de PKA también se evaluó en presencia de 200 μM de H89 (un inhibidor de cinasas como la PKA). Comparado con el control, la actividad de PKA disminuyó a 52% en las MPH intactas, en tanto que en la membrana interna, la actividad remanente fue del 21.1%. En la membrana externa y en la fracción soluble, la actividad disminuyó hasta 15.2% y 8.6%, respectivamente.

En presencia de 50 μM de PKI (un inhibidor específico de la PKA), la actividad de las MPH intactas comparada con el control disminuyó a 86.5%. En el caso de las membranas interna, externa y la fracción soluble, la actividad disminuyó a 40.8%, 19% y 11.1%, respectivamente. Cuando se empleó una concentración de PKI (200 μM) similar a la de H89, la actividad de PKA se redujo a 62.6%, 27.8%, 15.1% y 8.3% en MPH, membrana interna, membrana externa y fracción soluble, respectivamente. Usando las mismas concentraciones de los dos inhibidores (200 μM), la diferencia en el porcentaje de incorporación de ^{32}P no fue estadísticamente significativa, a pesar de que ambos inhibidores tienen diferentes mecanismos de acción sobre PKA.

La actividad de PKA también se determinó en ausencia de su activador, AMPc. En esta condición, la actividad en las MPH fue de 96.8%. Por otro lado, comparado con el control, la actividad observada en membrana interna, membrana externa y fracción soluble, fue de 49.7%, 21.3% y 12.1%, respectivamente. La diferencia en la actividad de PKA en presencia o ausencia de AMPc en todas las fracciones submitocondriales fue aproximadamente del 3%, la cual no fue estadísticamente significativa.

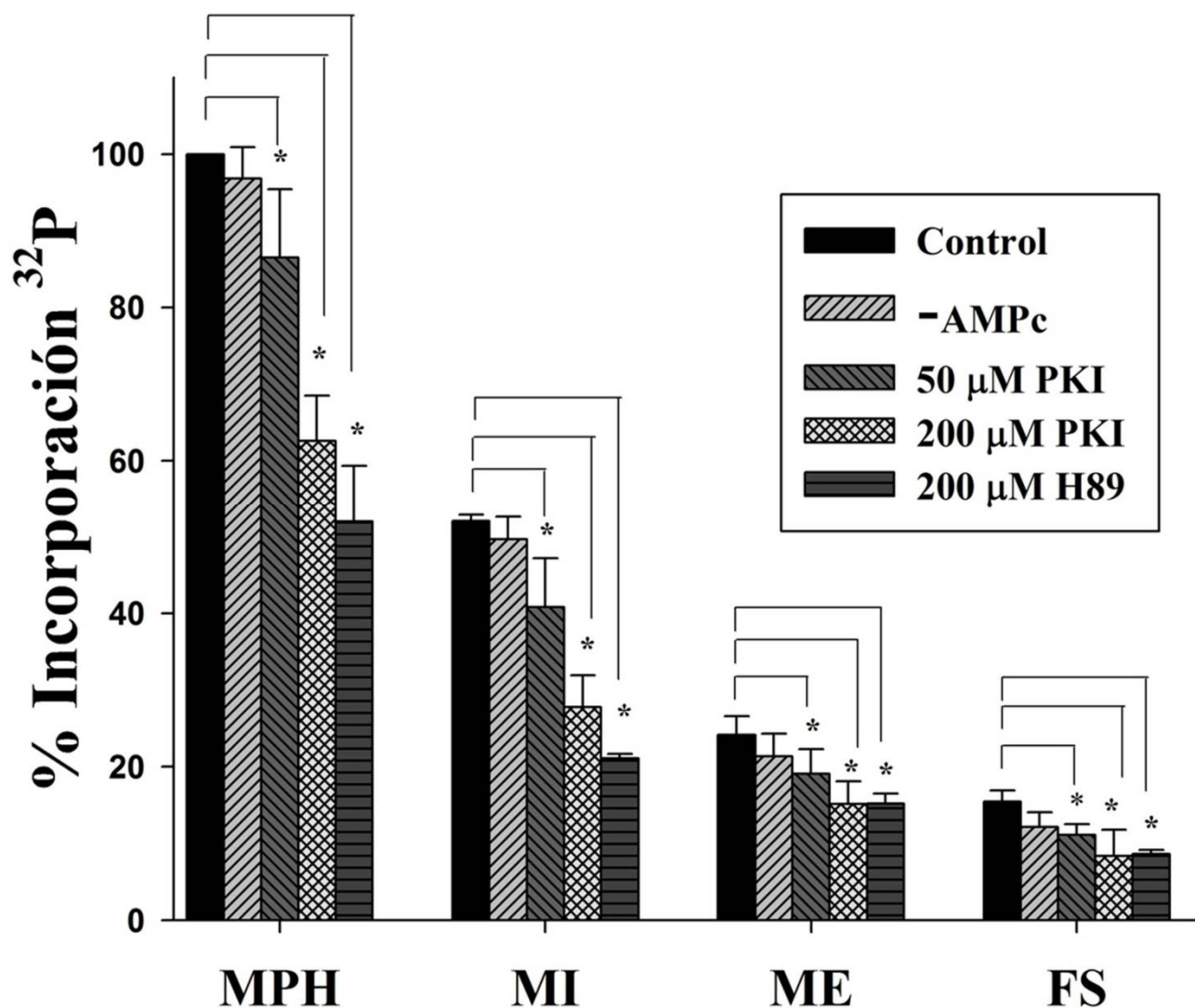


Figura 12. Actividad de la PKA en las mitocondrias intactas y en las fracciones submitocondriales. Los resultados se expresan como el porcentaje de incorporación de ^{32}P con respecto a las MPH. Las mitocondrias intactas y las fracciones submitocondriales se pre incubaron durante 30 min en presencia o ausencia de H89 200 μM , 50 μM ó 200 μM de PKI. Donde se indica, el experimento se realizó en ausencia de AMPc. El kemptido biotinilado (Signa TECT® cAMP-Dependent Protein Kinase (PKA) Assay System) se utilizó como sustrato de la PKA. Los datos mostrados representan el promedio \pm DE de 3 a 5 experimentos independientes por triplicado. * $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. MPH: mitocondrias del sincitiotrofoblasto de la placenta humana; ME: membrana mitocondrial externa; MI: membrana mitocondrial interna; FS: fracción soluble (matriz y espacio intermembrana).

7.4.- Efecto de los activadores de la PKA en la esteroidogénesis y en la fosforilación de proteínas de las MPH

Los siguientes experimentos se realizaron con el objetivo de verificar si a través de la adición de moléculas activadoras de la PKA se podría modificar la esteroidogénesis y la fosforilación de las proteínas mitocondriales.

La síntesis de progesterona en las MPH intactas se determinó en presencia o ausencia de AMPc (el activador natural de PKA) o de db-AMPc (un análogo permeable del AMPc) (Fig 13A y 13B). Los resultados obtenidos mostraron que la síntesis de progesterona no se modifica por la adición de AMPc o db-AMPc.

Tomando en cuenta que la actividad de la PKA está estrechamente relacionada con los eventos de fosforilación de proteínas, también se verificó el efecto de ambos activadores (AMPc y db-AMPc) en este contexto.

Aún cuando las MPH poseen múltiples proteínas que pueden ser sustrato potencial de cualquier cinasa, las autorradiografías únicamente mostraron la fosforilación de 3 proteínas de aproximadamente 46, 42 y 36 kDa. Sin embargo, cuando se adiciona AMPc o db-AMPc, no se observan cambios en el patrón de fosforilación (Figura 14A y 15A).

El análisis densitométrico de ambas autorradiografías mostraron el despliegue de 3 picos, los cuales corresponden a las proteínas de 46, 42 y 36 kDa (Figura 14B y 15B).

El análisis de la intensidad de las bandas se realizó por carril y no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa ante la adición de AMPc o db-AMPc en comparación con sus respectivos controles (Figura 14C y 15C). También se evaluó el efecto del 8Br-AMPc, obteniendo el mismo patrón de fosforilación que cuando se utilizó AMPc o db-AMPc (Figura 16A y 16B).

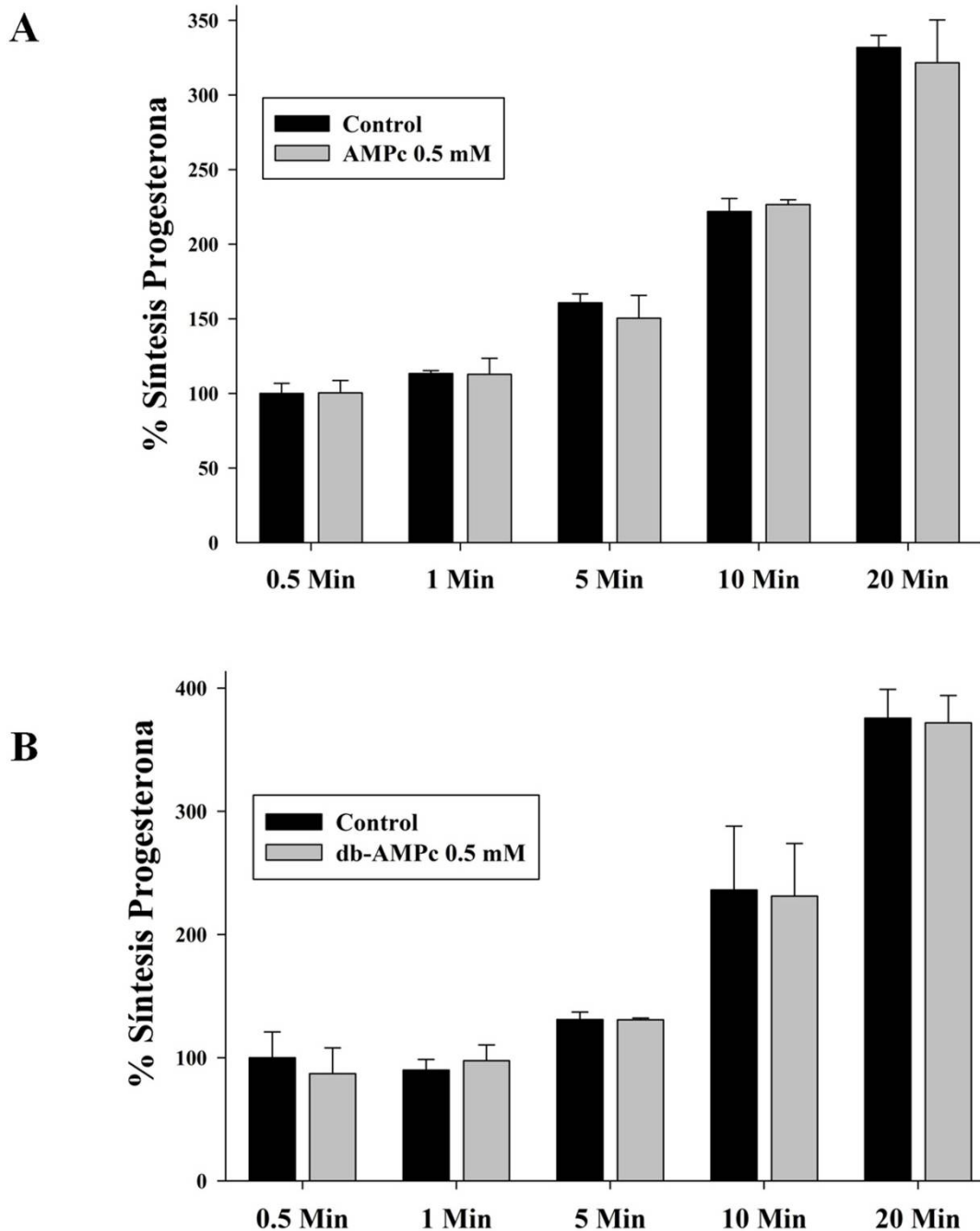


Figura 13. Efecto de los activadores de la PKA en la síntesis de progesterona. Donde se indica, las mitocondrias se preincubaron durante 30 min en presencia o ausencia de (A) 0.5 mM AMPc o (B) 0.5 mM db-AMPc. La reacción se inició mediante la adición del medio de síntesis de progesterona. La cuantificación de progesterona se realizó a diferentes tiempos empleando un kit comercial.

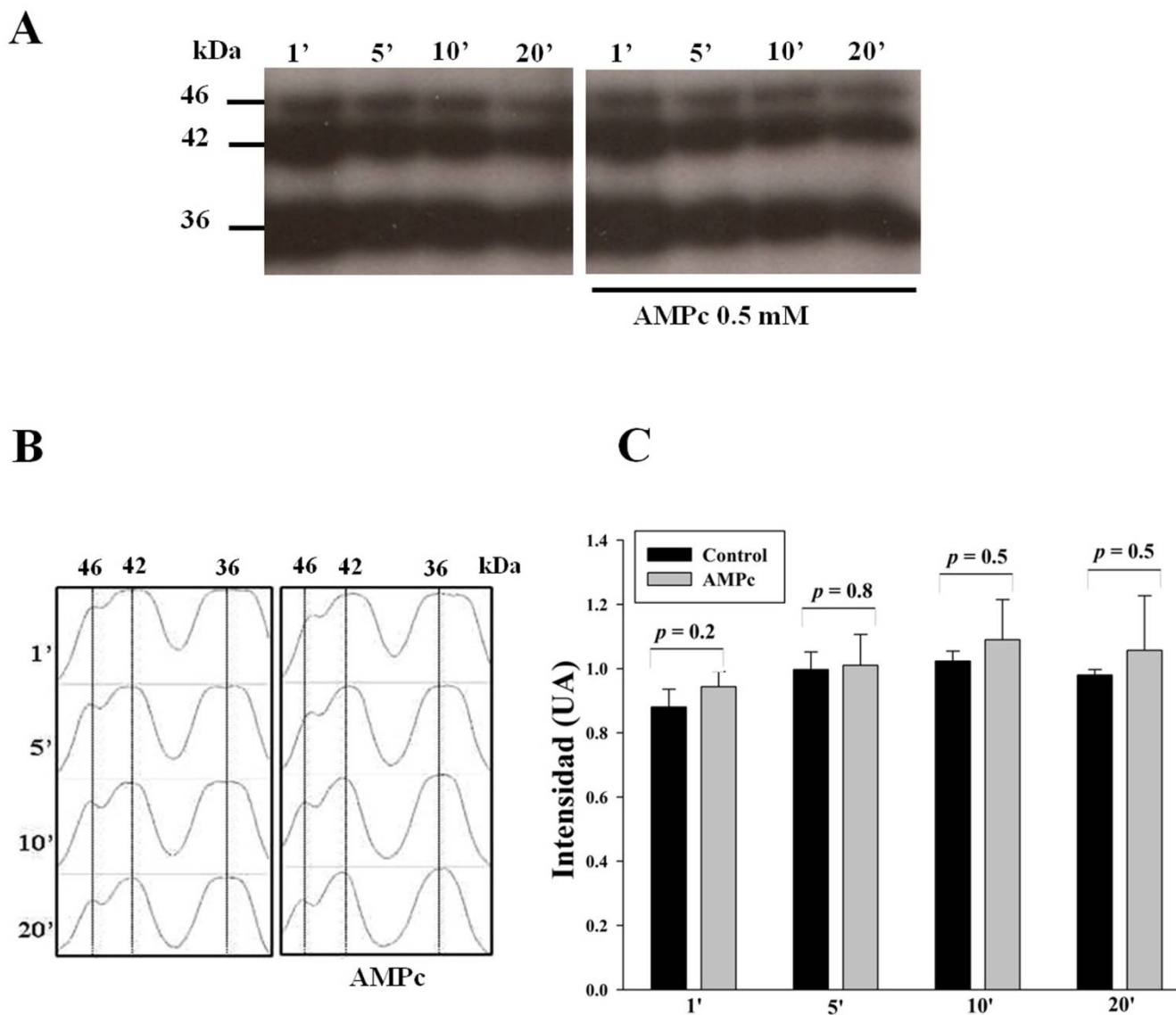


Figura 14. Efecto del AMPc en la fosforilación de proteínas de mitocondrias intactas. (A) Autorradiografía. Las mitocondrias se pre incubaron durante 30 min en presencia o ausencia de 0.5 mM AMPc. La reacción se inició mediante la adición del medio de síntesis de progesterona complementado con γ^{32} -ATP. La cantidad de proteína fue de 50 μ g por carril. (B) El análisis densitométrico por carril despliega 3 picos que corresponden a las proteínas de 46, 42 y 36 kDa (líneas sólidas). (C) Se muestra el análisis de la intensidad de las bandas por carril. * $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

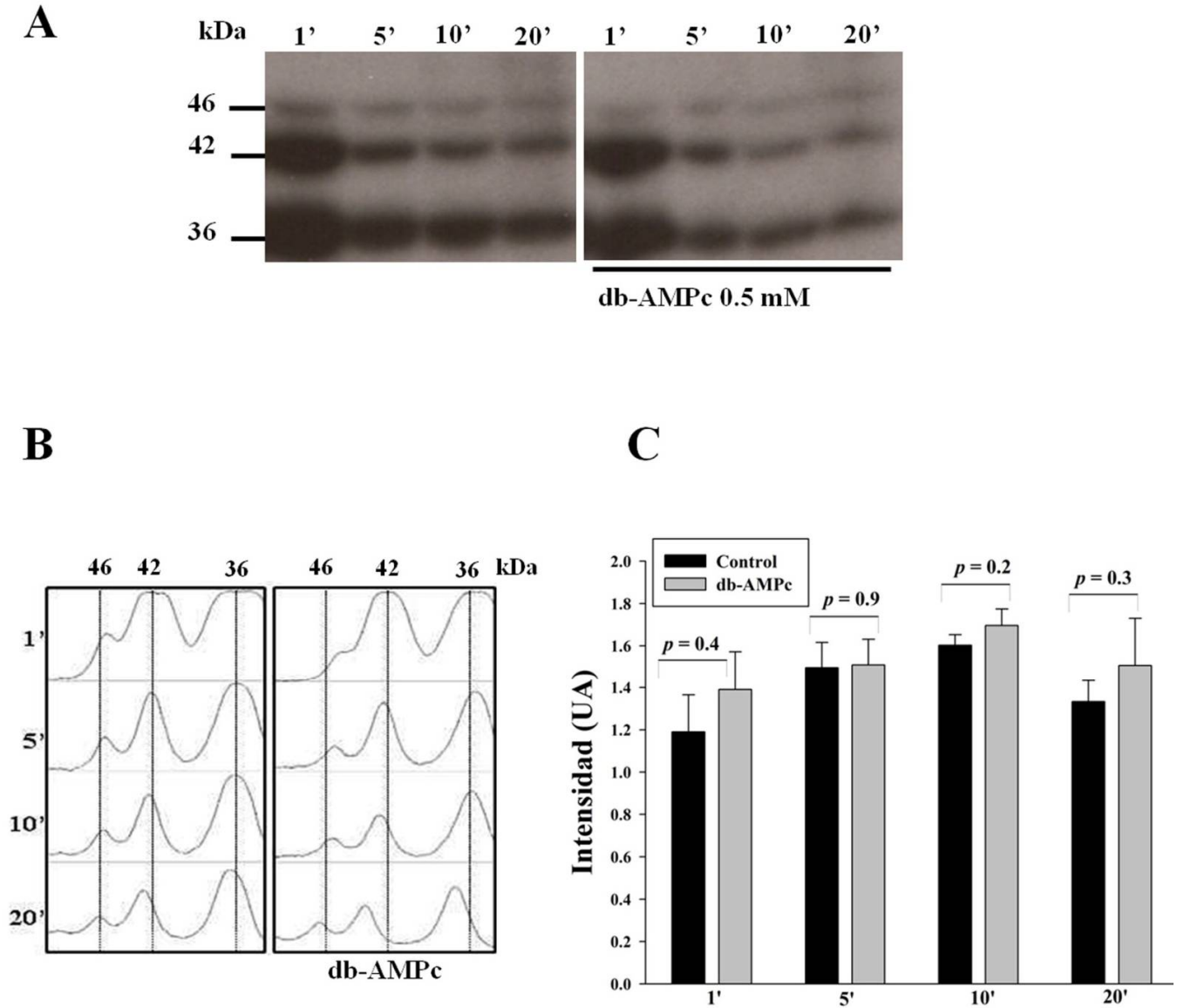


Figura 15. Efecto del db-AMPc en la fosforilación de proteínas de mitocondrias intactas (A) Autorradiografía. Las mitocondrias se preincubaron durante 30 min en presencia o ausencia de 0.5 mM db-AMPc. La reacción se inició mediante la adición del medio de síntesis de progesterona complementado with γ^{32} -ATP. La cantidad de proteína fue de 50 μ g por carril. (B) El análisis densitométrico por carril despliega 3 picos que corresponden a las proteínas de 46, 42 y 36 kDa (líneas sólidas). (C) Se muestra el análisis de la intensidad de las bandas por carril. * $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

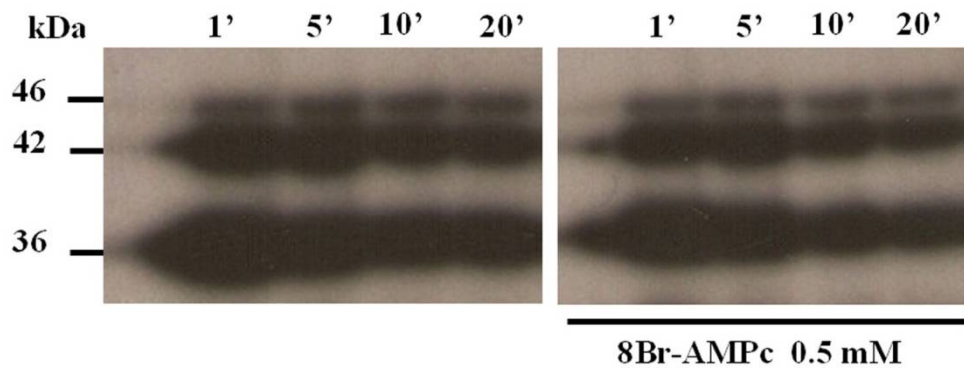
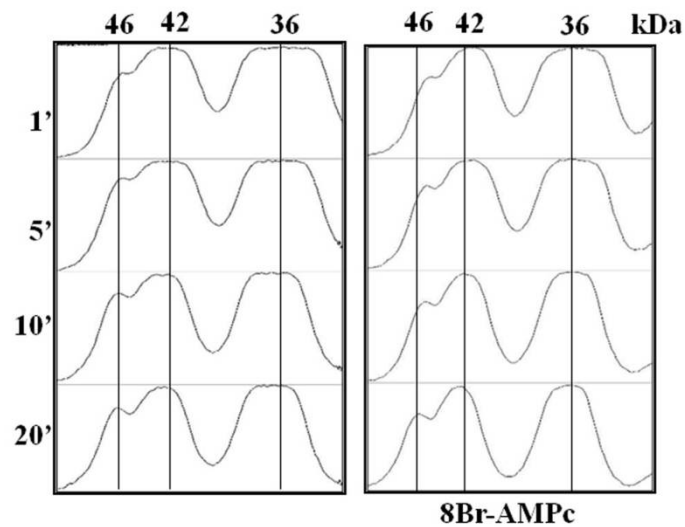
A**B**

Figura 16. Efecto del 8Br-AMPC en la fosforilación de proteínas de mitocondrias intactas (A) Autorradiografía. Las mitocondrias se pre incubaron durante 30 min en presencia o ausencia de 0.5 mM 8Br-AMPC. La reacción se inició mediante la adición del medio de síntesis de progesterona complementado con γ^{32} -ATP. La cantidad de proteína fue de 50 μ g por carril. (B) El análisis densitométrico por carril despliega 3 picos que corresponden a las proteínas de 46, 42 y 36 kDa (líneas sólidas).

7.5.- Efecto del db-AMPC en la disociación de la subunidad C α de las MPH

De acuerdo con el modelo clásico de activación de la PKA, la disociación y en consecuencia la activación de las subunidades catalíticas de PKA es inducida por la unión de AMPc a las subunidades reguladoras de la holoenzima. Considerando lo anterior, las MPH intactas se preincubaron en presencia de 0.5 mM de db-AMPC, con el objetivo de inducir la liberación de subunidades catalíticas y por ende su activación.

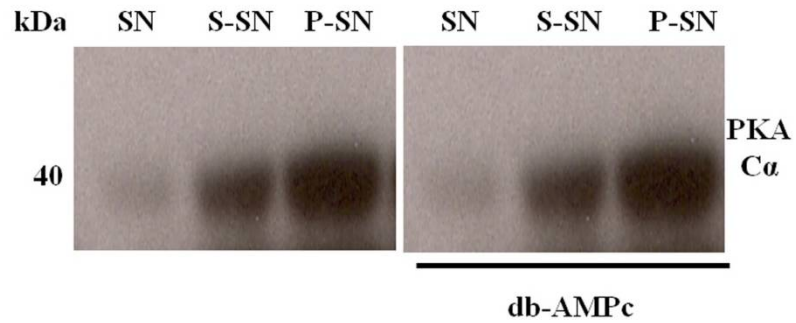
Después de 30 minutos de incubación con db-AMPC, las MPH se centrifugaron y el sobrenadante (SN) se analizó por inmunodetección en busca de la subunidad C α de PKA, la cual estaba prácticamente ausente del sobrenadante, lo que sugiere que C α se mantuvo asociada a las membranas mitocondriales (Figura 17A, primer carril de ambos paneles).

Las mitocondrias contenidas en el sedimento se sonicaron y posteriormente por centrifugación se separó la fracción soluble (S-SN) de la fracción membranal (P-SN).

La inmunodetección mostró que la subunidad C α de PKA continuaba teniendo la misma distribución entre la fracción soluble (Figura 17A, S-SN) y la fracción membranal (Figura 17A, P-SN) en comparación con el control, incluso después del tratamiento de las MPH con db-AMPC.

El análisis de la intensidad de la banda que corresponde a la subunidad C α indicó que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el control y la adición de db-AMPC (Figura 17B).

A



B

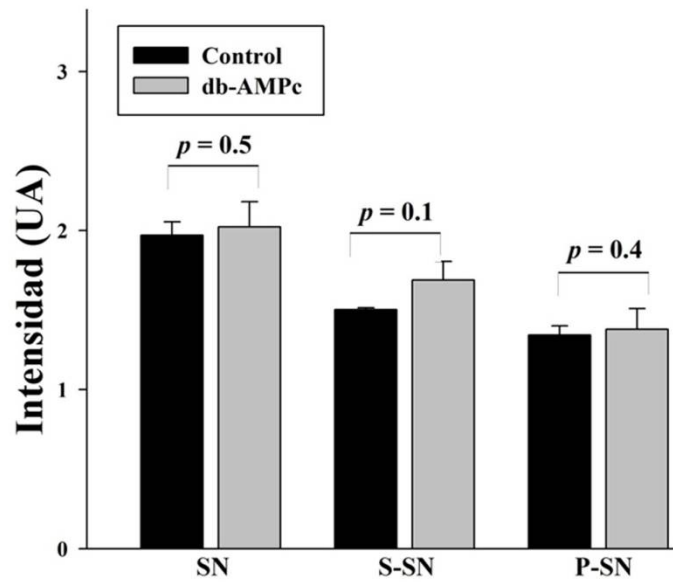


Figura 17. (A) Inmunodetección de la PKA C α en mitocondrias pre incubadas con 0.5 mM db-AMPC. La cantidad de proteína fue de 50 μ g por carril. (B) Análisis densitométrico de PKA C α . SN: sobrenadante; S-SN: fracción soluble; P-SN: fracción membranal.

7.6.- Efecto de los inhibidores de la PKA en la esteroidogénesis y en la fosforilación de proteínas mitocondriales

Una vez que se observó que ni la síntesis de progesterona ni la fosforilación de proteínas se modifica en presencia de los activadores de la PKA, el siguiente experimento se realizó con el objetivo de “prevenir la activación de PKA” empleando 50 μM de RpcAMP, un inhibidor de la subunidad reguladora de PKA. Los resultados mostraron que RpcAMP no tiene efecto sobre la síntesis de progesterona. Sin embargo, la síntesis de progesterona se inhibe hasta cerca del 50% en presencia de 200 μM de H89 (Figura 18).

Por otro lado, con respecto a la fosforilación de proteínas, la incubación de las MPH intactas con RpcAMP, no provocó ningún cambio en el patrón de fosforilación de las proteínas mitocondriales (Figura 19A). Paradójicamente, la adición de H89 provocó un aumento en la intensidad de fosforilación de las proteínas de 46, 42 y 36 kDa (Figura 19A). El análisis densitométrico desplegó tres picos que corresponden a las proteínas de 46, 42 y 36 kDa (Figura 12B). El análisis de la intensidad de las bandas mostró que existe una diferencia estadísticamente significativa entre H89 y el control; sin embargo, no hay diferencia significativa entre la adición de RpcAMP y el control (Figura 19C).

El uso de concentraciones mayores de RpcAMP (100, 200 y 300 μM) tampoco produjo cambios en la esteroidogénesis o en la fosforilación de las proteínas mitocondriales (Figura 20A y 20B).

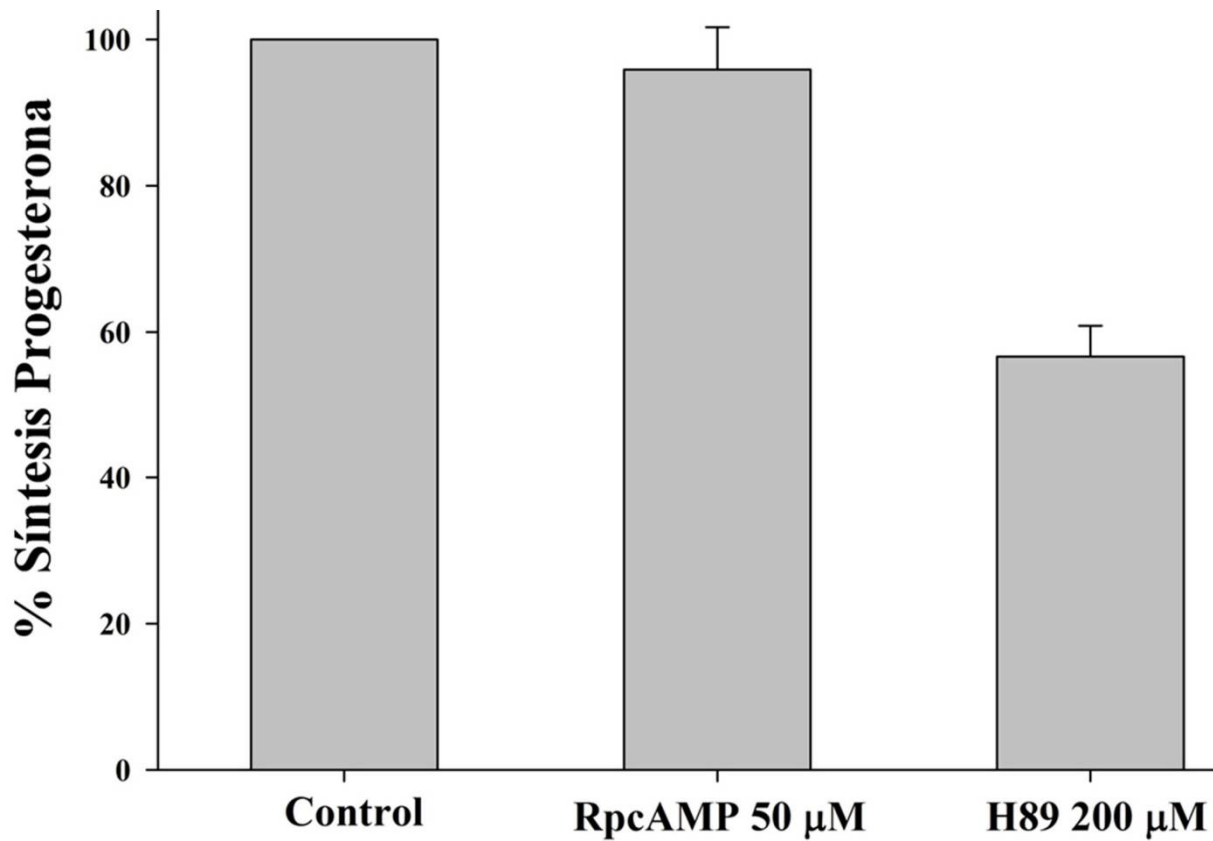


Figura 18. Efecto de los inhibidores de la PKA en la síntesis de progesterona. Las mitocondrias intactas se pre incubaron durante 30 minutos en presencia o ausencia de 200 μ M H89 o 50 μ M RpcAMP. La reacción se inició mediante la adición del medio de síntesis de progesterona. La reacción se detuvo a los 20 minutos. La cuantificación de progesterona se realizó utilizando un kit comercial.

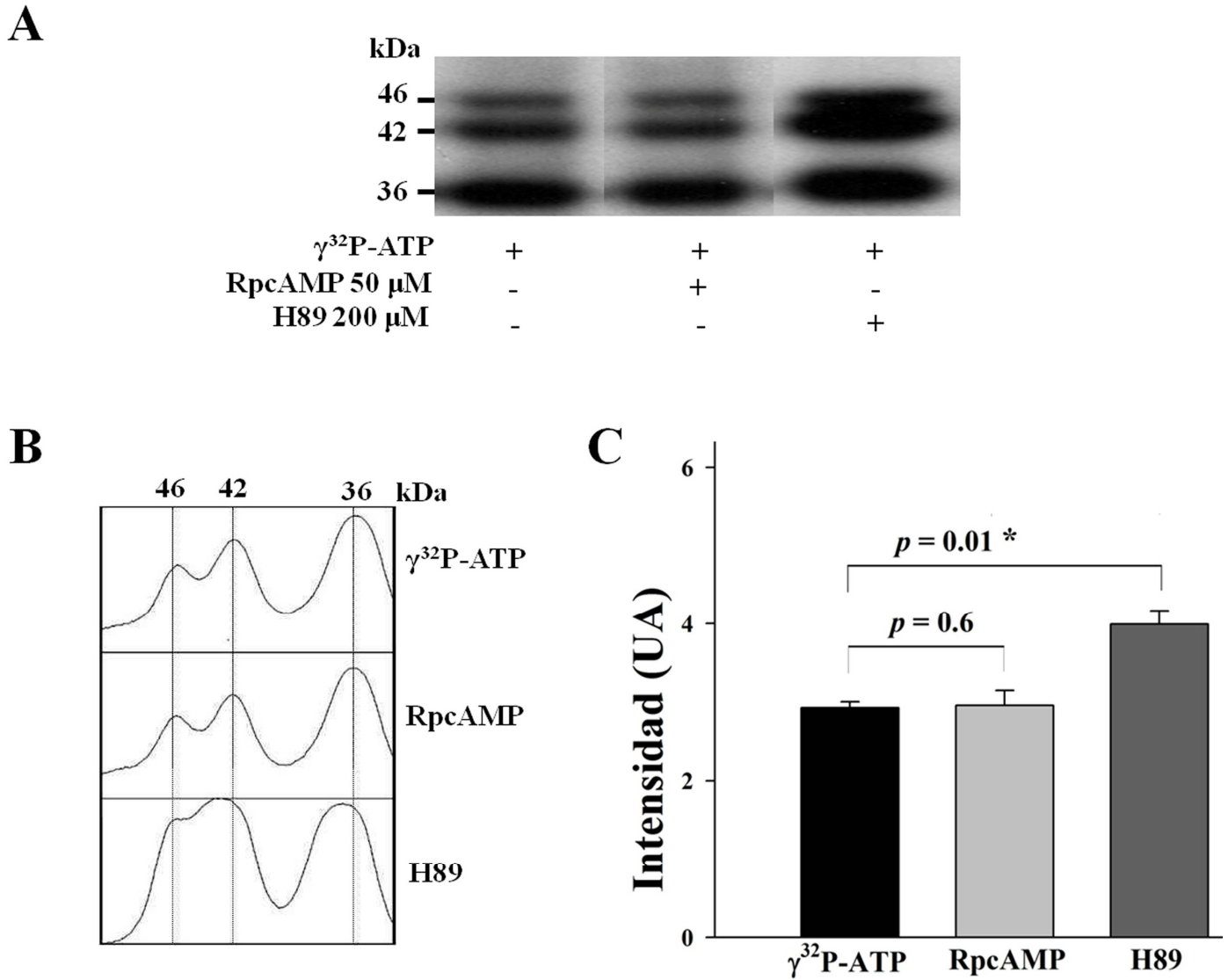


Figura 19. Efecto de los inhibidores de la PKA en la fosforilación de proteínas de mitocondrias intactas. (A) Autorradiografía. Las mitocondrias se pre incubaron durante 30 min en presencia o ausencia de 200 μM H89 o 50 μM RpcAMP. La reacción se inició mediante la adición del medio de síntesis de progesterona complementado con $\gamma^{32}\text{-ATP}$. La cantidad de proteína fue de 50 μg por carril. (B) El análisis densitométrico por carril despliega 3 picos que corresponden a las proteínas de 46, 42 y 36 kDa (líneas sólidas). (C) Se muestra el análisis de la intensidad de las bandas por carril. $*p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

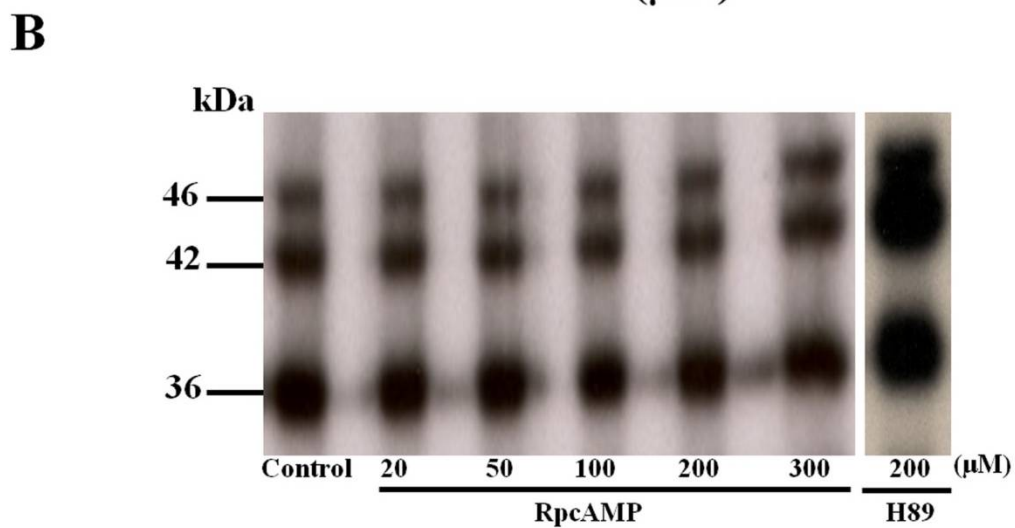
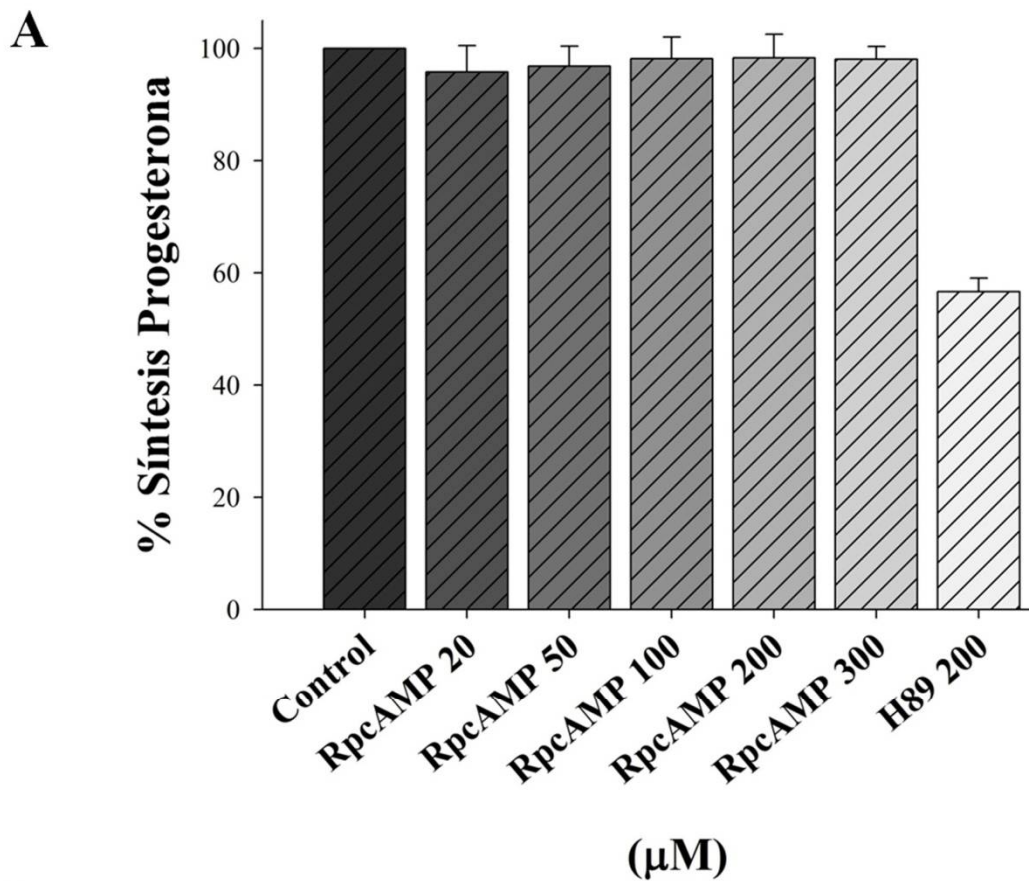


Figura 20. Efecto del RpcAMP y del H89 en la síntesis de progesterona y en la fosforilación de proteínas de mitocondrias intactas. Las mitocondrias se pre incubaron durante 30 min en presencia o ausencia de 200 µM H89 o 5 concentraciones de RpcAMP. (A) Síntesis de progesterona. (B) Autorradiografía. La cantidad de proteína fue de 50 µg por carril.

7.7.- Efecto del H89 en la fosforilación de proteínas de MPH

El propósito del siguiente experimento fue la identificación de proteínas que, en el contexto de la esteroidogénesis, podrían ser potenciales sustratos de la PKA. La observación de estos sustratos fosforilados por PKA se realizó por inmunodetección utilizando anticuerpos que identifican específicamente residuos de serina y treonina que forman parte de los motivos reconocidos por PKA (RRXT*/RRXS*) (Pearson *et al.*, 1991).

En la inmunodetección se observó que las MPH tienen múltiples proteínas que corresponden a sustratos fosforilados por PKA y la fosforilación de estas proteínas va disminuyendo con el tiempo (Figura 21A). Cuando las MPH se preincubaron en presencia de H89, la inmunodetección de los sustratos fosforilados por PKA disminuyó dramáticamente. Incluso, hacia los 10 y 20 minutos, la inmunodetección es prácticamente imposible.

Como se observó en las figuras 8A, 9A y 12A, son principalmente las proteínas de 46, 42 y 36 kDa las que se fosforilan en el contexto de la esteroidogénesis, y son estas mismas proteínas las que presentan un incremento en la intensidad de fosforilación en presencia de H89. En este sentido, dichas proteínas podrían ser sustrato de otras cinasas y no necesariamente de la PKA. Considerando esta posibilidad, se llevó a cabo la inmunodetección de residuos fosforilados de serina (Figura 21B) y treonina (Figura 21C), pero en este caso sin importar la secuencia flanqueante de aminoácidos. En la inmunodetección se observa que en presencia de H89, hay un incremento en la detección de fosfoserinas y de fosfotreoninas.

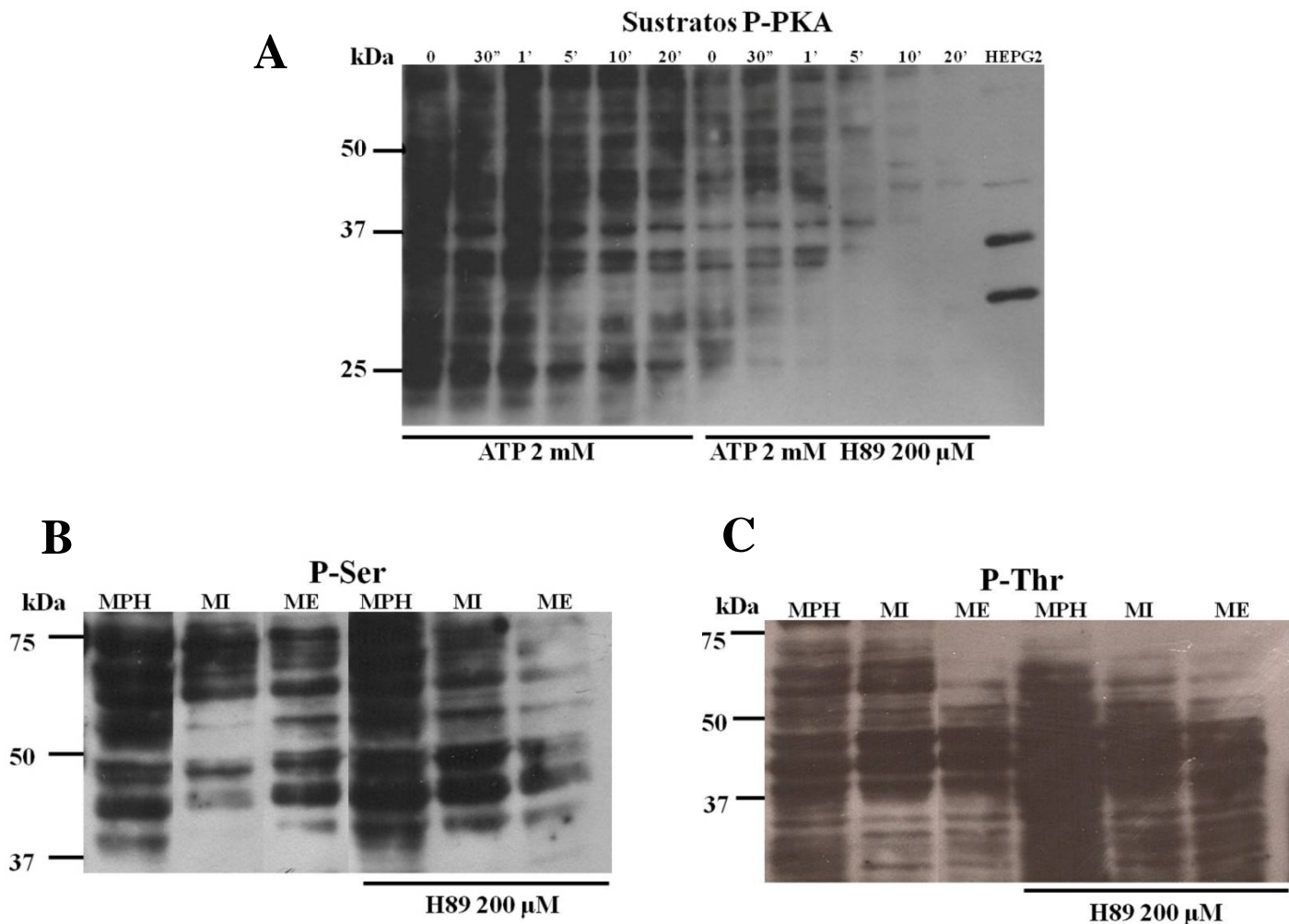


Figura 21. Inmunodetección de fosfoproteínas. (A) Sustratos fosforilados por la PKA. Las mitocondrias se pre incubaron por 30 minutos en presencia o ausencia de 200 μ M H89. La reacción se inició añadiendo medio de síntesis de progesterona complementado con ATP 2 mM. Para la inmunodetección se emplearon anticuerpos dirigidos contra los sustratos fosforilados por la PKA (RRXS*/T*) como se describió en la sección 6.7 de la Estrategia experimental. HEPG2 corresponde a una línea celular derivada de carcinoma hepatocelular. (B) Inmunodetección de fosfoserinas (P-Ser) y (C) fosfotreoninas (P-Thr). La inmunodetección se llevó a cabo con anticuerpos que reconocen Ser y Thr fosforiladas sin importar la secuencia flanqueante. La cantidad de proteína fue de 50 μ g por carril. MPH: mitocondrias del sinciciotrofoblasto de la placenta humana; ME: membrana mitocondrial externa; MI: membrana mitocondrial interna.

Al observar que existía una mayor inmunodetección de fosfoserinas y fosfotreoninas en presencia del H89, se realizó el siguiente experimento con el objetivo de identificar la participación de otra cinasa. Se emplearon anticuerpos que reconocen las proteínas fosforiladas por AKT (PKB), una cinasa que fosforila serinas y treoninas que forman parte de la secuencia RXXS*/T* (Pearson *et al.*, 1991). Los resultados muestran que en las mitocondrias intactas incubadas en presencia de H89, aumenta la identificación de los sustratos fosforilados por AKT (Figura 22). Estos datos sugieren la participación de PKA en la regulación de la actividad AKT.

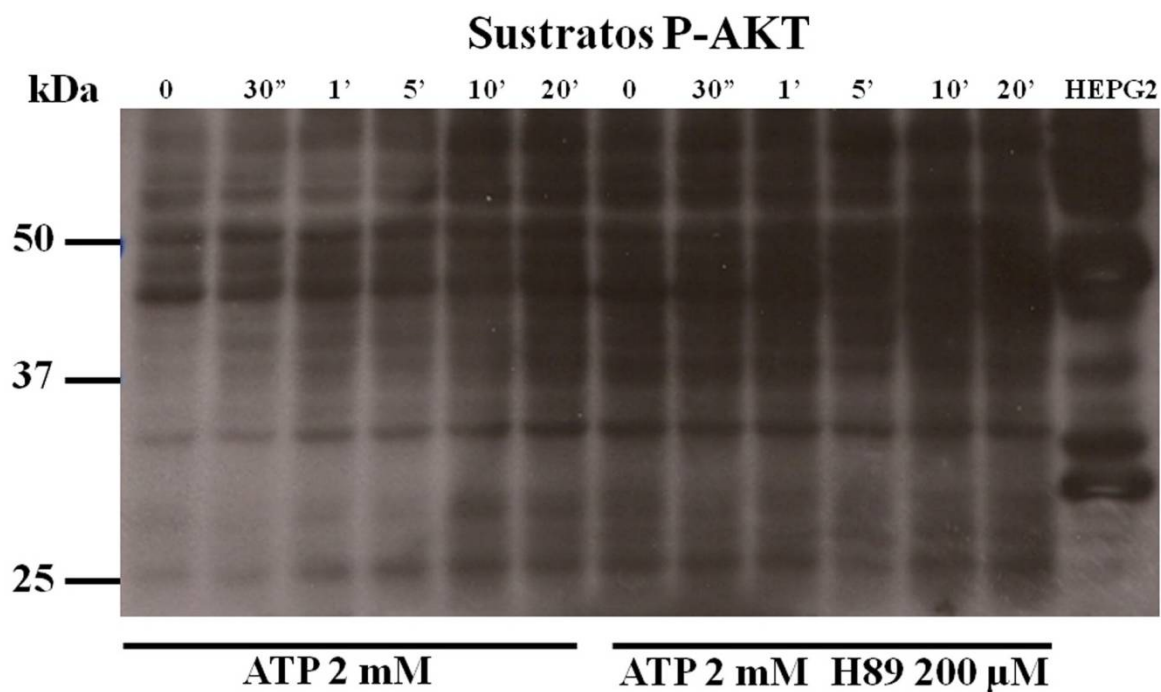


Figura 22. Inmunodetección de sustratos fosforilados por la AKT. Las mitocondrias se pre incubaron por 30 minutos en presencia o ausencia de 200 μM H89. La reacción se inició mediante la adición del medio de síntesis de progesterona complementado con ATP 2 mM. HEPG2 corresponde a una línea celular derivada de carcinoma hepatocelular. La cantidad de proteína fue de 50 μg por carril.

7.8.- Fosforilación *in vitro* de proteínas de las fracciones submitocondriales

Con la finalidad de identificar las proteínas potencialmente fosforilables por PKA en las fracciones submitocondriales, se llevó a cabo un ensayo de fosforilación *in vitro*, para el cual se utilizó la subunidad catalítica C α recombinante.

En la autorradiografía se observa que en ausencia de la subunidad C α , existe una incorporación esperada de ^{32}P a las proteínas de las diferentes fracciones submitocondriales, la cual es producto de la actividad intrínseca de cinasas presentes en las diferentes fracciones submitocondriales. Sin embargo, cuando se añade la subunidad C α , se produce la incorporación de ^{32}P principalmente a las proteínas ubicadas en la fracción soluble y en menor grado a las proteínas que pertenecen a las membranas externa e interna (Figura 23).

En la condición donde se añade la subunidad C α , se observa una banda de aproximadamente 40 kDa, la cual podría a su vez corresponder a la misma subunidad catalítica, que a su vez puede ser fosforilada.

Los resultados del ensayo de fosforilación *in vitro* son consistentes con la observación de que las MPH cuentan con múltiples proteínas que son susceptibles de ser fosforiladas por PKA (Figura 21A).

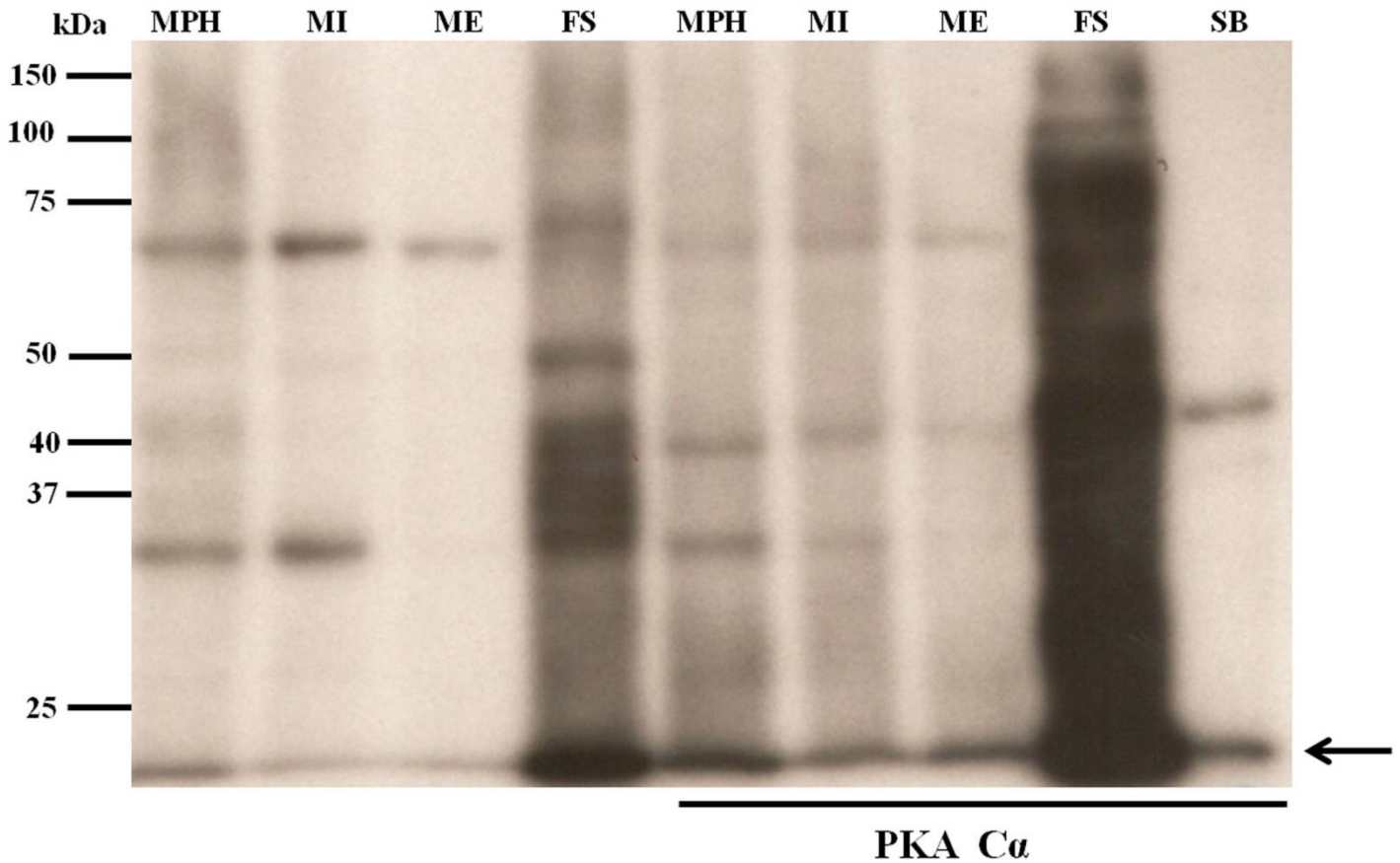


Figura 23. Fosforilación *in vitro* por la PKA. Autorradiografía. Las mitocondrias intactas y las fracciones submitocondriales se pre incubaron durante 20 minutos en un amortiguador de cinasas complementado con γ^{32} -ATP y en presencia o ausencia de la subunidad catalítica de la PKA recombinante (PKA C α). En la condición donde se añadió PKA C α , se identifica una banda de aproximadamente 40 kDa, la cual puede corresponder a la misma subunidad catalítica de la PKA fosforilada. Un sustrato biotinilado de PKA (SB) se empleó como control positivo (flecha). (PM: 998.2 Da). La cantidad de proteína fue de 50 μ g por carril. MPH: mitocondrias del sinciciotrofoblasto de la placenta humana; ME: membrana mitocondrial externa; MI: membrana mitocondrial interna; FS: fracción soluble (matriz y espacio intermembrana).

7.9.- Efecto del HCO_3^- en la síntesis de progesterona

Una vez que se observó que tanto la síntesis de progesterona como la actividad de PKA fueron sensibles al H89, pero insensibles a los activadores como el AMPc o el dbAMPc, se evaluó la posibilidad de inducir la esteroidogénesis a través de la activación de componentes que podrían encontrarse río arriba en la cascada de transducción de la PKA. En este contexto, previamente ha sido reportada la presencia de la enzima adenilato ciclasa soluble en la matriz mitocondrial de hígado de ratón (Acin-Perez *et al.*, 2009). Se sabe que esta enzima, encargada de catalizar la producción de AMPc, es susceptible de ser activada por cambios en las concentraciones de Ca^{2+} , ATP o HCO_3^- .

Con este antecedente, las MPH intactas se pre-incubaron durante 30 minutos en presencia de 30 mM de HCO_3^- y la esteroidogénesis se cuantificó a diferentes tiempos. La gráfica (Figura 24) muestra que el porcentaje de síntesis de progesterona no se modificó tras la incubación con HCO_3^- .

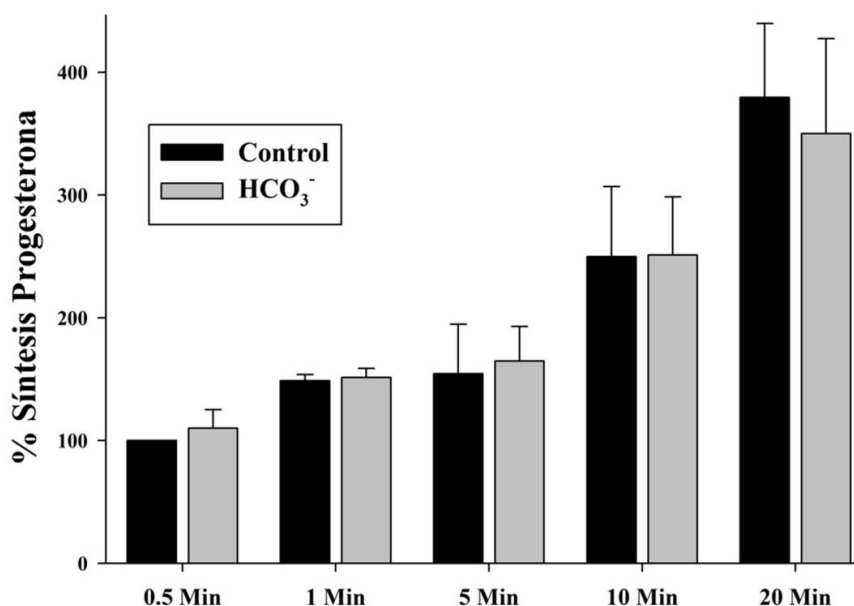


Figura 24. Efecto del HCO_3^- en la síntesis de progesterona. Las mitocondrias intactas se pre incubaron durante 30 minutos en presencia o ausencia de 30 mM HCO_3^- . La reacción se inició mediante la adición del medio de síntesis de progesterona. La cuantificación de progesterona se realizó a diferentes tiempos y se utilizando un kit comercial.

8.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La síntesis de progesterona que realiza la placenta humana es indispensable para el mantenimiento del embarazo, no obstante, los mecanismos de transducción de señales que subyacen al control de la esteroidogénesis no se conocen por completo. En este contexto, la vía de señalización mediada por AMPc/PKA es la más estudiada, no sólo en la placenta, sino también en otros tejidos con función esteroidogénica (Sewer y Waterman, 2002), donde la PKA se encarga de fosforilar factores de transcripción relacionados con la esteroidogénesis (Sands y Palmer, 2008) y a proteínas asociadas al transporte de colesterol hacia y al interior de la mitocondria (Arakane *et al.*, 1997).

En la placenta humana, se sabe que la hormona gonadotrofina coriónica humana se une al receptor de la hormona luteinizante/hCG, el cual está acoplado a proteínas G, activando la vía de señalización mediada por AMPc/PKA, lo que resulta en importantes eventos relacionados con la producción de progesterona, decidualización y diferenciación del citotrofoblasto (Weedon-Fekjaer y Taskén, 2012). Sin embargo, aún sigue siendo incierto el papel que podrían desempeñar otras hormonas en el control de las concentraciones celulares de AMPc.

La PKA ha sido identificada en la membrana interna y en la matriz de mitocondrias de mamífero aisladas a partir de diferentes tejidos (Papa *et al.*, 1999), así como de mitocondrias de rata (Schwoch *et al.*, 1990) y de células HeLa (Acin-Perez *et al.*, 2009). En este trabajo, se ha confirmado la presencia de la subunidad C α de la PKA en las mitocondrias aisladas del sinciotrofoblasto de la placenta humana y se identificó su distribución en las diferentes fracciones submitocondriales. Este hallazgo sugiere que a pesar de que la compartimentalización de la PKA cerca de las mitocondrias, a través de proteínas de anclaje (como las AKAP), podría ser importante al favorecer la comunicación entre el citoplasma y la mitocondria, la presencia de esta cinasa dentro de la mitocondria podría ser indispensable como parte de un sistema completo de transducción, haciendo más eficiente la modulación de la esteroidogénesis.

Para la identificación de la subunidad C α en la fracción soluble (matriz y espacio intermembrana), ésta tuvo que ser concentrada en el menor volumen posible, lo que

permitió la visualización de la subunidad $C\alpha$ en esta fracción. El análisis densitométrico permite sugerir que el porcentaje de la subunidad $C\alpha$ que se localiza en la fracción soluble es de aproximadamente 5%, mientras que las membranas interna y externa contienen 49.6% y 45%, respectivamente. Por otro lado, el hecho de que la subunidad $C\alpha$ se encuentre tanto en la fracción membranal como en la soluble, a diferencia de las subunidades reguladoras β , sugiere que puede haber dos poblaciones de PKA, una más abundante, probablemente en forma de holoenzima asociada a las membranas mitocondriales; y otra en menor proporción, representada por las subunidades catalíticas ya disociadas, las cuales se sabe que tienen la capacidad de difundir a través de membranas (Harootunian *et al.*, 1993). Por otro lado, en mitocondrias aisladas de corazón de bovino, se ha reportado que bajo concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} , las subunidades R de la PKA pueden ser degradadas de forma selectiva, dejando libres a las subunidades C activas, las cuales parecen ser más resistentes a la proteólisis (Shell y Larence, 2013).

El análisis densitométrico de la distribución de las subunidades $R\beta$ II y $C\alpha$, permite sugerir que en la membrana interna, la proporción de subunidades $R\beta$ II con respecto a las $C\alpha$ es de 2:1; en tanto que en la membrana externa, es de 1:1. Esta distribución desigual podría explicar el 5% de la subunidad $C\alpha$ libre encontrada en la fracción soluble.

En este trabajo también se identificó la presencia de las subunidades $R\beta$ I, aunque en menor proporción que las $R\beta$ II. En este sentido, el conocimiento de las isoformas de la PKA que se expresan en las mitocondrias del sinciotrofoblasto, es biológicamente relevante considerando que la especificidad en la señalización mediada por PKA está garantizada por la expresión diferencial de las subunidades R, las cuales tienen funciones diferentes en la homeostasis celular debido a importantes diferencias en la distribución tisular y en sus propiedades bioquímicas y físicas (como la afinidad por el AMPc) (Weedon-Fekjær y Taskén, 2012; Mantovani *et al.*, 2009). Taskén y colaboradores (1993) reportaron en una línea celular de células B neoplásicas de origen humano (Reh), la existencia de una PKA conformada por un heterodímero $RI\alpha$ - $RI\beta$. En este contexto, aún haría falta confirmar si la PKA localizada en las mitocondrias del sinciotrofoblasto está conformada por subunidades $C\alpha$ asociadas a homodímeros $R\beta$ I o $R\beta$ II.

Aún cuando se sabe que la PKA puede estar asociada a las mitocondrias a través de proteínas de anclaje (AKAPs) (Corso y Thomson, 2001; Thomson, 2002; Feliciello *et al.*, 2005; Gomez-Concha *et al.*, 2011; Ma y Thomson, 2012) garantizando una regulación espacial y temporal en los procesos de señalización, el mecanismo exacto por el cual la PKA se encuentra anclada dentro de las mitocondrias del sinciciotrofoblasto sigue siendo desconocido. En este contexto, un enfoque futuro podría centrarse en evaluar la participación de una proteína de anclaje conocida como SKIP (por sus siglas en inglés *Sphingosine Kinase Interacting Protein*), la cual se sabe que ancla holoenzimas de la isoforma I de PKA a la membrana mitocondrial interna (Means *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en este trabajo también muestran que la PKA está estrechamente asociada a la fracción membranal de las mitocondrias y que la disociación de sus subunidades catalíticas no se induce por el efecto de activadores de la holoenzima como el db-AMPC (Figura 17), como ocurre en el modelo clásico de activación de la PKA. En general, se ha aceptado que la unión del AMPC a las subunidades reguladoras de la PKA provoca la disociación completa de las subunidades catalíticas; sin embargo, se ha reportado la existencia de la PKA en su forma de holoenzima saturada con AMPC (Døskeland *et al.*, 1993). Por otra parte, Vigil y colaboradores han reportado que la adición de AMPC provoca únicamente la disociación de una parte de la población de la holoenzima de la isoforma β II de la PKA; sin embargo, en presencia de un sustrato peptídico y de AMPC, se induce un mayor grado de disociación de las subunidades catalíticas, pero un porcentaje significativo de esta isoforma β II permanece en su estado de holoenzima (Vigil *et al.*, 2004).

Por otro lado, en este trabajo también se encontró que la PKA distribuida en todas las fracciones submitocondriales es activa y susceptible de ser inhibida por H89 y por PKI. Las diferencias observadas en cuanto a la disminución de la actividad de PKA en función del inhibidor empleado, pueden ser explicadas por el mecanismo de acción. H89 actúa como un antagonista competitivo del ATP. En este tipo de inhibidores, los valores de IC50 varían de acuerdo a las concentraciones de ATP prevalcientes en el ambiente celular en un momento dado; por lo tanto, la cantidad de inhibidor necesaria para bloquear a una cinasa

puede ser variable (Murray, 2008). A pesar de que el H89 ha sido ampliamente utilizado como un inhibidor de PKA, se sabe que también puede inhibir a otras cinasas.

Con respecto al PKI, el inhibidor específico de PKA, éste actúa uniéndose a la subunidad catalítica libre de la PKA, de manera semejante a como lo hacen las subunidades reguladoras cuando se encuentran asociadas a las catalíticas en ausencia de AMPc (Murray, 2008; Dalton y Dewey, 2006). La constante de inhibición (K_i) del PKI es aproximadamente de 2 nM (Bogoyevitch *et al.*, 2005); sin embargo, 50 μ M es la concentración que se utiliza con mayor frecuencia (Bogan y Niswender, 2007). Tomando en cuenta la recomendación de que el H89 no debe ser utilizado como único inhibidor al evaluar la actividad de la PKA, se probaron dos concentraciones de PKI. Los resultados mostraron que la inhibición fue dosis-dependiente, obteniendo la mayor inhibición con 200 μ M de PKI. Esta alta concentración requerida podría deberse a que el inhibidor no accede eficazmente al sitio donde ejerce su acción. Sin embargo, cuando se emplearon las mismas concentraciones de los dos inhibidores (200 μ M de H89 y PKI), la diferencia en el porcentaje de incorporación de 32 P no fue estadísticamente significativa (Figura 12), a pesar que cada uno de los inhibidores tiene diferente mecanismo de acción sobre la PKA.

En relación a la actividad de fosforilación, se identificaron múltiples sustratos fosforilados por la PKA (residuos de serina y treonina que pertenecen a los motivos específicos RRXT*/RRXS*) (Pearson y Kemp, 1991) presentes en las mitocondrias intactas (Figura 21A). Y como se esperaba, la inmunodetección de estos sustratos fosforilados disminuyó en presencia del H89. La identificación de estos sustratos fosforilados confirma que las MPH tienen múltiples proteínas que son blancos adecuados para la PKA; pero por otro lado, sugiere que las MPH cuentan con un grupo de fosfatasa activas cuya función podría estar modulada por la actividad de fosforilación catalizada por la PKA. En este contexto, trabajos realizados en diferentes modelos han mostrado que la PKA puede inducir eventos de desfosforilación de proteínas y no solamente fungir como un activador de la fosforilación (Christoffersen *et al.*, 1994; Ahn *et al.*, 2007). En la Figura 25 se esquematiza el posible mecanismo por el cual en presencia del H89, se bloquea la actividad de la PKA, lo que resulta en inhibición de la fosforilación de proteínas mediada

por PKA, pero al mismo tiempo, el efecto del H89 provoca la activación de un mayor número de fosfatasa que desfosforilan los motivos RRXT*/RRXS*.

Por otro lado, en presencia del H89, existe un aumento en la incorporación de ^{32}P a las proteínas de 36, 42 y 46 kDa (Figura 19A). Este dato sugiere que la inhibición de PKA por H89 también puede resultar en la inactivación de otro grupo de fosfatasa y simultáneamente, otras cinasas diferentes a PKA catalizan la fosforilación de las mismas proteínas de 36, 42 y 46 kDa. En este sentido, se ha reportado en tejido cardíaco que la actividad de la proteína fosfatasa 1 (PP1) es regulada por una proteína de 19 kDa denominada inhibidor de fosfatasa 1 (I-1). La fosforilación de I-1 en la treonina 35 catalizada por la PKA induce la inhibición selectiva de PP1 (Nicolaou *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2011).

Durante la realización de este trabajo, se hicieron numerosos intentos por determinar la identidad de las proteínas de 36, 42 y 46 kDa observadas en las autorradiografías. Uno de los métodos consistió en separar las proteínas por isoelectroenfoque y posteriormente por electroforesis en condiciones desnaturizantes. Las autorradiografías muestran claramente las proteínas que incorporan ^{32}P ; desafortunadamente, la cantidad de proteína no era suficiente para ser identificada en los geles mediante tinción con plata o con azul de Coomassie. Es claro que aún hace falta trabajo por realizar para lograr identificar a dichas proteínas y en consecuencia determinar su participación en la esteroidogénesis.

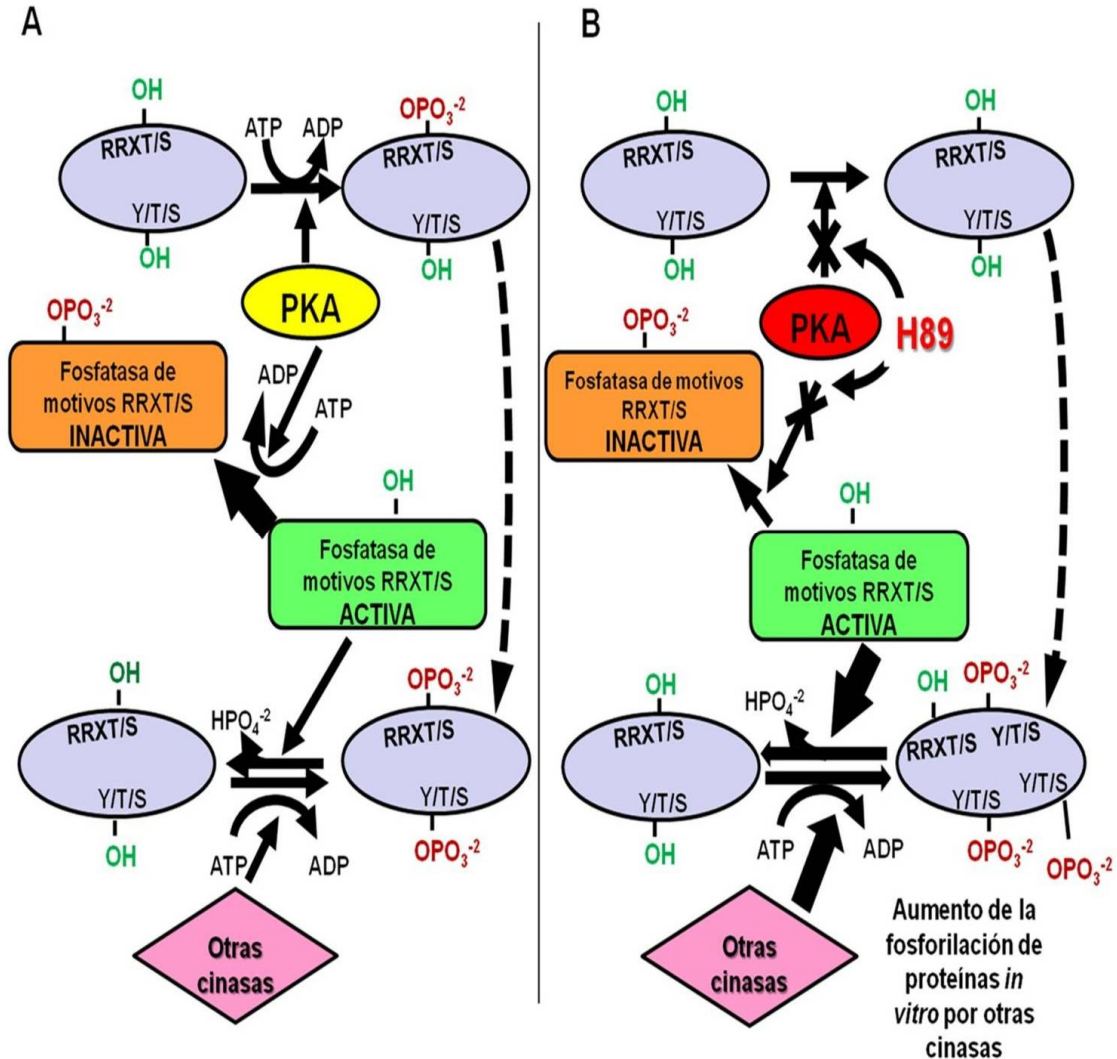


Figura 25. Modelo propuesto de la participación de la PKA en la fosforilación y en la síntesis de progesterona. (A) Múltiples proteínas mitocondriales son sustratos potenciales de la PKA y probablemente de otras cinasas (flecha discontinua) (RRXT/S: motivos específicos reconocidos por la PKA; Y/T/S- residuos de tirosina, treonina y serina). La PKA participa regulando el equilibrio entre fosforilación/desfosforilación al mantener un mayor grupo de fosfatasas inactivas (flecha gruesa) y dejando únicamente algunas fosfatasas activas que remueven el grupo fosfato de los aminoácidos que pertenecen a los motivos RRXT/S. (B) En presencia de H89, se inhibe la fosforilación mediada por la PKA. Simultáneamente, la inhibición con H89 provoca la inhibición de la PKA y en consecuencia la activación de un mayor número de fosfatasas (flecha gruesa). Los cambios en la fosforilación de proteínas podrían estar relacionados con la disminución de la síntesis de progesterona en presencia del H89.

El ensayo de fosforilación *in vitro* utilizando la subunidad catalítica recombinante de la PKA, reveló la presencia de múltiples proteínas solubles que pueden ser blancos de la actividad de la PKA. Es preciso señalar que todas estas proteínas observadas en este ensayo, no son necesariamente sustratos de la PKA *in vivo*. Asimismo, las diferencias observadas en el patrón de fosforilación en presencia y ausencia de la subunidad $C\alpha$ recombinante sugieren que en las condiciones de este ensayo, $C\alpha$ es capaz de llegar hasta las proteínas que cuentan con los motivos específicos (RRXT*/RRXS*) que son susceptibles de ser fosforilados por la PKA, pero esto no significa que dichas proteínas sean siempre blancos adecuados de la PKA en el curso de la esteroidogénesis.

Como se mencionó previamente, se ha reportado que una holoenzima de la PKA saturada con AMPc (sin la disociación de las subunidades C) puede tener cierto grado de actividad de cinasa (característica de las subunidades C libres), pero con diferente especificidad de sustratos (Døskeland *et al.*, 1993; Zaremborg *et al.*, 2000). Hasta este momento, no se sabe con exactitud si la activación *in vivo* de la PKA por AMPc en las mitocondrias del sincitiotrofoblasto implique necesariamente la disociación completa de las subunidades catalíticas y en consecuencia, diferentes eventos de fosforilación.

En conjunto, los experimentos realizados en presencia o ausencia del H89 para evaluar la incorporación de ^{32}P a las proteínas mitocondriales sugieren que las MPH tienen diversas proteínas susceptibles de ser sustratos de la PKA, pero a su vez pueden ser también blancos potenciales de otras cinasas. En este sentido, aún existe poca información con respecto a las cascadas de señalización independientes de AMPc que intervienen en la regulación de la síntesis de progesterona. Sin embargo, se ha reportado que los estrógenos, la insulina, el factor de crecimiento semejante a insulina I, el factor de crecimiento epidérmico, el calcitriol, los ésteres de forbol y citocinas tales como IL-1 y TNF- α , pueden estimular la síntesis de progesterona placentaria, y algunos de ellos, en forma independiente de la PKA (Tuckey, 2005; Ritvos, 1988; Feinberg *et al.*, 1994; Shanker y Rao, 1997; Barrera *et al.*, 2007).

Con estos antecedentes, en este trabajo también se confirmó la existencia de varias fosfoproteínas que podrían ser sustrato de algún otro tipo de cinasa de Ser/Thr diferente a la PKA. Aún hace falta identificar a la cinasa o cinasas que también podrían participar en la

modulación de la esteroidogénesis. Sin embargo, un posible candidato podría ser la cinasa de Ser/Thr, Akt, la cual ha sido identificada en células de neuroblastoma y se ha visto que es capaz de translocarse hacia diferentes compartimientos subcelulares, incluyendo las mitocondrias, donde puede residir tanto en la matriz como en las membranas externa e interna (Bijur y Jope, 2003), catalizando la fosforilación de sustratos específicos.

Colectivamente, los resultados sugieren que la síntesis de progesterona en las mitocondrias del sinciotrofoblasto requiere la comunicación entre varias cascadas de señalización, con la participación de diferentes cinasas, las cuales ejercen sus efectos a través de la fosforilación de distintos aminoácidos presentes en las mismas proteínas. Esto implicaría que una o varias proteínas puedan ser el sustrato de diferentes cinasas, y la fosforilación específica de uno o varios residuos de aminoácidos, dependiendo del tipo de cinasa, conduciría a la activación o a la inhibición de un determinado evento metabólico, como ocurre en el caso de las proteínas sustrato del receptor de insulina (IRS) (Taniguchi *et al.*, 2006).

El tratamiento de las mitocondrias con AMPc y db-AMPc no modifica ni la síntesis de P4 ni la incorporación de ^{32}P a las proteínas mitocondriales. La falta de respuesta a los activadores clásicos de la holoenzima y el hecho de que sólo el H89 induzca cambios en la esteroidogénesis y en la fosforilación de las proteínas de las MPH y de las diferentes fracciones submitocondriales, sugiere la participación de una PKA que ya se encuentra activa, siendo únicamente sensible al efecto de los inhibidores de la subunidad Ca , y que probablemente no puede ser activada con la adición de AMPc. Asimismo, la falta de respuesta en presencia de AMPc o db-AMPc nos lleva a considerar dos posibilidades:

1) Ambos activadores podrían no ser capaces de llegar a los puntos de unión del AMPc a las subunidades R ; o 2) podría existir la participación de un modo de regulación entre las fosfodiesterasas específicas (PDE) y las subunidades reguladoras de PKA. En este contexto, se ha informado que una PDE específica, RegA, mediante la interacción con subunidades $\text{RI}\alpha$, podría reconocer AMPc unido e hidrolizarlo directamente a 5'AMP y así provocar la terminación de la señal (Morthy *et al.*, 2011). En el contexto de este trabajo, ambas posibilidades podrían traducirse en una falta de cambio en la síntesis de progesterona y en el patrón de fosforilación de proteínas.

Teniendo en cuenta el mecanismo canónico de activación de la PKA, se utilizó RpcAMP (Figura 20), un diasterómero de AMPc que se une competitivamente a la subunidad reguladora de la PKA para prevenir la disociación inducida por AMPc y por lo tanto, previene la activación de la enzima (Rashid et al., 2007). La falta de respuesta al utilizar RpcAMP en el contexto de la síntesis de progesterona y la fosforilación de proteínas sugiere que la activación de PKA no se puede prevenir y la población de esta enzima podría haber sido activada previamente y permanece en ese estado hasta el aislamiento de las mitocondrias.

Para asegurarse de que la PKA no podía ser activada de acuerdo al modelo clásico, se evaluó la posibilidad de inducir la esteroidogénesis a través de la activación de componentes de la vía de señalización situados corriente arriba de la PKA, como sería el caso de la adenilato ciclasa soluble, la cual se ha identificado dentro de las mitocondrias de hígado de ratón y es sensible a HCO_3^- , ATP y Ca^{2+} (Acin-Perez et al., 2009). Curiosamente, la estimulación con HCO_3^- (Figura 24) no modificó la esteroidogénesis en las MPH. Recientemente, se ha informado que en las células HeLa el tratamiento con HCO_3^- aumenta las concentraciones de AMPc intramitocondrial; sin embargo, al igual que los análogos permeables del AMPc, ninguno logró inducir una actividad medible de la PKA en la matriz mitocondrial (Lefkimmiatis et al., 2013). No obstante, aún es necesario evaluar la presencia de la adenilato ciclasa soluble en el interior de las MPH y sobre todo, analizar si existen cambios en las concentraciones de AMPc durante el curso de la síntesis de progesterona. Otro enfoque interesante sería el de evaluar la participación de las fosfodiesterasas intramitocondriales (en la placenta) en la generación de microdominios de AMPc con el objetivo de comprender la manera por la cual este segundo mensajero puede estar relacionado con la esteroidogénesis, activando cascadas dependientes o independientes de PKA.

La placenta humana es un tejido endocrino único, regulado crónicamente, que exhibe notables diferencias en la síntesis de esteroides en comparación con otros tejidos esteroidogénicos clásicos, tales como la corteza suprarrenal y el cuerpo lúteo (Tuckey, 2005). En el presente trabajo se propone que una PKA localizada dentro de las mitocondrias del sinciotrofoblasto de la placenta humana podría participar en la

modulación de la síntesis de progesterona. Sin embargo, la activación de la PKA y su repercusión en la esteroidogénesis puede estar basada en un mecanismo diferente con respecto al de la PKA citosólica o tal vez por la participación de otras cinasas. En este contexto, la fosforilación y desfosforilación dinámica de las proteínas mitocondriales podría funcionar como un tipo de interruptor modulado por la PKA u otras cinasas y fosfatasas que en última instancia hacen posible que la placenta humana pueda producir el aumento de los niveles plasmáticos de progesterona a lo largo del embarazo, sin la ocurrencia de cambios sustanciales que podrían representar un riesgo de aborto o de parto pre-término.

REFERENCIAS

- Acin-Perez R, Salazar E, Kamenetsky M, Buck J, Levin LR, Manfredi G. Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 2009;9:265-76.
- Ahn JH, McAvoy T, Rakhilin SV, Nishi A, Greengard P, Nairn AC. Protein kinase A activates protein phosphatase 2A by phosphorylation of the B56delta subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:2979-84.
- Arakane F, King SR, Du Y, Kallen CB, Walsh LP, Watari H, et al. Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J Biol Chem* 1997;272:32656-62.
- Ardail D, Privat JP, Egret-Charlier M, Levrat C, Lerme F, Louisot P. Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J Biol Chem* 1990;265:18797-802.
- Ashby CD, Walsh DA. Characterization of the interaction of a protein inhibitor with adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinases. I. Interaction with the catalytic subunit of the protein kinase. *J Biol Chem* 1972;247:6637-42.
- Aye TT, Mohammed S, van den Toorn HW, van Veen TA, van der Heyden MA, Scholten A, et al. Selectivity in enrichment of cAMP-dependent protein kinase regulatory subunits type I and type II and their interactors using modified cAMP affinity resins. *Mol Cell Proteomics* 2009;8:1016-28.
- Bansal AS, Bora SA, Saso S, Smith JR, Johnson MR, Thum MY. Mechanism of human chorionic gonadotropin-mediated immunomodulation in pregnancy. *Expert Rev Clin Immunol*. 2012;8:747-53.
- Barrera D, Avila E, Hernández G, Halhali A, Biruete B, Larrea F, et al. Estradiol and progesterone synthesis in human placenta is stimulated by calcitriol. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103:529-32.
- Beebe SJ, Corbin JD. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. En: Boyer PD, Krebs ED (Eds.). *The Enzymes* 1986;17:43-111.
- Bijur GN, Jope RS. Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurochem* 2003;87:1427-35.
- Bogan RL, Niswender GD. Constitutive steroidogenesis in ovine large luteal cells may be mediated by tonically active protein kinase A. *Biol Reprod* 2007;77:209-16.
- Bogoyevitch MA, Barr RK, Ketterman AJ. Peptide inhibitors of protein kinases-discovery, characterisation and use. *Biochim Biophys Acta* 2005;1754:79-99.
- 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;39:1722-31.
- 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.

- Brown SH, Wu J, Kim C, Alberto K, Taylor SS. Novel isoform-specific interfaces revealed by PKA RII beta holoenzyme structures. *J Mol Biol* 2009;393:1070-82.
- Christoffersen J, Smeland EB, Stokke T, Taskén K, Andersson KB, Blomhoff HK. Retinoblastoma protein is rapidly dephosphorylated by elevated cyclic adenosine monophosphate levels in human B-lymphoid cells. *Cancer Res* 1994;54:2245-50.
- Corso M, Thomson M. Protein phosphorylation in mitochondria from human placenta. *Placenta* 2001;22:432-9.
- Dalton GD, Dewey WL. Protein kinase inhibitor peptide (PKI): a family of endogenous neuropeptides that modulate neuronal cAMP-dependent protein kinase function. *Neuropeptides* 2006;40:23-34.
- Darne FJ, McGarrigle HH, Lachelin GC. Diurnal variation of plasma and saliva oestrogen, progesterone, cortisol and plasma dehydroepiandrosterone sulphate in late pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1989;32:57-66.
- Dodge-Kafka KL, Kapiloff MS. The mAKAP signaling complex: integration of cAMP, calcium, and MAP kinase signaling pathways. *J Cell Biol* 2006;85:593-602.
- Døskeland SO, Maronde E, Gjertsen BT. The genetic subtypes of cAMP-dependent protein kinase—functionally different or redundant? *Biochim Biophys Acta* 1993;1178:249-58.
- Dremier S, Kopperud R, Døskeland SO, Dumont JE, Maenhaut C. Search for new cyclic AMP-binding proteins. *FEBS Lett* 2003;546:103-7.
- Feinberg BB, Anderson DJ, Steller MA, Fulop V, Berkowitz RS, Hill JA. Cytokine regulation of trophoblast steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:586-91.
- Feliciello A, Gottesman ME, Avvedimento EV. cAMP-PKA signaling to the mitochondria: protein scaffolds, mRNA and phosphatases. *Cell Signal* 2005;17:279-87.
- Fleury A, Mathieu AP, Ducharme L, Hales DB, LeHoux JG. Phosphorylation and function of the hamster adrenal steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Steroids Biochem Mol Biol* 2004;91:259-71.
- Gómez-Chang E, Larrea F, Martínez Montes F. Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *TIP Rev Esp Cienc Quím Biol* 2012;15:24-36.
- Gomez-Concha C, Flores-Herrera O, Olvera-Sanchez S, Espinosa-Garcia MT, Martinez F. Progesterone synthesis by human placental mitochondria is sensitive to PKA inhibition by H89. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43:1402-11.
- Gorostizaga A, Cornejo Maciel F, Brion L, Maloberti P, Podestá EJ, Paz C. Tyrosine phosphatases in steroidogenic cells: regulation and function. *Mol Cell Endocrinol* 2007;265-266:131-7.
- Handschuh K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, et al. Human chorionic gonadotropin produced by the invasive trophoblast but not the villous trophoblast promotes cell invasion and is down-regulated by

- peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Endocrinology*, 2007;148:5011-9.
- Harootunian AT, Adams SR, Wen W, Meinkoth JL, Taylor SS, Tsien RY. Movement of the free catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into and out of the nucleus can be explained by diffusion. *Mol Biol Cell* 1993;4:993-1002.
 - Horbinski C, Chu CT. Kinase signaling cascades in the mitochondrion: a matter of life or death. *Free Radic Biol Med* 2005;38:2-11.
 - Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
 - Lefkimiatis K, Leroni D, Hofer AM. The inner and outer compartments of mitochondria are sites of distinct cAMP/PKA signaling dynamics. *J Cell Biol* 2013;202:453-62.
 - Livigni A, Scorziello A, Agnese S, Adornetto A, Carlucci A, Garbi C, et al. Mitochondrial AKAP 121 links cAMP and src signaling to oxidative metabolism. *Mol Biol Cell* 2006;17:263-71.
 - Lochner A, Moolmar JA. The many faces H89: a review. *Cardiovasc Drug Rev* 2006;24:261-74.
 - Ma MP, Thomson M. Protein kinase A subunit α catalytic and A kinase anchoring protein 79 in human placental mitochondria. *Open Biochem J* 2012;6:23-30
 - Maldonado-Mercado MG, Espinosa-García MT, Gómez-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.
 - Maloberti P, Castilla R, Castillo F, Cornejo Maciel F, Mendez CF, Paz C, et al. Silencing the expression of mitochondrial acyl-CoA thioesterase I and acyl-CoA synthetase 4 inhibits hormone-induced steroidogenesis. *FEBS J* 2005;272:1804-14.
 - Manna PR, Dyson MT, Stocco DM. Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. *Mol Hum Reprod* 2009;15:321-33.
 - Mantovani G, Bondioni S, Alberti L, Gilardini L, Invitti C, Corbetta S, et al. Protein kinase A regulatory subunits in human adipose tissue: decreased R2B expression and activity in adipocytes from obese subjects. *Diabetes* 2009;58:620-6.
 - 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, Moncada R, Barcenas FJ, Espinosa-García T. Subcellular localization and properties of adenosine diphosphatase in human placenta. *Placenta* 1992;13:463-73.

- McKnight GS, Cummings DE, Amieux PS, Sikorski MA, Brandon EP, Planas JV, et al. Cyclic AMP, PKA, and the physiological regulation of adiposity. *Recent Prog Horm Res* 1998;53:139-59.
- Means CK, Lygren B, Langeberg LK, Jain A, Dixon RE, Vega AL, et al. An entirely specific type I A-kinase anchoring protein that can sequester two molecules of protein kinase A at mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:E1227-35.
- Mehta KD. Emerging role of protein kinase C in energy homeostasis: A brief overview. *World J Diabetes* 2014;5:385-92.
- Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* 1988;9:295-318.
- Miller WL. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol* 2013;379:62-73.
- Moore CC, Hum DW, Miller WL. Identification of positive and negative placenta-specific basal elements and a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element in the human gene for P450scc. *Mol Endocrinol* 1992;6:2045-58.
- Moore K, Persaud T.V. *Embriología clínica* 5a edición. México, D.F: Nueva Editorial Interamericana, c1995. 536 pp.
- Moorthy BS, Gao Y, Anand GS. Phosphodiesterases catalyze hydrolysis of cAMP-bound to regulatory subunit of protein kinase A and mediate signal termination. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10(2):M110.002295. DOI:10.1074/mcp.M110.002295.
- Murray AJ. Pharmacological PKA inhibition: All may not be what it seems. *Sci Signal* 2008;1:re4.
- 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.
- Nicolaou P, Hajjar RJ, Kranias EG. Role of protein phosphatase-1 inhibitor-1 in cardiac physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol* 2009;47:365-71.
- Nulsen JC, Silavin SL, Kao LC, Ringler GE, Kilman HJ, Staruss JF 3rd. Control of the steroidogenic machinery of the human trophoblast by cyclic AMP. *J Reprod Fertil Suppl* 1989;37:147-53.
- Papa S, Sardanelli AM, Scacco S, Technikova-Dobrova Z. cAMP-dependent protein kinase and phosphoproteins in mammalian mitochondria. An extension of the cAMP-mediated intracellular signal transduction. *FEBS Lett* 1999;444:245-9.
- Pearson RB, Kemp BE. Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol* 1991;200:62-81.
- Pidoux G, Taskén K. Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *J Mol Endocrinol* 2010;44:271-84.
- Posner JB, Hammermeister KE, Bratvold GE, Krens EG. The assay of adenosine-3',5'-phosphate in skeletal muscle. *Biochemistry* 1964;3:1040-4.

- Rashid G, Bernheim J, Green J, Benchetrit S. Parathyroid hormone stimulates endothelial expression of atherosclerotic parameters through protein kinase pathways. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292:F1215-8.
- Ringler GE, Strauss JF 3rd. In vitro systems for the study of human placental endocrine function. *Endocr Rev* 1990;11:105-23.
- Ritvos O. Modulation of steroidogenesis in choriocarcinoma cells by cholera toxin, phorbol ester, epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Mol Cell Endocrinol* 1988;59:125-33.
- Roostae A, Barbar E, Lavigne P, LeHoux JG. The mechanism of specific binding of free cholesterol by the steroidogenic acute regulatory protein: evidence for a role of the C-terminal alpha-helix in the gating of the binding site. *Biosci Rep* 2009;29:89-101.
- Sanderson JT. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicol Sci* 2006;94:3-21.
- Sands WA, Palmer TM. Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cell Signal* 2008;20:460-6.
- Schwoch G, Trinczek B, Bode C. Localization of catalytic and regulatory subunits of cyclic AMP-dependent protein kinases in mitochondria from various rat tissues. *Biochem J* 1990;270:181-8.
- Sewer MB, Waterman MR. cAMP-dependent transcription of steroidogenic genes in the human adrenal cortex requires a dual-specificity phosphatase in addition to protein kinase A. *Mol Endocrinol* 2002;29:163-74.
- Shanker YG, Rao AJ. Regulation of progesterone biosynthesis in the human placenta by estradiol 17 beta and progesterone. *Biochem Mol Biol Int* 1997;43:591-9.
- Shell JR, Larence DS. Probes of the mitochondrial cAMP-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta* 2013;1834:1359-63.
- Singh A, Redden JM, Kapiloff MS, Dodge-Kafka KL. The large isoforms of A-kinase anchoring protein 18 mediate the phosphorylation of inhibitor-1 by protein kinase A and the inhibition of protein phosphatase 1 activity. *Mol Pharmacol* 2011;79:533-40.
- Skålhegg BS, Taskén K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci* 1997;2:d331-42.
- Stocco DM, Wang X, Jo Y, Manna PR. Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol Endocrinol* 2005;19:2647-59.
- 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.

- 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 U S A* 1995;92:4778-82.
- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:85-96.
- Taskén K, Skålhegg BS, Solberg R, Andersson KB, Taylor SS, Lea T, et al. Novel isozymes of cAMP-dependent protein kinase exist in human cells due to formation of RI alpha-RI beta heterodimeric complexes. *J Biol Chem* 1993;268:21276-83.
- Taylor SS, Kim C, Cheng CY, Brown SH, Wu J, Kannan N. Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. *Biochim Biophys Acta* 2008;1784:16-26.
- Thomson M. Evidence of undiscovered cell regulatory mechanisms: phosphoproteins and protein kinases in mitochondria. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:213-9.
- Tuckey RC. Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta* 2005;26:273-81.
- Vigil D, Blumenthal DK, Brown S, Taylor SS, Trewhella J. Differential effects of substrate on type I and type II PKA holoenzyme dissociation. *Biochemistry* 2004;43:5629-36.
- Wang X, Walsh LP, Reinhart AJ, Stocco DM. The role of arachidonic acid in steroidogenesis and acute regulatory (StAR) gene and protein expression. *J Biol Chem* 2000;275:20204-9.
- Watari H, Arakane F, Moog-Ltz C, Kallen CB, Tomasetto C, Gerton GL, et al. MLN64 contains a domain with homology to the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that stimulates steroidogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:8462-7.
- Weedon-Fekjær MS, Taskén K. Review:Spatiotemporal dynamics of hCG/cAMP signaling and regulation of placental function. *Placenta* 2012;33:S87-91.
- Yokozaki H, Tortora G, Pepe S, Maronde E, Genieser HG, et al. Unhydrolyzable analogues of adenosine 3':5'-monophosphate demonstrating growth inhibition and differentiation in human cancer cells. *Cancer Res* 1992;52:2504-8.
- Zaremberg V, Donella-Deana A, Moreno S. Mechanism of activation of cAMP-dependent protein kinase: in *Mucor rouxii* the apparent specific activity of the cAMP-activated holoenzyme is different than that of its free catalytic subunit. *Arch Biochem Biophys* 2000;381:74-82.

Publicaciones

- **Gomez Chang E**, Espinosa-Garcia MT, Olvera-Sanchez S, Flores-Herrera O, Martinez F. PKA tightly bound to human placental mitochondria participates in steroidogenesis and is not modified by cAMP. *Placenta* 2014, DOI: 10.1016/j.placenta.2014.06.005
- **Gómez-Chang E**, Larrea F, Martínez Montes F. Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *TIP Rev Esp Cienc Quím Biol* 2012;15:24-36.
- Federico Martinez, Rebeca Milan, Oscar Flores-Herrera, Sofia Olvera-Sanchez, **Erika Gomez-Chang** and Maria Teresa Espinosa-Garcia (2012). The Role of Mitochondria in Syncytiotrophoblast Cells: Bioenergetics and Steroidogenesis, *Recent Advances in Research on the Human Placenta*, Dr. Jing Zheng (Ed.), ISBN: 978-953-51-0194-9, InTech.



PKA tightly bound to human placental mitochondria participates in steroidogenesis and is not modified by cAMP



E. Gomez-Chang, M.T. Espinosa-Garcia, S. Olvera-Sanchez, O. Flores-Herrera, F. Martinez*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-159, Coyoacán 04510, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:
Accepted 12 June 2014

Keywords:
Protein phosphorylation
PKA activity
Syncytiotrophoblast mitochondria
Steroidogenesis
Human placenta

ABSTRACT

Introduction: Protein phosphorylation plays an important role in the modulation of steroidogenesis and it depends on the activation of different signaling cascades. Previous data showed that PKA activity is related to steroidogenesis in mitochondria from syncytiotrophoblast of human placenta (HPM). PKA localization and contribution in progesterone synthesis and protein phosphorylation of HPM was assessed in this work.

Methods: Placental mitochondria and submitochondrial fractions were used. Catalytic and regulatory PKA subunits were identified by Western blot. PKA activity was determined by the incorporation of ^{32}P into proteins in the presence or absence of specific inhibitors. The effect of PKA activators and inhibitors on steroidogenesis and protein phosphorylation in HPM was tested by radioimmunoassay and autoradiography.

Results: The PKA α catalytic subunit was distributed in all the submitochondrial fractions whereas β II regulatory subunit was the main isoform observed in both the outer and inner membranes of HPM. PKA located in the inner membrane showed the highest activity. Progesterone synthesis and mitochondrial protein phosphorylation are modified by inhibitors of PKA catalytic subunit but are neither sensitive to inhibitors of the regulatory subunit nor to activators of the holoenzyme.

Discussion: The lack of response in the presence of PKA activators and inhibitors of the regulatory subunit suggests that the activation of intramitochondrial PKA cannot be prevented or further activated.

Conclusions: The phosphorylating activity of PKA inside HPM could be an important component of the steroidogenesis transduction cascade, probably exerting its effects by direct phosphorylation of its substrates or by modulating other kinases and phosphatases.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Steroidogenesis can be acutely or chronically regulated depending on the tissue and it may occur in the order of minutes and hours, respectively [1]. In acutely regulated tissues such as gonads, the response under the control of trophic hormones, initiates with the mobilization and delivery of cholesterol from the outer to the inner mitochondrial membrane, where it is converted to pregnenolone by the cytochrome P450 side chain cleavage enzyme (P450_{sc}) [2]. In tissues like brain and placenta, the chronic response includes genomic events that initiate within hours after stimuli and result, in general, in a higher expression of enzymes related to steroidogenesis [3]. In the case of adrenals,

adrenocorticotrophic hormone (ACTH) promotes steroidogenesis over the course of days by increasing the transcription of genes for steroidogenic enzymes. In addition, on a 15–60 min time scale, the same hormone, via cAMP, stimulates the phosphorylation of proteins like the Steroidogenic Acute Regulatory protein (StAR) [4], which is needed for the transfer of cholesterol from the outer to the inner mitochondrial membrane [5].

Both acute and chronic regulations are under the control of factors or hormones that can activate diverse signaling cascades mediated or not by cyclic adenosine monophosphate (cAMP) dependent protein kinase (PKA). However, it has been reported that the induction of steroidogenesis independently of cAMP is less than 1% compared to the cAMP-PKA dependent pathway [1].

The most studied pathway in steroidogenic tissues is mediated by cAMP/PKA, where the stimulation by trophic hormones induces the activation of the enzyme adenylate cyclase, which produces the second messenger, cAMP, which in turn binds to PKA.

* Corresponding author. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Mexico City, Mexico. Tel.: +52 55 56 23 2168; fax: +52 55 56 16 2419.
E-mail addresses: fedem@bq.unam.mx, fedem@unam.mx (F. Martinez).

When inactive, PKA is assembled as a tetrameric complex consisting of two regulatory (R) and two catalytic (C) subunits. The regulatory subunits have been described as scaffold proteins; however, they also serve as inhibitors of the C subunits [6]; since the holoenzyme dissociates in response to cAMP and in consequence the active C subunits are released [7]. Two major regulatory isoforms of PKA are known, RI and RII, and the classification is based on the type of the R subunit which binds to A-kinase anchoring proteins (AKAPs) with distinct levels of affinity [8]. Four different genes encoding for the regulatory subunits RI α , RI β , RII α and RII β , and three genes encoding for the catalytic subunits C α , C β and C γ [9] have been described. RI α and RII α are ubiquitously distributed whereas RI β and RII β are predominantly expressed in various endocrine tissues such as brain and fat [7,10].

It is known that PKA phosphorylates proteins like StAR as well as transcription factors associated with the activation of genes related to steroidogenesis [11]. In this sense, it is important to point out that disregarding the signaling cascade activated; the events of phosphorylation/dephosphorylation of proteins play an important role in steroidogenesis [12–14].

The human placenta has been recognized as a chronic response tissue, since there are no substantial short term fluctuations in maternal progesterone during pregnancy [15]. Besides, human placenta does not express the StAR protein, instead, it expresses MLN64, a protein that shares homology with StAR protein and is in charge of maintaining a non-limiting supply of cholesterol for placental progesterone synthesis [16–20]. Mitochondria isolated from human placental syncytiotrophoblast are a useful model to quantify the synthesis of progesterone and concomitantly observe the manifestation of post translational events within minutes (i.e. protein phosphorylation).

Protein phosphorylation is an important event for placental steroidogenesis. Previous data obtained by us and other groups working on human placenta and different tissues, have clearly shown that PKA activity is highly regulated and related to steroidogenesis; since the kinase inhibitor H89 decreases progesterone synthesis and increases protein phosphorylation in isolated mitochondria from syncytiotrophoblast of human placenta (HPM) as well as in BeWo cells [21,22].

Even though it has been reported that human placental steroidogenesis can be regulated by luteinizing hormone (LH) and human chorionic gonadotropin hormone (hCG) [3] it still remains poorly understood the role of other key hormones that control cAMP levels [20] as well as the interplay between the cytosolic signaling cascade mediated by cAMP/PKA and a putative complete intramitochondrial transduction pathway also possibly mediated by the phosphorylating activity of PKA upon specific targets related to progesterone synthesis. The knowledge of the signaling cascades that activate this biosynthetic process will help understand the fine tuning by which the human placenta synthesizes and releases increasing plasmatic concentrations of progesterone throughout pregnancy [20].

In order to assess the overall contribution of PKA in progesterone synthesis and protein phosphorylation in syncytiotrophoblast mitochondria, we searched for the distribution and activity of PKA in different submitochondrial fractions. The PKA C α subunit has already been identified in mitochondria isolated from human placenta [23] and specifically in both the outer and inner membranes [23].

In this work, we found that the C α subunit located in the inner membrane has the highest activity. RII β subunit was the main isoform detected in both the outer and the inner membranes. Progesterone synthesis was sensitive to inhibitors of the C subunit of PKA but it was insensitive to inhibitors of the R subunit or activators of the holoenzyme. The results suggest that an active

intramitochondrial PKA (tightly bound to the membrane fraction) participates in the modulation of steroidogenesis, and this kinase does not appear to be susceptible of being further activated by cAMP in the context of steroidogenesis and even more, its activation cannot be prevented by using inhibitors of the holoenzyme.

2. Materials and methods

2.1. Isolation of human syncytiotrophoblast mitochondria

Following governmental and ethics committee approval, placentas were obtained from the IMSS No 4 Gynecology and Obstetrics hospital. Full-term human placentas from healthy women were collected immediately after normal delivery and processed in the next 30 min. Mitochondria from placental syncytiotrophoblast were prepared as previously reported [24] with modifications previously implemented [25] in order to assure the isolation of syncytiotrophoblast mitochondria. To estimate the contamination degree of mitochondria with other cellular fractions, the activity of various enzyme markers was determined as previously reported by Martinez et al. [26]. Lactate dehydrogenase activity in HPM was less than 10%, and the contamination with plasma membrane was less than 5% [27].

2.2. Mitochondrial oxygen consumption

To assure mitochondrial integrity, oxygen uptake was estimated polarographically using a Clark type electrode in a reaction mixture containing 250 mM sucrose, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 10 mM succinate, 10 mM K₂HPO₄, 5 mM MgCl₂ and 0.2% bovine serum albumin (BSA) at pH 7.4 in a final volume of 1.2 ml at 37 °C and 1 mg/ml of syncytiotrophoblast mitochondrial protein. Oxygen consumption was stimulated by the addition of 300–500 nmol ADP [28]. Mitochondria with respiratory control higher than four were used.

2.3. Preparation of submitochondrial fractions

A swelling and shrinking procedure was performed to isolate the outer and inner mitochondrial membrane fractions with modifications to the method previously reported [29]. Briefly, 20–25 mg of mitochondrial protein was incubated for 20 min in an ice bath with 10 mM H₃PO₄, adjusted to pH 7.3 with Tris base in the presence of 10 μ g/ml aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride and 10 μ g/ml leupeptin. After incubation, sucrose was added to attain a concentration of 0.382 M and the mixture was incubated for 20 min in an ice bath. The mixture was centrifuged at 12,500 \times g for 10 min at 4 °C. The pellet contained the mitoplasts and the supernatant contained the outer mitochondrial membranes. The supernatant was centrifuged at 137,000 \times g for 1 h to obtain the outer membranes in the pellet, and in the supernatant remained the soluble proteins of the intermembrane space. The mitoplasts were incubated in 1 mM H₃PO₄, adjusted to pH 7.3 with Tris base for 20 min in an ice bath. Then, sucrose was added to reach a concentration of 0.31 M and the mixture was incubated for 20 min in an ice bath and centrifuged at 102,000 \times g for 1 h. The pellet contained the inner membranes and the supernatant contained the soluble proteins from the matrix. Matrix and intermembrane fractions were concentrated together by using an Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Device. Where indicated, submitochondrial fractions were washed with a solution containing 2 M KCl. Submitochondrial fractions were used immediately or kept at –70 °C until they were used. With this procedure, inner and outer membrane enriched fractions, as well as outer membranes joined at the contact sites to inner membrane fractions are obtained [29]. The enzyme activities of succinate dehydrogenase (SDH), monoamino oxidase (MAO), adenylate kinase (ADK) and creatine kinase as markers of the inner mitochondrial membrane, outer mitochondrial membrane, intermembrane space and contact sites, respectively, have already been assessed in the inner and outer membrane fractions [30]. However, in order to assure that we are obtaining inner and outer membrane enriched fractions, we assessed the enzyme activities of the chain respiratory complexes I and II as described below.

2.4. Activity determination of complex I and II from HPM and membranes

Activities of complex I (NADH:DCPIP oxidoreductase) and complex II (succinate:DCPIP oxidoreductase) were determined spectrophotometrically at 600 nm by following the reduction of the artificial electron acceptor 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP; 50 μ M; $\epsilon_{\text{DCPIP}} = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). HPM, inner or outer membranes were permeabilized with 0.3% Zwittergent 3–14 and incubated in 30 mM KH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 120 mM KCl, pH 7.4, and either 100 μ M NADH (complex I) or 10 mM succinate (complex II). Complex II was activated by preincubation in the presence of 0.2 mM phenazinemethosulfonate (PMS) during 2 min at 25 °C. The reaction was started by the addition of NADH or succinate. The final relationship was 1 mg of mitochondrial protein/ml.

2.5. Mitochondrial progesterone synthesis

Progesterone synthesis was determined in a medium consisting of 120 mM KCl, 10 mM MOPS pH 7.4, 0.5 mM EGTA, 10 mM isocitrate, 4 μ g of aprotinin/ml, 1 μ M leupeptin, 5 mM K₂HPO₄ pH 7.4 and 1 mg/ml of mitochondrial protein, in a final

volume of 50 μ l. After 20 min incubation at 37 °C, the reaction was stopped by adding 75 μ l of cold methanol. Where indicated, mitochondria were previously incubated for 30 min at 4 °C with 200 μ M H89, 0.5 mM cAMP, 0.5 mM db-cAMP, 20, 50, 100, 200, 300 μ M Rp-cAMP or 30 mM HCO_3^- and the reaction was initiated by adding the progesterone synthesis medium. Progesterone was determined by radioimmunoassay as previously described [22].

2.6. Protein determination

A Bradford assay was carried out to determine the amount of protein [31] using BSA as standard.

2.7. Electrophoretic techniques, Western blot analysis and autoradiography

SDS-PAGE was performed according to Laemmli [32] using 50 μ g of mitochondrial protein per lane. Proteins were stained with Coomassie® or electrotransferred to PVDF membranes (Immobilon P; Millipore) in a semi-dry electroblotting system (Bio-Rad) at 25 V for 50 min. Western blot analyses were performed to assess the following human proteins: PKA α cat; PKA β cat; PKA γ cat; PKAII β reg; PKAII α reg; PKAII α reg; adenine nucleotide translocase (ANT), cytochrome b, and monoamine oxidase B (MAO B) (Santa Cruz Biotechnology). The antibody against Phospho-PKA Substrates (RRXS*/T*) was from Phospho-(Ser/Thr) Kinase Substrate Antibody Sampler Kit (Cell Signaling). Phosphoserine/threonine antibodies were obtained from the PhosphoProtein Purification Kit (QIAGEN). Western blot was carried out following the manufacturer's recommendations and proteins were visualized using horseradish peroxidase-conjugated goat antimouse IgG (Pierce) at a dilution of 1:1000, and the Enhanced ChemiLuminescence assay (Amersham Life Science) according to the manufacturer's instructions. The PVDF membranes were exposed to BioMax® film from Kodak® for various times. Results were quantified by densitometry using a public domain Java image processing program (ImageJ) developed at the U.S National Institutes of Health (freely available at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

2.8. ^{32}P incorporation to mitochondrial proteins

Syncytiotrophoblast mitochondria (1 mg/ml) were incubated 30 min in the presence or absence of 50 μ M okadaic acid, 100 μ M sodium orthovanadate, 200 μ M H89, 50 μ M RpcAMP, 0.5 mM 8-bromoadenosine (8Br-cAMP), 0.5 mM cAMP or 0.5 mM db-cAMP at 4 °C. Protein phosphorylation was initiated by adding the

progesterone synthesis medium plus 0.32 μ M $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (6000 Ci/mmol). At the indicated times, the reaction was stopped with 1.5 volumes of cold methanol. The sample was centrifuged at 13,000 \times g, the pellet recovered and the phosphorylated proteins were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blot or by autoradiography. Radioactive bands were visualized by exposure for 7 days to BioMax® film from Kodak®. Experiments were performed in triplicate with at least three different placentas.

2.9. PKA activity assay

The activity of PKA was assessed using the commercial kit, Signa TECT® cAMP-Dependent Protein Kinase (PKA) Assay System, according to the manufacturer's instructions. Intact mitochondria or submitochondrial fractions were preincubated for 30 min at 4 °C in the presence or absence of 200 μ M H89 or 50 μ M PKI; the reaction was initiated by adding the reaction mixture which contained PKA assay buffer, 5 μ M cAMP, PKA 100 μ M biotinylated substrate, and 0.1 mM ATP/ $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (6000 Ci/mmol). Where indicated, the activity of PKA was assessed in the absence of cAMP. The radioactivity was measured in a Beckman Coulter liquid scintillation counter. Each experiment was performed in triplicate with at least three different placental tissues. The activity is reported as the percentage of ^{32}P incorporated to a biotinylated substrate (Kemptide), which is highly specific for PKA.

Analytical grade reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), E. Merck (Darmstadt, Germany), and BioRad (Hercules, CA, USA). $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP from Perkin Elmer (USA).

2.10. In vitro phosphorylation assay

In vitro phosphorylation was carried out by incubating 50 μ g of intact mitochondria, soluble fraction, inner or outer membrane for 20 min at 37 °C in a 10X Kinase buffer, which contained 200 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 M NaCl, 120 mM MgCl_2 and 0.1 mM ATP/ $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (6000 Ci/mmol) in a final volume of 50 μ l. To initiate the reaction, the purified 40 kDa cAMP-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit (Promega) was added. A biotinylated PKA substrate was used as a positive control.

2.11. Statistical analysis

As the activity of PKA in intact human placental mitochondria and submitochondrial fractions was assessed with fresh and frozen samples, an independent samples *t*-test was conducted and there was no significant difference between both

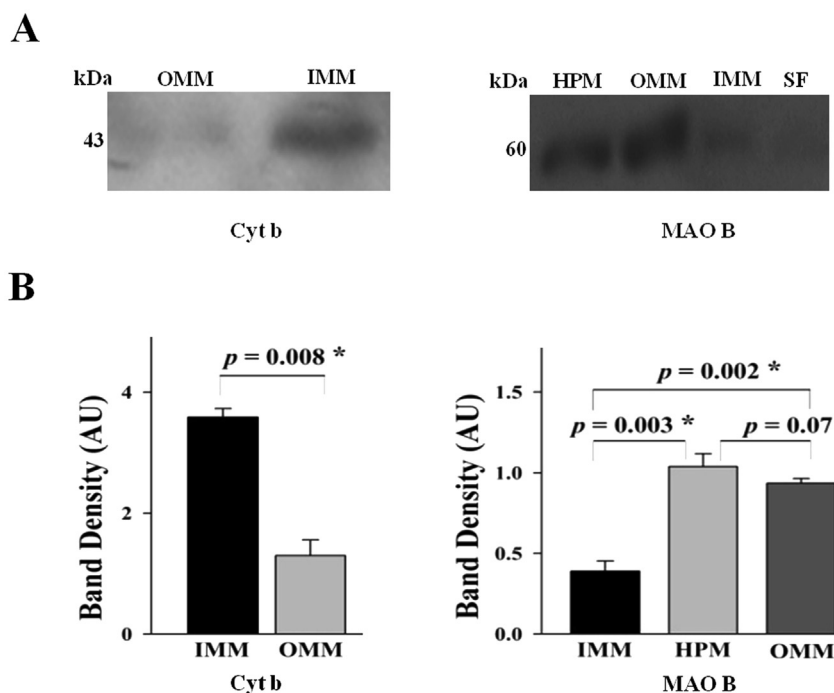


Fig. 1. Identification of PKA isoforms by Western blot. (A) Immunodetection in intact human placental mitochondria isolated from syncytiotrophoblast and submitochondrial fractions of two membrane-bound proteins: monoamine oxidase (MAO B) and cytochrome b (Cyt b). (B) The band intensities for MAO B and Cyt b are shown. The data represent the mean \pm SD performed in triplicate with at least three different placentas. An asterisk indicates a *p* value <0.05 which was considered to be statistically significant. (C) Distribution of PKA R β I, R β II and C α subunits in submitochondrial fractions. A band of approximately 70 kDa was also immunodetected when assessing RII β subunit. Two bands were identified with the PKA C α antibody. A more intense band of approximately 40 kDa, and a minor band of approximately 90 kDa. (D) Band intensities of PKA C α , R β I and β II subunits. (E) Immunodetection of PKA C α subunit in intact mitochondria and submitochondrial fractions washed in a 2 M KCl solution, as described in Materials and Methods. (F) Band intensities of PKA C α and R β II subunits after washing in a 2 M KCl solution. HPM: human placental mitochondria from syncytiotrophoblast; OMM: outer mitochondrial membrane; IMM: inner mitochondrial membrane; SF: soluble fraction (matrix and intermembrane space). Protein concentration was 50 μ g per lane. These are representative experiments performed in triplicate with three different placental tissues.

conditions. The data shown represent the mean \pm SD of three to five independent experiments in triplicate. Since the group sizes were unequal but with a normal distribution and equal variance, an analysis of variance (ANOVA) was carried out with a Tukey *post hoc* test. Data obtained from densitometric measurements of the bands from three separate experiments have been pooled and are expressed as the mean \pm SD. Results were analyzed by paired *t*-test and a *p* value <0.05 was considered to be statistically significant in all analyses performed.

3. Results

3.1. Distribution of PKA $C\alpha$ and RII β subunits in submitochondrial fractions

HPM were fractionated to obtain separately the outer and the inner membranes as well as the soluble (matrix and intermembrane space) fractions. However, as it was previously mentioned, with the method reported by Ardail [29], inner and outer membrane enriched fractions, as well as outer membranes joined at the contact sites to inner membrane fractions are obtained. In order to evaluate the obtaining of outer and inner membrane enriched fractions, a Western blot identifying two well known membrane-bound proteins was carried out: cytochrome b for the inner membrane and the monoamine oxidase B (MAO B) for the outer membrane. The results showed that cytochrome b was identified in the inner membrane (Fig. 1A left panel) with a significantly higher intensity than in outer membrane (Fig. 1B left panel). MAO B was found in the outer membrane (Fig. 1A right panel) with a significantly higher intensity than in the inner membrane (Fig. 1B right panel). Also, the enzyme activities of the respiratory complexes I (NADH:DCPIP oxidoreductase) and II (succinate:DCPIP oxidoreductase) were determined as described under Materials and Methods. The activity of both complexes I ($p = 0.02$) and II ($p = 0.01$) was significantly higher in the inner membrane than in the outer membrane (Table 1). The minor activity of complex I in the inner mitochondrial membrane compared to intact HPM could be due to the membranes freezing and thawing.

The soluble fraction was concentrated as much as possible, in order to determine the presence of PKA. A band of approximately 40 kDa in all submitochondrial fractions was identified by Western Blot (Fig. 1C), which corresponds to PKA α catalytic ($C\alpha$) subunit. A band of approximately 90 kDa was also immunodetected. The band intensity of the 40 kDa protein was significantly higher in the soluble fraction compared to the inner and the outer membranes, but there was no significant difference between intact HPM and the rest of the submitochondrial fractions (Fig. 1D right panel). PKA β and γ catalytic subunits were not immunodetected. On the other hand, the presence and isoforms of the R subunit were also assessed. Bands of approximately 50 kDa proteins corresponding to β I and β II regulatory (R) subunits were identified in intact HPM and in both the outer and inner membranes, being RII β isoform the most abundant (Fig. 1C). A band of approximately 70 kDa was also immunodetected when assessing RII β subunit. The immunoblots shown (Fig. 1C) and their quantification (Fig. 1D) were taken and analyzed from samples loaded and separated in the same gel; however, images were partitioned for clarity. Densitometric measurements of the bands from three separate experiments have been pooled and are expressed as the mean \pm SD.

The band intensity of β I subunit was significantly higher in intact HPM compared to the outer and inner membranes (Fig. 1D left panel). The band intensity of β II subunit was not significantly different between HPM and the outer and inner membranes (Fig. 1D central panel). Since just a mild immunodetection of β I subunit was observed, we only continued assessing the presence of β II subunit.

To discard the possibility that $C\alpha$ or β II subunits could be associated to submitochondrial fractions due to non-specific interactions, intact HPM and submitochondrial fractions were

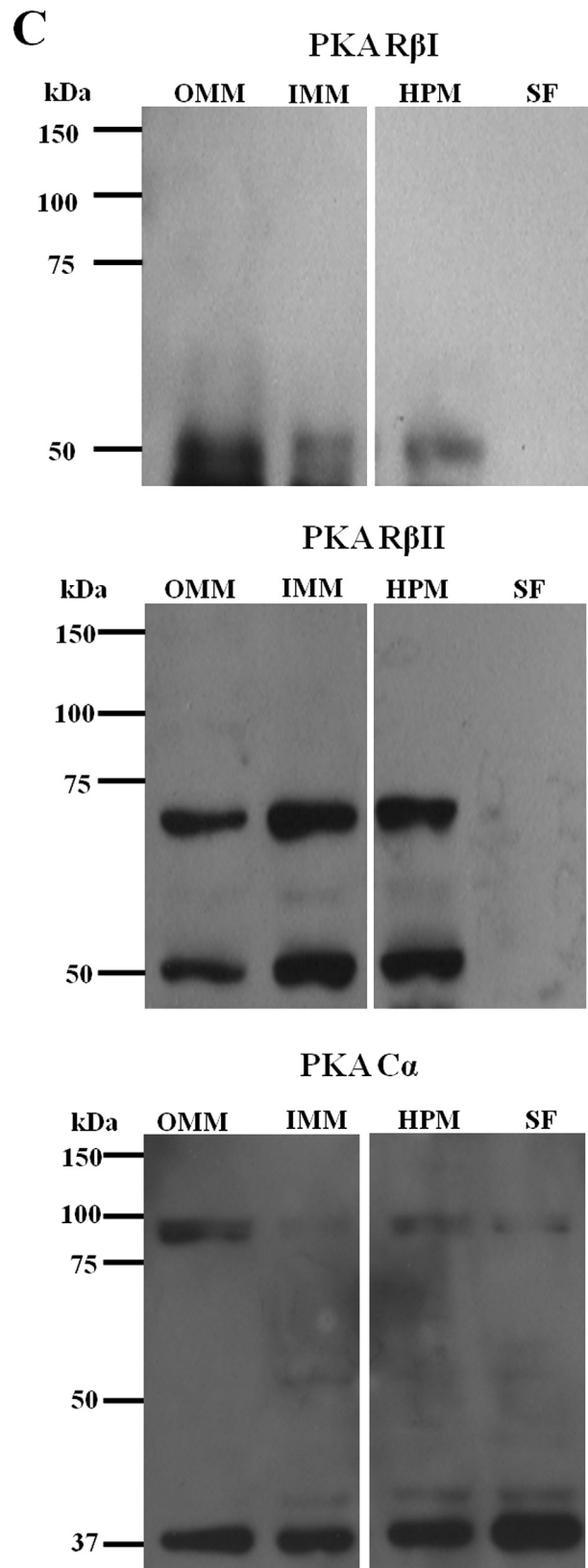


Fig. 1. (continued).

washed twice in a solution with high ionic strength (2 M KCl). It was observed that both subunits were still identified in the same submitochondrial fractions (Fig. 1E) with similar band intensity than before the wash with KCl (Fig. 1F).

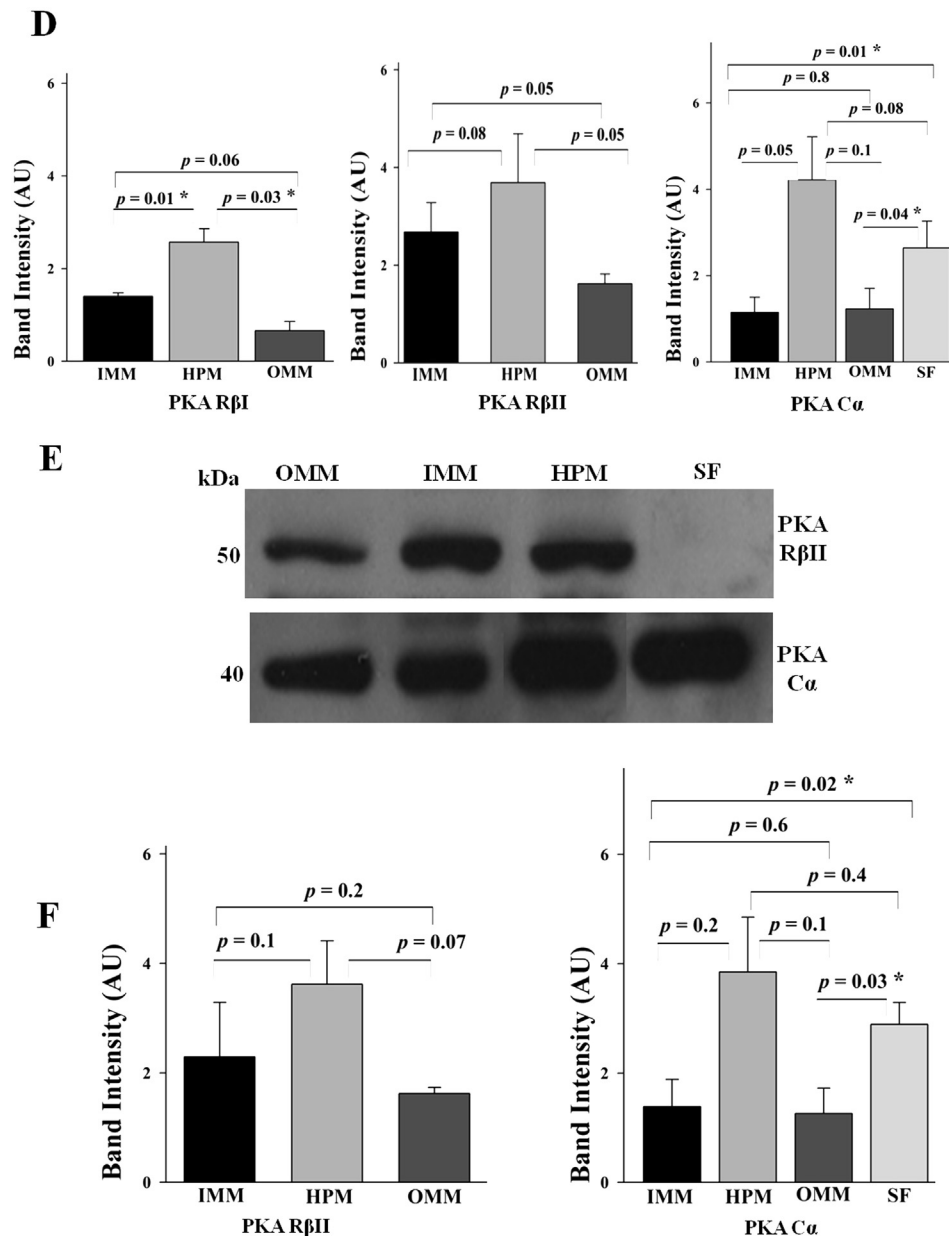


Fig. 1. (continued).

3.2. Activity of PKA in submitochondrial fractions

The activity of PKA in submitochondrial fractions was assessed using a cAMP-Dependent Protein Kinase Assay System as described under Materials and Methods. The results showed (Fig. 2) that the highest PKA activity was found in the inner membrane, which was about 52% as compared to HPM control, while the outer membrane and the soluble fractions showed the lowest activity as compared to control, 24.1% and 15.4%, respectively.

The PKA activity of intact mitochondria and of each submitochondrial fraction was also evaluated in the presence of 200 μ M H89 (a PKA inhibitor). Compared to control, PKA activity in HPM decreased to 52%, while in the inner membrane, the remaining activity was 21.1%. In the outer membrane and the soluble fractions, the remaining activity was 15.2% and 8.6%, respectively.

In the presence of 50 μ M PKI (another PKA inhibitor), the activity in HPM compared to control decreased to 86.5%. In the

case of the inner membrane, the outer membrane and the soluble fractions, the activity diminished to 40.8, 19% and 11.1% respectively. When a concentration of PKI similar to that of H89 was employed, PKA activity decreased to 62.6%, 27.8%, 15.1%, and 8.3%, corresponding to HPM, inner membrane, outer membrane and soluble fractions, respectively. Using the same concentrations of both inhibitors (200 μ M), the difference in the percentage of 32 P incorporation was not statistically significant, even though each one of the inhibitors has a different action mechanism upon PKA.

The activity of PKA was also determined in the absence of its activator, cAMP. In this condition, the activity of HPM was about 96.8%. Compared to control, in the inner membrane, the outer membrane and the soluble fractions, the activity observed was 49.7%, 21.3% and 12.1%, respectively. The difference in the activity of PKA in the presence or absence of cAMP in all the fractions was approximately 3%.

Table 1
Enzyme activities of complex I and II in human placental mitochondria and membranes.

	Complex I NADH dehydrogenase nmol/mg/min	n	Complex II succinate dehydrogenase nmol/mg/min	n
HPM	22.1 ± 3.1	3	2.57 ± 0.7	6
IMM	3.48 ± 0.8*	11	13.5 ± 4.0*	3
OMM	0.68 ± 0.2	5	1.62 ± 1.3	5

The enzyme activities were determined as described under Material and Methods. Results are expressed as nmol DCPIP/mg/min. Each experiment was performed in triplicate. The values shown are the mean ± SD from three to eleven different placentas, as specified. As indicated by an asterisk, the activity of both complexes I and II was significantly higher in the inner membrane than the outer membrane; complex I ($p = 0.02$); complex II ($p = 0.01$). A p value less than 0.05 was considered to be statistically significant. HPM: human placental mitochondria from syncytiotrophoblast; OMM: outer mitochondrial membrane; IMM: inner mitochondrial membrane.

3.3. Effect of PKA activators on steroidogenesis and protein phosphorylation of syncytiotrophoblast mitochondria

We hypothesized that the addition of PKA activators to HPM could increase progesterone synthesis. The steroidogenesis by HPM was determined in the presence or absence of cAMP (the PKA natural activator) or db-cAMP (a membrane permeable analog of cAMP). Interestingly, progesterone synthesis was not modified by cAMP or db-cAMP (Fig. 3A and B). Since PKA activity is closely related to protein phosphorylation, the effect of both activators was tested in this context. Although HPM have multiple proteins that can serve as substrates of any kinase, only three proteins were phosphorylated. The same pattern of protein phosphorylation was observed when using cAMP or db-cAMP, (Fig. 3C and E). Densitometry scans of both autoradiographies (Fig. 3C and E) displayed three peaks at 46, 42 and 36 kDa (Fig. 3D and F left panels). The

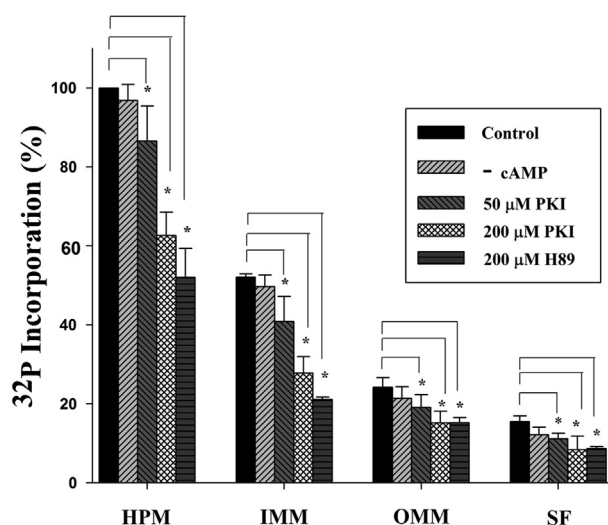


Fig. 2. PKA activity in HPM and submitochondrial fractions. PKA activity was assessed as described in Materials and Methods. Results are expressed as the percentage of ^{32}P incorporation, with respect to mitochondria. Intact mitochondria and submitochondrial fractions were previously incubated for 30 min in the presence or absence of 200 μM H89 or either 50 μM or 200 μM PKI. Where indicated, the experiment was carried out without the addition of cAMP. The data shown represent the mean ± SD of three to five independent experiments in triplicate. An analysis of variance (ANOVA) with a Tukey *post hoc* test was conducted. An asterisk indicates a p value < 0.05 which was considered to be statistically significant. HPM: human placental mitochondria from syncytiotrophoblast; OMM: outer mitochondrial membrane; IMM: inner mitochondrial membrane; SF: soluble fraction (matrix and intermembrane space).

band intensity was analyzed per lane and there was no significant difference between cAMP or db-cAMP with respect to their controls (Fig. 3D and F right panels). The effect of 8Br-cAMP was also tested, obtaining the same protein phosphorylation pattern as when using cAMP or db-cAMP (Fig. S1).

The dissociation of the PKA C subunits and in consequence its activation, is mediated by cAMP binding to the R subunits. Considering all this, intact HPM were pre-incubated in the presence of 0.5 mM db-cAMP to evaluate if the PKA α subunit could be released from the holoenzyme by the addition of this cAMP permeable analog. After 30 min incubation with db-cAMP followed by centrifugation, PKA α subunit was practically absent in the supernatant (SN) which means that it remained associated to mitochondrial membranes (Fig. 3G, first lane of both panels). The pellet, containing the mitochondria, was sonicated and then, the soluble and membrane fractions were separated. The results showed that the subunit α of PKA had the same distribution among the soluble (Fig. 3G, S-SN) and membrane fractions (Fig. 3G, P-SN) compared to control even after the treatment of HPM with db-cAMP. The band intensity of the PKA α subunit was not significantly different between the control and db-cAMP (Fig. 3H).

3.4. Effect of PKA inhibitors on steroidogenesis and protein phosphorylation of syncytiotrophoblast mitochondria

Since the PKA holoenzyme activators neither affected steroidogenesis nor protein phosphorylation, it was intended to prevent “PKA activation” by using 50 μM RpcAMP, an inhibitor of the PKA regulatory subunit. The results showed that RpcAMP did not have any effect on progesterone synthesis (Fig. 4A). Higher concentrations of RpcAMP (100, 200 and 300 μM) did not show any difference (Fig. S2). However, as previously reported [22], steroidogenesis was inhibited only in the presence of H89 (Fig. 4A). Moreover, in relation to protein phosphorylation, the incubation of intact mitochondria showed that PKA was insensitive to the RpcAMP inhibitor and interestingly, the addition of H89 paradoxically provoked an increase in the labeling of the 36, 42 and 46 kDa proteins (Fig. 4B). The densitometry scan displayed three peaks corresponding to the 36, 42 and 46 kDa proteins (Fig. 4C left panel). The analysis of the band intensity per lane showed a significant difference between H89 and control and between H89 and RpcAMP, but there was no significant difference with RpcAMP compared to control (Fig. 4C right panel).

3.5. Effect of H89 in protein phosphorylation from syncytiotrophoblast mitochondria

The next step was addressed to make an approach to identify the putative target proteins of PKA related to steroidogenesis. Phosphorylated substrates in HPM by PKA activity were identified by Western blot using antibodies recognizing serine and threonine residues located specifically in the motif for PKA activity (RRXT*/RRXS*) [33]. It can be observed (Fig. 5A) that HPM have multiple proteins as substrates for PKA activity. Moreover, protein phosphorylation decreased in a time course fashion.

When HPM were previously incubated in the presence of H89 the immunodetection of the PKA substrates diminished dramatically and at 10 or 20 min the identification of substrates for PKA was not possible (Fig. 5A).

As we have shown (Fig. 3C, E and 4B), ^{32}P was incorporated to 46, 42 and 36 kDa proteins and the labeling increased in the presence of H89. In this sense, we hypothesized that these proteins could be the substrate for other kinases. Therefore, a Western blot was carried out to immunodetect the presence of proteins

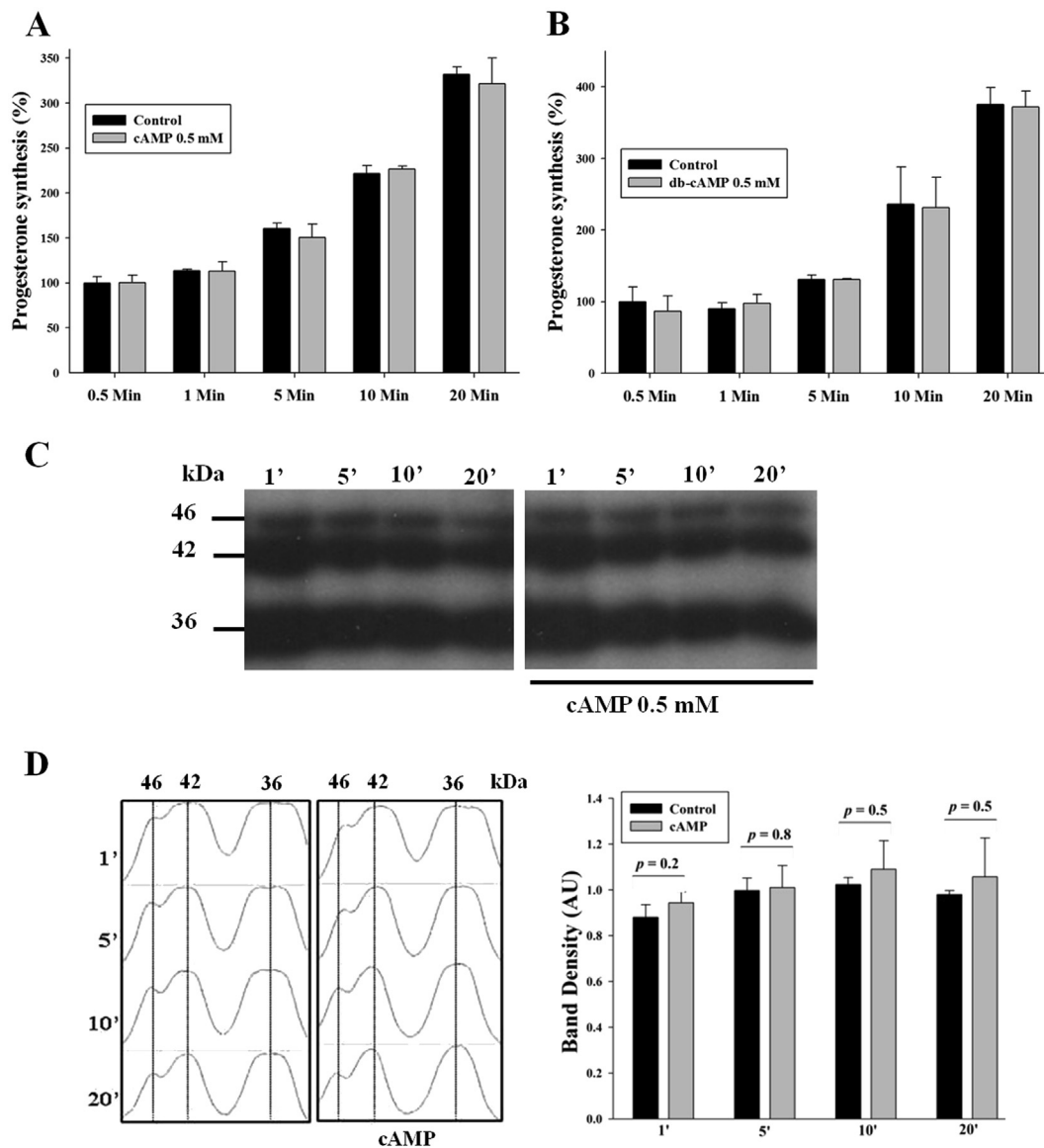


Fig. 3. Effect of PKA activators on progesterone synthesis and protein phosphorylation. (A and B) Where indicated, intact mitochondria were pre-incubated for 30 min in the presence or absence of 0.5 mM cAMP or 0.5 mM db-cAMP. Then, the reaction was started by adding progesterone synthesis medium. The quantification of progesterone at different times was assessed as described in Materials and Methods by using a commercial kit. (C and E) Autoradiography. Intact mitochondria were pre-incubated for 30 min in the presence or absence of 0.5 mM cAMP or 0.5 mM db-cAMP, and then incubated at different times with progesterone synthesis medium complemented with γ - 32 P-ATP. (D and F left panels) Densitometry scans of each lane exhibit three peaks at 46, 42 and 36 kDa indicated with solid lines. (D and F right panels) Band intensities of each lane represent the mean \pm SD performed in triplicate with three different placental tissues. (G) Immunodetection of PKA α subunit in mitochondria pre-incubated with 0.5 mM db-cAMP. SN: supernatant; S-SN: supernatant after sonication; P-SN: pellet after sonication. Protein concentration was 50 μ g per lane. (H) Band intensity of PKA α subunit in SN, S-SN, and P-SN is shown.

phosphorylated at serine (Fig 5B) or threonine residues (Fig. 5C), disregarding the flanking sequence of amino acids. It is shown that in the presence of H89, the detection of phosphothreonines/serines is increased.

3.6. *In vitro* 32 P incorporation to submitochondrial proteins

In order to identify the potential phosphorylation targets in the submitochondrial fractions, an *in vitro* phosphorylation assay adding purified PKA catalytic subunit was carried out. The autoradiography showed (Fig. 6A) that when no catalytic subunit was added to the incubation medium, there was the expected incorporation of 32 P to proteins of the different submitochondrial fractions; this is due to the intrinsic kinase activity. However, when extra catalytic subunit was added, 32 P was incorporated mainly to

proteins located in the matrix and intermembrane space (soluble fraction), and to a lesser extent, to proteins located in the outer and inner membrane membranes. A band of approximately 40 kDa appears when adding the purified PKA, which may correspond to the catalytic subunit that in turn can also be phosphorylated. These results are consistent with the finding that whole HPM have multiple proteins capable of being substrates for PKA (Fig. 5A).

In the context of steroidogenesis, the incorporation of 32 P to the inner and outer membrane proteins without purified PKA catalytic subunit and only in the presence or absence of H89 or RpcAMP was tested. The inner membrane incorporated more 32 P than the outer membrane, but in the presence of H89, an increased labeling of 36, 42 and 46 kDa proteins was observed. RpcAMP did not modify the incorporation of 32 P to the outer or inner membrane proteins (Fig. 6B).

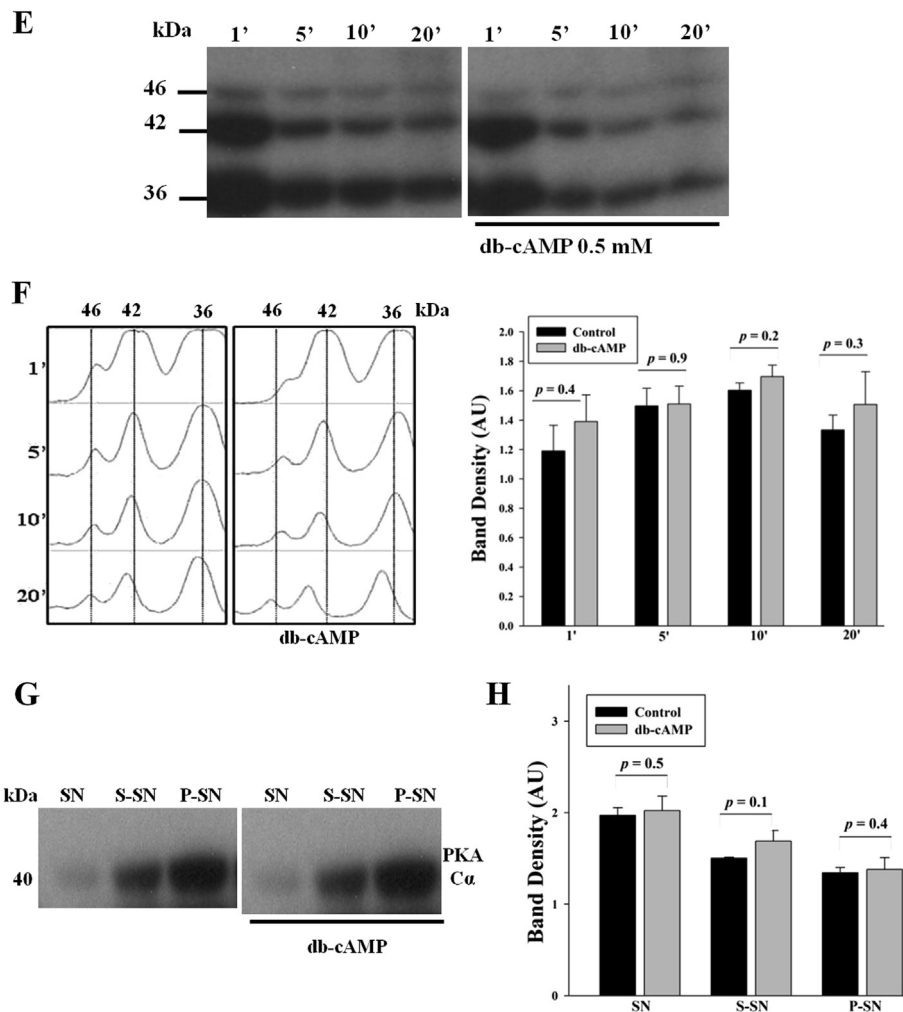


Fig. 3. (continued).

Once it was observed that progesterone synthesis and PKA activity were sensitive to H89, but irresponsive to stimulators such as cAMP or db-cAMP, the possibility of inducing steroidogenesis by activating components that could be located upstream the PKA transduction pathway was assessed. The presence of a soluble adenylate cyclase in the mitochondrial matrix isolated from mouse liver has been previously reported [34]. This enzyme catalyzes the production of cAMP and can be activated by HCO_3^- . Intact HPM were pre-incubated for 30 min in the presence of 30 mM HCO_3^- and steroidogenesis was quantified at different times. The percentage of progesterone synthesis was not modified after incubation with HCO_3^- (Fig. S3).

4. Discussion

Progesterone synthesis by the human placenta is essential for the maintenance of pregnancy, but the control of placental steroidogenesis is not completely understood; nevertheless, the signaling pathway mediated by cAMP/PKA is the most studied not only in placenta but also in other tissues with steroidogenic function [35], where this kinase has been implicated in the phosphorylation of transcription factors related to steroidogenesis [36] and of proteins that are in charge of cholesterol transport to mitochondria [4].

The human chorionic gonadotropin hormone (hCG) binds and activates the G-protein coupled luteinizing hormone/hCG receptor, activating the cAMP/PKA pathway, which results in important events related to progesterone production, decidualization and cytotrophoblast differentiation [37]. However, the role of other key hormones that control cAMP levels still remains uncertain.

PKA has been identified in the inner membrane/matrix of mammalian mitochondria isolated from different tissues [38] including mitochondria obtained from rats [39] and in HeLa cells [34]. As previously reported [22,23], we have confirmed the presence of PKA C α subunit in intact syncytiotrophoblast mitochondria isolated from human placenta and in submitochondrial fractions. This finding suggests that even though the compartmentalization of PKA near the mitochondria through anchoring proteins like AKAP could be important in the transduction pathway that allows communication between cytoplasm and mitochondria, the presence of this kinase inside mitochondria could make more efficient the transduction cascade related to the modulation of steroidogenesis. Two bands of approximately 90 and 70 kDa were also immunodetected when assessing PKA C α and RII β subunits, respectively (Fig. 1C). This suggests the presence of higher weight precursors, as also reported before for the C α subunit [23].

It must be pointed out that in a previous report by our work group [22], the C α subunit was not identified in the soluble fraction.

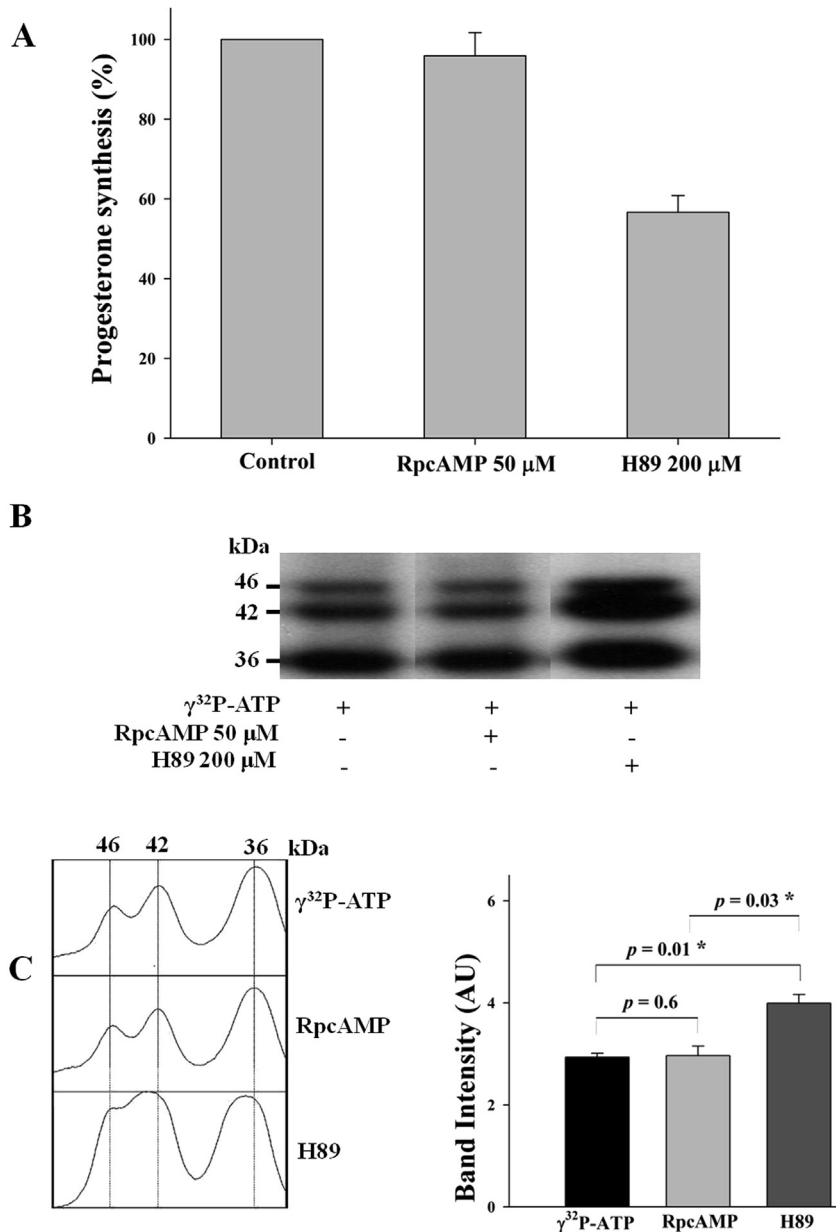


Fig. 4. Effect of PKA inhibitors on progesterone synthesis and protein phosphorylation. (A) Where indicated, intact mitochondria were pre-incubated for 30 min in the presence or absence of 200 μM H89 or 50 μM RpcAMP. Then, the reaction was started by adding progesterone synthesis medium. The reaction was stopped after 20 min incubation and the quantification of progesterone was assessed using a commercial kit. (B) Autoradiography. Intact mitochondria were pre-incubated for 30 min in the presence or absence of 200 μM H89 or 50 μM RpcAMP and then incubated for 20 min with progesterone synthesis medium complemented with $\gamma^{32}\text{-ATP}$. (C left panel) Densitometry scans of intact mitochondria pre-incubated in the presence or absence of 200 μM H89 or 50 μM RpcAMP. (C right panel) Band intensities are plotted and they represent the mean \pm SD performed in triplicate with three different placental tissues. A p value <0.05 was considered to be statistically significant, indicated with an asterisk.

In this work, the soluble fraction was concentrated as much as possible in a minimum volume, which allowed visualizing the α subunit in the matrix. The densitometry analysis allows us to suggest that the percentage of the α subunit located in the matrix or in the intermembrane space is about 5%, whereas the inner and outer membranes contain 49.6% and 45%, respectively. On the other hand, the fact that the α subunit was found in the membrane as well as in the soluble fraction unlike the β regulatory subunits, suggests that there may be two populations of PKA, one more abundant that could still be associated to the mitochondrial membranes and the other in a lower amount, represented by the dissociated catalytic subunit, which is known to be able to diffuse through membranes [40]. Moreover, it has been reported that in

bovine heart mitochondria, under Ca^{2+} physiological concentrations, the R subunit can be selectively digested, thereby releasing free active C subunits, which appear to be more resistant to proteolysis [41]. The densitometry analysis of the distribution of PKA βII and α subunits let us to suggest that in the inner membrane, the ratio of regulatory βII subunits with respect to the catalytic ones is 2:1, meanwhile in the outer membrane is 1:1. This unequal distribution could explain the 5% of the free catalytic subunit found in the soluble fraction.

In this work, PKA βI and βII subunits were identified. The knowledge of the precise PKA isoform expressed in syncytiotrophoblast mitochondria is biologically relevant, since it is known that the specificity in PKA signaling is ensured by the differential

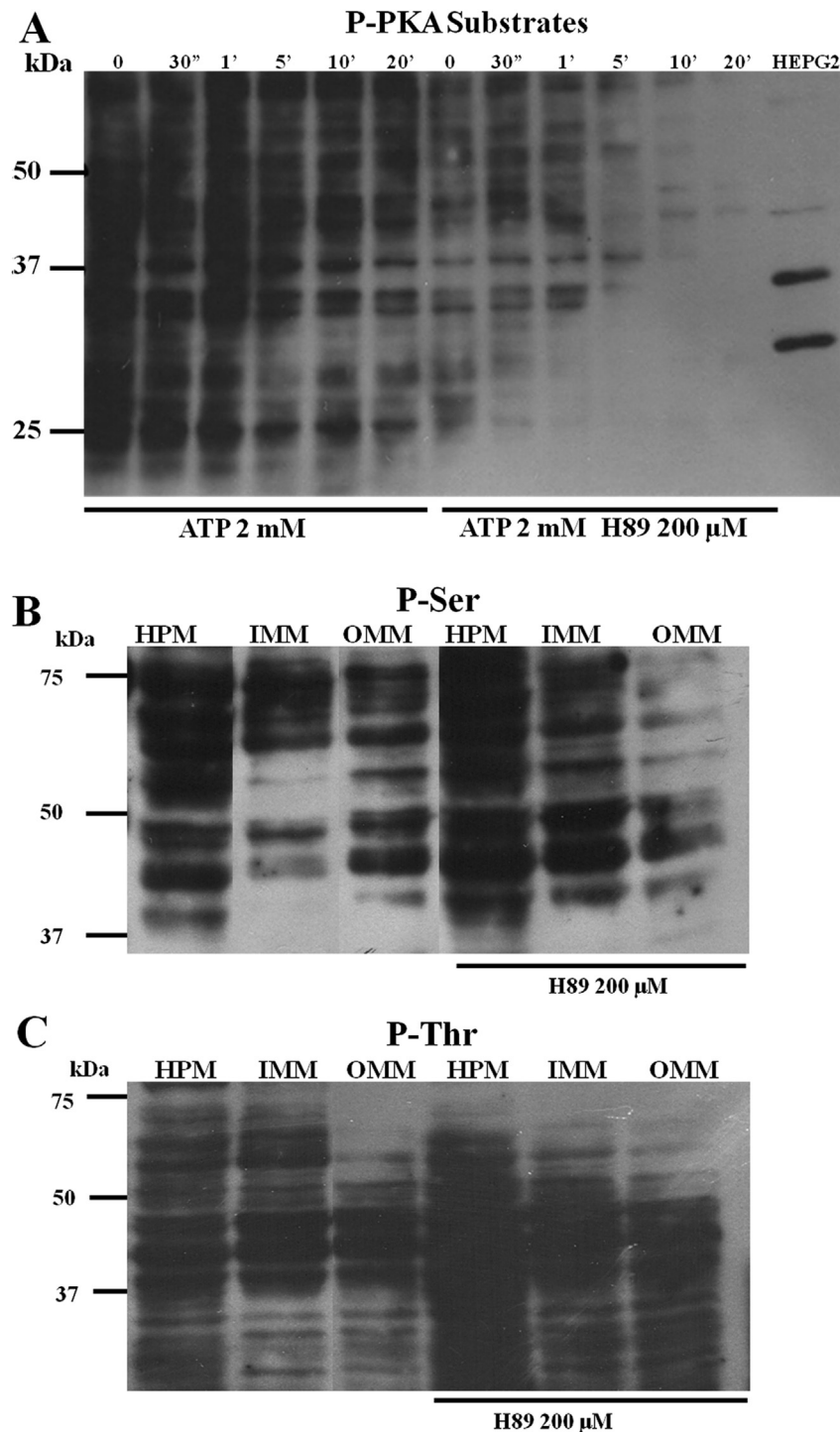


Fig. 5. Identification of substrates phosphorylated by PKA and the effect of H89 on mitochondrial protein phosphorylation. (A) Immunodetection of substrates phosphorylated by PKA by Western blot. Intact HPM were pre-incubated for 30 min with 200 μM H89 where indicated. The reaction was initiated by the addition of progesterone synthesis medium complemented with ATP 2 mM. HEPG2 corresponds to a cell line derived from liver hepatocellular carcinoma. (B) Immunodetection of phosphoserines and (C) phosphothreonines. Where indicated, HPM, outer (OMM) and inner membrane (IMM) were pre-incubated for 30 min with 200 μM H89 and then with progesterone synthesis medium for 20 min. These are representative experiments performed in triplicate with at least three placental tissues.

expression of the R subunit, which has different roles in cell homeostasis explained by major differences in tissue distribution and biochemical and physical properties (i.e cAMP affinity) [37,42].

Taskén et al. reported that a human neoplastic B cell line (Reh) contained a PKA consisting of a R1 α -R1 β heterodimer [43]. In this sense, future work would reveal if syncytiotrophoblast

mitochondrial PKA is composed by C subunits bound to R homodimers, or if it is possible that the holoenzyme contains R β I- β II heterodimers.

PKA can be associated through A-kinase anchoring proteins (AKAPs) to mitochondria [12,13,22,23,44] ensuring spatial and temporal regulation of the PKA-signaling events; however the

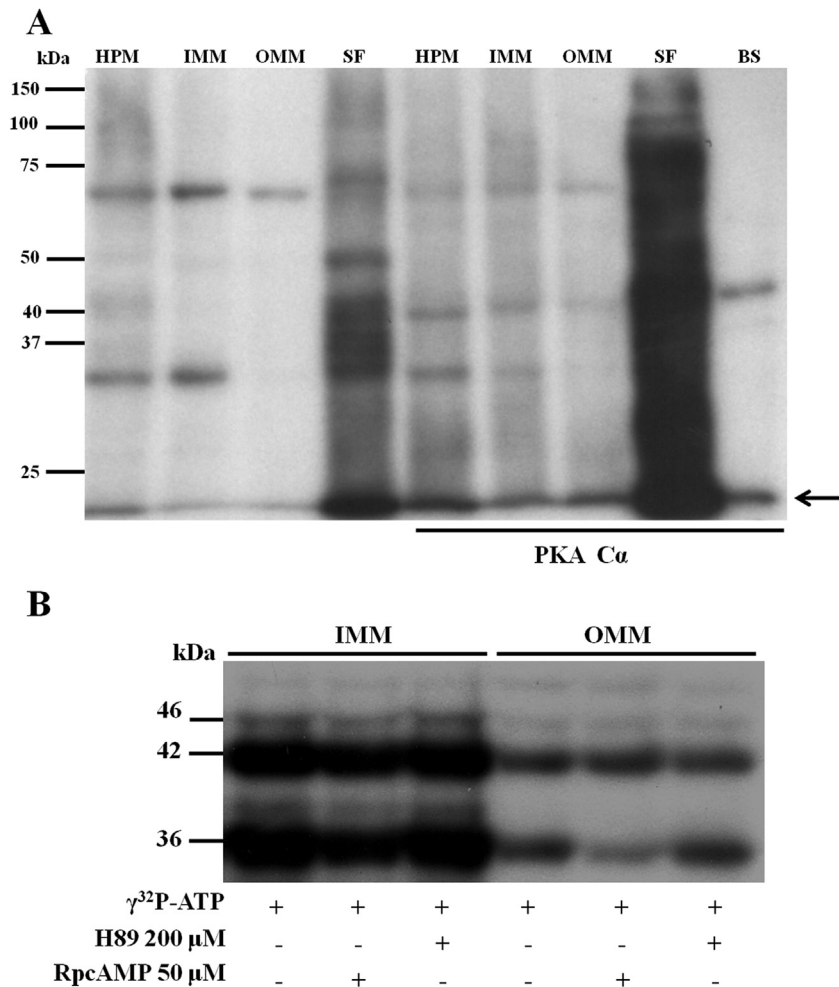


Fig. 6. *In vitro* phosphorylation by PKA. (A) Autoradiography. Intact mitochondria and submitochondrial fractions were incubated for 20 min in a kinase buffer complemented with $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ and in the presence or absence of purified 40 kDa cAMP-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit. A band of approximately 40 kDa identified when adding purified PKA, may correspond to the catalytic subunit, which can also be phosphorylated. A biotinylated PKA substrate (BS) (Molecular Weight: 998.2 Da) was used as a positive control (solid arrow). (B) Autoradiography. Outer and inner mitochondrial membranes were pre-incubated in the presence or absence of 200 μM H89 or 50 μM RpcAMP and then with progesterone synthesis medium for 20 min. Protein concentration was 50 μg per lane. HPM: human placental mitochondria from syncytiotrophoblast; OMM: outer mitochondrial membrane; IMM: inner mitochondrial membrane; SF: soluble fraction (matrix and intermembrane space). These are representative experiments performed in triplicate with at least three different placental tissues.

exact mechanism by which PKA is anchored inside HPM remains to be elucidated. In this context, future approaches could be focused on assessing the presence of an anchoring protein termed sphingosine kinase interacting protein (SKIP), which tethers type I PKA holoenzymes to the inner mitochondrial membranes [45].

Our results show that PKA is tightly associated to the mitochondrial membrane fraction, but most important, that its dissociation cannot be favored by the known holoenzyme activators (Fig. 3G) as it occurs in the classical model of PKA activation. In this sense, it has been widely accepted that cAMP activates PKA by causing C subunits to physically dissociate from R subunits; however it has been reported that cAMP-saturated PKA may exist within the cell without the dissociation of its subunits [46]. Moreover, Vigil et al. have reported that the addition of cAMP to the type βII holoenzyme causes only partial dissociation, while the addition of peptide substrate as well as cAMP, causes somewhat more dissociation, but a significant percentage of intact βII holoenzyme remains [47].

During the course of our study, we found that the PKA distributed in all the submitochondrial fractions had activity liable to be inhibited by H89 and PKI. The slight differences observed in the

decrease of PKA activity depending on the inhibitor used, could be due to their action mechanism. H89 acts as a competitive antagonist of ATP and it has been largely used as a PKA inhibitor; however, it is known that it can inhibit other kinases besides PKA. In such type of inhibitors, the IC_{50} values vary according to the prevailing ATP concentration; thus, the amount of inhibitor needed for the kinase blockade could be variable [48]. In regard to PKI, which is considered as a more specific PKA inhibitor, it binds to the free catalytic subunit of PKA, in a way similar to how regulatory subunits are attached to the catalytic ones in the absence of cAMP [48,49]. The inhibition constant (K_i) of PKI is about 2 nM [50]; nevertheless, 50 μM is the most used concentration of PKI [51]. Considering the recommendation that H89 should not be used alone to study PKA activity [48], we tested two PKI concentrations in this work. The inhibition was dose-dependent, obtaining the major inhibition at 200 μM . This high concentration required could be due to an ineffective access of the inhibitor to the site where it exerts its action. However, when using the same concentrations of both inhibitors (H89 and PKI at 200 μM), the difference in the percentage of ^{32}P incorporation was not statistically significant, even though each one of the inhibitors has a different action mechanism upon PKA.

The important activity of PKA associated to the inner membrane could be related to the steroidogenic contact sites, but further work should be done to determine if in fact PKA is associated to the contact sites.

In relation to the activity of PKA, we identified phosphorylated substrates of PKA present in intact mitochondria (serine and threonine residues that belong to specific motifs RRXT*/RRXS*) [33]. And as expected, the recognition of these phosphorylated substrates diminishes in the presence of H89 (Fig. 5A). The identification of the PKA phosphorylated substrates confirmed that HPM have several phosphoproteins that are suitable substrates for PKA, but also suggests that mitochondria have a basal pool of active phosphatases that perhaps are modulated by the phosphorylating activity of PKA. In this regard, studies performed in different models have revealed that PKA can stimulate dephosphorylation of proteins in addition to its best known role as an activator of protein phosphorylation [52,53].

The addition of H89 blocked the activity of PKA which resulted in the inhibition of protein phosphorylation directly catalyzed by PKA, but at the same time, left active a greater number of phosphatases that dephosphorylate specific motifs (RRXT*/RRXS*) previously phosphorylated by PKA. The possible mechanism is depicted in Scheme 1.

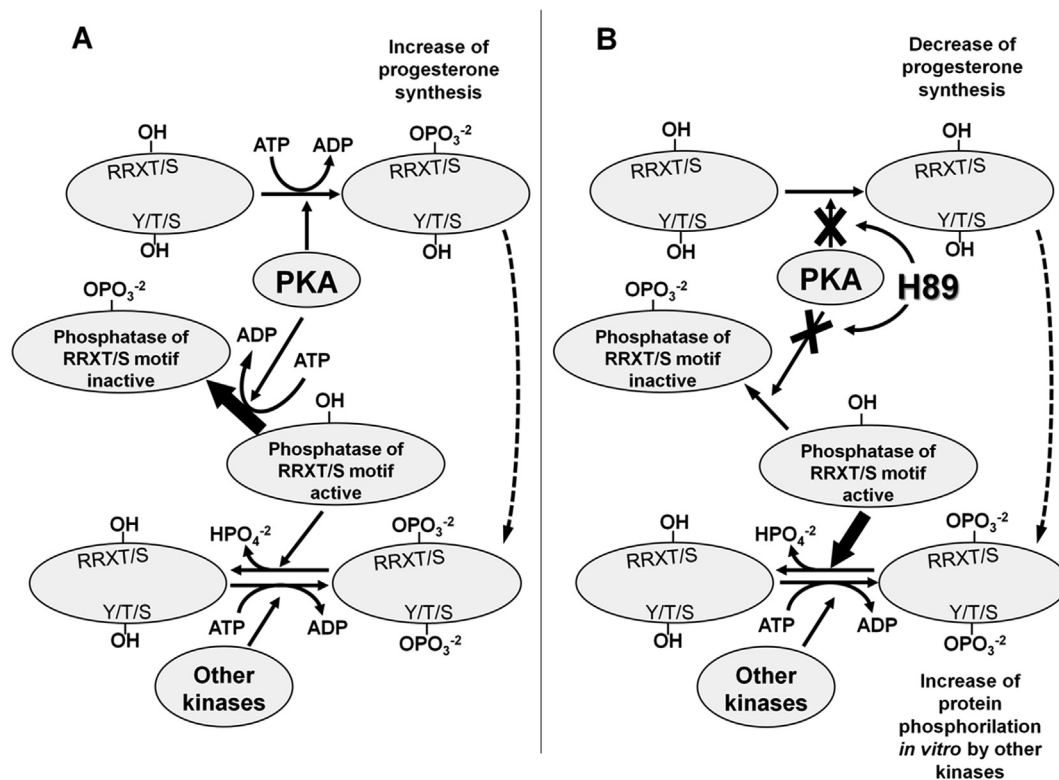
On the other hand, when using ^{32}P , the labeling of 46, 42 and 36 kDa proteins increases when H89 is added [22]. This data in turn suggested that the inhibition of PKA by H89 may also result in the inactivation of another pool of phosphatases. In this sense, in cardiac tissue, it has been reported that the activity of the serine-threonine-specific protein phosphatase 1 (PP1) is regulated by a

19 kDa protein phosphatase-inhibitor 1 (I-1). The phosphorylation of I-1 at Thr-35 by PKA induces the selective inhibition of PP1 [54,55].

We propose the putative participation of phosphatases since it has been tested the effect of two phosphatase inhibitors, okadaic acid (50 μM) and sodium orthovanadate (100 μM) on protein phosphorylation in intact HPM. In the presence of okadaic acid, it was observed a mild increase in the labeling of the proteins of approximately 36 and 46 kDa. On the other hand, when incubating with orthovanadate, there was a decrease in the labeling of the same two proteins. Both experiments suggested the presence and participation of serine, threonine and tyrosine phosphatases in the dephosphorylation mechanism located in HPM (Fig. S4).

Our work group has performed several attempts to elucidate the identity of the 46, 42 and 36 kDa proteins. One of the approaches has consisted in using 2D-SDS PAGE to identify the spots that correspond to the proteins that incorporate ^{32}P . Autoradiography clearly shows the proteins that incorporate ^{32}P but unfortunately, the quantity of protein in the SDS-PAGE is not sufficient to be detected by silver or Coomassie staining. Nevertheless, further work should be performed to achieve the identification of these proteins and the way in which they participate in steroidogenesis.

The *in vitro* phosphorylation assay with purified PKA catalytic subunit revealed several soluble phosphorylated proteins unlike control. It must be pointed out, that all these proteins are not necessarily *in vivo* PKA substrates. The differences observed in the protein phosphorylation pattern could suggest that the purified $C\alpha$ subunit is able to reach proteins that contain the motifs (RRXT*/S*) susceptible of being phosphorylated by PKA, but it does not mean



Scheme 1. Proposed model for the role of PKA in protein phosphorylation and progesterone synthesis. (A) Several syncytiotrophoblast mitochondrial proteins are suitable substrates for PKA and perhaps for other kinases (dotted line). (RRXT/S-specific motifs recognized by PKA; Y/T/S-tyrosine, threonine and serine residues). At the same time, the equilibrium between phosphorylation/dephosphorylation could probably be reached by PKA, which maintains a major pool of inactive phosphatases when phosphorylated (thick arrow), thus letting only few active phosphatases that remove the phosphate from the amino acids that belong to RRXT/S motifs. (B) In the presence of H89, the protein phosphorylation directly catalyzed by PKA is inhibited. Simultaneously, the inhibition with H89 provokes the blockage of PKA and in consequence, the activation of more phosphatases (thick arrow). The same proteins that are substrate for PKA could also be the substrate for other kinases. The changes in protein phosphorylation could be related to the decrease in progesterone synthesis when H89 is added.

that these proteins are always suitable substrates of PKA in the course of steroidogenesis. As it has been previously mentioned, it has been reported that a cAMP-bound holoenzyme (without dissociation) may retain some of the kinase activity of the free C subunits but with different substrate specificity [46,56]. Until now, we do not know exactly if the *in vivo* activation of the holoenzyme by cAMP in the syncytiotrophoblast mitochondria necessarily means dissociation and in consequence different phosphorylation events.

Collectively, the experiments carried out to assess the incorporation of ^{32}P to mitochondrial proteins in the presence or absence of H89, suggest that whole HPM have several proteins susceptible of being PKA substrates but they could also be putative targets of any other kinase. In relation to this matter, there is still little information on the signaling cascades independent of cAMP involved in the regulation of progesterone synthesis. However, it has been reported that estrogens, insulin, insulin-like growth factor I, epidermal growth factor, calcitriol, phorbol esters and cytokines such as IL-1 and TNF- α can stimulate placental progesterone synthesis, and some of them independently of PKA [20,57–60].

With this background, in this work, we confirmed the existence of several phosphoproteins that may be substrates for some type of Ser/Thr kinase besides PKA. The exact nature of this kinase and its identification inside HPM remains to be elucidated; however, a possible candidate could be the serine/threonine kinase Akt, which has been identified in neuroblastoma cells and is known to be able to translocate into different subcellular compartments including mitochondria and has been found to reside in the matrix and the inner and outer membranes [61], where it can phosphorylate specific substrates.

Collectively, these results suggest that progesterone synthesis in syncytiotrophoblast mitochondria implies the crosstalk between more than one signaling cascade with the participation of several kinases, which are able to exert their effects by phosphorylating distinct amino acids present in the same protein. Thus, one or several proteins can be the substrate for several kinases, and the specific phosphorylated residues of amino acids lead to the activation or inhibition of a metabolic event, as it occurs in the case of the insulin receptor substrate protein [62].

The treatment of HPM with cAMP or db-cAMP neither modified progesterone production, nor the incorporation of ^{32}P to mitochondrial proteins. The fact that only H89 induces changes in steroidogenesis and protein phosphorylation, suggests the involvement of a PKA that could be already active and, as a consequence, is only sensitive to an inhibitor of the C α subunit. The lack of response to classical holoenzyme activators indicates that the PKA found in isolated mitochondria and in the different submitochondrial fractions could already be active and it is only liable to be inhibited but probably not to be further activated. On the other hand, the unresponsiveness to cAMP or db-cAMP leads us to consider two possibilities: 1) both activators might not be able to reach the binding sites of cAMP at the R subunits, or 2) it could be involved the participation of a novel mode of regulation between specific phosphodiesterases (PDEs) and the PKA regulatory subunits. In this context, it has been reported that a specific PDE, RegA, by interacting with RI α subunits, could recognize bound cAMP and hydrolyze it directly, or alternatively, it might induce the active dissociation of cAMP from its binding site with the subsequent hydrolysis of cAMP to 5'AMP with the following signal termination [63]. In the context of this work, both possibilities could result in a lack of change in progesterone synthesis and in the protein phosphorylation pattern.

Considering the canonical mechanism of PKA activation, we used RpcAMP (Fig. S2), which is a diastereomer of cAMP that competitively binds to the regulatory subunit of PKA to prevent cAMP-induced dissociation and activation of the enzyme [64]. The lack of response when using RpcAMP in the context of progesterone

synthesis and protein phosphorylation suggests that the activation of more PKA cannot be prevented and the population of this enzyme could have been previously activated and remains in that state until the isolation of mitochondria from syncytiotrophoblast of full term placentas.

To make sure that PKA could not be further activated, we assessed the possibility of inducing steroidogenesis by addressing to activate components of the signaling pathway located upstream to PKA, like a soluble adenylate cyclase identified inside mouse liver mitochondria that is sensitive to HCO_3^- , ATP and Ca^{2+} [34]. Interestingly, the stimulation with HCO_3^- (Fig. S3) did not modify HPM steroidogenesis. Recently, it has been reported in HeLa cells that bicarbonate treatment increased intramitochondrial cAMP, but along with membrane permeant cAMP analogues, it failed to induce measurable matrix PKA activity [65]. Further work should be done to assess the presence of the soluble adenylate cyclase inside HPM and most important, if there are changes in cAMP concentrations during the course of progesterone synthesis. In this sense, an approach to evaluate the involvement of placental intramitochondrial phosphodiesterases (PDEs) in the generation of cAMP microdomains will help to understand the way by which this ubiquitous second messenger can be related to steroidogenesis by the activation of a dependent or independent PKA cascade.

Human placenta is a unique endocrine chronically regulated tissue that exhibits notable differences in steroid synthesis compared to other classical steroid producing tissues such as adrenal cortex and corpus luteum [20]. This study proposes that a syncytiotrophoblast intramitochondrial PKA might participate in the synthesis of progesterone. However, PKA activation and its repercussion on steroidogenesis could be reached by a mechanism different from that observed in the cytosolic PKA or perhaps by the participation of other kinases. Hence, the dynamic phosphorylation and dephosphorylation of mitochondrial proteins could function as a type of switch modulated by PKA or other kinases and phosphatases that ultimately makes possible for the human placenta to produce rising plasmatic levels of progesterone without the occurrence of substantial changes that could represent a risk for abortion or preterm labor.

Conflict of interest

No conflict of interests.

Acknowledgments

This work was partially supported by Grants IN211912 from DGAPA from the Universidad Nacional Autónoma de México and CONACyT 168025. E. Gomez-Chang is a student of the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México and was supported by a Grant from CONACyT (215670). Part of this work was included in her PhD thesis. The authors thank Dra. Ma. Esther Urrutia for the statistical data analysis. Dr. J.L. Pérez-García reviewed and corrected the usage of English in this manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2014.06.005>.

References

- [1] Stocco DM, Wang X, Jo Y, Manna PR. Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol Endocrinol* 2005;19:2647–59.

- [2] Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* 1988;9:295–318.
- [3] Moore CC, Hum DW, Miller WL. Identification of positive and negative placenta-specific basal elements and a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element in the human gene for P450scc. *Mol Endocrinol* 1992;6:2045–58.
- [4] Arakane F, King SR, Du Y, Kallen CB, Walsh LP, Watari H, et al. Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J Biol Chem* 1997;272:32656–62.
- [5] Miller WL. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol* 2013;379:62–73.
- [6] Brown SH, Wu J, Kim C, Alberto K, Taylor SS. Novel isoform-specific interfaces revealed by PKA RII beta holoenzyme structures. *J Mol Biol* 2009;393:1070–82.
- [7] Taylor SS, Kim C, Cheng CY, Brown SH, Wu J, Kannan N. Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. *Biochim Biophys Acta* 2008;1784:16–26.
- [8] Aye TT, Mohammed S, van den Toorn HW, van Veen TA, van der Heyden MA, Scholten A, et al. Selectivity in enrichment of cAMP-dependent protein kinase regulatory subunits type I and type II and their interactors using modified cAMP affinity resins. *Mol Cell Proteomics* 2009;8:1016–28.
- [9] Skälhgg BS, Taskén K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci* 1997;2:d331–42.
- [10] McKnight GS, Cummings DE, Amieux PS, Sikorski MA, Brandon EP, Planas JV, et al. Cyclic AMP, PKA, and the physiological regulation of adiposity. *Recent Prog Horm Res* 1998;53:139–59.
- [11] Manna PR, Dyson MT, Stocco DM. Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. *Mol Hum Reprod* 2009;15:321–33.
- [12] Corso M, Thomson M. Protein phosphorylation in mitochondria from human placenta. *Placenta* 2001;22:432–9.
- [13] Thomson M. Evidence of undiscovered cell regulatory mechanisms: phosphoproteins and protein kinases in mitochondria. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:213–9.
- [14] Gorostizaga A, Cornejo Maciel F, Brion L, Maloberti P, Podestá EJ, Paz C. Tyrosine phosphatases in steroidogenic cells: regulation and function. *Mol Cell Endocrinol* 2007;265–266:131–7.
- [15] Darne FJ, McGarrigle HH, Lachelin GC. Diurnal variation of plasma and saliva oestrogen, progesterone, cortisol and plasma dehydroepiandrosterone sulphate in late pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1989;32:57–66.
- [16] 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 U S A* 1995;92:4778–82.
- [17] Watari H, Arakane F, Moog-Ltz C, Kallen CB, Tomasetto C, Gerton GL, et al. MLN64 contains a domain with homology to the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that stimulates steroidogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:8462–7.
- [18] 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;39:1722–31.
- [19] 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 Fertl Suppl* 2000;55:3–12.
- [20] Tuckey RC. Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta* 2005;26:273–81.
- [21] Maldonado-Mercado MG, Espinosa-García MT, Gómez-Concha C, Monreal-Flores J, Martínez F. Steroidogenesis in BeWo cells: role of protein kinase A and benzodiazepines. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:901–8.
- [22] Gomez-Concha C, Flores-Herrera O, Olvera-Sanchez S, Espinosa-Garcia MT, Martinez F. Progesterone synthesis by human placental mitochondria is sensitive to PKA inhibition by H89. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43:1402–11.
- [23] Ma MP, Thomson M. Protein kinase A subunit α catalytic and A kinase anchoring protein 79 in human placental mitochondria. *Open Biochem J* 2012;6:23–30.
- [24] 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.
- [25] Olvera-Sanchez S, Espinosa-García MT, Monreal J, Flores-Herrera O, Martinez F. Mitochondrial heat shock protein participates in placental steroidogenesis. *Placenta* 2011;32:222–9.
- [26] Martinez F, Moncada R, Barcnas FJ, Espinosa-García T. Subcellular localization and properties of adenosine diphosphatase in human placenta. *Placenta* 1992;13:463–73.
- [27] 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.
- [28] Martínez F, Uribe A, Milán R, Teresa Espinosa-García M, Gracia-Pérez C, Flores Herrera O. Differential effects of magnesium on the hydrolysis of ADP and ATP in human term placenta. Effect of substrates and potassium. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:1004–16.
- [29] Ardail D, Privat JP, Egret-Charlier M, Levrat C, Lerme F, Louisot P. Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J Biol Chem* 1990;265:18797–802.
- [30] Uribe A, Strauss 3rd JF, Martínez F. Contact sites from human placental mitochondria: characterization and role in progesterone synthesis. *Arch Biochem Biophys* 2003;413:172–81.
- [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.
- [32] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- [33] Pearson RB, Kemp BE. Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol* 1991;200:62–81.
- [34] Acin-Perez R, Salazar E, Kamenetsky M, Buck J, Levin LR, Manfredi G. Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 2009;9:265–76.
- [35] Sewer MB, Waterman MR. cAMP-dependent transcription of steroidogenic genes in the human adrenal cortex requires a dual-specificity phosphatase in addition to protein kinase A. *Mol Endocrinol* 2002;29:163–74.
- [36] Sands WA, Palmer TM. Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cell Signal* 2008;20:460–6.
- [37] Weedon-Fekjær MS, Taskén K. Review: Spatiotemporal dynamics of hCG/cAMP signaling and regulation of placental function. *Placenta* 2012;33: S87–91.
- [38] Papa S, Sardanelli AM, Scacco S, Technikova-Dobrova Z. cAMP-dependent protein kinase and phosphoproteins in mammalian mitochondria. An extension of the cAMP-mediated intracellular signal transduction. *FEBS Lett* 1999;444:245–9.
- [39] Schwoch G, Trinczek B, Bode C. Localization of catalytic and regulatory subunits of cyclic AMP-dependent protein kinases in mitochondria from various rat tissues. *Biochem J* 1990;270:181–8.
- [40] Harootunian AT, Adams SR, Wen W, Meinkoth JL, Taylor SS, Tsien RY. Movement of the free catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into and out of the nucleus can be explained by diffusion. *Mol Biol Cell* 1993;4:993–1002.
- [41] Shell JR, Larence DS. Probes of the mitochondrial cAMP-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta* 2013;1834:1359–63.
- [42] Mantovani G, Bondioni S, Alberti L, Gilardini L, Invitti C, Corbetta S, et al. Protein kinase A regulatory subunits in human adipose tissue: decreased R2B expression and activity in adipocytes from obese subjects. *Diabetes* 2009;58: 620–6.
- [43] Taskén K, Skälhgg BS, Solberg R, Andersson KB, Taylor SS, Lea T, et al. Novel isoforms of cAMP-dependent protein kinase exist in human cells due to formation of RI alpha-RI beta heterodimeric complexes. *J Biol Chem* 1993;268: 21276–83.
- [44] Feliciello A, Gottesman ME, Avvedimento EV. cAMP-PKA signaling to the mitochondria: protein scaffolds, mRNA and phosphatases. *Cell Signal* 2005;17:279–87.
- [45] Means CK, Lygren B, Langeberg LK, Jain A, Dixon RE, Vega AL, et al. An entirely specific type I A-kinase anchoring protein that can sequester two molecules of protein kinase A at mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108: E1227–35.
- [46] Døskeland SO, Maronde E, Gjertsen BT. The genetic subtypes of cAMP-dependent protein kinase—functionally different or redundant? *Biochim Biophys Acta* 1993;1178:249–58.
- [47] Vigil D, Blumenthal DK, Brown S, Taylor SS, Trewheella J. Differential effects of substrate on type I and type II PKA holoenzyme dissociation. *Biochemistry* 2004;43:5629–36.
- [48] Murray AJ. Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Sci Signal* 2008;1:re4.
- [49] Dalton GD, Dewey WL. Protein kinase inhibitor peptide (PKI): a family of endogenous neuropeptides that modulate neuronal cAMP-dependent protein kinase function. *Neuropeptides* 2006;40:23–34.
- [50] Bogoyevitch MA, Barr RK, Ketterman AJ. Peptide inhibitors of protein kinases—discovery, characterisation and use. *Biochim Biophys Acta* 2005;1754:79–99.
- [51] Bogan RL, Niswender GD. Constitutive steroidogenesis in ovine large luteal cells may be mediated by tonically active protein kinase A. *Biol Reprod* 2007;77:209–16.
- [52] Christoffersen J, Smeland EB, Stokke T, Taskén K, Andersson KB, Blomhoff HK. Retinoblastoma protein is rapidly dephosphorylated by elevated cyclic adenosine monophosphate levels in human B-lymphoid cells. *Cancer Res* 1994;54:2245–50.
- [53] Ahn JH, McAvoy T, Rakhilin SV, Nishi A, Greengard P, Nairn AC. Protein kinase A activates protein phosphatase 2A by phosphorylation of the B56delta subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:2979–84.
- [54] Nicolaou P, Hajjar RJ, Kranias EG. Role of protein phosphatase-1 inhibitor-1 in cardiac physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol* 2009;47:365–71.
- [55] Singh A, Redden JM, Kapiloff MS, Dodge-Kafka KL. The large isoforms of A-kinase anchoring protein 18 mediate the phosphorylation of inhibitor-1 by protein kinase A and the inhibition of protein phosphatase 1 activity. *Mol Pharmacol* 2011;79:533–40.
- [56] Zaremberg V, Donella-Deana A, Moreno S. Mechanism of activation of cAMP-dependent protein kinase: in *Mucor rouxii* the apparent specific activity of the cAMP-activated holoenzyme is different than that of its free catalytic subunit. *Arch Biochem Biophys* 2000;381:74–82.
- [57] Ritvos O. Modulation of steroidogenesis in choriocarcinoma cells by cholera toxin, phorbol ester, epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Mol Cell Endocrinol* 1988;59:125–33.

- [58] Feinberg BB, Anderson DJ, Steller MA, Fulop V, Berkowitz RS, Hill JA. Cytokine regulation of trophoblast steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:586–91.
- [59] Shanker YG, Rao AJ. Regulation of progesterone biosynthesis in the human placenta by estradiol 17 beta and progesterone. *Biochem Mol Biol Int* 1997;43:591–9.
- [60] Barrera D, Avila E, Hernández G, Halhali A, Biruete B, Larrea F, et al. Estradiol and progesterone synthesis in human placenta is stimulated by calcitriol. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103:529–32.
- [61] Bijur GN, Jope RS. Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurochem* 2003;87:1427–35.
- [62] Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:85–96.
- [63] Moorthy BS, Gao Y, Anand GS. Phosphodiesterases catalyze hydrolysis of cAMP-bound to regulatory subunit of protein kinase A and mediate signal termination. *Mol Cell Proteomics* 2011;10(2). <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M110.002295>. M110.002295.
- [64] Rashid G, Bernheim J, Green J, Benchetrit S. Parathyroid hormone stimulates endothelial expression of atherosclerotic parameters through protein kinase pathways. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:F1215–8.
- [65] Lefkimiatis K, Leronna D, Hofer AM. The inner and outer compartments of mitochondria are sites of distinct cAMP/PKA signaling dynamics. *J Cell Biol* 2013;202:453–62.

Gómez-Chang, Erika; Larrea, Fernando; Martínez-Montes, Federico
VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADAS A LA ESTEROIDOGENESIS

Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, vol. 15, núm. 1, 2012, pp. 24-36

Universidad Nacional Autónoma de México

Mexico, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43228285003>



Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas,

ISSN (Versión impresa): 1405-888X

revistatip@yahoo.com

Universidad Nacional Autónoma de México

México

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADAS A LA ESTEROIDOGÉNESIS

Erika Gómez-Chang¹, Fernando Larrea²
y Federico Martínez-Montes¹

¹Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Ciudad Universitaria, C.P. 04510, Delegación Coyoacán, México, D.F. ²Depto. de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México, D.F. E-mail: fedem@bq.unam.mx

RESUMEN

La biosíntesis de las hormonas esteroides es necesaria para mantener la función reproductiva y la homeostasis en general. Este proceso que se lleva a cabo en tejidos esteroideogénicos regulados en forma aguda o crónica, activa vías de señalización mediadas particularmente por cinasas de proteínas dependientes del adenosín monofosfato cíclico/AMPC (PKA). Datos obtenidos en placenta humana por nuestro grupo de trabajo y en otros tejidos informados en la literatura, muestran que la fosforilación dinámica de proteínas catalizada por PKA, está asociada a la esteroideogénesis, incluyendo su regulación hormonal. Sin embargo, se conoce la participación de otras cascadas de transducción de señales independientes de PKA y que son activadas por hormonas tróficas, citocinas o factores de crecimiento, así como por iones de cloruro y calcio e inclusive por metabolitos del ácido araquidónico. El estudio y comprensión de los factores estimulantes, así como de los mecanismos que regulan la síntesis de las hormonas esteroides, permitirá identificar los sitios potenciales de intervención y de esta manera coadyuvar al mantenimiento de la homeostasis y de las diferentes funciones dependientes de los mismos.

Palabras Clave: *Cinasa de proteínas dependiente de AMPc, esteroideogénesis, fosforilación de proteínas, regulación aguda y crónica, transducción de señales.*

ABSTRACT

The biosynthesis of steroid hormones is necessary to maintain reproductive functions and body homeostasis. This process, which is carried out in acutely and chronically regulated steroidogenic tissues, depends on the activation of signaling pathways particularly mediated by the cyclic adenosine monophosphate dependent protein kinase (PKA). Data obtained by our and other groups in human placenta and other tissues, have clearly showed that dynamic phosphorylation catalyzed by PKA is related to steroidogenesis, including its hormonal regulation. It is known, however, that this process also involves the participation of other PKA independent signaling cascades, which are activated by trophic hormones, cytokines or growth factors and others such as calcium, chloride ions and arachidonic acid metabolites. The understanding of the stimulating factors, as well as the mechanisms that regulate the synthesis of steroid hormones, will allow us the identification of potential intervention sites that may contribute to maintain body homeostasis and different functions depending on them.

Key Words: *Cyclic adenosine monophosphate dependent protein kinase, steroidogenesis, protein phosphorylation, acute and chronic regulation, signal transduction.*

INTRODUCCIÓN

Las hormonas esteroides se clasifican en esteroides sexuales (andrógenos, estrógenos y progesterona), glucocorticoides (cortisol) y mineralocorticoides (aldosterona) y se sintetizan principalmente en las

glándulas suprarrenales, las gónadas, la placenta y el sistema nervioso central. Su principal efecto es sobre la homeostasis corporal al modular diversas funciones como son la reproductiva, incluyendo el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios, entre otros. La esteroideogénesis puede estar sujeta a una regulación a corto o largo plazo dependiendo del tejido. En las gónadas y en las glándulas suprarrenales la

regulación es aguda, en tanto que en el cerebro y en la placenta es crónica. Los dos tipos de regulación pueden estar bajo el control de diversos factores u hormonas, que en el caso de la respuesta aguda inicia en el orden de minutos e implica la movilización del colesterol hacia la mitocondria^[1] y su translocación de la membrana mitocondrial externa hacia la interna, donde ocurre la síntesis de pregnenolona por acción de la enzima citocromo P450scc (CYP11A1; por sus siglas en inglés Cholesterol side cleavage enzyme).

La cascada de señalización más estudiada en la esteroidogénesis es la mediada por la cinasa de proteínas dependiente del adenosín monofosfato cíclico/AMPC (PKA). El efecto agudo de las hormonas tróficas incrementa el contenido intracelular de AMPC activando a la PKA, la cual fosforila proteínas involucradas en el transporte de colesterol hacia la mitocondria, como es el caso de la proteína StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) de 30 kDa, cuya expresión aumenta por el efecto hormonal que promueve la esteroidogénesis en gónadas y corteza suprarrenal^[2]. La respuesta crónica por el estímulo de hormonas tróficas se inicia en el transcurso de horas e involucra también la participación de PKA a través de la fosforilación de factores de transcripción relacionados con la activación de genes que codifican para enzimas esteroidogénicas, además de la proteína StAR^[3]. La vía mediada por PKA/AMPC es la principal cascada estimulada en los diferentes tejidos esteroidogénicos; sin embargo, hay evidencias de la participación de otras vías de señalización activadas tanto por hormonas como por factores derivados de macrófagos y factores de crecimiento que actúan a través de PKA o bien a través de otras vías independientes de AMPC y que pueden estar mediadas por la proteína cinasa dependiente de calmodulina (PKC), iones de cloruro y calcio, metabolitos derivados del ácido araquidónico o proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK). Cabe mencionar que las respuestas generadas independientemente de las concentraciones de AMPC, suelen ser poco potentes comparadas con las que son mediadas por PKA/AMPC, por lo que su efecto se relaciona con la modulación o potenciación de la esteroidogénesis actuando en forma sinérgica con PKA. Cualquiera que sea la cascada de señalización activada, destaca la importancia de los eventos de fosforilación o desfosforilación de sustratos específicos por proteínas cinasas y fosfatasas, respectivamente, con efectos pleiotrópicos sobre diferentes funciones celulares como son el metabolismo, crecimiento, diferenciación y la esteroidogénesis^[4-6].

El objetivo de esta revisión es mostrar un panorama general sobre el proceso esteroidogénico en los tejidos que están sujetos a regulación aguda y crónica, así como las principales vías de señalización que están involucradas.

Con ello se pretende hacer énfasis en las diferencias entre y que caracterizan a ambos tipos de regulación. Esta revisión pretende también ofrecer una descripción del proceso de biosíntesis de

hormonas esteroides en los tejidos que responden de manera aguda y crónica, así como de las vías de señalización que se activan con el objeto de integrar la información existente con hincapié en la comunicación entre las varias vías o cascadas de transducción y su asociación con los eventos de fosforilación y desfosforilación que ocurren a nivel intracelular.

REGULACIÓN DE LA ESTEROIDOGÉNESIS POR RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G

Tanto en forma aguda como crónica, la esteroidogénesis se inicia por el estímulo de mensajeros primarios que pueden ser de naturaleza hormonal. Estos efectos se traducen en eventos de fosforilación o desfosforilación de proteínas e incluso de factores de la transcripción que participan en la regulación diferencial de la esteroidogénesis. Para que ocurra la transducción de la señal, el primer mensajero requiere de su interacción con receptores de siete dominios transmembranales que están acoplados a proteínas Gs. Éstas inducen la activación de la adenilato ciclasa, la cual cataliza la formación de AMPC a partir de ATP. El AMPC, como segundo mensajero, activa a la PKA. Cabe mencionar que también existen otras proteínas como los canales iónicos, fosfodiesterasas, proteínas de intercambio de nucleótidos (EPAC) y proteínas cinasas dependientes de GMPc (PKG), que son activadas por AMPC^[7-9]. La cascada de señalización mediada por PKA es universal pero muestra variaciones en cuanto a los factores que la estimulan y los efectos finales obtenidos. Estructuralmente, la PKA es un tetrámero conformado por dos subunidades catalíticas (C) y dos reguladoras (R)^[10]. Existen 4 tipos de subunidades reguladoras (RI α , RII α , RI β y RII β), todas codificadas por genes separados, así como 3 tipos de subunidades catalíticas (C α , C β y C γ). El tipo de subunidad reguladora define a la isoforma tipo I de PKA (α y β) y la tipo II (α y β). Las subunidades RI α y RII α son ubicuas, en tanto que las subunidades RI β y RII β se expresan predominantemente en cerebro y tejido adiposo entre otros órganos endocrinos. Las isoformas difieren en cuanto a su distribución tisular y celular y en la afinidad por AMPC, sugiriendo que la holoenzima permite decodificar señales dependiendo de la tasa de activación, duración y magnitud del estímulo inicial^[11-12]. La importancia de las 2 isoformas de PKA radica en su expresión y localización diferencial que no sólo es tejido dependiente, sino también específica de algunos organelos celulares. En este sentido, destaca la participación de las proteínas AKAP (por sus siglas en inglés Akinase anchoring proteins), una familia de proteínas funcionalmente relacionadas y conformadas por más de 50 miembros, resultado del procesamiento y empalme alternativo del RNAm. Estas familias de proteínas fijan a las subunidades reguladoras de la PKA anclándola hacia una localización subcelular específica. La afinidad con la que PKA interactúa con las AKAP's depende del tipo de la subunidad reguladora. La asociación específica de ciertas AKAP's con las isoformas de PKA constituye un mecanismo de regulación de esta cinasa, asegurando que ésta se ubique cerca del sitio donde se genera el AMPC que la activa y de los sustratos que serán fosforilados.

En el caso de la mitocondria, la proteína AKAP-121 fija a la isoforma II de PKA a la membrana mitocondrial externa formando complejos, pero se ha visto que las AKAP's también pueden fijar ARNm e incluso a una fosfatasa modulada por PKA denominada PTPD1 (por sus siglas en inglés *protein tyrosine phosphatase*)^[13,14,15]. El anclaje de cinasas y fosfatasas por las AKAP's sugiere que los eventos de fosforilación y desfosforilación asociados a diversos procesos celulares podrían ser más eficientes al compartimentalizar a las vías de transducción de señales (Figura 1)^[13,16].

La principal respuesta de las células esteroidogénicas a los factores hormonales es la activación de receptores acoplados a proteínas G, con la consecuente estimulación de la adenilato ciclasa y el incremento en las concentraciones intracelulares de AMPc. En las gónadas y las glándulas suprarrenales, la respuesta aguda mediada por la vía AMPc-PKA involucra la fosforilación de enzimas como la hidrolasa de ésteres del colesterol o de proteínas que participan en el transporte de colesterol hacia la mitocondria como es el caso de la StAR (Figura 2). Numerosas evidencias han demostrado la importancia de la participación de PKA en el mantenimiento de la tasa de expresión estacionaria de StAR, así como de su actividad a través de la fosforilación de los residuos de Ser194/195 y Ser 56/57 en el humano y el murino, respectivamente^[17].

Los fenómenos acoplados de fosforilación/desfosforilación mediados por PKA se han documentado como punto clave de

la regulación de procesos como el crecimiento, la migración celular e incluso de cambios morfológicos celulares^{18,19}. Por otro lado, en tejidos de regulación crónica, como la placenta y el sistema nervioso central, los procesos de fosforilación/desfosforilación ocurren a nivel de los factores de transcripción como el esteroideogénico 1 (SF-1), GATA-4 y la proteína fijadora de los elementos de respuesta a AMPc (CREB) e incluso en aquellos que codifican para proteínas asociadas al transporte de colesterol y de enzimas esteroidogénicas (Figura 3)^[3].

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INDEPENDIENTES DE AMPc Participación de PKC

La familia de PKC consiste en múltiples isoenzimas con diversos patrones de distribución en diferentes tejidos. La unión de ligandos a receptores acoplados a proteínas G_q o con actividad de cinasas de tirosinas inducen la activación de la fosfolipasa C con la consecuente producción de IP3 (inositol 1,4,5-trifosfato) y DAG (diacilglicerol). El IP3 provoca la apertura de los canales de Ca²⁺ del retículo endoplásmico, con lo que se incrementan las concentraciones citosólicas de este ion. El calcio ejerce su acción como segundo mensajero activando a otras cinasas por lo consiguiente se amplifica la señal iniciando así la cascada de fosforilaciones dependientes de PKC. Las isoenzimas de PKC no sólo difieren en su localización, sino también en su capacidad de respuesta inducida por IP3, DAG o calcio. Por otro lado, la actividad de PKC también es regulada por su asociación a proteínas de anclaje, como es el caso de PRKCA-binding protein, que ancla a PKC α a la mitocondria^[20].

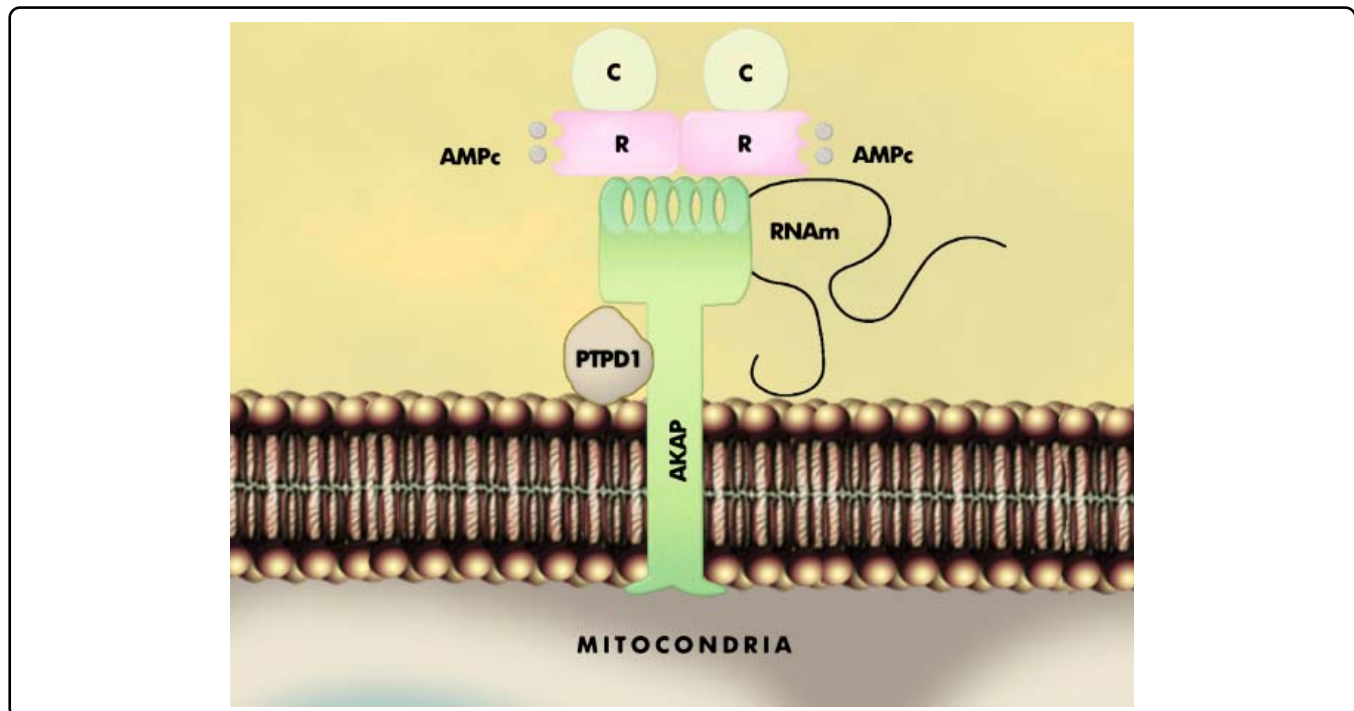


Figura 1. Complejo de transducción asociado a la mitocondria. Anclaje de PKA por la proteína AKAP. Modificado de Feliciello, Gottesman & Avvedimento^[13].

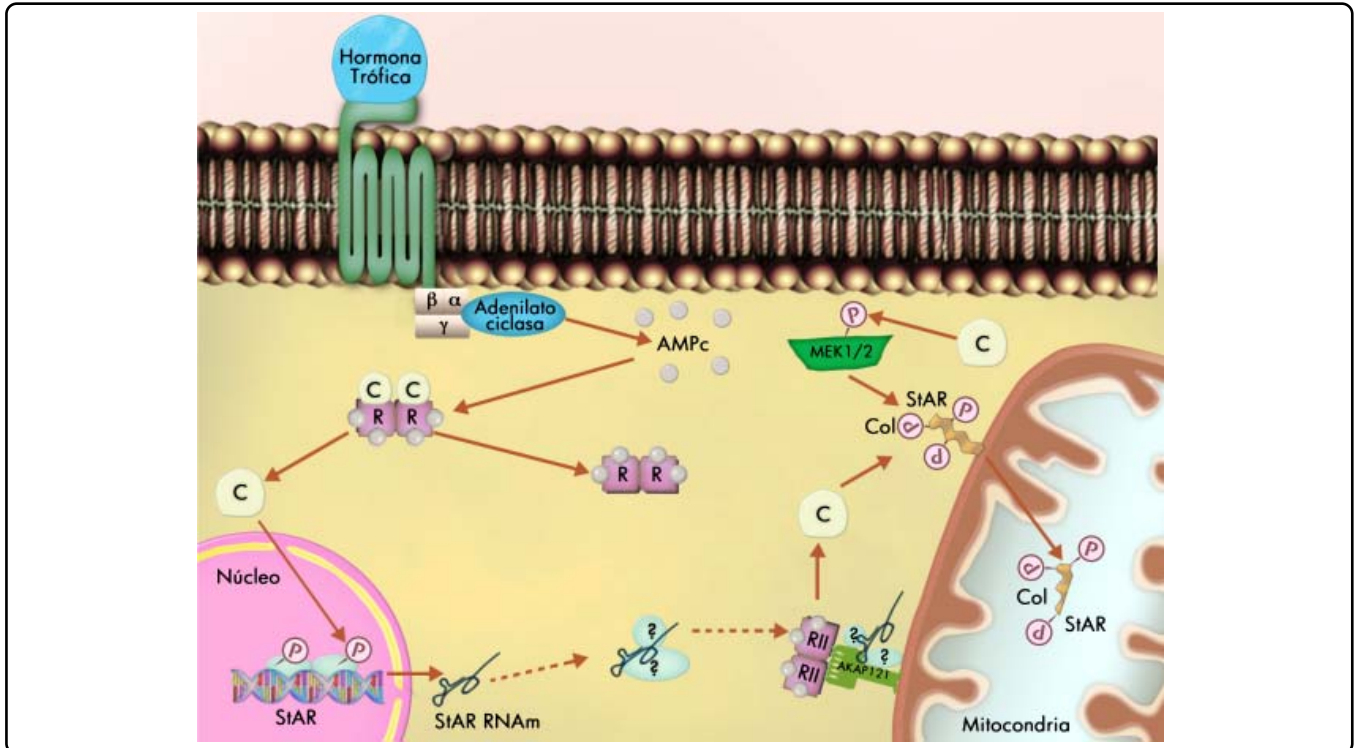


Figura 2. Regulación de la esteroidogénesis. La activación de receptores acoplados a proteínas G y de la vía mediada por AMPc-PKA produce la fosforilación de la proteína StAR o de factores de la transcripción. Modificado de Manna, Dyson & Stocco³.

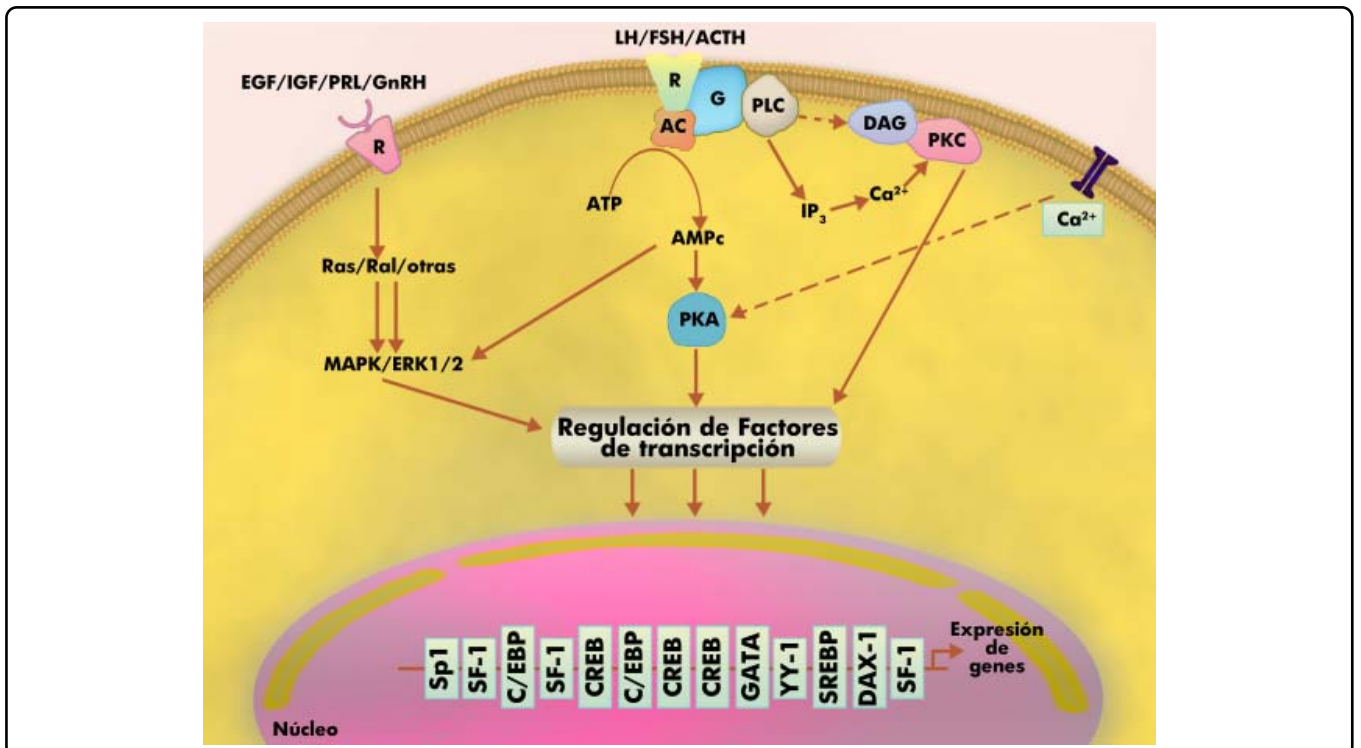


Figura 3. Regulación de la esteroidogénesis a través de eventos de fosforilación mediados por diferentes cinasas. Modificado de Manna, Dyson & Stocco³¹.

Algunos primeros mensajeros hormonales inducen la vía mediada por PKC, pero los resultados con respecto a la participación de esta cinasa en la esteroidogénesis han sido controversiales, ya que en algunos casos, los eventos de fosforilación se asocian al incremento en la síntesis hormonal, en tanto que en otros, se produce inhibición o simplemente no se observan los efectos. La activación de PKC se ha estudiado empleando PMA, un éster de forbol, que funciona como análogo del DAG; sin embargo, su efecto parece ser principalmente a nivel transcripcional sin alterar directamente la tasa de fosforilación. Por otra parte, la activación de PKC con PMA puede activar cinasas efectoras de MAPK, como ERK1/2, que a su vez pueden fosforilar a proteínas como CREB^[21]. Estos datos sugieren que PKC y sus activadores funcionan modulando la esteroidogénesis a través de efectos transcripcionales y postraduccionales de proteínas asociadas a la síntesis de hormonas esteroides (Figura 4)^[21].

Participación de las MAPK

La vía mediada por las MAPK (cinasas de proteínas activadas por mitógeno) participa en la transducción de señales iniciadas

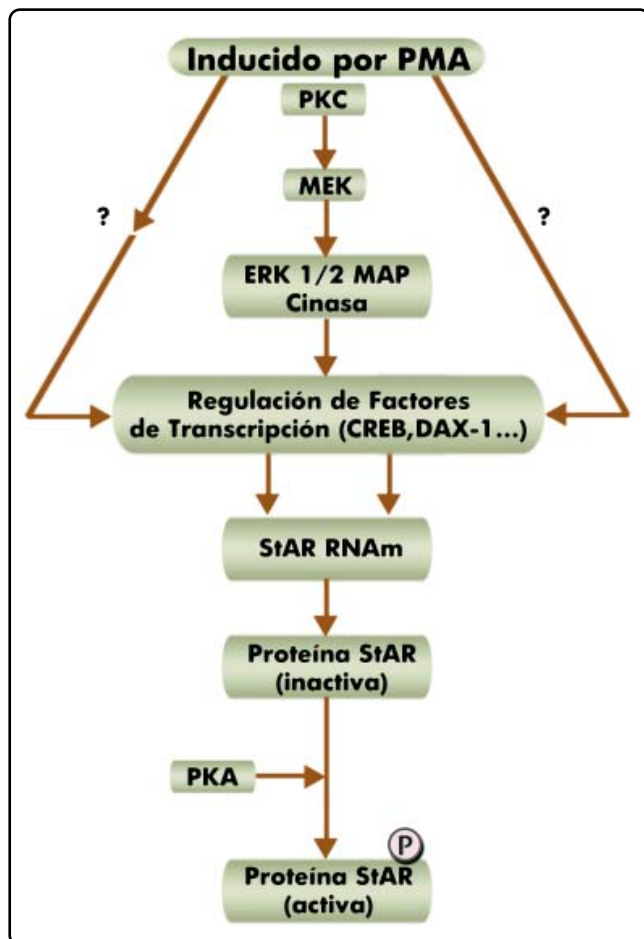


Figura 4. Modulación de la esteroidogénesis a través de la activación de PKC inducida por ésteres de forbol. Modificado de Stocco, Wang, Jo & Manna^[21].

por citocinas como IL-1 (interleucina 1) y de factores como EGF (factor de crecimiento epidérmico) e IGF-1 (factor de crecimiento semejante a insulina), cuyos receptores tienen actividad intrínseca de tirosina cinasa, lo que desencadena la activación secuencial de otras cinasas efectoras como MEK-ERK1/2. La respuesta esteroidogénica mediada por vías como la de MAPK es moderada (menos del 1%) comparada con la que se induce a través de la vía AMPc/PKA. La función de MAPK implica la fosforilación de diversos factores de transcripción asociados a la biosíntesis de esteroides como CREB, ATF-1 (factor activador de la transcripción 1) y cJun/cJunD, lo que incluso puede resultar en la regulación de la expresión de la proteína StAR. En el caso de las células de Leydig del ratón, la respuesta provocada por la unión de IGF-1 a su receptor, activa a factores de la transcripción mediante la participación de varias cinasas como la PKA, PKC y MAPK (Figura 5)^[21].

Participación del Ácido Araquidónico

En las células esteroidogénicas la respuesta aguda inducida por hormonas como la LH (hormona luteinizante) o la hCG (hormona

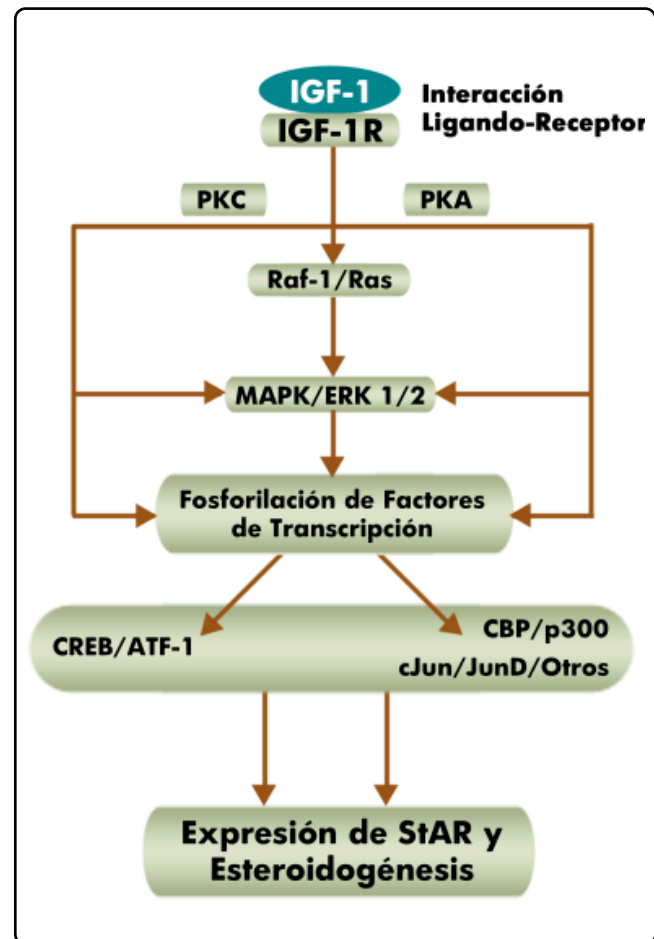


Figura 5. Modulación de la esteroidogénesis a través de diferentes cascadas de señalización iniciadas por factores como IGF-1. Modificado de Stocco, Wang, Jo & Manna^[21].

gonadotropina coriónica humana) provoca el aumento en las concentraciones intracelulares de AMPc, así como la mayor liberación de ácido araquidónico por acción de la fosfolipasa A2. La importancia del ácido araquidónico radica en que sus metabolitos participan en la regulación transcripcional y expresión de la StAR. Además de esta vía, en las células suprarrenales, se han descrito otras alternativas para la liberación intracelular del ácido araquidónico a través de la inducción de la acil-CoA tioesterasa mitocondrial, también denominada ARTIS (de sus siglas en inglés *AA-rthioesterase involved in steroidogenesis*) y la ACS4 (*AA-preferring acyl-CoA synthase*), ambas enzimas importantes para proveer el ácido araquidónico que se requiere para la expresión de StAR^[22,23]. Hasta este momento se ha visto que la principal vía de señalización involucrada en la esteroidogénesis es la que está mediada por PKA/AMPc, aunque dependiendo del tejido, pueden participar otras cascadas de transducción de señales que en general actúan en conjunto con la PKA modulando el proceso biosintético. En la siguiente sección se hará una integración de la forma en la que actúan las vías de señalización mencionadas para inducir la esteroidogénesis en tejidos de regulación aguda y crónica.

BIOSÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES

El proceso de síntesis de mineralocorticoides, glucocorticoides, andrógenos, progestinas y estrógenos a partir del colesterol, se lleva a cabo por diversas enzimas entre las cuales se encuentran diferentes tipos de citocromo P450, deshidrogenasas de esteroides y reductasas. La síntesis de las hormonas esteroides inicia con la conversión del colesterol a pregnenolona por la enzima citocromo P450_{scc}/Cyp11A1 localizada en la membrana interna mitocondrial. La pregnenolona es biotransformada a progesterona por acción del complejo enzimático de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ^{4-5} isomerasa (3 β -HSD). Existen dos isoformas de la 3 β -HSD, una de localización mitocondrial y otra en el retículo endoplásmico^[24].

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE PARTICIPAN EN LOS TEJIDOS ESTEROIDOGÉNICOS

Placenta Humana

Una de las funciones de la placenta humana es la síntesis de progesterona, la cual es indispensable para el mantenimiento del embarazo. A diferencia de otros tejidos como la corteza suprarrenal o las gónadas, la placenta no cuenta con regulación aguda de la esteroidogénesis. Los esteroides sintetizados bajo la forma de regulación aguda muestran cambios sustanciales en sus concentraciones plasmáticas en sólo minutos después de la estimulación hormonal. La placenta humana no expresa la proteína StAR, y es a través de otras como la proteína MLN64 (*Metastatic Lymph Node 64*) que realiza sus funciones biológicas. MLN64, comparte el dominio START (por sus siglas en inglés *StAR-related Transfer domain*) con la StAR y por lo tanto podría estar involucrada en el transporte de colesterol hacia la mitocondria^[25]. En la regulación crónica ocurre el incremento en la transcripción y traducción de genes que codifican para las enzimas

esteroidogénicas e incluso la fosforilación de factores de la transcripción. Este tipo de regulación favorece el incremento en la síntesis de progesterona sin que se presenten variaciones sustanciales en sus concentraciones circulantes a lo largo del embarazo. De manera similar a lo que ocurre en otros tejidos, la biotransformación del colesterol a pregnenolona es catalizada por el complejo enzimático citocromo P450_{scc}. Las células del sinciotrofoblasto, a diferencia de las células suprarrenocorticales y las gónadas, expresan a la enzima 1,3 β -HSD responsable de la síntesis mitocondrial de la progesterona. La placenta humana carece de la 17hidroxilasa y 17,20 desmolasa, por lo que no puede sintetizar derivados del androstano y del estrano a partir de precursores como la progesterona^[26].

Se desconocen todavía los mecanismos que modulan la biosíntesis de hormonas esteroides en la placenta humana; sin embargo, existe suficiente evidencia observada en cultivos primarios de células del trofoblasto del papel del AMPc en la producción crónica de progesterona. A este respecto, los análogos de AMPc estimulan a largo plazo la expresión de genes que codifican para algunos componentes de la maquinaria esteroidogénica^[27] como P450_{scc} y adrenodoxina. Por otra parte, en cultivos de células inmortalizadas de coriocarcinoma (BeWo), la presencia de AMPc induce la acumulación del ARNm de enzimas esteroidogénicas como la P450_{scc}^[28].

Aún cuando no se conocen las principales vías de señalización para la síntesis de progesterona en la placenta, uno de los mecanismos de transducción de señales mejor estudiado es el mediado por PKA. En mitocondrias aisladas de la placenta humana se han identificado proteínas fosforiladas en serina y treonina y en menor grado en tirosina^[15]. Esto sugiere la actividad potencial de cinasas. La importancia de la vía AMPc-PKA ha sido demostrada en células BeWo y en mitocondrias aisladas de la placenta humana, donde la utilización de H89 (inhibidor de la actividad de PKA) produce disminución de la síntesis de progesterona, sugiriendo de manera importante la participación de esta cinasa en la regulación de la esteroidogénesis placentaria^[15,29]. Existe evidencia de que en cultivos primarios de células derivadas del trofoblasto o en células inmortalizadas del coriocarcinoma, la estimulación con hormonas como hCG, eleva el contenido intracelular de AMPc que induce la activación de PKA, lo que a su vez se traduce en el incremento de la síntesis de progesterona.

En estudios realizados por nuestro grupo utilizando mitocondrias aisladas de la placenta humana, se demostró la interacción directa entre PKA, AKAP-121 y PTPD^[13,15]. Por otra parte, también se observó que existe actividad de PKA que no se modifica por AMPc, sin embargo, en presencia de H89 disminuye la síntesis de progesterona pero en forma paradójica incrementa la incorporación de ³²P a 3 proteínas mitocondriales. En conjunto, todos estos hallazgos sugieren la presencia de un proceso de activación constitutiva de PKA^[15] que en el contexto de la

esteroidogénesis placentaria resulta imprescindible para el mantenimiento de las concentraciones plasmáticas de la progesterona necesarias a lo largo de la gestación^[30]. Lo anterior sugiere que la vía mediada por PKA juega un papel importante en la regulación de la esteroidogénesis placentaria, aunque no se descarta la posibilidad de la participación de otras cascadas de transducción de señales ya sea incrementando o modulando la biosíntesis hormonal.

En la placenta humana, resulta de gran relevancia elucidar las vías de señalización asociadas y la posibilidad de que las cinasas participantes formen complejos con proteínas de anclaje cerca de su sitio de acción, lo cual permitiría la integración de señales mediadas por AMPc con efectores de otras cascadas para regular procesos específicos inducidos por hormonas. Así mismo, tampoco se descarta la presencia de un sistema completo de señalización dentro de la mitocondria que module la síntesis de la progesterona mediante la fosforilación reversible de proteínas, mecanismo que ha sido descrito en mitocondrias de mamífero, donde la fosforilación de complejos de la cadena respiratoria permite una regulación a corto plazo de la fosforilación oxidativa^[31].

Células de Leydig^[11]

La testosterona y la 5 α -dihidrotestosterona son dos hormonas importantes para el desarrollo del fenotipo masculino, de los caracteres sexuales secundarios y la espermatogénesis,

incluyendo la conducta sexual. En el testículo, las células de Leydig son las responsables de la síntesis de andrógenos. La síntesis de testosterona ocurre a través de dos vías conocidas como Δ^4 y Δ^5 ^[1,24,32] (Figura 6). En el humano, a diferencia del roedor, la vía predominante para la síntesis de testosterona es la vía de los Δ^5 . La síntesis de testosterona en las células de Leydig está regulada en forma aguda principalmente por el efecto de la LH, la cual, al unirse y activar a receptores acoplados a proteínas G estimula la síntesis de AMPc. La acumulación intracelular de AMPc conduce a la activación de PKA y a la fosforilación de la proteína StAR. Esta cascada de transducción de señal no es la única en activarse, ya que el testículo genera una gran variedad de moléculas reguladoras que inducen vías activadoras independientes de AMPc, como es el caso de los factores de crecimiento como EGF e IGF-I, los que estimulan la expresión de StAR y la síntesis de hormonas esteroides a través de vías que involucran a MAPK y PKC^[21,33,34]. Algunas citocinas, derivadas de los macrófagos y del ácido araquidónico producen la activación de PKC y en ciertos casos éstos funcionan en sinergia con LH para promover la esteroidogénesis testicular^[21,35,36]. Estas observaciones sugieren la presencia en el testículo de tres vías de señalización que al activarse y comunicarse entre ellas, modifican la tasa de síntesis hormonal. La participación de otras vías de señalización en la esteroidogénesis testicular no sólo involucra a las diferentes cinasas, sino también al tipo de segundo mensajero que induce su activación. Se conoce el efecto predominante de AMPc/PKA en la esteroidogénesis; sin

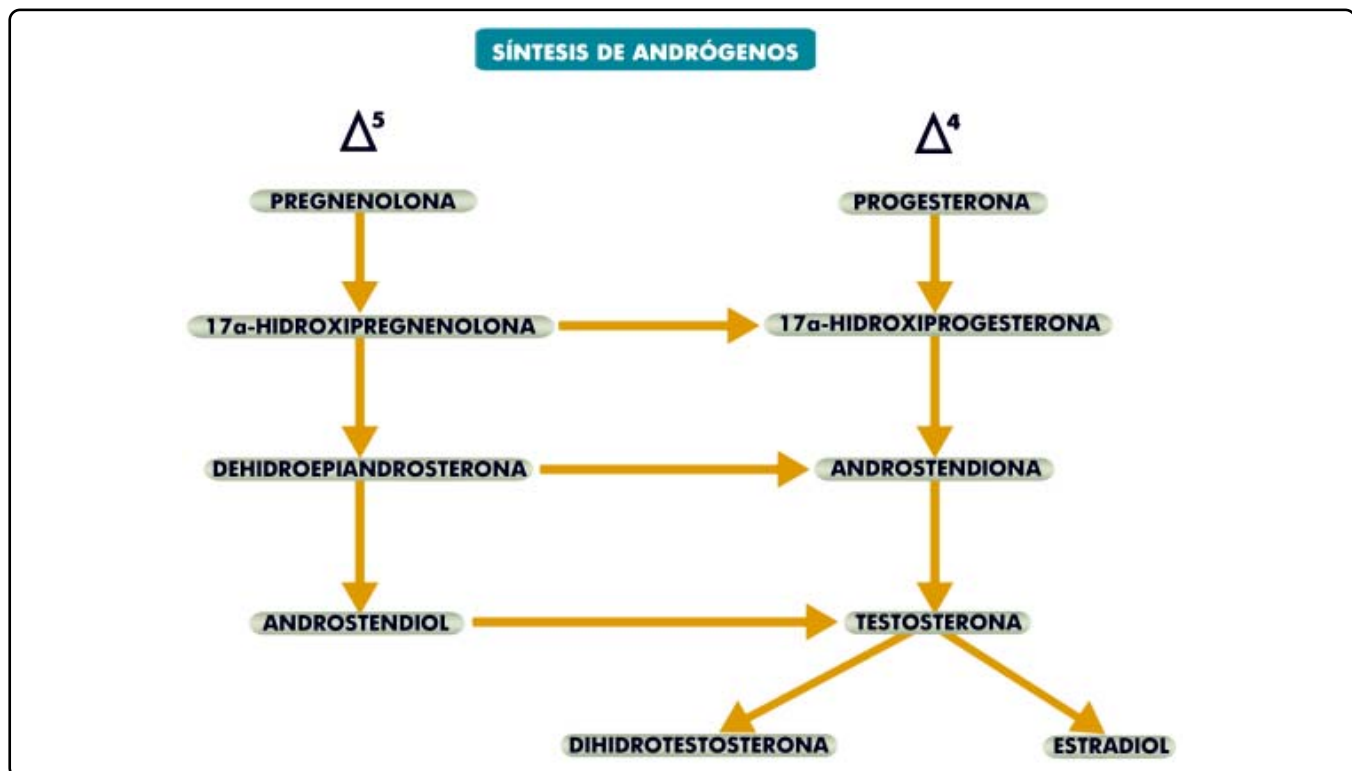


Figura 6. Vía Δ^4 y Δ^5 para la síntesis de andrógenos.

embargo, en células de Leydig obtenidas de ratas adultas, también se han identificado la presencia de transcritos de la guanilato ciclasa (encargada de la producción del segundo mensajero GMPC), de la cinasa PKG I y II y de la fosfodiesterasa 5 (PDE5-específica para la degradación de GMPC). En estos estudios, se observó que la estimulación de la guanilato ciclasa asociada a la inhibición de la PDE5, produjo un incremento de la esteroidogénesis y de la fosforilación de StAR^[37]. Aún no se conoce la modulación precisa de esta vía y la forma en la que podría estar interactuando con las cascadas dependientes de AMPc. Como ocurre con otras células esteroidogénicas, las células de Leydig cuentan con sistemas de fosforilación/desfosforilación dependientes de la acción coordinada de cinasas y fosfatasa. En las células MA-10, la LH activa la cascada de PKA y provoca tanto la fosforilación de proteínas directamente relacionadas con la esteroidogénesis, como la desfosforilación mediada por fosfatasa de tirosinas, siendo ambos procesos necesarios para la biosíntesis hormonal^[5,38,39].

Corteza Suprarrenal

Las hormonas que se sintetizan en la corteza suprarrenal ejercen importantes funciones como la regulación del equilibrio hídrico-electrolítico, la respuesta inmunitaria al estrés, el metabolismo de carbohidratos y el mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios, entre otros. La corteza suprarrenal está dividida estructural y funcionalmente en 3 capas, la glomerular, la fasciculada y la reticular donde se producen los mineralocorticoides, glucocorticoides y los esteroides sexuales, respectivamente. El principal estímulo para la síntesis de glucocorticoides y esteroides sexuales es la hormona adrenocorticotrófica (ACTH), cuyo efecto es a través de la generación de AMPc y activación de la PKA. Por otro lado, la angiotensina II y el potasio constituyen los principales estímulos para la producción de mineralocorticoides a través de la vía IP3/DAG y la activación PKC^[24].

La primera reacción comprometida en la vía biosintética de esteroides es la biotransformación del colesterol a pregnenolona por P450_{scc}^[40]. En el retículo endoplásmico de la corteza suprarrenal, la enzima 3β-HSD transforma la pregnenolona a progesterona. Posteriormente, la enzima P450_{c21} (CYP21A2), la cual se expresa en las 3 capas de la corteza suprarrenal, cataliza la conversión de la progesterona y de la 17α-hidroxi-progesterona en precursores de las hormonas biológicamente activas, aldosterona y cortisol (Figura 7). Los andrógenos se forman por la acción de la CYP17, una enzima única que también se encuentra en los ovarios y testículos y que cuenta con actividades de 17α-hidroxilasa y 17,20 desmolasa. La actividad de este complejo enzimático convierte la 17α-pregnenolona y 17α-progesterona en dehidroepiandrosterona y androstendiona, respectivamente^[19,24] (Figura 7). La producción de mineralocorticoides, glucocorticoides y de esteroides sexuales por la corteza suprarrenal se regula a través de varios estímulos externos que actúan en forma específica mediante la activación

de distintas cascadas de señalización. La ACTH incrementa principalmente la producción de glucocorticoides y esteroides sexuales mediante la vía AMPc-PKA, a través de la fosforilación de StAR y de SF-1. Las hormonas con actividad mineralocorticoide dependen de factores como la angiotensina II y el potasio a través de la vía del IP3/DAG-PKC^[24].

La respuesta aguda a la acción de la ACTH implica la unión al receptor 2 de melanocortina, la activación de proteínas Gs, la generación de AMPc y activación de PKA. Esta vía induce la fosforilación de StAR y el acceso de colesterol a la mitocondria. La respuesta crónica favorece la fosforilación de factores de transcripción de enzimas esteroidogénicas como el CREM (modulador de los elementos de respuesta a AMPc)^[24]. En ambas respuestas, se requieren de eventos de fosforilación y acoplamiento de la desfosforilación catalizados por fosfatasa dependientes de AMPc para la expresión, por ejemplo, de CYP17^[41]. En modelos *in vivo* e *in vitro*, la estimulación con ACTH resultó en la activación de fosfatasa de tirosinas. Estos resultados sugieren la dependencia de AMPc de dichas fosfatasa, cuyo efecto es mediado por PKA. En la esteroidogénesis suprarrenal pueden coexistir varias vías de señalización como se observa en ciertos tipos celulares suprarrenocorticales, en los cuales a pesar de ser deficientes de PKA, la ACTH, estimula la fosforilación de las MAPK, cuya activación temporal parece ser necesaria para la esteroidogénesis; efecto similar al observado en las células MA-10 de Leydig^[42]. Estos datos sugieren que en algunos tejidos con capacidad esteroidogénica, existe comunicación entre efectores de dos cascadas de transducción diferentes^[43].

Existen otros factores que actúan en la corteza suprarrenal regulando la síntesis de hormonas esteroides como son el EGF y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGFb), que modulan la expresión de CYP17 mediante la cascada de MAPK. Los ésteres de forbol también modulan la expresión de CYP17 activando la vía de PKC^[19].

En las células glomerulares la Ang II, a través de las MAPK, aumenta la expresión de StAR y de la 3β-HSD, incrementando así la síntesis de aldosterona^[44]. Aún hace falta establecer tanto las vías de señalización que se inducen en respuesta a los diferentes estímulos que actúan sobre las tres capas suprarrenocorticales, así como la potencial participación de otras moléculas que estarían funcionando como anclaje de los efectores de las cascadas de transducción de señales.

Cuerpo Lúteo

El ovario se divide en tres regiones: la corteza externa conformada por el epitelio germinal y los folículos, la médula de localización central constituida por tejido estromal y la región del hilio^[45]. Las células esteroidogénicas del ovario son las células de la granulosa, las cuales forman parte del compartimento vascular que rodea a los ovocitos y las células de la teca que están ubicadas en el

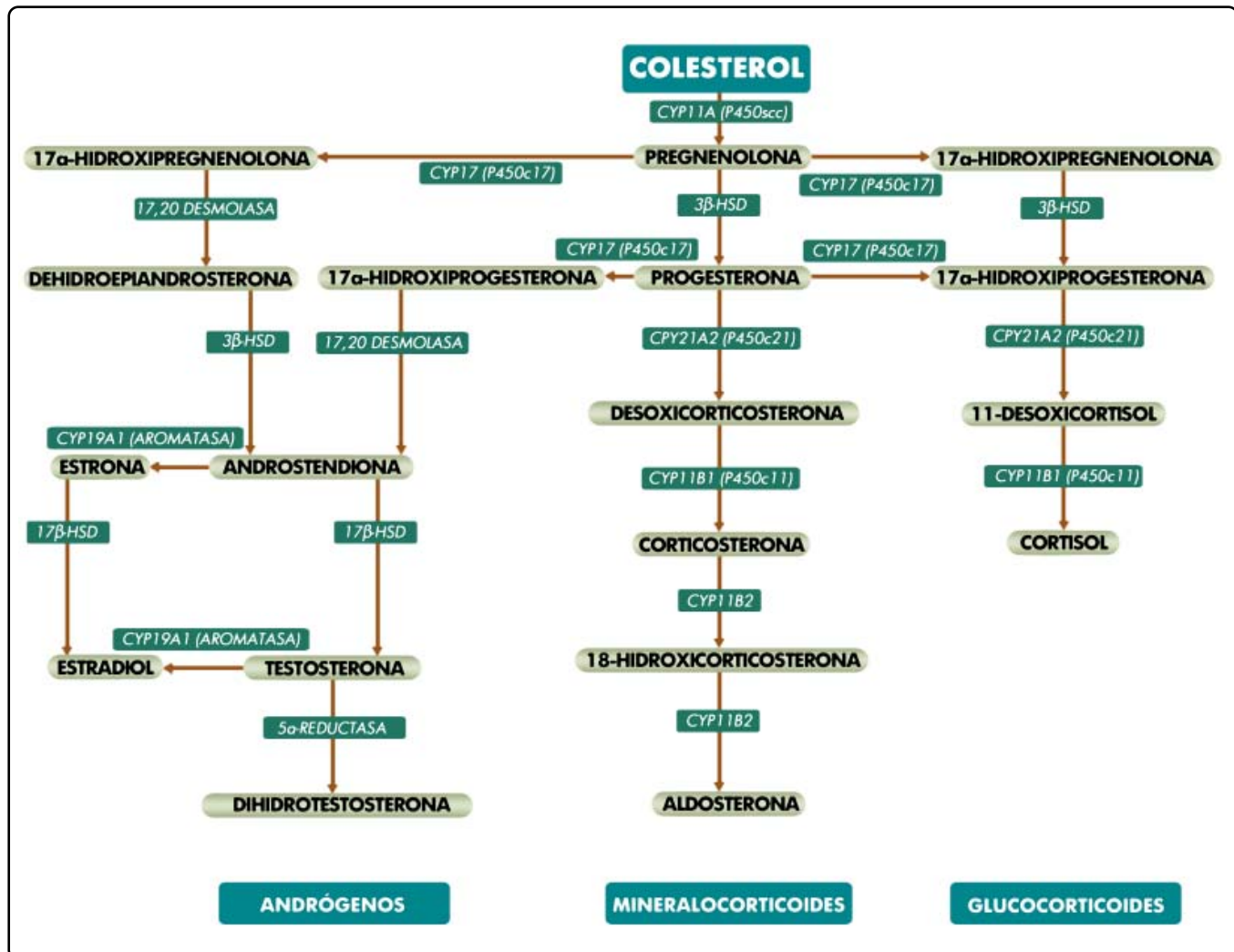


Figura 7. Vía biosintética de las hormonas córtico suprarrenales y las enzimas participantes.

estroma ovárico. Ambos compartimentos están separados por la lámina basal^[46]. Las funciones principales del ovario son la ovogénesis y la síntesis de hormonas esteroides. La unidad funcional del ovario es el folículo, el cual está constituido por células de la granulosa, de la teca e intersticiales que rodean al ovocito en crecimiento, funcionando como soporte nutricional además de llevar a cabo la síntesis de hormonas esteroides^[47]. El ovario secreta esteroides como la pregnenolona, progesterona, 17α-hidroxi progesterona, 17α-hidroxi pregnenolona, dehidroepiandrosterona, androstendiona, testosterona, estrona y 17β-estradiol^[48-49]. Bajo el estímulo de hormonas, factores de crecimiento y citocinas, la biosíntesis de esteroides cambia cualitativa y cuantitativamente a lo largo del ciclo ovárico, presentando una intensa actividad esteroidogénica durante la fase lútea y pasando de ser un órgano principalmente productor de estrógenos a uno predominantemente secretor de progesterona. En el humano, la esteroidogénesis ovárica ocurre de acuerdo con la teoría de dos células/dos gonadotropinas^[50].

La producción de estrógenos por las células de la teca, requiere de la síntesis de precursores androgénicos (androstendiona) a partir del colesterol, bajo la acción de la LH. Los andrógenos difunden hacia el compartimento avascular de las células de la granulosa. A este nivel, y por efecto de la FSH, los andrógenos son biotransformados a estrógenos por acción de la aromatasa (CYP19)^[51]. En la fase lútea, el compartimento ocupado por las células de la granulosa se vasculariza, permitiendo así el aporte de colesterol, aunado a un incremento en la expresión de enzimas esteroidogénicas que resulta en el aumento de la producción de progesterona y estrógenos derivados de los andrógenos de la teca (Figura 8). En el ovario, las células de la granulosa, por acción de la FSH, constituyen la principal fuente de estrógenos requeridos para el crecimiento, la ovulación y el desarrollo de las características sexuales secundarias, entre otras. Durante la fase lútea o pregestacional del ciclo ovárico, las células de la granulosa luteinizadas se encargan de la producción de progesterona, hormona responsable de los cambios durante la fase lútea del

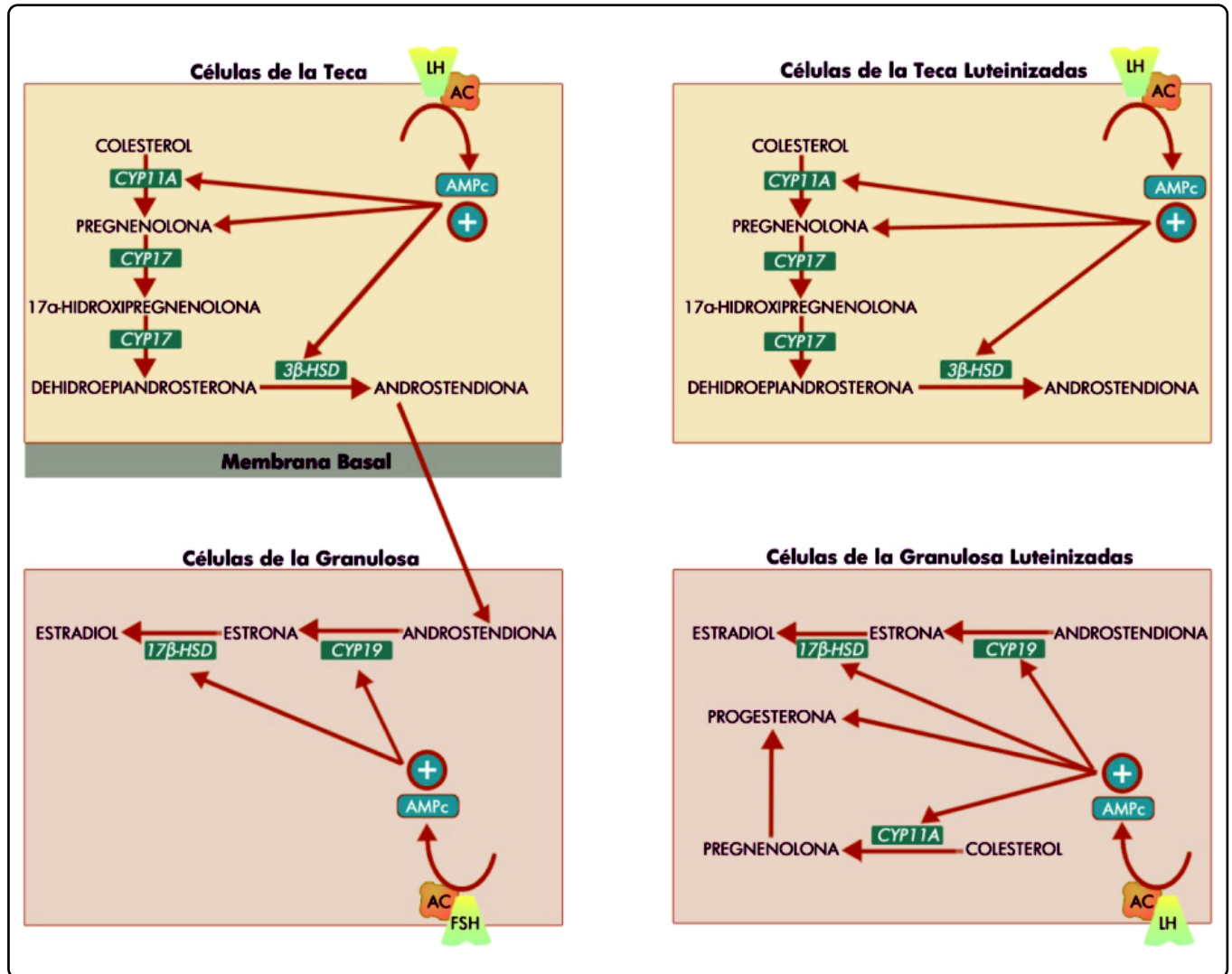


Figura 8. Esteroidogénesis ovárica en las fases folicular y lútea. Modificado de Havelock, Rainey & Carr^[51].

ciclo menstrual y esencial para el mantenimiento del embarazo^[1]. Una vez ocurrida la ovulación, las células del folículo ovárico van a constituir el cuerpo lúteo, el cual sintetiza predominantemente progesterona en respuesta a la LH, a través de la vía AMPc/PKA. Como en otras células esteroidogénicas, existen otras vías de señalización que se activan en forma dependiente de AMPc pero independiente de PKA, como en las células de la granulosa, donde a través de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (dependientes de AMPc) se activan también las vías de MAPK, PI3-K y PKB. La participación MAPK ha sido implicada en la regulación de la esteroidogénesis utilizando LH y hCG, las que además de elevar las concentraciones de AMPc, activan a ERK1/2 (quinasas efectoras de MAPK) en células de la granulosa luteinizadas. También se ha observado que durante la luteinización de las células de la granulosa, la secreción de progesterona inducida por hCG coincide con un descenso en la expresión de la subunidad catalítica de PKA, lo que sugiere que durante la

luteinización de las células de la granulosa la síntesis de progesterona es menos dependiente de PKA^[52].

En el cuerpo lúteo de la oveja se han descrito dos poblaciones celulares, unas de aproximadamente 12-20 μm de diámetro que responden a LH con incrementos de 5 a 15 veces las concentraciones circulantes de progesterona y otras de mayor tamaño que de manera basal secretan suficientes cantidades de progesterona. Este último tipo celular se caracteriza por no responder a la LH a pesar de expresar los receptores para esta hormona^[53].

No se conocen los mecanismos responsables de la modulación en las células lúteas de lo que parece ser un tipo de regulación aguda y otra probablemente constitutiva; la que asegura la adecuada producción de progesterona, durante el primer trimestre de gestación con el objeto de establecer y mantener el embarazo.

CONCLUSIONES

La esteroidogénesis es importante para el mantenimiento de la homeostasis hidroelectrolítica, así como de las funciones reproductivas y metabólicas del cuerpo. De particular importancia es el caso de la placenta, en donde la síntesis de progesterona es indispensable para el mantenimiento del embarazo y la perpetuación de la especie. De ahí surge el interés de conocer los mecanismos que regulan o modulan la biosíntesis hormonal. Se sabe que existen tejidos esteroidogénicos que tienen la capacidad de responder en forma aguda o crónica dependiendo de las necesidades del organismo, las que son modificadas durante las distintas etapas del crecimiento y desarrollo, incluyendo las condiciones de estrés o de inflamación o de un proceso fisiológico como el embarazo; sin embargo, se desconocen los factores endocrinos, paracrinos o incluso autocrinos que dan origen a la secuencia de señales a nivel intracelular y que determinan que un tejido secreta una hormona específica en el orden de minutos o bien en el transcurso de horas a días. Para esto, las células utilizan vías de señalización donde los principales efectores son cinasas que fosforilan proteínas mediadoras que a su vez activan o inhiben la expresión y/o actividad de enzimas, incluyendo factores de transcripción o proteínas que son responsables de la respuesta esteroidogénica a corto o largo plazo. Para realizar estas funciones, las células utilizan mecanismos de transducción de señales que son comunes a varios tipos celulares, la diferencia radica en el estímulo que inicia la cascada de señalización y de comunicación entre los componentes de cada una de las vías que al final se traducen en ciclos de fosforilación y que son claves, en este caso, para la esteroidogénesis, así como para los procesos generales de crecimiento y diferenciación celular. En esta revisión se mencionaron algunas de las principales vías de señalización que utilizan los tejidos esteroidogénicos sujetos a la regulación aguda o crónica. Cabe mencionar que de las vías más estudiadas se encuentra la mediada por PKA; sin embargo, se conocen otras cinasas que actuando de manera independiente también participan en estos procesos. En este sentido, hay evidencia de que las células utilizan proteínas de anclaje que fijan a componentes específicos de las vías en localizaciones subcelulares específicas, formando así complejos de señalización que hacen más eficiente la actividad de las cinasas e incluso de las fosfatasa. La participación de estas proteínas de anclaje sugiere que los eventos de fosforilación y desfosforilación de proteínas están altamente regulados no sólo por las diferentes vías activadas en respuesta a hormonas tróficas o a otros factores, sino por la localización específica dentro de la célula y en la proximidad de un organelo en particular. El conocimiento de la secuencia que ocurre en la activación de los efectores de una cascada, en particular en los tejidos esteroidogénicos de respuesta aguda o crónica, permitirá identificar puntos clave de regulación que podrían ser objetivos terapéuticos a través del diseño de fármacos que modulen positiva o negativamente la producción de algún producto hormonal en los casos donde la deficiencia pudiera manifestarse como un espectro de alteraciones en la reproducción, el metabolismo y el balance hídrico o bien en

casos de neoplasias hormono dependientes o para el tratamiento de mujeres gestantes con riesgo de aborto o de parto pre-término asociado a una disminución en los niveles circulantes de la progesterona.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo parcial de los proyectos DGAPA IN217609 y IN211912, así como del proyecto de CONACyT 168025. Erika Gómez Chang es becaria del CONACyT (215670).

REFERENCIAS

- Hu, J., Zhang, Z., Shen, W.J. & Azhar, S. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr. Metab. (Lond.)* **7**, 47 (2010).
- Granot, Z. *et al.* Proteolysis of normal and mutated steroidogenic acute regulatory proteins in the mitochondria: the fate of unwanted proteins. *Mol. Endocrinol.* **17**, 2461-2476 (2003).
- Manna, P.R., Dyson, M.T. & Stocco, D.M. Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. *Mol. Hum. Reprod.* **15**, 321-333 (2009).
- Corso, M. & Thomson, M. Protein phosphorylation in Mitochondria from human placenta. *Placenta* **22**, 432-439 (2001).
- Thomson, M. Evidence of undiscovered cell regulatory mechanisms: phosphoproteins and protein kinases in mitochondria. *Cell Mol. Life Sci.* **59**, 213-219 (2002).
- Gorostizaga, A. *et al.* Tyrosine phosphatases in steroidogenic cells: Regulation and function. *Mol. Cell Endocrinol.* **265-66**, 131-137 (2007).
- Dremier, S., Kopperud, R., Doskeland, S.O., Dumon, J.E. & Maenhaut, C. Search for new cyclic AMP binding proteins. *FEBS Lett.* **546**, 103-107 (2003).
- Dodge-Kafka, K.L. & Kapiloff, M.S. The mAKAP signaling complex: Integration of AMPc, calcium, and MAP kinase signaling pathways. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 593-602 (2006).
- Aye, T.T. *et al.* Selectivity in enrichment of AMPc-dependent protein kinase regulatory subunits type I and type II and their interactors using modified AMPc affinity resins. *Mol. Cell Proteomics* **8**, 1016-1028 (2009).
- Taylor, S.S., Knighton, D.R., Zheng, J., Ten Eyck, L.F. & Sowadski, J.M. cAMP-dependent protein kinase and the protein kinase family. *Faraday Discuss.* **93**, 143-152 (1992).
- McKnight, G.S. *et al.* Cyclic AMP, PKA, and the physiological regulation of adiposity. *Recent Prog. Horm. Res.* **53**, 139-159 (1998).
- Taylor, S.S. *et al.* Signaling through AMPc and AMPc-dependent protein kinase diverse strategies for drug design. *Biochim. Biophys. Acta* **1748**, 16-26 (2008).
- Feliciello, A., Gottesman, M.E. & Avvedimento, E.V. cAMP-PKA signaling to the mitochondria: protein scaffolds, mRNA and phosphatases. *Cell Signal* **17**, 279-287 (2005).
- Livigni, A. *et al.* Mitochondrial AKAP121 links AMPc and src signaling to oxidative metabolism. *Mol. Biol. Cell.* **17**, 263-271 (2006).
- Gómez-Concha, C., Flores-Herrera, O., Olvera-Sánchez, S., Espinosa-García, M.T. & Martínez, F. Progesterone synthesis by human placental mitochondria is sensitive to PKA inhibition by H89. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 1402-1411 (2011).

16. Pidoux, G. & Taskén, K. Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *J. Mol. Endocrinol.* **44**, 271-284 (2010).
17. Fleury, A., Mathieu, A.P., Ducharme, L., Hales, D.B. & LeHoux, J.G. Phosphorylation and function of the hamster adrenal steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **91**, 259-271 (2004).
18. Pollheimer, J. & Knöfler, M. Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review. *Placenta* **26**, S21-30 (2005).
19. Sewer, M.B., Li, D., Dammer, E.B., Jagarlapudi, S. & Lucki, N. Multiple Signaling Pathways Coordinate CYP17 Gene Expression in the Human Adrenal Cortex. *Acta Chim. Slov.* **55**, 53-57 (2008).
20. Horbinski, C. & Chu, C.T. Kinase signaling cascades in the mitochondrion: a matter of life or death. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 2-11 (2005).
21. Stocco, D.M., Wang, X., Jo, Y. & Manna, P.R. Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol. Endocrinol.* **19**, 2647-2659 (2005).
22. Maloberti, P. et al. Silencing the expression of mitochondrial acyl-CoA thioesterase I and acyl-CoA synthetase 4 inhibits hormone-induced steroidogenesis. *FEBS J.* **272**, 1804-1814 (2005).
23. Wang, X., Walsh, L.P., Reinhart, A.J. & Stocco, D.M. The role of arachidonic acid in steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory (StAR) gene and protein expression. *J. Biol. Chem.* **275**, 20204-20209 (2000).
24. Sanderson, T. The Steroid Biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicol. Sci.* **94**, 3-21 (2006).
25. Moog-Lutz, C. et al. MLN64 exhibits homology with the steroidogenic acute regulatory protein (STAR) and is over-expressed in human breast carcinomas. *Int. J. Cancer* **71**, 183-191 (1997).
26. Tuckey, R.C. Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta* **26**, 273-281 (2005).
27. Nulsen, J.C. et al. Control of the steroidogenic machinery of the human trophoblast by cyclic AMP. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **37**, 147-153 (1989).
28. Ringler, G.E. & Strauss, J.F. 3rd. *In vitro* systems for the study of human placental endocrine function. *Endocr. Rev.* **11**, 105-123 (1990).
29. Maldonado-Mercado, M.G., Espinosa-García, M.T., Gómez-Concha, C., Monreal-Flores, J. & Martínez, F. Steroidogenesis in BeWo cells: role of protein kinase A and benzodiazepines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 901-908 (2008).
30. Duan, L., Yan, D., Zeng, W., Yang, X. & Wei, Q. Effect of progesterone treatment due to threatened abortion in early pregnancy for obstetric and perinatal outcomes. *Early Hum. Dev.* **86**, 41-43 (2010).
31. Acín-Pérez, R. et al. Modulation of mitochondrial protein phosphorylation by soluble adenylyl cyclase ameliorates cytochrome oxidase defects. *EMBO Mol. Med.* **1**, 392-406 (2009).
32. Wilson, J.D. Dihydrotestosterone formation in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **250**, 3498-3504 (1975).
33. Lin, T., Wang, D., Hu, J. & Stocco, D.M. Upregulation of human chorionic gonadotrophin-induced steroidogenic acute regulatory protein by insulin-like growth factor in rat Leydig cells. *Endocrine* **8**, 73-78 (1998).
34. Manna, P.R., Huhtaniemi, I.T., Wang, X.J., Eubank, D.W. & Stocco, D.M. Mechanisms of epidermal growth factor signaling: regulation of steroid biosynthesis and the steroidogenic acute regulatory protein in mouse Leydig tumor cells. *Biol. Reprod.* **67**, 1393-1404 (2002).
35. Wang, X.J. et al. Interaction between arachidonic acid and AMPc signaling pathways enhances steroidogenesis and StAR gene expression in MA-10 Leydig tumor cells. *Mol. Cell Endocrinol.* **188**, 55-63 (2002).
36. Bornstein, S.R., Rutkowski, H. & Vrezas, I. Cytokines and steroidogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* **215**, 135-141 (2004).
37. Andric, S.A., Janjic, M.M., Stojkov, N.J. & Kostic, T.S. Protein kinase G-mediated stimulation of basal Leydig cell steroidogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **293**, 1399-1408 (2007).
38. Cornejo Maciel, F., Poderoso, C., Gorostizaga, A., Paz, C. & Podestá, E.J. LH/chorionic gonadotropin signaling pathway involves protein tyrosine phosphatase activity downstream of protein kinase A activation: evidence of an obligatory step in steroid production by Leydig cells. *J. Endocrinol.* **170**, 403-411 (2001).
39. Paz, C. et al. Protein tyrosine phosphatases are involved in LH/chorionic gonadotropin and 8Br-AMPC regulation of steroidogenesis and STAR protein levels in MA-10 Leydig cells. *J. Endocrinol.* **175**, 793-801 (2002).
40. García-Pérez, C. & Martínez, F. Los mecanismos que controlan la síntesis de progesterona en la placenta humana. *REB* **21**, 181-189 (2002).
41. Sewer, M.B. & Waterman, M.R. AMPc-dependent transcription of steroidogenic genes in the human adrenal cortex requires a dual-specificity phosphatase in addition to protein kinase A. *J. Mol. Endocrinol.* **29**, 163-174 (2002).
42. Hirakawa, T. & Ascoli, M. The lutropin/choriogonadotropin receptor-induced phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinases in Leydig cells is mediated by a protein kinase a-dependent activation of ras. *Mol. Endocrinol.* **17**, 2189-2200 (2003).
43. Poderoso, C. 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* **3**, e1443 (2008).
44. Otis, M. & Gallo-Payet, N. Role of MAPKS in angiotensin II-induced steroidogenesis in rat glomerulosa cells. *Mol. Cell Endocrinol.* **265-266**, 126-130 (2007).
45. Carr, B.R. in William's Textbook of Endocrinology (Saunders, W.B.) 751-817 (Hartcourt & Brace, Philadelphia, PA, 1998).
46. Weakly, B.S. Electron microscopy of the oocyte and granulosa cells in the developing ovarian follicles of the golden hamster. *J. Anat.* **100**, 503-534 (1966).
47. Gore-Langton, R.E. & Armstrong, D.T. en The Physiology of Reproduction. (Knobil, E & Neill, J.D.) 571-627 (Raven Press, New York, 1994).
48. Baird, D.T. & Fraser, I.J. Concentration of estrone and estradiol-17p in follicular fluid and ovarian venous blood of women. *Clin. Endocrinol.* **4**, 171-175 (1969).
49. Baird, D.T., Burger, P., Heavon-Jones, G.D. & Scaramuzzi, R.J. The site of secretion of androstenedione in non-pregnant women. *J. Endocrinol.* **63**, 201-212 (1974).
50. Ryan, K.J. & Petro, Z. Steroid biosynthesis by human ovarian

- granulosa and theca cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **26**, 56-52 (1966).
51. Havelock, J.C., Rainey, W.E. & Carr, B.R. Ovarian granulosa cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.* **228**, 67-78 (2004).
52. Chin, E.C. & Abayasekara, D.R. Progesterone secretion by luteinizing human granulosa cells: a possible AMPc-dependent but PKA-independent mechanism involved in its regulation. *J. Endocrinol.* **183**, 51-60 (2004).
53. Niswender, G.D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction* **123**, 333-339 (2002).

The Role of Mitochondria in Syncytiotrophoblast Cells: Bioenergetics and Steroidogenesis

Federico Martinez, Rebeca Milan, Oscar Flores-Herrera, Sofia Olvera-Sanchez, Erika Gomez-Chang and Maria Teresa Espinosa-Garcia
Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Distrito Federal, Mexico

1. Introduction

Human placenta maintains pregnancy. The mitochondria of this tissue synthesize pregnenolone (P5) from cholesterol through a transport chain formed by adrenodoxin, adrenodoxin reductase and cytochrome P450_{scc} (CYP11A1; EC 1.14.15.6), which breaks up the lateral chain of cholesterol. P5 is transformed into progesterone (P4) within mitochondria by the 3 β -OH-steroid-dehydrogenase- Δ^5 -6 β -isomerase (3HSD). The particular hormone(s) or substance(s) that modulate P4 synthesis during pregnancy is currently unknown (Strauss et al., 1996; Martinez & Strauss, 1997); nevertheless, the presence of cAMP analogues stimulated P4 synthesis in trophoblastic cells, suggesting that a hormonal signal or another kind of signal may modulate the concentration of this second messenger into the cells (Ringler et al., 1989; Strauss et al., 1992). Although P4 synthesis was suggested to be the main function of the placenta, the analysis of P450_{scc} cytochrome concentration shows that placental mitochondria have a lower content of P450_{scc} than respiratory chain cytochromes (Table 1), even when it is compared to adrenal gland mitochondria, suggesting that placental mitochondria participate in other functions different to that from steroidogenesis.

Cytochrome	Human Placenta			Adrenal Glands			
	nmol/mg of mitochondrial protein			nmol/mg of mitochondrial protein			
$a_1 + a_3$	0.140	0.10	-	0.23	0.75		
b	0.089	0.07	-	0.17	0.32		
$c + c_1$	0.125	0.13		0.29	0.67		
P450 _{scc}	0.110	0.10	0.123	1.50	1.30	0.39	1.0
Reference	Négríe et al., 1979	Simpson & Miller, 1978	Meigs & Ryan, 1968	Cammer & Estabrook, 1967	Harding & Nelson, 1966	I. Hanukoglu & Z. Hanukoglu, 1986	Jefcoate et al., 1973

Table 1. Concentration of cytochromes in human placenta and adrenal gland mitochondria

It seems that ATP synthesis in placental mitochondria is not related to its consumption at the cytoplasm, but rather it is related to the mitochondrial metabolism and, although seemingly contradictory, this allows pregnancy to reach full-term delivery.

2. Transport

2.1 Transport of carbohydrates, lipids, and amino acids

The development of both placenta and fetus is metabolically related. The mother supplies the essential nutrients for the fetus and the placenta, and their transport is strictly controlled in the placenta by the expression and the activity of specific transporters in the plasma membrane of syncytiotrophoblast (Angiolini et al., 2006). When the development of the fetus is optimal, some transporters of nutrients and ions are downregulated in the placenta; then a decrease of cellular receptors for specific molecules is observed (Hahn et al., 1999).

The placenta uses mainly glucose for its metabolism and at the same time transports it to the fetus that requires 4-8 mg/kg/min of glucose for the oxidative phosphorylation (OXPHOS) process (Aldoretta & Hay, 1995). Two isoforms of GLUT have been identified: GLUT1 and GLUT3 (Kahn & Flier, 1990). GLUT 1 is responsible of glucose uptake from the maternal circulation and its activity is independent of insulin. Glucose itself down-regulates the placental GLUT1 providing a fetal protection mechanism when maternal glucose is high (Hahn, 1998). GLUT3 is relevant during implantation and establishment of the placenta, and thereafter GLUT3 is not required; suggesting that GLUT3 has no relevance in glucose uptake after the first trimester (Clarson et al., 1997).

Glucose placental transport is accomplished by facilitated diffusion through GLUT1 transporter, but its expression is not affected by the concentration of extracellular glucose (3.7 mM or 70 mg/dl maternal and 3.2 mM or 61 mg/dl fetal) (Ingermann, 1987). It has been reported that the placenta is in constant hypoxia, for which it has a glycolytic metabolism, where 70% of total glucose is used to produce ATP through anaerobic glycolysis (Hanguel et al., 1986).

Glycogen is synthesized by the human placenta only as a primary response to maternal hyperglycemia. Although glycogen during pregnancy has been reported (Ville, 1953), the placenta does not synthesize glycogen efficiently (Barash et al., 1991). There are data showing the presence of gluconeogenic enzymes (Matalon & Michals, 1984), and Prendergast et al. demonstrate that the placenta synthesizes glucose, and evidence of the presence of glucose-6-phosphatase has been published (Matsubara et al., 1999; Prendergast et al., 1999); however, it is unknown whether the glucose synthesis might have any physiologic relevance.

The incubation of trophoblastic cells, perfused explants or placentas, produces lactic acid as a result of anaerobic glycolysis used by the fetus (Battaglia, 1989; Piquard et al., 1990). The radioactivity of glucose labeled with ^{14}C showed the following distribution: lactate 60-69%, glycogen 1.3-4.8%, pentose pathway 5%, fatty acids 0.7-1.4% and CO_2 1.6-2.4% (Desoye & Shafirir, 1994). Similarly, in slices of human placenta from middle gestation, 73% of glucose was degraded through glycolysis, 10% through pentose pathway and the rest through lipids formation and glycogen synthesis. Although pentose pathway has been described in the placenta (Shelley, 1979), reports suggest that it does not make an important contribution to

glucose metabolism (Moe et al., 1991). The placenta can also use fructose or lactate as energy sources.

Condition	Glucose consumption	Lactate production
	mmol/h/g	
95% O ₂ + 5% CO ₂	6.96 ± 2.50	21.23 ± 7.79
95% N ₂ + 5% CO ₂	12.50 ± 3.36	24.06 ± 5.24

Table 2. Glucose consumption and lactate production in human placenta (Modified from Schneider et al., 1988).

The placenta transports 50% of fatty acids to the fetus during the last trimester of pregnancy; that is the reason why β -oxidation is not a good candidate for ATP generation. In addition, placental membranes have a lipoprotein lipase which catalyzes the degradation of lipoproteins, mainly VLDL (Coleman, 1986). Fatty acids and glycerol are transported by simple diffusion and, once inside the trophoblast, they are bound to proteins and are transported to the basal stratus to diffuse to the fetus.

The following proteins have been related to the transport of lipids, the plasma membrane fatty acid binding protein (pFABPpm), fatty acid transporter protein (FATP) and the cytoplasmic fatty acid binding protein family (FABP) (Hornstra et al., 1995). pFABPpm makes up about 4% of cytosolic proteins, it is responsible for the intracellular distribution of fatty acids and to the membrane, and mainly binds essential long chain fatty acids. Also, the transport of essential fatty acids by the placenta is important, since these acids are implicated in cell-cell signaling and contribute to the development of the fetal brain, as well as cardiovascular and lung development (Wollet, 2005; Cunningham et al., 2009).

Cholesterol is the precursor of steroid hormones but it is not synthesized by the human placenta. Trophoblast cells express receptors for lipoproteins like LDL, VLDL, and class A scavenger receptors, as well as for the LDL receptor-related protein (LRP), the apolipoprotein E (apoE) receptor 2, and the scavenger receptor class B type (SR-BI). The cholesterol required for the synthesis of P4 is provided by maternal lipoproteins (Strauss et al., 1996; Palinski, 2009) (Fig.1).

Protein synthesis is essential for fetal development; the human placenta has at least three different amino acid transporters (neutral, cationic and anionic) coupled to an ionic energy dependent process. Two cationic amino acid transporter systems called y^+ (Hoeltzli & Smith, 1989) and y^+L (Fei et al., 1995) are specific for cationic amino acids and are widely expressed in both maternal and fetal sides. System " y " is Na^+ -independent (Moe, 1995) and system y^+L has higher affinity for lysine and neutral amino acids. Transport of neutral amino acids involves the transporters A, ASC and L. Type A is a Na^+ -dependent transporter with affinity for amino acids with short polar or linear side chains. System ASC is a Na^+ -dependent transport for serine, cysteine, threonine and glutamine. The system L is a Na^+ independent transporter for large aromatic or non-polar branched side chains of amino acids (Yudilevich & Sweiry, 1985).

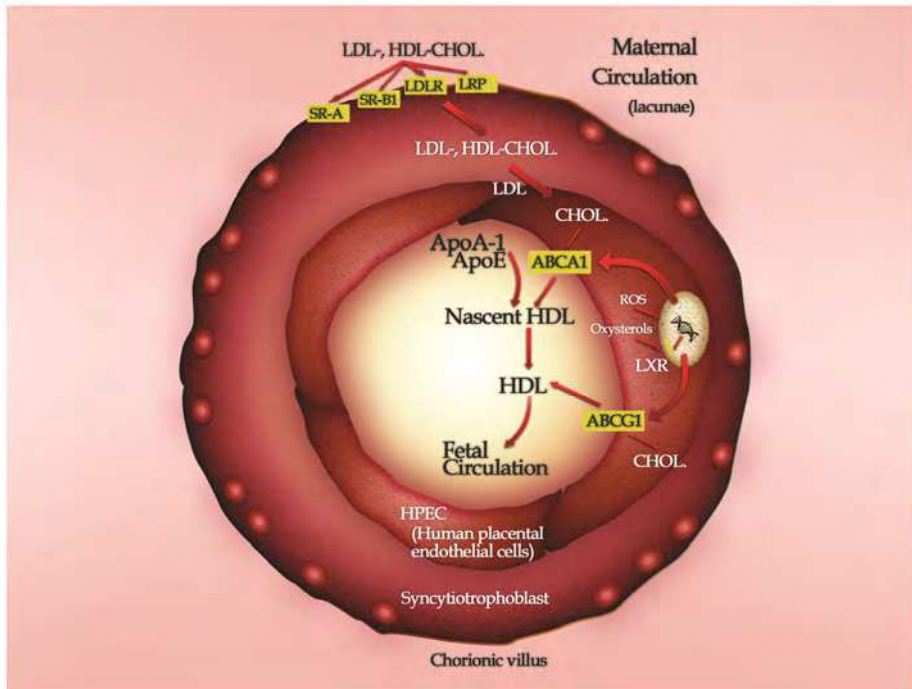


Fig. 1 Maternal-fetal cholesterol transport in the placenta (Modified from Palinski, 2009).

2.2 Transport of relevant ions

Ions are needed for fetus growth and metabolism, due to their contribution to cell homeostasis. The ions are not only related to amino acid transport, because ion transporters are necessary for other cellular functions. Na^+ is transported actively (Stulc et al., 1995). Carter has reported that 30% of the ATP produced by the placenta is used for the synthesis of proteins and steroids; while Na^+/K^+ ATPase consumes another 20-30%, making these processes the most costly and the main consumers of placental energy (Carter, 2000).

Chloride is co-transported with Na^+ or K^+ ; it is bidirectional and almost symmetrical and apparently associated with the maintenance of cell volume. Calcium is transported to the fetus against a concentration gradient reaching a fetal plasma concentration higher than maternal plasma concentration (Stulc, 1997).

Potassium is taken by the Na^+/K^+ -ATPase and its efflux through the K^+ -channel (K_{ATP}); the fetal transport of K^+ is against a concentration gradient and independent of the maternal potassium status (Stulc, 1997).

The movement of ions in the cell has relevance in the mitochondrial metabolism; the increase of K^+ in the cytoplasm in adrenal cells stimulates aldosterone synthesis (Spät & Pitter, 2004). The mechanism involves the release of Ca^{2+} from its cellular reservoirs modifying the mitochondria metabolism. Human placental mitochondria have a vectorial influx of Ca^{2+} , and changes in its concentration modifies P4 synthesis (García-Pérez et al.,

2002), although this transport can be modified by K^+ . It has been observed that the increases of K^+ also modify mitochondrial steroidogenesis (Martinez, 1995). The transport of K^+ in the mitochondria has not been clarified, but it has been proposed that it could be through the $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ channel described by Garlid (Garlid & Paucek, 2003).

3. Energetic metabolism

3.1 Architecture of the human placental mitochondria

The size, aspect and organization of mitochondrial membranes vary between species, tissues and physiological conditions. Using isolated mitochondria and cultured cells, Hackenbrock revealed a close coupling between ultrastructure and energetic state (Hackenbrock et al., 1971). In the energized state, when low ADP concentrations are limited for OXPHOS (the so-called respiratory state IV), mitochondria display the common, orthodox conformation: filamentous electron-dense cristae within a matrix of intermediate electron density. When high ADP concentrations accelerate OXPHOS (the respiratory state III), mitochondria adopt the condensed conformation: the matrix is condensed and electron dense, while the intermembrane space and cristae-lumen appears swollen and electron light. Reversible changes between the orthodox and condensed conformation are modulated by metabolites, by drugs that inhibit respiratory complexes or by ionophores that uncouple respiration and phosphorylation (Hackenbrock, 1968, 1971). Decades ago, several authors confirmed that stimulation of respiration induces the condensed conformation, with a characteristic electron-dense matrix in mitochondria (Malka et al., 2005; Rossignol et al., 2004). It is reasonable to assume that mitochondrial ultrastructure, morphology and dynamics are linked and thus, that mitochondrial morphology and dynamics are also modulated by OXPHOS.

Although many types of mitochondrial cristae structure have been described (Munn, 1974), from recent electron microscopic tomography studies, the differences between typical mitochondria are now evident; e.g., liver (Mannella, 1994, 1997), neuronal (Perkins, 1997, 2001a), brown adipose tissue (Perkins et al., 1998), fungus (Nicastro et al., 2000; Perkins et al., 2001b), rods and cones (Perkins, 2003), and those from steroidogenic tissues, e.g., Leydig cells (Prince, 2002). In general, cristae from typical mitochondria are lamellar while in steroidogenic cells are tubular, vesicular, or tubulovesicular (Reichert et al., 2002). It has been suggested that due to this particular morphology of the cristae, mitochondria of Leydig cells should not be able to produce ATP, since the narrow gap between lamellae would not allow the location of the F_1 subunit of ATP synthase (Prince, 2002); however, a recent publication indicates that mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$), mitochondrial ATP synthesis, and mitochondrial respiration are all required to support Leydig cell steroidogenesis (Allen et al., 2006).

In our laboratory, two kinds of mitochondria were isolated from human placenta: non steroidogenic mitochondria with typical cristae from cytotrophoblast, and steroidogenic mitochondria with vesicular cristae from syncytiotrophoblast. *In situ*, large mitochondria were observed in cytotrophoblast cells, with morphology similar to the typical liver mitochondria, and containing lamellar cristae in an orthodox configuration (Fig. 2). In contrast, the syncytiotrophoblast contains smaller mitochondria with a condensed matrix and cristae composed by vesicular regions connected by narrow tubules. The larger cytotrophoblast mitochondria have a round shape, whereas syncytiotrophoblast

mitochondria display an irregular shape with protuberances of the outer and inner membranes (De Los Rios Castillo et al., 2011).



Fig. 2. Ultrastructure of human syncytiotrophoblast and cytotrophoblast cells. (A) Electron micrograph of term placenta villus showing syncytiotrophoblast and underlying cytotrophoblast. N, nucleus; M, mitochondria. 10,000 X. (B) Isolated mitochondria from human cytotrophoblast and syncytiotrophoblast. Scale bar, 200 nm (Modified from De Los Rios Castillo et al., 2011)

Isolated cytotrophoblast and syncytiotrophoblast mitochondria showed values for respiratory control higher than those previously reported for this tissue (Olivera & Meigs, 1975) and the oxygen uptake was coupled to ATP synthesis, reaching 151 ± 16 and 153 ± 13 nmol ATP/mg/min, respectively (De Los Rios Castillo et al., 2011). These observations demonstrate the presence of functional mitochondria in both cell types, retaining the ability to increase the consumption of oxygen and the synthesis of ATP upon the addition of ADP.

3.2 Energetic pathways

The metabolism of mitochondria involves two major pathways: energy production and P4 synthesis, and several evidences show that both are closely related, as suggested by the similar content of cytochromes from the electron transport chain cytochrome P450_{sc}, suggesting the alternating activity of both pathways, which can generate ATP for cell function and for P4 synthesis to maintain pregnancy. A mechanism to regulate the functioning of both pathways could be the presence of alternative enzymes, e.g. an NADP-dependent isocitrate dehydrogenase is associated to the inner mitochondrial membrane; isocitrate, the substrate for this enzyme supports progesterone synthesis, while succinate promotes the synthesis of ATP.

It has been described that ATP-diphosphohydrolase and ADPase enzymes are tightly bound to mitochondrial membranes and their activities are involved in steroidogenesis. Particularly, the activity of ATP-diphosphohydrolase was described as supporting P4 synthesis, probably providing the energy requirement for cholesterol transport between the mitochondrial

membranes, similar to the activity of mitochondrial GDPase reported in adrenal gland (Fig. 3). Additionally, these enzymes could participate in the transformation of ATP to adenosine, which can be released into the blood vessels to promote oxygenation of the placenta.

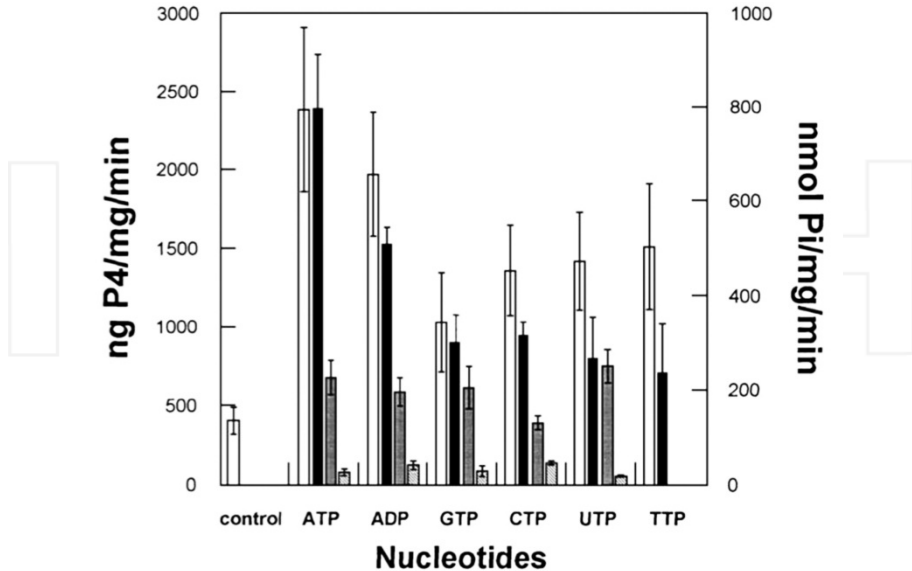


Fig. 3. Effect of several nucleotides on progesterone synthesis and their hydrolysis by human placental apyrase. Mitochondria were incubated in progesterone synthesis medium with or without 1 mM 5'p-fluorsulfonyl benzoyl adenosine (FSBA). Nucleotide hydrolysis was also performed in progesterone synthesis medium. Progesterone synthesis (\square); nucleotide hydrolysis (\blacksquare); progesterone synthesis + FSBA (▨); nucleotide hydrolysis + FSBA (▩) (Modified from Flores-Herrera et al., 2002).

The concentration of adenine nucleotides is another way to analyze the pathways that produce energy in the form of ATP. The total amount of nucleotides at the time of expelling is 0.766 a 0.816 mmol/g wet weight, ATP 0.49, ADP 0.23, and AMP 0.12 nmol/g wet weight (Young & Schneider, 1984). In mitochondria isolated from full-term human placenta the concentrations of nucleotides are 1.24 5.78 y 1.09 nmol of ATP, ADP, and AMP/mg of protein, respectively (Martinez et al., 1987). These data suggest that in spite of the anoxia produced by labor, the placenta synthesizes mainly ATP, whereas glycogen levels do not vary significantly until 60 minutes after labor (Bloxam & Bobinski, 1984). The fact that mitochondria synthesize ATP does not imply that they supply the trophoblast with ATP for its cellular functioning in an important amount.

3.3 The relevance of nucleotide hydrolysis

With regard to their steroidogenic role, syncytiotrophoblast mitochondria synthesize P4 (35.7 ± 0.9 ng P4/mg/min) due to the presence of 3HSD in their inner membrane (Cherradi et al., 1994; Martinez et al., 1997; Brand et al., 1998). Their steroidogenic activity was ten times higher than cytotrophoblast mitochondria (3.6 ± 1.34 ng P4/mg/min). In both cases,

22(R)-hydroxycholesterol, a soluble substrate used to assess maximal steroidogenesis (Tuckey, 1992) increased steroidogenic activity to 92.2 ± 3.4 and 10.1 ± 3.95 ng P4/mg/h in syncytiotrophoblast and cytotrophoblast mitochondria, respectively (De Los Rios Castillo et al., 2011). Additionally we demonstrated that ATP is essential for progesterone synthesis (Flores-Herrera et al., 2002). These results agree with the specialized role of each placental cell (Martinez et al., 1997) and demonstrate that isolated mitochondria from syncytiotrophoblast are intact and retain their physiological function.

Nevertheless, human syncytiotrophoblast mitochondria have bioenergetics and steroidogenic functions, which raise an interesting question: why do they have an irregular shape with tubular, vesicular, or tubulovesicular cristae? At present, there is interest concerning proteins that govern mitochondrial ultrastructure, but few of such proteins have been identified (Pellegrini & Scorrano, 2007). It has been speculated that the dimer of F_0F_1 -ATP synthase (complex V for oxidative phosphorylation of ATP) may play a major role in determining cristae formation (Paumard et al., 2002; Minauro-Sanmiguel et al., 2005; Dudkina et al., 2005; Strauss et al., 2008). Dimerization of F_0F_1 -ATP synthase in the mitochondrial inner membrane has been described in yeast (Arnold et al., 1998) and bovine mitochondria (Schägger & Pfeiffer, 2000). A critical role in the stability of the mammalian dimeric complex V has been proposed for the inhibitory F_1 moiety protein (IF_1) (García et al., 2006). IF_1 is known to dimerize in solution (Gordon-Smith et al., 2001), and this dimer has been recently shown to interact with two molecules of soluble F_1 simultaneously (Cabezón et al., 2000; Dominguez-Ramirez et al., 2001). If the same interaction occurs in the membrane, it might be responsible for the dimerization of the F_0F_1 -ATP synthase complex, and in mammalian cells, changes in IF_1 concentration affect the degree of F_0F_1 -ATP synthase dimerization, which in turn could alter the formation of cristae (García et al., 2006). In this sense, the density of mitochondrial cristae in HeLa cells is increased by IF_1 overexpression and decreased by IF_1 suppression (Campanella et al., 2008); interestingly, IF_1 overexpression increases both the formation of dimeric F_0F_1 -ATP synthase and F_0F_1 -ATP synthase activity (Campanella et al., 2008).

The analysis of the electron transport chain and oxidative phosphorylation complexes from human syncytiotrophoblast and cytotrophoblast mitochondria allow us to demonstrate that the dimeric form of the F_0F_1 -ATP synthase (complex V) is involved in the cristae architecture in trophoblast cells (De Los Rios Castillo et al., 2011). In this sense, we found that the dimer of mitochondrial F_0F_1 -ATP synthase is scarce in syncytiotrophoblast associated to a low IF_1 concentration. Due to the fact that human placenta cells are ontogenetically related, i.e. cytotrophoblast cells differentiate into syncytiotrophoblast cells, the amounts of IF_1 found in the steroidogenic cells could be the result of cell differentiation and have a significant effect on their mitochondrial architecture (tubulovesicular cristae) and physiology (P4 synthesis). The amount of IF_1 and F_0F_1 -ATP synthase dimer present in these mitochondria is probably related to its physiological functions.

But, why do syncytiotrophoblast cells have mitochondria with atypical cristae morphology? Since the human placenta does not express StAR (Tuckey, 2005) and TSPO (Maldonado-Mercado et al., 2008), two proteins involved in mitochondrial cholesterol flow, it has been suggested that the reduction in the size of syncytiotrophoblast mitochondria and the change in the structure of cristae may improve the steroidogenic activity of syncytiotrophoblast cells (Martinez et al., 1997). In this sense, the translocation of cholesterol to P450scc has been

well known to be the rate-limiting step in steroidogenesis; thus, a greater surface could enhance the movement of cholesterol to the inner membrane where P450_{scc} is located. It is tempting to speculate that the non-orthodox cristae structure in mitochondria from steroidogenic tissue allows cholesterol to flow from the outer to the inner mitochondrial membranes and improves hormone production.

3.4 Mitochondrial accessory proteins involved in progesterone synthesis

For P4 synthesis by human syncytiotrophoblast mitochondria, the cristae architecture could not be considered as the only and most important issue; we have identified a set of different proteins involved in hormone production as a heat shock protein-60 kDa (HSP60), associated to the increases of progesterone synthesis through its association with the MLN64-like protein (Olvera-Sanchez et al., 2011); an ADPase, and an ATP-diphosphohydrolase associated to mitochondrial membranes (Uribe et al., 1999; Flores-Herrera et al., 1999).

ATP-diphosphohydrolase is anchored to mitochondrial membranes with its nucleotide-hydrolyzing activity oriented to the intermembrane space. The kinetic characterization of its activity in a detergent solubilized fraction revealed that it can use ATP, ADP, GTP, GDP, UTP, UDP, CTP, CDP, TTP and TDP in a cation (Mg^{+2} , Ca^{+2} , and Zn^{+2}) dependent fashion as substrates (Flores-Herrera et al., 1999) (Fig. 4). ATP hydrolysis by this ATP-diphosphohydrolase can stimulate oxygen uptake in intact mitochondria from syncytiotrophoblast coupling with ATP synthesis (Martinez et al., 1993). Since one main function of mitochondria is the synthesis of ATP through the F_0F_1 -ATPase activity, the presence of external mitochondria ATP-diphosphohydrolase and an ADPase in the human

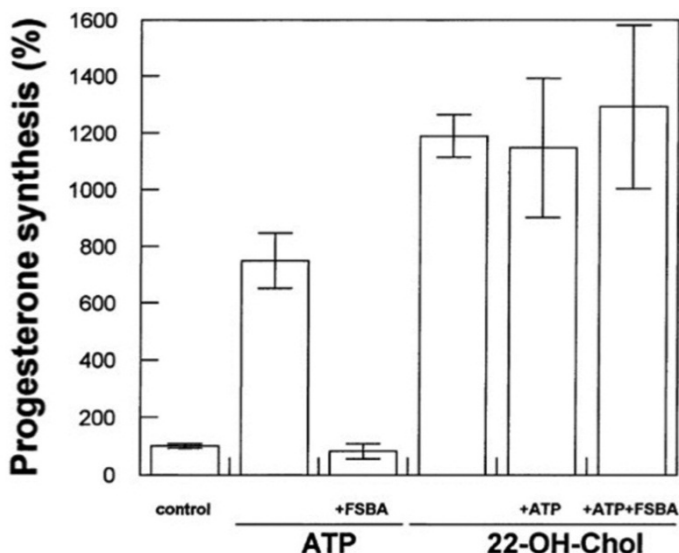


Fig. 4. Effect of 22(R)-hydroxycholesterol (22-OH-Chol) on progesterone synthesis. Mitochondria were incubated in progesterone synthesis medium with or without 1 mM FSBA. Where indicated, 1 mM ATP or 15 μ M 22-OH-Chol was added. 100% progesterone synthesis = 142 ng progesterone/mg/min (Modified from Flores-Herrera et al., 2002).

placental mitochondria could produce a futile cycle due to the combination of the F_0F_1 -ATPase and ATP-diphosphohydrolase activities, being lethal for trophoblast cells. However, the futile cycle is not observed, because the addition of ATP (or ADP) to isolated mitochondria induces oxygen consumption without uncoupling the respiration, suggesting the presence of mechanisms that regulate the activity of ATP-diphosphohydrolase in a way that trophoblast cells remain alive (Martinez et al., 1993). Indeed, ATP-diphosphohydrolase activity and its substrate specificity seem to be regulated by the proton electrochemical potential ($\Delta\mu_{H^+}$), i.e. if mitochondrial inner membrane is energized, ATP-diphosphohydrolase selectively hydrolyzes ATP, while dissipation of $\Delta\mu_{H^+}$ by CCCP produces a loss of substrate specificity, and is able to hydrolyze ATP and GTP equally (O. Flores-Herrera, et al., manuscript in preparation).

With respect to ATP-diphosphohydrolase role in syncytiotrophoblast mitochondria steroidogenesis, its activity in presence of ATP is involved in cholesterol transport between mitochondrial membranes (Flores-Herrera et al., 1999; Flores-Herrera et al., 2002). In addition, other nucleotide hydrolase activities have been determined in mitochondria from other steroidogenic tissues; in particular, in adrenal mitochondria GTP enhances steroidogenesis, a process modulated by a GTPase (X. Xu & T. Xu, 1989); however, no conclusion can be drawn yet in this steroidogenic tissue. However, syncytiotrophoblast mitochondria hydrolyze several nucleosides tri- and di-phosphatides increasing P4 synthesis, which is sensitive to ATP-diphosphohydrolase inhibition by FSBA, a non-hydrolysable ATP analog (Flores-Herrera et al., 2002) (Fig. 4). Finally, although the mechanisms of regulation of this enzyme have to be elucidated, we conclude that ATP-diphosphohydrolase is anchored to syncytiotrophoblast mitochondrial membranes, which nucleotide hydrolysis activity is involved in cholesterol transport between mitochondrial membranes and in oxygen uptake by mitochondrial electron transport chain (Flores-Herrera et al., 2002).

4. Signaling pathway in placental steroidogenesis

4.1 The role of mitochondria in the phosphorylation cell signaling

Progesterone synthesis by human placenta is essential for the maintenance of pregnancy. In the human being, P4 is produced in the corpus luteum cells during the secretory phase of the menstrual cycle; whereas in the early stages of pregnancy its production continues due to the stimulus of the Chorionic Gonadotropin hormone (hCG); however, between the 6th and 8th week of gestation, the corpus luteum decreases its production of P4, which is now synthesized by the trophoblastic cells of the placenta (Tuckey, 2005).

Unlike the other steroidogenic tissues, placental steroidogenesis is chronically regulated. Both regulation systems are under the control of diverse factors or hormones that activate signal transduction pathways in different forms, allowing either short-term or long-term regulation. In general, the chronic response is started within hours after the initiating stimulus and involves the activation of certain signaling pathways, among them the cAMP-dependent protein kinase (PKA) cascade is the most important.

The effect mediated by PKA/cAMP in long-term and short-term regulation of steroidogenesis is the main pathway stimulated by trophic hormones which acts through G protein-coupled receptors, which in turn activates the enzyme adenylate cyclase, which increases the content of cAMP. cAMP has pleiotropic effects such as the activation of PKA,

which phosphorylates proteins and transcription factors such as the steroidogenic factor (SF-1) and the protein cAMP response element binding (CREB), the latter being the main mediator of positive changes in gene expression (Sands, 2008); for example, the activation of StAR gene (Stocco et al., 2005) or even its phosphorylation (Fig. 5).

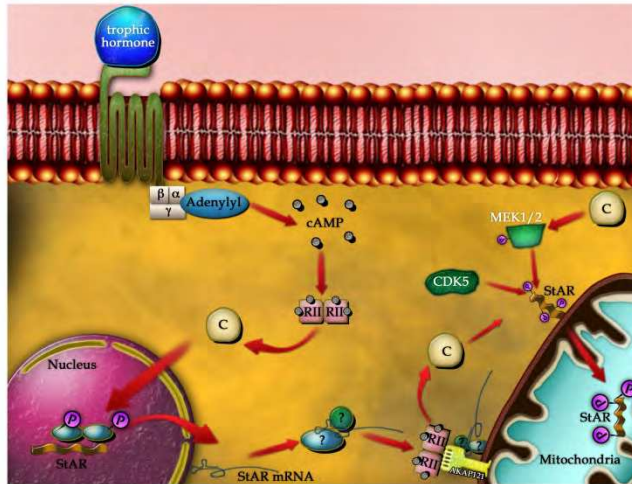


Fig. 5. The model illustrates the activation of the transduction pathway mediated by PKA/cAMP in the posttranscriptional and posttranslational regulation StAR protein (Modified from Manna, 2009).

Although other PKA-dependent and -independent signaling pathways have been reported, the responses generated are generally less potent than those mediated by PKA/cAMP (Manna et al., 2006).

During pregnancy, the production of P4 gradually increases with no substantial variations observed (Tuckey, 2005). It has been reported that a plasmatic decrease of P4 is associated with a higher probability of abortion (Duan et al., 2010).

The addition of 8Br-cAMP or dibutyryl-cAMP to cultured trophoblast cells stimulated the P4 synthesis by increasing the transcription and translation of P450_{scc} and adrenodoxin. Nevertheless, independent of the factors involved modulating the intracellular concentration of cAMP, the likely participation of different hormones and the trophic factors and cytokines that could have endocrine, paracrine, autocrine or intracrine effect in the regulation of steroidogenesis through the signaling pathway mediated by PKA is still unknown; since, as it has been said, there are other pathways that can participate in the regulation of P4 synthesis (Manna et al., 2006; Stocco et al., 2005) (Fig. 6).

In trophoblast choriocarcinoma-derived cells of human placenta (BeWo) the addition of hCG increased P4 synthesis through PKA. Other factors also increased in a variable way the production of P4; nevertheless, it has been suggested that its main effect would be predominantly as a regulator and just in a few cases as a stimulant of steroidogenesis, although through the activation of cAMP-dependent pathways and PKA activation (Manna et al., 2006).

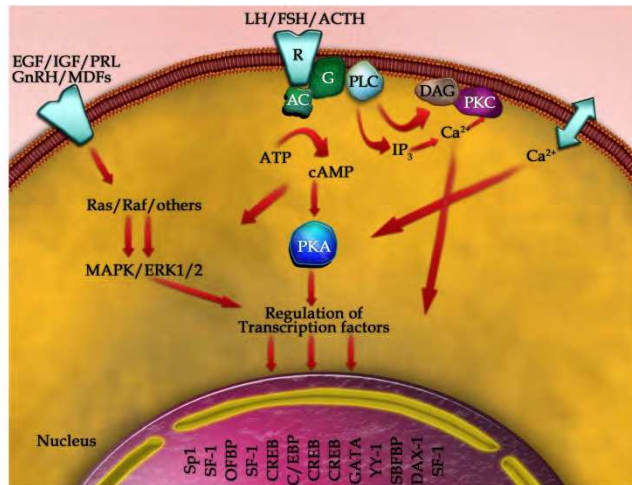


Fig. 6. Model proposed to illustrate the cAMP-dependent and -independent pathways in the regulation of StAR expression and steroidogenesis in adrenal gland and gonads (Modified from Manna, 2009).

Although the signaling pathways associated with P₄ synthesis in human placenta are unknown, one of the best studied mechanism is the one mediated by PKA activation. Unlike gonads, adrenal cortex, and the corpus luteum, P₄ synthesis by placental cells in the presence of cAMP soluble derivatives produce no acute response, not even in cells obtained from first-trimester placentas (Zosmer et al., 1997).

Previous data confirm that trophoblast cells have the machinery to produce cAMP, which may increase its concentration in cytoplasm through the stimulation of β_2 adrenergic receptors in full-term placentas (Kasugai et al., 1987). Interestingly, in first-trimester placentas, norepinephrine increased the content of cAMP mediated by α_1 -adrenergic receptors (Shi & Zhuang, 1993). There is also evidence of the potential effect of other hormones that may stimulate placental P₄ synthesis through cAMP-dependent pathways, just like it happens in the case of estrogens (Pepe & Albretch, 1999), insulin (Lavy et al., 1987), insulin-like growth factor 1 (Nestler, 1987) and epidermal growth factor (Ritvos, 1988). The results suggest the possibility of different stimuli for specific effectors according to the gestational age.

The function of PKA in cells is vital, since its activity is aimed at specific functions, which include the differential expression of regulatory and catalytic subunits in different tissues. Thus, anchor proteins (AKAP's, A-kinase anchor proteins) in certain cellular locations place PKA close to its substrates, making its activity more efficient (Fig. 7). For instance, in Leydig tumoral cells from mice the association of AKAP 121 with the regulatory subunit α of PKA II in mitochondria in response to cAMP was observed, which was interpreted as a powering effect of steroidogenesis on directing the synthesis and activation of StAR to the mitochondrion in response to cAMP (Dyson et al., 2008).

In a similar way, mitochondria isolated from human placenta show the interaction of PKA, AKAP-121, and PTPD1 (Gómez-Concha et al., 2011) (Fig. 8). In addition, it was seen that in the presence of radioactive ATP several proteins were phosphorylated in less than 5 min on

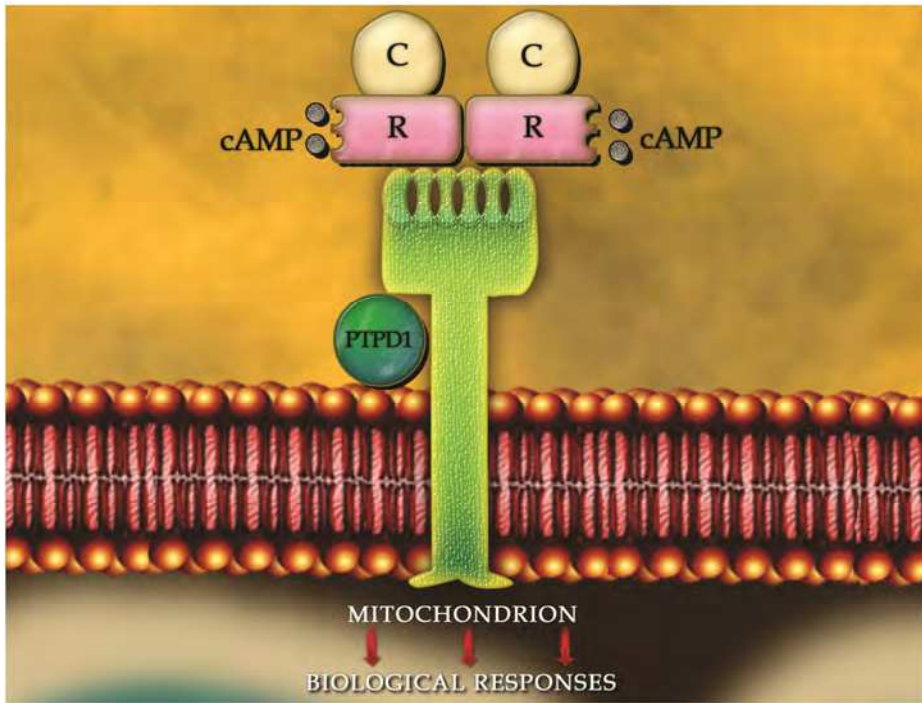


Fig. 7. A signaling complex made up by AKAP 121, which anchors PKA close to the mitochondrion, thus facilitating the phosphorylation of mitochondrial proteins (Modified from Feliciello, 2005).

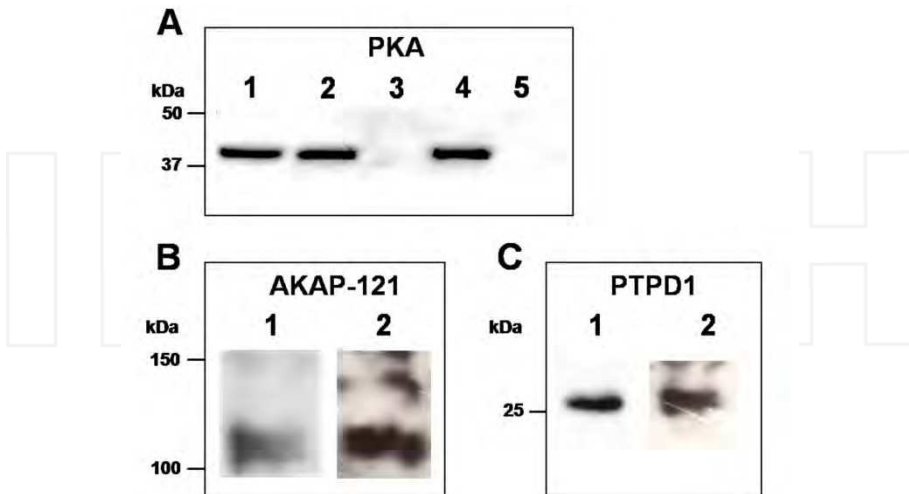


Fig. 8. Immunodetection of PKA (A), AKAP-121 (B) and PTPD1 (C) (see Material and Methods from Gómez Concha, 2011.)

serine and threonine, and to a lesser degree on tyrosine, suggesting the potential activity of kinases. Likewise, the importance of cAMP-PKA pathway in BeWo cells and in mitochondria isolated from human placenta was shown using H89, an inhibitor of PKA activity (Maldonado-Mercado et al., 2008). In mitochondria isolated from syncytiotrophoblast, steroidogenesis was inhibited 50% with 100 μM of H89, whereas in BeWo cells with concentrations of 10 and 20 μM , an inhibition of steroidogenesis of 70% and 90% was found, respectively. The addition of 22(*R*)-hydroxycholesterol to the isolated mitochondria previously inhibited with H89, reestablishes P4 synthesis, thus confirming that the activities of P450_{sc} and 3HSD are not affected by H89.

The results show that to the maximal concentration of H89 inhibited the synthesis of P4 in 99%, but only 50% of protein phosphorylation, which suggests that there are other kinase activities in mitochondria isolated from the human placenta, suggesting the pathway mediated by PKA could be associated to another pathways that ensures the production of P4; then it is relevant to determine the kinases that participate and their associations with the steroidogenesis by the human placenta as it was proposed (Maldonado-Mercado et al., 2008; Gómez-Concha et al., 2011) (Fig. 9).

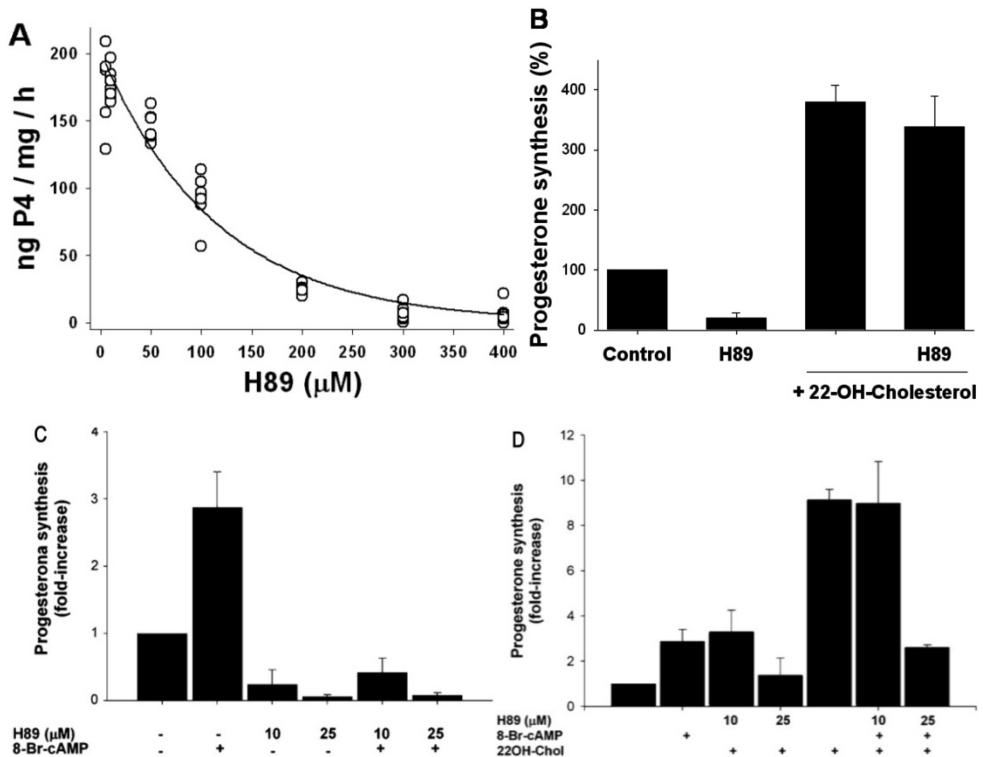


Fig. 9. Progesterone syntheses by syncytiotrophoblast mitochondria (A and B) and progesterone synthesis in BeWo cells (C and D) (see Material and Methods from Maldonado-Mercado et al., 2008, and Gómez-Concha et al., 2011). 22(*R*)-hydroxycholesterol (22-OH-Cholesterol or 22OH-Chol).

Interestingly, in cultured human placenta cells, the stimulus of an acute signaling pathway associated with steroidogenesis as the one observed in isolated mitochondria has not been described; nevertheless it has been suggested that the pathway mediated by PKA/cAMP plays an important role in the regulation of placental steroidogenesis, perhaps with the potential participation of other signal transduction pathways, as it has been observed in other tissues (Dodge-Kafka & Kapiloff, 2006). The endocrine, paracrine, autocrine, and even intracrine mechanisms that modulate this process are still to be described. No matter which one is the signaling pathway activated, the importance of the events of dynamic phosphorylation of proteins with pleiotropic effects in cellular functions as hormonal synthesis is the most relevant (Corso & Thomson, 2001; Gorostizaga et al., 2007; Thomson, 2002).

4.2 Protein phosphorylation in the control of steroidogenesis

Protein phosphorylation is one of the most studied postranslational modifications. The modification of target proteins on specific residues allows structural changes, changes in the protein-protein interaction, and favors their activation or inactivation (Chang & Karin, 2001), thus achieving the regulation of their functions (Matthews, 1995; Klumpp & Krieglstein, 2005; Puttick et al, 2008).

It has been shown that the activity of certain proteins modulated by phosphorylation/dephosphorylation has a temporary effect in specific cellular regions such as the plasma membrane, endoplasmic reticulum, and nucleus, regulating the cellular metabolism (Trost, 2010; Bauman & Scott, 2002), a system that seems to be associated with steroidogenesis (Gómez-Concha et al., 2011), similar to StAR protein (Steroidogenic acute regulatory protein) in adrenal glands and gonads. StAR protein phosphorylation mediated by PKA stimulates the transport of cholesterol from the cytoplasm into mitochondrial membranes (Stocco, 2000; Thomson, 1998; Manna & Stocco, 2005), apparently through a multiprotein complex associated to this organelle (Thomson, 2002) (Fig.10).

It has been suggested that a tyrosine phosphatases is the key for the regulation of StAR and the transport of cholesterol, where phosphorylation/dephosphorylation of intermediary proteins is fundamental in the regulation of steroids biosynthesis (Cooke et al, 2011). Although the placenta does not synthesize StAR protein, data suggest that trophoblast cells have a phosphorylation/dephosphorylation system associated with steroidogenesis.

It has been described that the PKA activity associated with mitochondria is different from that of cytoplasm, suggesting a differential regulation according to their subcellular location, maybe related to the complex formed by PKA, AKAP 121, and PTPD1 (Felicciello et al, 2001; Gómez-Concha et al., 2011). This way, the identification of proteins phosphorylated on their serine, tyrosine, and threonine residues suggests that the metabolism of placental mitochondria has important kinase activity (Gómez-Concha et al., 2011).

In BeWo cells and in isolated mitochondria from placenta, the phosphorylated proteins of 46, 42 and 36 kDa appear to be a potential target of kinases and phosphatases system, where the H89 change the balance of phosphorylation/ dephosphorylation between proteins of 42 and 36 kDa (Maldonado-Mercado et al., 2008; Gómez-Concha et al., 2011) (Fig. 11 and 12).

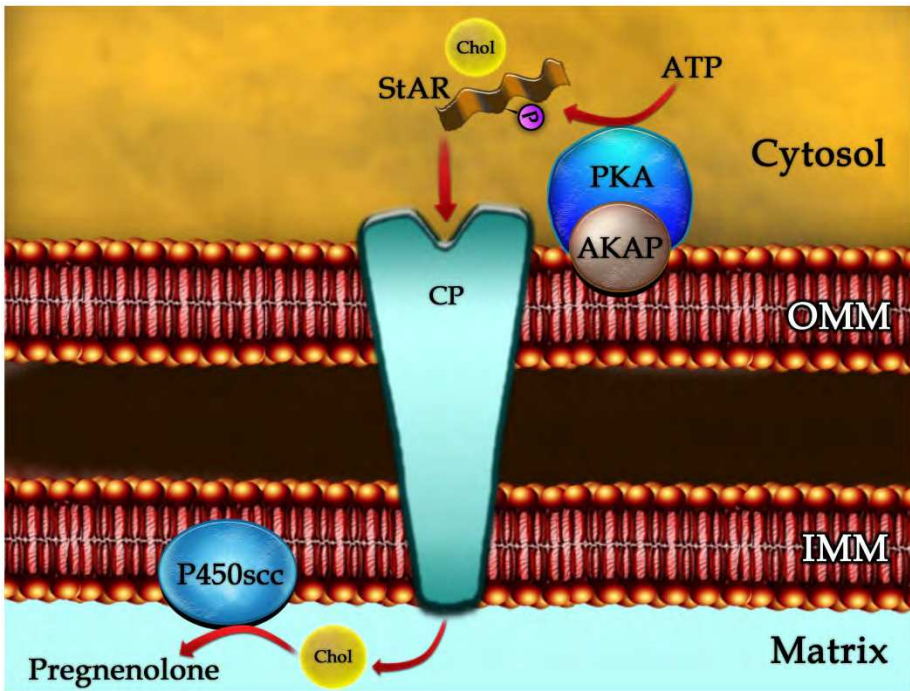


Fig. 10. Propose model for steroidogenic modulation by mitochondrial PKA (Modified from Thomson, 2002).

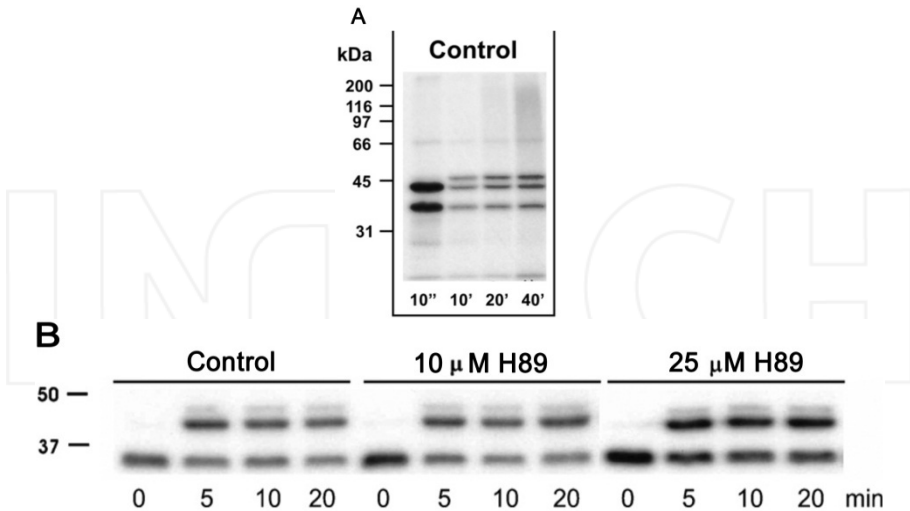


Fig. 11. Incorporation of ($\gamma^{32}\text{P}$) to syncytiotrophoblast mitochondria proteins (A) and isolated mitochondria from BeWo cells in the presence of H89 (B). (see Material and Methods from Maldonado-Mercado et al., 2008; Gómez -Concha et al., 2011)

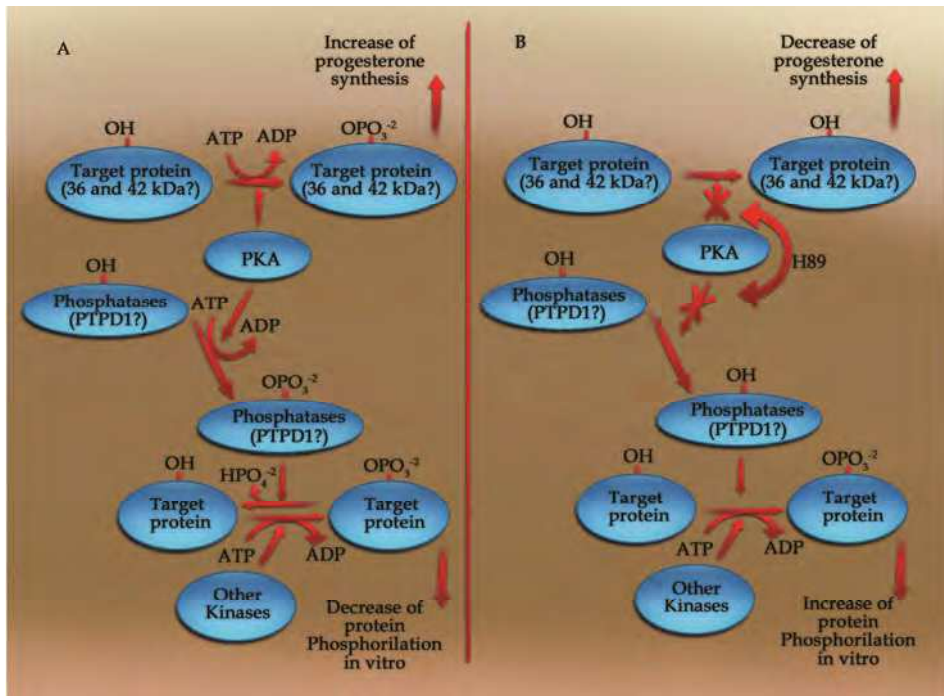


Fig. 12. Model proposed for the participation of PKA in steroidogenesis by syncytiotrophoblast mitochondria (Modified from Gómez -Concha et al., 2011).

5. Steroidogenesis

The transport of cholesterol to mitochondria by proteins is required for steroidogenesis. Deep differences between the placenta and adrenal glands have been observed, which are tightly associated to the permanent production of progesterone.

Meanwhile the cellular movement of cholesterol from cytoplasm to different organelles is accomplished by StAR, i.e. adrenal glands, gonads, liver, brain and others; human placenta does not express the StAR protein. A metastatic lymph node 64 protein (MLN64), which has similar characteristics to StAR protein to recognize cholesterol and transport it to the mitochondria, has been implicated in the movement of cholesterol in the human placenta; also, other proteins have been associated with cholesterol transport, such as the heat shock protein 60 (HSP60) (Olvera-Sanchez et al, 2011) and porine (Espinosa-Garcia et al., 2000).

In the previous sections of this chapter, several aspects of the trophoblast cells have been described. As it was observed, the human placenta possesses special characteristics basically oriented to maintain the relationship between mother and fetus in order to reach a successful delivery. The human placenta works as a mechanical barrier, being highly specific about the molecules that can cross it. In a sense, it controls by itself the mechanisms that regulate the metabolism and hormone production to assure nutrient supply by using different metabolic and signaling pathways, also modulating the mitochondrial activity

through ATP-diphosphohydrolase and other enzymatic activities due to the relevant role that mitochondria play in both ATP synthesis and steroidogenesis.

As mentioned before, cholesterol is the source of steroid hormones, but the human placenta is unable to synthesize it, so the cholesterol must be obtained from mother's lipoproteins. During pregnancy, the amount of progesterone required is high, and during the first trimester its production is responsibility of the corpus luteum, while the egg implantation in the maternal epithelium of the uterus occurs.

5.1 Electron transport chain coupled to cytochrome P450scc

Placental steroidogenesis is an essential process for reproduction. Syncytiotrophoblast cells are the P4-producing cells in the human placenta (Martinez et al., 1997). By full-term pregnancy, placenta produces about 300 mg of P4 per day (Strauss et al., 1996). The first enzymatic stage in its production is the conversion of cholesterol into P5 by P450scc type I (CYP11A1; EC 1.14.15.6), composed by approximately 530 amino acids, including the signal peptide necessary for its association to the mitochondrial inner membrane and only one heme group. P450scc receives six electrons from 3 moles of NADPH through a 54 kDa flavoprotein, ferredoxin reductase (adrenodoxin reductase), and ferredoxin (adrenodoxin) a 2Fe-2S protein with a molecular weight of 13.5 kDa. Both are found in the mitochondrial matrix. Studies of the molecular mechanism about the formation of this complex and electron transport have proposed a stoichiometry for proteins 1:1:1 or 1:2:1, and it has been suggested that adrenodoxin behaves as a mobile electron transporter from adrenodoxin reductase to P450scc (Miller, 2005), and the interaction between CYP11A and adrenodoxin reductase has been shown by molecular biology technics (Payne & Hales, 2004; Strushkevicha, 2011) (Fig. 13).

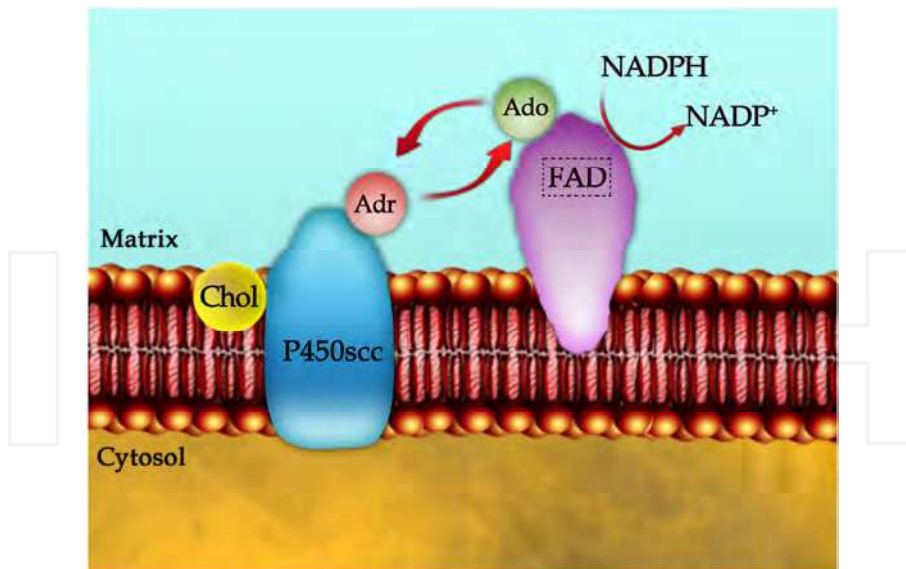


Fig. 13. Electron transport from adrenodoxin reductase to P450scc. Ado = adrenodoxin; Adr = Adrenodoxin reduced; FAD = adrenodoxin reductase (Modified from Payne and Hales, 2004).

The transformation of cholesterol into P5 requires three mono-oxygenation reactions, using molecular oxygen, involving two stereo-specific hydroxylations with the formation of 22(*R*)-hydroxycholesterol and 20(*R*),22(*R*)-dihydroxycholesterol followed by the breaking of the bond C-C between carbons 20 and 22 to release the lateral chain, yielding isocaproaldehyde and P5, which is changed into P4 through two consecutive reactions that require NAD⁺ and are catalyzed by the same enzyme 3HSD type 1 (EC 5.3.3.1) with no release of intermediaries. Two isoenzymes of 3HSD are known in humans, product of different genes (Payne & Hales, 2004). In the placenta, 3HSD is found in the mitochondria, unlike other steroidogenic tissues in which it is found in the endoplasmic reticulum. The activity of this enzyme is higher than P450_{scc} activity; therefore, it is not a limiting step in P4 synthesis (Tuckey, 2005). On the other hand, no disease involving the loss of 3HSD activity in the placenta is known, suggesting that its absence is incompatible with pregnancy.

5.2 Systems for cholesterol transport and mitochondrial contact sites

The cholesterol that participates in P4 synthesis comes from maternal circulation as lipoprotein complexes (LDL or HDL) which bind to their receptors in the plasma membrane. LDLs are released from their endosomal receptors to make late endosomes/lysosomes and obtain free cholesterol as substrate for P450_{scc} (Hu et al., 2010).

The transport of cholesterol from the cytoplasm into the outer mitochondrial membrane in most steroidogenic tissues is associated to many proteins; the StAR, is the first protein identified as part of a family that contains the START domain (StAR-related lipid transfer domain) of about 210 amino acids. It is synthesized as a 37 kDa protein with a signal peptide aimed to the mitochondrion to yield cholesterol to the outer mitochondrial membrane and, then is transformed into a 30 kDa intramitochondrial protein (Manna & Stocco, 2005). This protein is phosphorylated and activated in response to hormonal stimulation in steroidogenic cells (Arakane et al., 1996). The constructs lacking the 62 amino acid residues from the amino-terminal of StAR yields a truncated protein still able to participate in steroidogenesis. These results suggest that the translocation of the StAR protein to the interior of the mitochondria is not a requisite for cholesterol transport, and suggests that cholesterol may be transferred to another soluble acceptor protein or transporter in the outer mitochondrial membrane which finally allows it to reach P450_{scc} for P4 synthesis (Bose et al., 2000; Alpy & Tomasetto, 2006). Nevertheless, the human placenta does not express StAR, and it has been proposed that the protein MLN64 (Moog-Lutz, 1997) could perform the activity of cholesterol transporter. MLN64 is a 54 kDa protein (445 amino acids), isolated from a metastatic nodule of breast cancer. MLN64 is found in late endosomes and has two functional domains, one in the amino end with four transmembrane domains and another at the carboxyl end, corresponding to the START domain, oriented towards the cytoplasm, composed by 227 amino acids with an identity of 37% of StAR sequence. The tridimensional organization of its crystals shows the formation of a hydrophobic tunnel which allows the collocation of one molecule of cholesterol. This location supports the theory of MLN64 substituting StAR in human placenta to promote the flow of cholesterol.

Full-term human placenta isolated mitochondria synthesize P4 without the addition of exogenous cholesterol (Martinez et al., 1997). It has been reported that cholesterol transport between human placenta mitochondrial membranes requires proteins, since when treated with trypsin they are unable to transport cholesterol and, therefore, synthesize P4.

Nevertheless, mitochondria treated with trypsin were able to efficiently transform 22(R)-hydroxycholesterol into P₄, a substrate that does not need a protein membrane transport system, showing that the P450_{scc} chain is not modified by such treatment; thus making human placenta isolated mitochondria an adequate model for the study of cholesterol transport and steroidogenesis (Espinosa-García et al., 2000).

The transport of cholesterol towards the inner mitochondrial membrane requires many proteins associated with the contact sites; these are dynamic structures formed by proteins coming from both the outer and inner membrane and work as complexes that are assembled and degraded according to specific mitochondria conditions. Hence, contact sites might represent the most efficient route for cholesterol to reach P450_{scc} (Thomson, 2003).

It has been reported that during the isolation of mitochondrial contact sites from full-term human placenta, 3 fractions were obtained from the outer membrane and 4 from the inner membrane. The protein composition was specific for each one of them and only one fraction of the inner membrane was able to transform cholesterol into P₄. In such fraction, reported as steroidogenic site, porine, creatine kinase, the translocator of adenine nucleotides, ATP-diphosphohydrolase, MLN64, and HSP90, HSP72, HSP40 and HSP27, enzymes of the P450_{scc} chain, and NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase were identified. These results support the theory that binding sites are an efficient system for cholesterol transit in the human placenta mitochondria (Uribe et al., 2003) (Fig. 14).

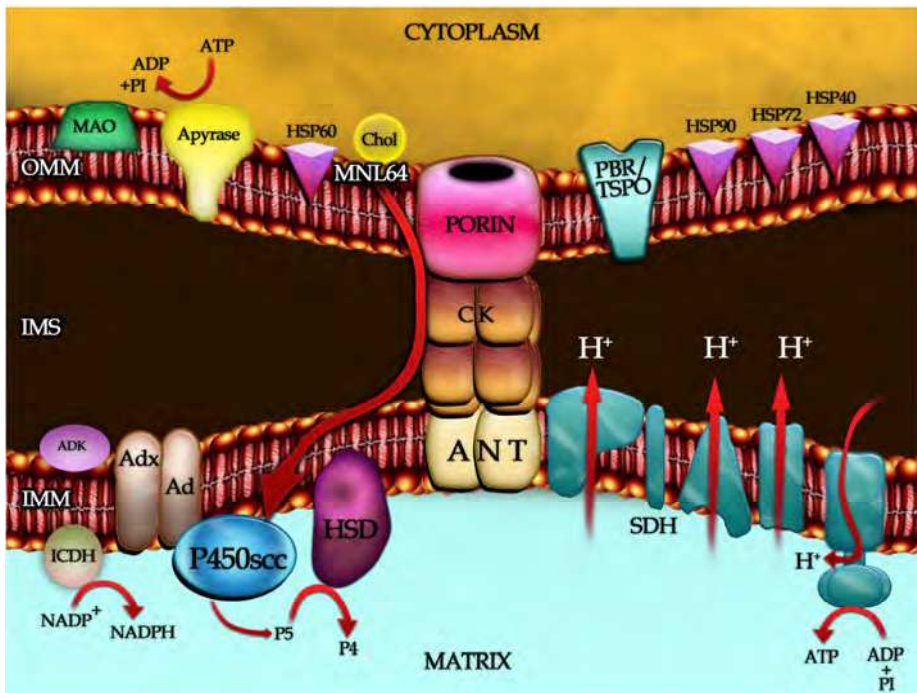


Fig. 14. Model of isolated contact sites from human placental syncytiotrophoblast mitochondria. (Modified from Uribe et al., 2003).

The use of MLN64 antibodies allowed the recognition of a 60 kDa protein identified as an HSP and another 30 kDa protein corresponding to the START domain of MLN64, in human placenta isolated mitochondria. Results suggest that both proteins participate in placental steroidogenesis, favoring both cholesterol movement towards mitochondrial membranes and the release of P4 from mitochondria (Olvera-Sanchez et al., 2011).

5.3 Steroidogenesis regulation

P4 biosynthesis regulation in placenta seems to be at two levels. One is related to hormones and/or factors currently unknown, which initiates a signal transduction cascade involving PKA activation cAMP mediated, as explained before, and another level involving the mitochondria.

As for the mechanism at mitochondrial level, it has been proposed that the activity of P450_{scc} might be regulated by the concentration of adrenodoxin reductase which causes a decrease of P450_{scc} affinity for cholesterol, and makes it work just at 16% of its capacity (Tuckey & Headlam, 2002). Nevertheless, the results obtained from mitochondria isolated from the placenta in the presence of 22(R)-hydroxycholesterol show no limitation in their capacity to produce P4. Therefore, it is unlikely that in physiologic conditions the activity of adrenodoxin reductase is a controlling factor.

Just like other steroidogenic tissues, the limiting step in P4 production is the access of cholesterol to mitochondria. So far, no evidence of any protein limiting transport is available, surely because it would be incompatible with pregnancy. Data available suggest that placental cells have the necessary mechanisms to allow cholesterol to reach mitochondria constantly, making P4 synthesis a constitutive metabolic pathway that assures, independently of nutritional conditions, physical or related to mother's health, that the fetus reaches the full term of pregnancy. In this context, the knowledge of the endocrine, paracrine, etc., signaling pathways would allow the development of therapeutic strategies that favor the integral development of the fetus.

Nevertheless, it is important to mention that acute regulation at mitochondrial level is necessarily accompanied by a chronic modulation mediated by the control of the transcription/translation of the genes that encode for the different steroidogenic enzymes, in a tissue-specific fashion. As for the placenta, it has been observed that there are mechanisms controlling the expression of the genes of the steroidogenic enzymes in which cAMP has no prominent role.

In gonads or adrenal glands, mutations of the genes encoding for proteins STARD1, CYP11A1 or 3HSD affects steroid production, being SF-1 the main factor regulating P450_{scc} expression (Schimmer & White, 2010). Nevertheless, SF-1 factor is not found in human placenta. It has been suggested that P450_{scc} expression is regulated by AP-2 factors that bind to cis elements overlapped to the sequences required for the recognition of SF-1 in other steroidogenic tissues (Ben-Zimra, 2002). It has also been proposed that LBP (Long Terminal Repeat Binding Proteins) identified in the syncytiotrophoblast might assume the regulator role of SF-1, binding to the region -155 to -131 of the promoter of the genes that allow the expression of P450_{scc}. LBP-1b would act as an activator of the expression of P450_{scc}, whereas LBP-9 and LBP-32 would act as repressors (Henderson et al., 2008; LaVoie & King, 2009).

6. Conclusion

On the whole, the information shows that mitochondria isolated from human placenta are an appropriate model to study the mechanisms of cholesterol transport. The physiological difference between human placenta and other steroidogenic organs make the human syncytiotrophoblast a particular tissue, which maintains a functional independence while allowing the interaction between the mother and the fetus to successfully reach the full term of pregnancy in order to perpetuate the species.

7. Acknowledgements

The present work has the partial support of DGAPA, UNAM (IN202496, IN200399, IN203006, IN 217609), and CONACYT (26096M). The author thanks Dr. José Luis Pérez-García in the translation of the present chapter.

8. References

- Aldoretta, P.W. & Hay, W.W. (1995). Metabolic Substrates for Fetal Energy Metabolism and Growth. *Clinics in Perinatology*, Vol.22, No.1, (March 1995), pp.15-37, ISSN 0095-5108
- Allen, J.A; Shankara, T.; Janus, P.; Buck, S.; Diemer, T.; Hales, K.H. & Hales, D.B. (2006). Energized, Polarized, and Actively Respiring Mitochondria are Required for Acute Leydig Cell Steroidogenesis. *Endocrinology*, Vol.147, No.8, (August 2006), pp. 3924-3935, ISSN 0013-7227
- Alpy, F. & Tomasetto, C. (2006). MLN64 and MENTHO, Two Mediators of Endosomal Cholesterol Transport. *Biochemical Society Transactions*, Vol. 34, Pt.3, (June 2006), pp. 343- 345, ISSN 0300-5127
- Angiolini, E.; Fowden, A.; Coan, P.; Sandovici, I.; Smith, P.; Dean, W.; Burton, G.; Tycko, B.; Reik, W.; Sibley, C. & Contância, M. (2006). Regulation of Placental Efficiency for Nutrient Transport by Imprinted Genes. *Placenta*, Vol.27, Suppl A, (April 2006), pp. S98-102, ISSN 0143-4004
- Arakane, F.; Sugawara, T.; Nishino, H.; Liu, Z.; Holt, J.A.; Pain, D.; Stocco, D.M.; Miller, W.L. & Strauss J.F. 3rd. (1996). Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) Retains Activity in the Absence of its Aitochondrial Import Sequence: Implications for the Mechanism of StAR Action. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, Vol. 93, No. 24, (November 1996), pp. 13731-13736, ISSN 0027-8424
- Arnold, I.; Pfeiffer, K.; Neuport, W.; Stuart, R.A. & Schägger, H. (1998). Yeast Mitochondrial F1F0-ATP Synthase Exists as a Dimer: Identification of Three Dimer-Specific Subunits. *The EMBO Journal*, Vol.17, No.24, (December 1998), pp. 7170- 7178, ISSN 0261-4189
- Barash, V.; Reskin, A.; Shafrir, E.; Waddell, I.D. & Burchell, A. (1991). Kinetic and Immunologic Evidence for the Absence of Glucose-6-phosphatase in Early Human Chorionic Villi and Term Human Placenta. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.1073, No.1, (January 1991), pp. 161-167, ISSN 0304-4165
- Battaglia, F.C. (1989). An Update Off and Placental Metabolism: Carbohydrate and Amino Acids. *Biology of the Neonate*, Vol.55, No.6, pp. 347-354, ISSN 0006-3126

- Bauman, A.L. & Scott, J.D. (2002). Kinase- and Phosphatase-Anchoring Proteins: Harnessing the Dynamic Duo. *Nature Cell Biology*, Vol.4, No.8, (August 2002), pp. E203-E206, ISSN1465-7392
- Ben-Zimra, M.; Koler, M. & Orly, J. (2002). Transcription of Cholesterol Side-Chain Cleavage Cytochrome P450 in the Placenta: Activating Protein-2 Assumes the Role of Steroidogenic Factor-1by Binding to an Overlapping Promoter Element. *Molecular Endocrinology*, Vol.16, No.8, (August 2002), pp. 1864-1880, ISSN 0888-8809
- Bloxam, D.L. & Bobinski, P.M. (1984). Energy Metabolism and Glycolysis in the Human Placenta During Ischaemia and in Normal Labour. *Placenta*, Vol.5, No.5, (September-October 1984), pp. 381-394, ISSN 0143-4004
- Bose, H.S.; Whittal, R.M.; Huang, M.C.; Baldwin, M.A. & Miller, W.L. (2000). N-218 MLN64, a Protein with StAR-like Steroidogenic Activity, Is Folded and Cleaved Similarly to StAR. *Biochemistry*, Vol.39, No.38, (September 2000), pp. 11722-11731, ISSN 0006-2960
- Brand, C.; Cherradi, N.; Defaye, G.; Chinn, A.; Chambaz, E.M.; Feige, J.J. & Bailly, S. (1998). Transforming Growth Factor Beta1 Decreases Cholesterol Supply to Mitochondria Via Repression of Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression. *Journal of Biological Chemistry*, Vol.273, No.11, (March 1998), pp. 6410-6416, ISSN 0021-9258
- Cabezón, E.; Arechaga, I.; Jonathan, P.; Butler, G. & Walker, J.E. (2000). Dimerization of Bovine F1-ATPase by Binding the Inhibitor Protein, IF1. *Journal of Biological Chemistry*, Vol.275, No.37, (September 2000), pp. 28353-28355, ISSN 0021-9258
- Cammer, W. & Estabrook, R.W. (1967). Spectrophotometric Studies of the Pigments of Adrenal Cortex Mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol.122, No.3, (December 1967), pp. 735-747, ISSN 0003-9861
- Campanella, M.; Casswell, E.; Chong, S.; Farah, Z.; Wieckowski, M.R.; Abramov, A.; Y. Tinker, A. & Duchen, M.R. (2008). Regulation of Mitochondrial Structure and Function by the F1Fo-ATPase Inhibitor Protein, IF1. *Cell Metabolism*, Vol.8, No.1, (July 2008), pp. 13-25. ISSN 1550-4131
- Carter, A.M. (2000). Placental Oxygen Consumption. Part I: in vivo Studies-a Review. *Placenta*, Vol.21, Suppl. A, (March-April 2000), pp. S31-37, ISSN 0143-4004
- Chang, L. & Karin, M. (2001). Mammalian MAP Kinase Signalling Cascades. *Nature*, Vol.410, No.6824, (March 2001), pp. 37-40, ISSN0028-0836
- Cherradi, N.; Defaye, G. & Chambaz, E.M. (1994). Characterization of the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase Activity Associated With Bovine Adrenocortical Mitochondria. *Endocrinology*, Vol.134, No.3, (March 1994), pp. 1358-1364. ISSN 0013-7227
- Clarson, L.H.; Glazier, J.D.; Sides, M.K. & Sibley, C.P. (1997). Expression of the Facilitated Glucose Transporters (GLUT1 and GLUT3) by a Choriocarcionoma Cell Line (Jar) and Cytotrophoblast Cell in Culture. *Placenta*, Vol.18, No.4, (May 1997), pp. 333-339, ISSN 0143-4004
- Coleman, R.A. (1986). Placental Metabolism and Transport of Lipids. *Federation Proceedings*, Vol.45, No.10, (September 1986), pp. 2519-2523, ISSN 0014-9446
- Cooke, M.; Mele, P.; Maloberti, P.; Duarte, A.; Poderoso, C.; Orlando, U.; Paz, C.; Cornejo Maciel, F. & Podestá, E.J. (2011). Tyrosine Phosphatases as Key Regulators of Star Induction and Cholesterol Transport: SHP2 as a Potential Tyrosine Phosphatase

- Involved in Steroid Synthesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol.336, No.1-2, (April 2011), pp. 63-69, ISSN 0303-7207
- Corso, M. & Thomson, M. (2001). Protein Phosphorylation in Mitochondria from Human Placenta. *Placenta*, Vol.22, No.5, (May 2001), pp. 432-439, ISSN 0143-4004
- Cunningham, P. & McDermott, L. (2009). Long Chain PUFA Transport in Human Term Placenta. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Vol.139, No.4, (February-April 2009), pp. 636-639, ISSN 0002-9165
- De Los Rios Castillo, D.; Zarco-Zavala, M.; Olvera-Sanchez, S.; Pardo, J.P.; Juarez, O.; Martinez, F.; Mendoza-Hernandez, G.; Garcia-Trejo J.J. & Flores-Herrera O. (2011). Atypical Cristae Morphology of Human Syncytiotrophoblast Mitochondria. Role for Complex V. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol.286, No.27, (July 2011), pp. 23911-23919, ISSN 0021-9258
- Desoye, G. & Shafir, E. (1994). Placental Metabolisms and its Regulation in Health and Diabetes. *Molecular Aspects of Medicine*, Vol.15, No.6, pp. 505-682, ISSN 0098-2997
- Dodge-Kafka, K.L. & Kapiloff, M.S. (2006). The mAKAP Signaling Complex: Integration of AMPc, Calcium, and MAP Kinase Signaling Pathways. *European Journal of Cell Biology*, Vol.85, No.7, (July 2006), pp.593-602, ISSN 0171-9335
- Dominguez-Ramirez, L.; Mendoza-Hernandez, G.; Carabez-Trejo, A.; Gomez-Puyou, A. & Tuena de Gomez-Puyou, M. (2001). Equilibrium Between Monomeric and Dimeric Mitochondrial F1-inhibitor Protein Complexes. *FEBS Lett*, Vol.507, No.2, (October 2001), pp. 191- 194, ISSN 0014-5793
- Duan, L.; Yan, D.; Zeng, W.; Yang, X. & Wei, Q. (2010). Effect of Progesterone Treatment Due to Threatened Abortion in Early Pregnancy for Obstetric and Perinatal Outcomes. *Early Human Development*, Vol.86, No.1, (January 2010), pp. 41-3, ISSN 0378-3782
- Dudkina, N.V.; Heinemeyer, J.; Keegstra, W.; Boekema, E.J. & Braun, H.P. (2005). Structure of Dimeric ATP Synthase from Mitochondria: an Angular Association of Monomers Induces the Strong Curvature of the Inner Membrane. *FEBS Lett*, Vol.579, No.25, (October 2005), pp. 5769-5772, ISSN 0014-5793
- Dyson, M.T.; Jones, J.K.; Kowalewski, M.P.; Manna, P.R.; Alonso, M.; Gottesman, M.E. & Stocco, D.M. (2008). Mitochondrial A-Kinase Anchoring Protein 121 Binds Type II Protein Kinase A and Enhances Steroidogenic Acute Regulatory Protein-Mediated Steroidogenesis in MA-10 Mouse Leydig Tumor Cells. *Biology of Reproduction*, Vol.78, No.2, (February 2008), pp. 267-77, ISSN 0006-3363
- Espinosa-Garcia, M.T.; Strauss J.F. III & Martinez, F. (2000). A Trypsin-Sensitive Protein is Required for Utilization of Exogenous Cholesterol for Pregnenolone Synthesis by Placental Mitochondria. *Placenta*, Vol.21, No.7, (September 2000), pp. 654 -660, ISSN 0143-4004
- Fei, Y.J.; Prasad, P.D.; Leibach, F.H. & Ganapathy, V. (1995). The Amino Acid Transport System y⁺L Induced in *Xenopus laevis* Oocytes by Human Choriocarcinoma Cell (JAR) mRNA is Functionally Related to the Heavy Chain of the 4F2 Cell Surface Antigen. *Biochemistry*, Vol.34, No.27, (July 1995), pp. 8744-8751, ISSN 0006-2960
- Feliciello, A.; Gottesman, M.E. & Avvedimento, E.V. (2001). The Biological Functions of A-kinase Anchor Proteins. *Journal of Molecular Biology*, Vol.308, No.2, (April 2001), pp. 99-114, ISSN 0022-2836

- Feliciello, A.; Gottesman, M.E. & Avvedimento EV. (2005). cAMP-PKA Signaling to the Mitochondria: Protein Scaffolds, mRNA and Phosphatases. *Cell Signal*, Vol.17, No.3, (March 2005), pp. 279-87, ISSN 0898-6568
- Flores-Herrera, O.; Uribe, A.; Pardo, J.P.; Rendón, J.L. & Martínez, F. (1999). A Novel ATP-diphosphohydrolase from Human Term Placental Mitochondria. *Placenta*, Vol.20, No.5-6, (July-August 1999), pp. 475-484, ISSN 0143-4004
- Flores-Herrera, O.; Uribe, A.; García-Pérez, C.; Milán, R. & Martínez, F. (2002). 5-p-Fluorosulfonylbenzoyl Adenosine Inhibits Progesterone Synthesis in Human Placental Mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular and Cell Biology of Lipids*, Vol.1585, No.1, (November 2002), pp. 11-18, ISSN 1388-1981
- García, J.J.; Morales-Ríos, E.; Cortés-Hernandez, P. & Rodríguez-Zavala, J.S. (2006). The Inhibitor Protein (IF1) Promotes Dimerization of the Mitochondrial F1F0-ATP Synthase. *Biochemistry*, Vol.45, No.42, (October 2006), pp. 12695-12703, ISSN 0006-2960
- García-Pérez, C.; Pardo, J.P. & Martínez, F. (2002). Ca²⁺ Modulates Respiratory and Steroidogenic Activities of Human Term Placental Mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol.405, No.1, (September 2002), pp. 104-111, ISSN0003-9861
- Garlid, K.D. & Paucek, P. (2003). Mitochondrial Potassium Transport: the K⁺ Cycle. *Biochimica et Biophys Acta, Bioenergetics*, Vol.1606, No.1-3, (September 2003), pp. 23-41, ISSN 0005-2728
- Gómez-Concha, C.; Flores-Herrera, O.; Olvera-Sanchez, S.; Espinosa-Garcia, M.T. & Martínez, F. (2011). Progesterone Synthesis by Human Placental Mitochondria is Sensitive to PKA Inhibition by H89. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol.43 No.9, (September 2011), pp. 1402-11, ISSN: 1357-2725
- Gordon-Smith, D.J.; Carbajo, R.J.; Yang, J.; Videler, H.; Runswick, M.J.; Walker, J.E. & Neuhaus, D. (2001). Solution Structure of a C-terminal Coiled-coil Domain From Bovine IF(1): the Inhibitor Protein of F(1) ATPase. *Journal of Molecular Biology*, Vol.308, No.2, (April 2001), pp. 325-339, ISSN 0022-2836
- Gorostizaga A, Cornejo Maciel F, Brion L, Maloberti P, Podestá EJ, & Paz C. (2007). Tyrosine Phosphatases in Steroidogenic Cells: Regulation and Function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol.265-266, (February 2007), pp. 131-137, ISSN 0303-7207
- Hahn, T.; Barth, S.; Weiss, U.; Mosgoeeller, W. & Desoye, G. (1998). Sustained Hyperglycemia In Vitro Down-Regulates the GLUT1 Glucose Transport System of Cultured Human Term Placental Trophoblast: a Mechanism to Protect Fetal Development? *Federation of American Societies for Experimental Biology*, Vol. 12, No.12, (September 1998), pp. 1221-1231, ISSN 0892-6638
- Hahn, T.; Barth, S.; Graf, R.; Engelmann, M.; Beslagic, D.; Reul, J.M.; Holsboer, F.; Dohr, G. & Desoye, G. (1999). Placenta Glucose Transport Expression is Regulated by Glucorticoids. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol. 84, No.4, (April 1999), pp. 1445-1452, ISSN 0021-972X
- Hackenbrock, C.R. (1968). Ultrastructural Bases for Metabolically Linked Mechanical Activity in Mitochondria. II. Electron Transport-linked Ultrastructural Transformations in Mitochondria. *The Journal of Cell Biology*, Vol.37, (May 1968), No.2, pp. 345-69, ISSN 0021-9525

- Hackenbrock, C.R.; Rehn, T.G.; Weinbach, E.C. & Lemasters, J.J. (1971). Oxidative Phosphorylation and Ultrastructural Transformation in Mitochondria in the Intact Ascites Tumor Cell. *The Journal of Cell Biology*, Vol.51, (October 1971), No. 1, pp. 123-37, ISSN 0021-9525
- Hanguel, S.; Dezmaizieres, V. & Challier, J.C. (1986). Glucose Uptake, Utilization, and Transfer by The Human Placenta As Functions of Maternal Glucose Concentration. *Pediatric Research*, Vol.20, No.3, (March 1986), pp. 269-273, ISSN 0031-3998
- Hanukoglu, I. & Hanukoglu, Z. (1986). Stoichiometry of Mitochondrial Cytochromes P-450, Adrenodoxin and Adrenodoxin Reductase in Adrenal Cortex and Corpus Luteum. Implications for Membrane Organization and Gene Regulation. *European Journal of Biochemistry*, Vol.157, No.1, (Mayo 1986), pp. 27-31, ISSN 0014-2956
- Harding, B.W. & Nelson, D.H. (1966). Electron Carriers of the Bovine Adrenal Cortical Respiratory Chain and Hydroxylating Pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.241, No.10 (May 1966), pp. 2212-2219, ISSN 1864-6158
- Henderson, Y.C.; Frederick, M.J.; Wang, M.T.; Hollier, L.M. & Clayman, G.L. (2008). LBP-1b, LBP-9, and LBP-32/MGR Detected in Syncytiotrophoblasts from First-Trimester Human Placental Tissue and Their Transcriptional Regulation. *DNA and Cell Biology*, Vol.27, No.2, (February 2008), pp. 71-79, ISSN 1044-5498
- Hoeltzli, S.D. & Smith, C.H. (1989). Alanine Transport System in Isolated Basal Plasma Membrane of Human Placenta. *The American Journal of Physiology*, Vol.256, No.3-Pt1, (March 1989), pp. C630-C637, ISSN 0002-9513
- Hornstra, G.; Al, M.D.; van Houwelingen, A.C. & Foreman-van D. (1995). Essential Fatty Acids in Pregnancy and Early Human Development. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, Vol.61, No.1, (July 1995), pp. 57-62, ISSN 0301-2115
- Hu, J.; Zhang, Z.; Shen, W.J. & Azhar, S. (2010). Review Cellular Cholesterol Delivery, Intracellular Processing and Utilization for Biosynthesis of Steroid Hormones. *Nutrition and Metabolism*, Vol.7, (June 2010), pp. 47-72, ISSN 1743-7075
- Ingermann, R.L. (1987). Control of Placental Glucose Transfer. *Placenta*, Vol.8, no.6, (November-December 1987), pp. 557-571, ISSN 0143-4004
- Jefcoate, C.R.; Simpson, E.R.; Boyd, G.S.; Brownie, A.C. & Orme-Johnson, W.H. (1973). The Detection of Different States of the P-450 Cytochromes in Adrenal Mitochondria: Changes Induced by ACTH. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol.212, (June 1973), pp. 243-61, ISSN 0077-8923
- Kahn, B.B & Flier, J.S. (1990). Regulation of Glucose-Transporter Gene Expression in Vitro and In Vivo. *American Diabetes Association*, Vol.13, No. 6, (June 1990), pp. 548-564, ISSN 0149-5992
- Kasugai M, Kato H, Iriyama H, Kato M, Ninagawa T, & Tomoda Y. (1987). The Roles of Ca²⁺ and Adenosine 3', 5'-Monophosphate in the Regulation of Progesterone Production by Human Placental Tissue. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Vol.65, No.1, (July 1987), pp. 122-126, ISSN0021-972X
- Lavy, G.; Barnea, E.R. & Decherney, A.H. (1987). The Effect of Insulin on Oestradiol and Progesterone Release by Normal and Diabetic Placentae In Vitro. *Placenta*, Vol.8, No.4, (July-August 1987), pp. 443-8, ISSN 0143-4004

- LaVoie, H.A. & King, S.R. (2009). Transcriptional Regulation of Steroidogenic Genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Experimental Biology and Medicine*, Vol.234, No.8, (August 2009), pp. 880-907, ISSN 1535-3702
- Maldonado-Mercado, G.; Espinosa-Garcia, M.T.; Gomez-Concha, C.; Monreal-Flores, J. & Martinez, F. (2008). Steroidogenesis in BeWo Cells: Role of Protein Kinase A and Benzodiazepines. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol. 40, No.5, pp. 901-908, ISSN 1357-2725
- Malka, F.; Guillery O.; Cifuentes-Diaz, C.; Guillou, E.; Belenguer, P.; Lombes, A. & Rojo, M. (2005). Separate Fusion of Outer and Inner Mitochondrial Membranes. *European Molecular Biology Organization reports*, Vol.6, (September 2005), No.9, pp.853-859, ISSN 1469-221X
- Manna, P.R. & Stocco, D.M. (2005). Regulation of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression: Functional and Physiological Consequences. *Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, Vol.5, No.1, (March 2005), pp. 93 - 108, ISSN 1568-0088
- Manna, P.R.; Chandrala, S.P.; Jo, Y. & Stocco, D.M. (2006). cAMP-Independent Signaling Regulates Steroidogenesis in Mouse Leydig Cells in the Absence of StAR Phosphorylation. *Journal of Molecular Endocrinology*, Vol.37, No.1, (August 2006), pp. 81-95, ISSN 0952-5041
- Manna, P.R.; Dyson, M.T. & Stocco, D.M. (2009). Regulation of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein Gene Expression: Present and Future Perspectives. *Molecular Human Reproduction*, Vol.15, No.6, 8June 2009), pp. 321-33 ISSN 1360-9947
- Mannella, C.A.; Marko, M.; Penczek, P.; Barnard, D. & Frank, J. (1994). The Internal Compartmentation of Rat-Liver Mitochondria: Tomographic Study Using the High-Voltage Transmission Electron Microscope. *Microscopy Research Technique*, Vol.27, No.4, (March 1994), pp. 278-283, ISSN 1097-0029
- Mannella, C.A.; Marko, M. & Buttle, K. (1997). Reconsidering Mitochondrial Structure: New Views of an Old Organelle. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol.22, No.2, (February 1997), pp. 37-38, ISSN 0968-0004
- Martinez, F.; Chávez, E. & Echegoyen, S. (1987). Decreased Exchange of Adenine Nucleotides in Human Placental Mitochondria. *International Journal of Biochemistry*, Vol.19, No.3, pp. 275-279, ISSN 1357-2725
- Martinez, F.; Espinosa-García, M.T.; Flores-Herrera, O. & Pardo, J.P. (1993). Respiratory Control Induced by ATP in Human Term Placental Mitochondria. *Placenta*, Vol.14, No.3, (May-June 1993), pp. 321-331. ISSN 0143-4004
- Martinez, F.; Pardo, J.P.; Fores-Herrera, O. & Espinosa-García, M.T. (1995). The Effect of Osmolarity on Human Placental Mitochondria Function. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol.27, No.8, (August 1995), pp. 795-803, ISSN 1357-2725
- Martinez, F. & Strauss J.F. III (1997). Regulation of Mitochondrial Cholesterol Metabolism. In: *Subcellular Biochemistry: Cholesterol: its Functions and Metabolism in Biology and Medicine*. Bittman, R., pp. 205-234, Plenum Press, ISBN 0306454785/0-306-45478-5, N.Y., USA.
- Martinez, F.; Kiriakidou, M. & Strauss J.F. III (1997). Structural and Functional Changes in Mitochondria Associated with Trophoblast Differentiation: Methods to Isolate Enriched Preparations of Syncytiotrophoblast Mitochondria. *Endocrinology*, Vol.138, No.5 (May 1997), pp. 2172-2183, ISSN 0013-7227

- Matalon, R. & Michals, K. (1984). Gluconeogenic Enzymes in the Human Placenta. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, Vol.7, No.4, (1984), pp. 179-181, ISSN 0141-8955
- Matthews, H.R. (1995). Protein Kinases and Phosphatases that Act on Histidine, Lysine, or Arginine Residues in Eukaryotic Proteins: A Possible Regulator of the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade. *Pharmacology & Therapeutics*, Vol.67, No.3, pp. 323-350, ISSN 0163-7258
- Matsubara, S.; Takizawa, T. & Sato, I. (1999). Glucose-6-Phosphatase is Present in Normal and Preeclamptic Placental Trophoblasts: Ultrastructural Enzyme-Histochemical Evidence. *Placenta*, Vol. 20, No.1, (January 1999), pp. 81-85, ISSN 0143-4004
- Milan, R.; Flores-Herrera, O.; Espinosa-Garcia, M.T.; Olvera-Sanchez, S. & Martinez, F. (2010). Contribution of Potassium in Human Placental Steroidogenesis. *Placenta*, Vol.31, No.10, (August-October 2010), pp. 860-866, ISSN 0143-4004
- Miller, W.L. (2005). Minireview: Regulation of Steroidogenesis by Electron Transfer. *Endocrinology*, Vol.146, No.6, (June 2005), pp.2544-2550, ISSN 0013-7227
- Meigs, R.A. & Ryan, K.J. (1968). Cytochrome P-450 and Steroid Biosynthesis in the Human Placenta. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.165, No.3, (October 1968), pp. 476-82, ISSN 0006-3002
- Minauro-Sanmiguel, F.; Wilkens, S. & Garcia, J.J. (2005). Structure of Dimeric Mitochondrial ATP Synthase: Novel F₀ Bridging Features and the Structural Basis of Mitochondrial Cristae Biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, Vol.102, No.35, (August 2005), pp. 12356-12358, ISSN 1091-6490
- Moe, A.J. (1995). Placental Amino Acid Transport. *The American Journal of Physiology*, Vol.268, No.6, Pt1, (June 1995), pp. C1321-C1331, ISSN 0002-9513
- Moe, A.J.; Farmer, D.R.; Nelson, D.M. & Smith, C.H. (1991). Pentose Phosphate Pathway in Cellular Trophoblast From Full-Term Human Placentas. *The American Journal of Physiology*, Vol.261, No.6Pt1, (December 1991), PP. C1042-1047, ISSN 0363-6127
- Moog-Lutz, C.; Tomasetto, C.; Régnier, C.H.; Wendling, C.; Lutz, Y.; Muller, D.M.; Chenard, B.P. & Rio, M. (1997). MLN64 Exhibits homology with the Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) and is Over-Expressed in Human Breast Carcinomas. *International Journal of Cancer*, Vol.71, No.2, (April 1997), pp. 183-191, ISSN 0020-7136
- Munn, E.A. (1974). The Structure of Mitochondria, In: *The cell*, Saunders, W.B., pp. 414-419, Academic Press, ISBN 0-7216-3584-9, Germany.
- Négríé, C.; Triadou, N.; Michel, O.; Bouhnik, J. & Michel, R. (1979). Oxidative Phosphorylation Reactions and Cholesterol Hydroxylation Mechanisms in Human Term Placental Mitochondria. *Journal of Steroid Biochemistry*, Vol.11, No.2, (August 1979), pp. 1135-40, ISSN 0022-4731
- Nestler, J.E. (1987). Modulation of Aromatase and P450 Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme Activities of Human Placental Cytotrophoblasts by Insulin and Insulin-Like Growth Factor I. *Endocrinology*, vol.121, No.5, (November 1987), pp. 1845-1852, ISSN 0013-7227
- Nicastro, D.; Frangakis, A.S.; Typke, D. & Baumeister, W. (2000). Cryo-Electron Tomography of Neurospora Mitochondria. *Journal of Structural Biology*, Vol.129, No.1, (February 2000), pp. 48-56, ISSN 1047-8477

- Olivera, A.A. & Meigs, R.A. (1975). Mitochondria From human Term Placenta. I. Isolation and Assay Conditions for Oxidative Phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta, Bioenergetics*, Vol.376, No.3, (March 1975), pp. 426-435, ISSN 0005-2728
- Olvera-Sanchez, S.; Espinosa-Garcia, M.T.; Monreal, J.; Flores-Herrera, O. & Martinez F. (2011). Mitochondrial Heat Shock Protein Participates in Placental Steroidogenesis. *Placenta*, Vol.32, No.3, (March-June 2011), pp. 222-229. ISSN 0143-4004
- Palinski, W. (2009). Maternal- Fetal cholesterol transport in the placenta. Good, Bad and Target for Modulation. *Circulation Research*, Vol.104, No.5, (March 2009), pp. 569-571, ISSN 0009-7330
- Paumard, P.; Vaillier, J.; Couлары, B.; Schaeffer, J.; Soubannier, V.; Mueller, D.M.; Brethes, D.; di Rago, J.P. & Velours, J. (2002). The ATP Synthase is Involved in Generating Mitochondrial Cristae Morphology. *The EMBO Journal*, Vol.21, No.3, (February 2002), pp. 221-230, ISSN 0261-4189
- Payne, A.H. & Hales, D.B. (2004). Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones. *Endocrine Reviews*, Vol.25, No.6, (December 2004), pp. 947-970, ISSN 0163-769X
- Pellegrini, L. & Scorrano, L. (2007). A Cut Short to Death: Parl and Opa1 in the Regulation of Mitochondrial Morphology and Apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, Vol.14, No.4, (July 2007), pp. 1275-1284, ISSN 1350-9047
- Pepe, G.J. & Albretch, E.D. (1999). Regulation of Functional Differentiation of the Placental Villous Syncytiotrophoblast by Estrogen During Primate Pregnancy. *Steroids*, Vol.64, No.9, (September 1999), pp. 624-627 ISSN: 0039-128X
- Perkins, G.A.; Renken, C.W.; Martone, M.E.; Young, S.J.; Ellisman, M. & Frey, T. (1997). Electron Tomography of Neuronal Mitochondria: Three-Dimensional Structure and Organization of Cristae and Membrane Contacts. *Journal of Structural Biology*, Vol.119, No.3, (August 1997), pp. 260-272, ISSN 1047-8477
- Perkins, G.A.; Song, J.Y.; Tarsa, L.; Deerinck, T.J.; Ellisman, M.H. & Frey, T.G. (1998). Electron Tomography of Mitochondria from Brown Adipocytes Reveals Crista Junctions. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, Vol.30, No.5, (October 1998), pp. 431-442, ISSN 0145-479X
- Perkins, G.A.; Renken, C.W.; Frey, T.G. & Ellisman, M.H. (2001a). Membrane Architecture of Mitochondria in Neurons of the Central Nervous System. *Journal of neuroscience research*, Vol.66, No.5, (December 2001), pp. 857-865, ISSN 0360-4012
- Perkins, G.A.; Renken, C.W.; van der Klei, I.J.; Ellisman, M.H. & Neupert, W. (2001b). Electron Tomography of Mitochondria After the Arrest of Protein Import Associated with Tom19 Depletion. *European Journal of Cell Biology*, Vol.80, No.2, (February 2001), pp. 139-150, ISSN 0171-9335
- Perkins, G.A.; Ellisman, M.H. & Fox, D.A. (2003). Three-Dimensional Analysis of Mouse Rod and Cone Mitochondrial Cristae Architecture: Bioenergetic and Functional Implications. *Molecular Vision*, Vol.9, (March 2003), pp. 60-73, ISSN 1090-0535
- Piquard, F.; Schaefer, A.; Dellenbach, P. & Haberey, P. (1990). Lactate Movements in the Human Placenta In Situ. *Biology of the Neonate*, Vol.58, No.2, pp. 61-68, ISSN 0006-3126
- Prendergast, C.H.; Parker, K.H.; Gray, R.; Venkatesan, S.; Bannister, P.; Castro-Soares, J.; Murphy, K.W.; Beard, R.W.; Regan, L.; Robinson, S.; Steer, P.; Halliday, D. &

- Johnston, D.G. (1999). Glucose Production by the Human Placenta In Vivo. *Placenta*, Vol.20, No.7, (September 1999), pp. 591-598, ISSN 0143-4004
- Prince, F.P. (2002). Lamellar and Tubular Associations of the Mitochondrial Cristae: Unique Forms of the Cristae Present in Steroid-Producing Cells. *Mitochondrion*, Vol.1, No.4, (February 2002), pp. 381-389, ISSN 1567-7249
- Puttick, J.; Baker, E.N. & Delbaere, L.T. (2008). Histidine Phosphorylation in Biological Systems. *Biochimica et Biophysica Acta, Proteins and Proteomics*, Vol.1784, No.1, (January 2008), pp. 100-105, ISSN 1570-9639
- Reichert, A.S. & Neupert, W. (2002). Contact Sites Between the Outer and Inner Membrane of Mitochondria-Role in Protein Transport, *Biophysica Acta Molecular Cell Research*, Vol.1592, No.1, (September 2002), pp. 41-49, ISSN 0167-4889
- Ringler, G.E.; Kao, L.C.; Miller, W.L. & Strauss, J.F. III (1989). Effects of 8-Bromo-cAMP on Expression of Endocrine Functions by Cultured Human Trophoblast cells. Regulation of Specific mRNAs. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol.61, No.1, (Jan 1989), pp. 13-21, ISSN 0303-7207.
- Ritvos, O. (1988). Modulation of Steroidogenesis in Choriocarcinoma Cells by Cholera Toxin, Phorbol Ester, Epidermal Growth Factor and Insulin-Like Growth Factor I. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol.59, No.1-2, (September 1988), pp. 125-133, ISSN 0303-7207
- Rossignol, R.; Gilkerson, R.; Aggeler R.; Yamagata, K.; Remington, S.J. & Capaldi, R.A. (2004). Energy Substrate Modulates Mitochondrial Structure and Oxidative Capacity in Cancer Cells. *American Association for Cancer Research*, vol.64, (February 2004), No.3, pp. 985-893, ISSN 0008-5472
- Sands, W. & Palmer, T.M. (2008). Regulating Gene Transcription in Response to Cyclic AMP Elevation. *Cellular Signaling*, Vol.20 No.3, (March 2008), pp.460-466, ISSN 0898-6568
- Schimmer, B.P. & White, P.C. (2010). Steroidogenic Factor 1: Its Roles in Differentiation, Development, and Disease. *Molecular Endocrinology*, Vol.24, No.7, (July 2010), pp. 1322-1337, ISSN 0888-8809
- Schneider, H.; Malek, A.; Duft, R. & Bersinger, N. (1988). Evaluation of an In Vitro Dual Perfusion System for the Study of Placental Proteins: Energy Metabolism. In: *Placenta as a model and a source*, Genbacev, O.; Klopper, A. & Beaconsfield. R., pp. 39-50, Plenum Press, ISBN 0306432382, New York, USA
- Schägger, H. & Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the Respiratory Chains of Yeast and Mammalian Mitochondria. *The EMBO Journal*, Vol.19, No.8, (April 2000), pp. 1777-1783, ISSN 0261-4189
- Shelley, H.J. (1979). Transfer of Carbohydrates, In: *Placental transfer*, Chamberlain, G. & Wilkinson, A.W. pp. 118-1412, Pitman Medical, ISBN 0272795313, Ithaca, New York, USA
- Shi, C.Z. & Zhuang, L.Z. (1993). Stimulatory Effect of Norepinephrine on Progesterone Production by Human First Trimester Placenta Explants In Vitro. *Life Sciences*, Vol.52, No.20, pp. 1657-65, ISSN 0024-3205
- Simpson, E.R. & Miller, D.A. (1978). Cholesterol Side-Chain Cleavage, Cytochrome P450, and Iron-Sulfur Protein in Human Placental Mitochondria. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol.190, No.2, (October 1978), pp. 800-808, ISSN 0303-7207

- Spät, A. & Pitter, J.G. (2004). The Effect of Cytoplasmic Ca²⁺ Signal on the Redox State of Mitochondrial Pyridine Nucleotides. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol. 215, No.1-2, (February 2004), pp. 115-118, ISSN 0303-7207
- Stocco, D.M. (2000). Intramitochondrial Cholesterol Transfer. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular and Cell Biology of Lipids*, Vol.1486, No.1, (June 2000), pp.184-197, ISSN 1388-1981
- Stocco, D.M.; Wang, X.; Jo, Y. & Manna, P.R. (2005). Multiple Signaling Pathways Regulating Steroidogenesis and Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression: More Complicated than we Thought. *Molecular Endocrinology*, Vol.19, No.11, (November 2005), pp.2647-2659, ISSN0888-8809
- Strauss, J.F. III; Kido, S.; Sayegh, R.; Sakuragi, N. & Gafvels, M.E. (1992). The cAMP Signalling System and Human Trophoblast Function. *Placenta*, Vol.13, No.5, (September-October 1992), pp. 389-403, ISSN 0143-4004
- Strauss, J.F. III; Martinez, F. & Kiriakidou, M. (1996). Placental Steroid Hormone Synthesis: Unique Features and Unanswered Questions. *Biology of Reproduction*, Vol.54, No.2, (February 1996), pp. 303-311, ISSN 0006-3363
- Strauss, M.; Hofhaus, G.; Schröder, R.R. & Kühlbrandt, W. (2008). Dimer Ribbons of ATP Synthase Shape the Inner Mitochondrial Membrane. *The EMBO Journal*, Vol.27, No.7, (April 2008), pp. 1154-1160, ISSN 0261-4189
- Strushkevicha, N.; MacKenziea, F.; Cherkesovab, T.; Grabovecb, I.; Usanovb, S. & Parka, H.W. (2011). Structural Basis for Pregnenolone Biosynthesis by the Mitochondrial Monooxygenase System. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. Vol.108, No.25, (June 2011), pp. 10139-10143 ISSN 0027-8424
- Stulc, J.; Stulcová, B. & Sibley, C.P. (1995). Mechanisms of the Fetomaternal Transfer of Na⁺ Across the Dually Perfused Placenta of the Rat. *Placenta*, Vol.16, No.2, (March 1995), pp. 127-135, ISSN 0143-4004
- Stulc, J. (1997). Placental Transfer of Inorganic Ions and Water. *Physiological Reviews*, Vol.77, No.3, (July 1997), pp. 805-836, ISSN 0031-9333
- Thomson, M. (2002). Evidence of Undiscovered Cell Regulatory Mechanisms: Phosphoproteins and Protein Kinases in Mitochondria. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol.59, No.2, (February 2002), pp. 213-219, ISSN: 1420-682X
- Trost, M.; Bridon, G.; Desjardins, M. & Thibault, P. (2010). Subcellular Phosphoproteomics, In: *Mass Spectrometry Reviews*, Vol.29, No.6, (November-December 2010), pp. 962-990 ISSN 1098-2787
- Tuckey, R.C. (1992). Cholesterol Side-Chain Cleavage by Mitochondria from the Human Placenta. Studies Using Hydroxycholesterols as Substrates. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Vol.42, No.8, (September 1992), pp. 883-890, ISSN 0960-0760
- Tuckey, R.C. & Headlam, M.J. (2002). Placental Cytochrome P450_{sc} (CYP11A1): Comparison of Catalytic Properties Between Conditions of Limiting and Saturating Adrenodoxin Reductase. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Vol.81, No.2, (June 2002), pp. 153-158, ISSN 0960-0760
- Tuckey, R. C. (2005). Progesterone Synthesis by the Human Placenta, *Placenta*, Vol.26, No.4, (April 2005), pp. 273-281. ISSN 0143-4004
- Uribe, A.; Flores-Herrera, O.; Rendón, J.L.; Espinosa-García, M.T. & Martinez, F. (1999). Presence of Two Enzymes, Different from the F₁F₀-ATPase, Hydrolyzing

- Nucleotides in Human Term Placental Mitochondria. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol.31, No.2, (February 1999), pp. 319-330. 1357-2725
- Uribe, A.; Strauss J.F. III & Martinez, F. (2003). Contact Sites from Human Placental Mitochondria. Characterization and Role in Progesterone Synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol.413, No.2, (May 2003), pp. 172-181, ISSN 0003-9861
- Ville, C.A. (1953). The Metabolism of Human Placenta In Vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.205, No.1, (November 1953), pp. 113-123, ISSN 0021-9258
- Wollet, L. (2005). Maternal Cholesterol in Fetal Development: Transport of Cholesterol from Maternal to the Fetal Circulation. *The American journal of clinical nutrition*, Vol.82, No.6, (December 2005), pp. 1155-1161, ISSN 0002-9165
- Xu, X.; Xu, T.; Robertson, D.G & Lamberth, J.D. (1989). GTP Stimulates Pregnenolone Generation in Isolated Rat Adrenal Mitochondria. *Journal of Molecular Biology*, Vol.264, No.30, (October 1989), pp. 17674-17680, ISSN 0022-2836
- Young, M.P. & Schneider, H. (1984). Metabolic Integrity of the Isolated Perfused Lobule of Human Placenta. *Placenta*, Vol.5, No.2, (March-April 1984), pp. 95-104. ISSN 0143-4004
- Yudilevich D.L. & Sweiry J.H. (1985). Transport of Amino Acids in the Placenta. *Biochimica et Biophys Acta*, Vol.822, No.2, (September 1985), pp. 169-201, ISSN 0006-3002
- Zosmer, A.; Elder, M.G. & Sullivan, M.F. (1997). Second Messenger and the Control of Progesterone Production from First Trimester Trophoblast. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Vol.62, No.2-3, (June 1997), pp. 201-205, ISSN 0960-0760

INTECH



Recent Advances in Research on the Human Placenta

Edited by Dr. Jing Zheng

ISBN 978-953-51-0194-9

Hard cover, 428 pages

Publisher InTech

Published online 07, March, 2012

Published in print edition March, 2012

This book contains the total of 19 chapters, each of which is written by one or several experts in the corresponding field. The objective of this book is to provide a comprehensive and most updated overview of the human placenta, including current advances and future directions in the early detection, recognition, and management of placental abnormalities as well as the most common placental structure and functions, abnormalities, toxicology, infections, and pathologies. It also includes a highly controversial topic, therapeutic applications of the human placenta. A collection of articles presented by active investigators provides a clear update in the area of placental research for medical students, nurse practitioners, practicing clinicians, and biomedical researchers in the fields of obstetrics, pediatrics, family practice, genetics, and others who may be interested in human placentas.

How to reference

In order to correctly reference this scholarly work, feel free to copy and paste the following:

Federico Martinez, Rebeca Milan, Oscar Flores-Herrera, Sofia Olvera-Sanchez, Erika Gomez-Chang and Maria Teresa Espinosa-Garcia (2012). The Role of Mitochondria in Syncytiotrophoblast Cells: Bioenergetics and Steroidogenesis, Recent Advances in Research on the Human Placenta, Dr. Jing Zheng (Ed.), ISBN: 978-953-51-0194-9, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-research-on-the-human-placenta/the-role-of-mitochondria-in-syncytiotrophoblast-cells-bioenergetics-and-steroidogenesis>

INTECH

open science | open minds

InTech Europe

University Campus STeP Ri
Slavka Krautzeka 83/A
51000 Rijeka, Croatia
Phone: +385 (51) 770 447
Fax: +385 (51) 686 166
www.intechopen.com

InTech China

Unit 405, Office Block, Hotel Equatorial Shanghai
No.65, Yan An Road (West), Shanghai, 200040, China
中国上海市延安西路65号上海国际贵都大饭店办公楼405单元
Phone: +86-21-62489820
Fax: +86-21-62489821