

00551
16



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

**EFEECTO DEL POTASIO SOBRE LA SINTESIS DE
PROGESTERONA EN MITOCONDRIAS DE LA
PLACENTA HUMANA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)

P R E S E N T A:
QFB. REBECA ETELVINA / MILAN CHAVEZ

TUTOR: DR. FEDERICO MARTINEZ MONTES



MEXICO, D. F.

JUNIO 2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

EFFECTO DEL POTASIO SOBRE LA SÍNTESIS DE PROGESTERONA EN MITOCONDRIAS DE LA PLACENTA HUMANA

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de Maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Federico Martínez Montes en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Oscar Flores Herrera por la elaboración de la figura 14 de este trabajo.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Federico Martínez Montes Facultad de Medicina

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez Facultad de Medicina

Dra. Marina Gavilanes Ruiz Facultad de Química

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (37263 M) y por PAEP- UNAM (IN220802).

El jurado del Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente Dra. Marina Gavilanes Ruiz

Vocal Dr. Luis Vaca Domínguez

Secretario Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Suplente Dr. Gerardo Gamba Ayala

Suplente Dr. Salvador Uribe Carvajal

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

Resumen	6
Introducción	
- Generalidades de los Tejidos Esteroidogénicos	7
- El Transporte de Colesterol	11
- Los Puntos de Unión	12
- Papel del Potasio en las Células Esteroidogénicas	15
- Esteroidogénesis en la Placenta Humana	17
Hipótesis	21
Objetivo General	21
Objetivos Particulares	21
Materiales y Métodos	
- Aislamiento de las Mitocondrias de la Placenta Humana (MPH)	22
- Hidrólisis de ATP y ADP en las MPH	22
- Consumo de Oxígeno de las MPH	23
- Incorporación de Colesterol	24
- Síntesis de Progesterona	25

Resultados

- Hidrólisis de Nucleótidos 25
- Consumo de Oxígeno 32
- Síntesis de Progesterona 34
- Incorporación de Colesterol 38

Discusión 43

Conclusiones 48

Perspectivas 48

Bibliografía 49

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resumen

En algunas células esteroidogénicas el K^+ participa como un modulador de la síntesis de hormonas esteroides. Sin embargo, no existe información acerca del papel fisiológico del K^+ en la placenta humana.

Se estudió el efecto del potasio sobre varias funciones mitocondriales, en presencia y ausencia de nucleótidos de adenina. En las mitocondrias de la placenta, el K^+ estimula la síntesis de progesterona, así como en la incorporación de colesterol, la cual se favorece en presencia de K^+ y ATP. El ATP favorece la síntesis de progesterona en las mitocondrias de la placenta humana, lo que sugiere que al igual que en otros tejidos esteroidogénicos es necesario el uso de energía para el transporte de colesterol hacia las membranas mitocondriales y de ahí hacia el citocromo P450_{scc}. Este proceso se favorece cuando se encuentra presente en el medio tanto el K^+ como el ATP. Se sugiere que tanto el K^+ como el ATP pudieran modular el transporte de colesterol y la síntesis de progesterona.

Los datos muestran el papel bioquímico que tiene el K^+ vía de síntesis de progesterona en las mitocondrias aisladas, pero todavía falta conocer el papel fisiológico que tiene este catión en las células de la placenta humana.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

Generalidades de los tejidos Esteroidogénicos

Los tejidos esteroideogénicos sintetizan diversas hormonas como los glucocorticoides, mineralocorticoides, progestágenos, estrógenos y andrógenos, utilizando al colesterol como sustrato. Sin embargo, el colesterol no solamente se emplea para llevar a cabo la síntesis de las hormonas esteroideas, sino que es uno de los principales componentes de la membrana celular. Su presencia permite la curvatura de la membrana al intercalarse entre los fosfolípidos de la bicapa, además de regular su fluidez [1], aumentando la resistencia celular al daño físico. La distribución del colesterol en la membrana plasmática es asimétrica, dando como origen la formación de microdominios; que parece estar relacionada con la concentración de esfingomielina. Estos microdominios podrían estar involucrados en mecanismos de transducción de señales, así como en la asociación y distribución de lípidos y proteínas membranales [2,3], pero el mecanismo que está mediando la distribución de colesterol en las diversas membranas celulares todavía no se conoce [4]. La distribución asimétrica del colesterol no es exclusiva de la membrana plasmática, sino que también se presenta en las membranas de los distintos orgánulos [5]. Se sabe que la concentración de colesterol en la membrana plasmática de cualquier tipo celular sano es de aproximadamente 30 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína [6], mientras que su concentración disminuye en las membranas intracelulares, siendo la membrana interna de la mitocondria la que presenta la concentración de colesterol más baja, entre 3 a 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína.

TECNOLOGÍA
FALLA DE ORIGEN

Debido a la importancia que tiene el colesterol en la fisiología de la célula, su metabolismo está altamente regulado y depende de tres procesos que son: 1) El aporte de colesterol a la célula a través de la captación de las lipoproteínas de baja densidad por medio de receptores membranales específicos, así como también de su síntesis de novo en cantidad suficiente para satisfacer las necesidades celulares. Estos dos mecanismos participan en la homeostasis en la concentración de colesterol celular. 2) Su incorporación y distribución a las diversas membranas o bien en los depósitos específicos si las células los presentan. 3) Por último, su transformación en sales biliares y en hormonas esteroideas.

Dado el papel que tienen estas hormonas para la comunicación intercelular, es necesario conocer los mecanismos que regulan su síntesis. La biosíntesis de las hormonas esteroides se inicia con el transporte del colesterol desde sus depósitos en el citoplasma hasta la membrana externa mitocondrial y de ahí a la membrana interna, en donde se encuentra la cadena del citocromo P450_{scc} (side cleavage chain). Esta cadena se encuentra formada por la adrenodoxina reductasa que recibe los electrones provenientes del NADPH, una adrenodoxina y el propio citocromo P450_{scc}, que corta la cadena lateral del colesterol una vez que éste ha sido reducido dando origen a la pregnenolona [7], la cual es precursora tanto de la progesterona como de otras hormonas esteroides [8]. En todos los tejidos esteroideogénicos se considera al transporte de colesterol del citoplasma a las mitocondrias como el paso limitante de la vía [9]. La velocidad de síntesis de esteroides en los diferentes tejidos está controlada por la presencia de diversas hormonas pépticas específicas para cada tejido. Por ejemplo la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) aumenta la síntesis de glucocorticoides en la corteza suprarrenal de las células de la fasciculata;

mientras que la angiotensina II (All) y el potasio (K^+) aumentan la síntesis de mineralocorticoides en las células suprarrenales de la glomerulosa; [10], la gonadotropina coriónica (GC) o la hormona luteinizante (LH) estimulan la síntesis de progesterona en las células del cuerpo lúteo [11], y la LH incrementa la síntesis de testosterona en las células de Leydig [12].

En la mayoría de los tejidos esteroideogénicos la respuesta celular a un estímulo hormonal consta de dos fases; la primera es denominada aguda, en la cual hay un aumento en la captación de colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) [13], así como su movilización de los depósitos específicos hacia la mitocondria ocasionando un aumento en la concentración de colesterol disponible para el citocromo P450_{scc}, e incrementando la síntesis de pregnenolona. Esta fase ocurre en los primeros 5 minutos después de que se lleva a cabo la unión de la hormona con su receptor, y no hay síntesis de novo de las enzimas de la cadena asociada al citocromo P450_{scc}. La segunda fase de la respuesta es la lenta o trófica, existe una estimulación en la transcripción del ADN como respuesta al estímulo hormonal, lo que permite mantener los niveles apropiados de enzimas y proteínas que se encargan del transporte de colesterol así como de aquellas que constituyen la cadena de electrones asociada al citocromo P450_{scc} [14].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

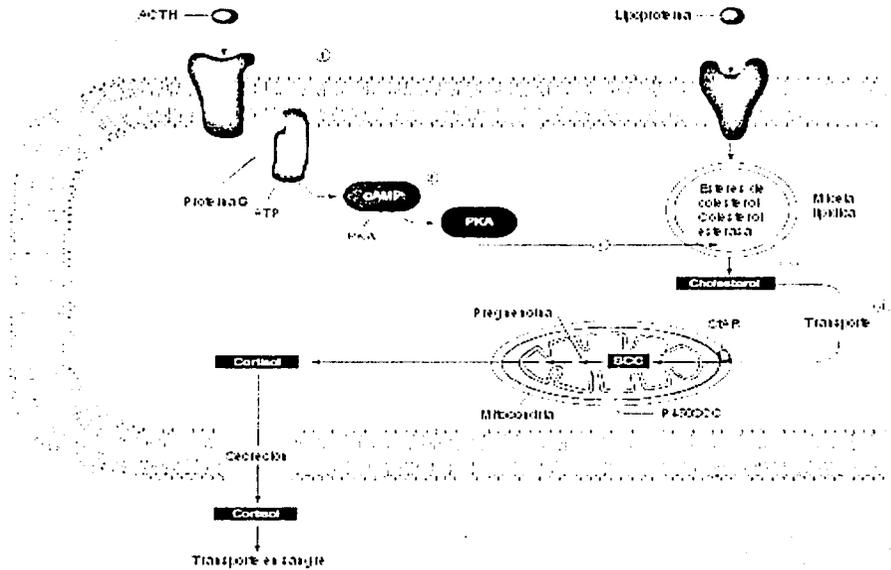


Figura 1. Esquema general de la síntesis de hormonas esteroideas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El Transporte de Colesterol

En estudios realizados en las glándulas suprarrenales, se encontró que las proteínas que se encargan del transporte intracelular del colesterol se pueden dividir en dos grupos: I) aquellas que transportan al colesterol desde el citoplasma a la membrana externa de la mitocondria y II) las que lo transfieren desde la membrana externa mitocondrial a la interna. Algunas de estas proteínas incluyen a la proteína acarreadora de esteroides (SCP2 del inglés Sterol Carrier Protein), la cual tiene un peso molecular de 13 kDa e *in vitro* es capaz de llevar a cabo la transferencia de varios esteroides. En condiciones fisiológicas la SCP2 presenta una pobre actividad de transporte de colesterol, además de una baja especificidad para movilizar este esteroide [15]. En las glándulas suprarrenales un estímulo con la ACTH, promueve el transporte de colesterol desde el citoplasma hasta las mitocondrias donde se acumula; después de tratar a las células por 24 horas con la hormona aumenta la enzima presente en el citoplasma[16]; no obstante, el papel de la SCP2 en el metabolismo esteroideogénico aún no es claro. En este tipo celular también se encuentra presente el péptido activador de la esteroideogénesis (SAP del inglés Steroidogenic Activator Polypeptide), el cual tiene un peso molecular de 2.2 kDa, y es el producto de la hidrólisis de la proteína de choque térmico GRP-78; esta hidrólisis es promovida por AMPc [17]. La SAP requiere GTP para transportar al colesterol entre las membranas mitocondriales hasta el citocromo P450_{scc}. Se ha demostrado que la presencia de SAP no es esencial para llevar a cabo el transporte de colesterol, por lo cual no se le considera como una proteína indispensable de la esteroideogénesis [18].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR Steroidogenic Acute Regulatory), también está involucrada en el metabolismo hormonal. Tiene un peso molecular de 30 kDa y se expresa de manera abundante en las gónadas y la corteza suprarrenal, así como también en tejidos no esteroideos como el riñón. De manera particular, la placenta humana que es un tejido esteroidogénico, no expresa la proteína StAR [19]. Después de presentarse el estímulo hormonal (ACTH, LH o HCG) existe un aumento del RNAm para la proteína StAR mediado por el AMPc. El precursor de StAR se sintetiza rápidamente durante la fase aguda de la esteroidogénesis, el cual experimenta dos cortes proteolíticos en el extremo N-terminal [20] dando origen a la forma madura de la proteína, la cual es degradada una vez que ha transportado el colesterol a la membrana interna y se encuentra dentro de la mitocondria [21]. Hasta el momento, la StAR es la única proteína la cual ha demostrado un papel indispensable en la esteroidogénesis, ya que su ausencia provoca la enfermedad congénita denominada hiperplasia adrenal lipóide [22]. El mecanismo mediante el cual la proteína StAR transfiere el colesterol entre las membranas mitocondriales no ha sido establecido, sin embargo se ha propuesto que pudiera ser a través de la formación de puntos de unión entre las membranas mitocondriales.

Los Puntos de Unión en las Mitocondrias

La presencia de sitios de contacto o puntos de unión entre las membranas mitocondriales se describió por primera vez por Hackenbrock en 1968 [23], siendo definidos como los sitios en los cuales se realiza una semifusión de las membranas mitocondriales. La formación de los puntos de unión es un proceso dinámico, cuyas estructuras agregan y disgregan constantemente en la mitocondria [24]. Los puntos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de unión participan en el transporte de las proteínas mitocondriales que se sintetizan en el citoplasma, en el metabolismo energético, así como en el proceso apoptótico. Debido a la estructura que presentan los puntos de unión han sido propuestos como la vía de ingreso del colesterol a la membrana interna mitocondrial.

En los estudios llevados a cabo en las glándulas suprarrenales, el grupo de Kimura [25], observó que al estimular a las células con ACTH se presentaba un aumento en la velocidad de síntesis de fosfolípidos, lo que resultaba en un incremento en la concentración de fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina en la membrana mitocondrial externa [26], así como en un aumento en la concentración de Ca^{2+} libre en la matriz mitocondrial [24,25]. Esto favorece un cambio conformacional de la bicapa lipídica hacia la fase hexagonal, a través de la cual se puede favorecer el transporte de colesterol entre las membranas mitocondriales y, por lo tanto, se proporciona el sustrato para la esteroidogénesis. En este modelo propuesto por Kimura [25] no se toma en cuenta la existencia de las proteínas transportadoras de colesterol descritas anteriormente.

De manera alternativa, el grupo de Jefcaote [27] propuso como modelo de los puntos de unión aquel en el cual se incluye la información reportada para las mitocondrias de hígado de rata durante la fosforilación oxidativa, así como la presencia de la creatina cinasa, que se encuentra en el espacio intermembranal en forma de dímeros y que al formarse el punto de unión se autoasocia a una configuración octamérica [28]. Al parecer, la creatina cinasa se une con la porina que está asociada a la membrana externa mitocondrial y con el translocador de adenín nucleótidos, el cual se localiza en la membrana interna de la mitocondria, formándose un microcompartimento que funciona como un túnel que permite el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

intercambio de moléculas [29]. En estos puntos de unión también se ha descrito la presencia de la glutatión transferasa y de una fosfoproteína de 30 kDa, la cual pudiera estar directamente relacionada con el transporte de colesterol, además de la adenilato cinasa, la nucleótido difosfocinasa [27] y el receptor de benzodiazepinas. Este receptor ha sido asociado a algunas funciones fisiológicas como son los procesos de proliferación y crecimiento celular [30], y en los tejidos esteroideogénicos su presencia es abundante, por lo que se ha sugerido que su presencia pudiera estar relacionada con la esteroideogénesis [31], aunque no hay datos que lo confirmen. En respuesta al estímulo hormonal por ACTH, este receptor se encuentra formando agregados de cuatro a seis moléculas, lo que favorece la formación de un poro mitocondrial o de puntos de unión entre las membranas, lo que facilitaría el transporte de colesterol [32].

La formación de los puntos de unión no solamente se favorecida por los cambios en la composición lipídica y la estructura membranal, y por la asociación de diferentes enzimas que permiten la formación de un canal a través del cual se pueden transportar diversas moléculas, sino que también el aumento en el volumen mitocondrial favorece la aparición de los sitios de contacto. El grupo de Lambeth y Stevens en 1985 [33], demostraron que en las glándulas suprarrenales existe un cambio en el volumen mitocondrial después de presentarse el estímulo con la ACTH, lo que podría favorecer la presencia de los sitios de contacto. El estímulo hormonal puede generar un cambio en la concentración de iones, lo cual resulta en un cambio en la actividad mitocondrial.

Los cambios en la actividad celular y mitocondrial asociados a la presencia de iones han sido estudiados por el grupo de Hollan, el cual ha demostrado que al aislar

a las mitocondrias del hígado de la rata en medios que contenían KCl o NaCl como agentes osmóticos, existía un aumento en el volumen de la matriz mitocondrial y una disminución de la fuerza protón-motriz [34]. Uno de los cationes cuya concentración en la célula se encuentra altamente regulada es el K^+ , ya que un aumento en su concentración citoplasmática conlleva a un hinchamiento mitocondrial. Este fenómeno ha sido descrito por Halestrap [35], quien describe que los cambios en la concentración de K^+ en la mitocondria producen un aumento del volumen de la matriz, que a su vez estimula el consumo mitocondrial de oxígeno (estado 3 de la respiración mitocondrial) que favorece la síntesis de ATP y la oxidación de sustratos en el ciclo de Krebs.

Papel del Potasio en las Células Esteroidogénicas

Las glándulas suprarrenales se encuentran dividida en tres regiones denominadas granulosa (superficial) que sintetiza aldosterona, fasciculata que se sintetiza cortisol y corticoesterona, y la reticular en la cual se sintetiza dehidroepiandrosterona y androstenodiona. La esteroidogénesis en las diversas regiones se encuentra regulada por la presencia por varias hormonas de origen peptídico.

En las células de la glomerulosa el estímulo puede estar dado por ACTH, así como por la presencia de angiotensina II (Ang II), la cual activa a la fosfolipasa C liberando diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) [36]. El diacilglicerol activa la proteína cinasa C fosforilando diversas proteínas, entre ellas la StAR. Adicionalmente el IP_3 aumenta la concentración de calcio intracelular al estimular la liberación de éste de sus depósitos celulares [37,38].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sin embargo, las células de la glomerulosa no solamente responden a la presencia de Ang II, sino que otro de los agonistas para la síntesis de aldosterona es el K^+ , [39] es capaz de abrir los canales de calcio dependientes de voltaje del tipo L y T [40]. Los canales de tipo L se caracterizan por permitir la entrada de Ca^{2+} de manera sostenida, su regulación está mediada por la vía de la fosforilación de proteínas dependientes de AMPc, su inhibición por agentes farmacológicos como la dihidropiridinas y benzodiazepinas [41]. Por otra parte, los canales tipo T se caracterizan por su rápida inactivación, permitiendo un flujo transitorio de Ca^{2+} y son insensibles a los antagonistas para Ca^{2+} [42]. El aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular a través de estos canales, favorece un aumento de la expresión de la proteína StAR, estimulando la síntesis de aldosterona. [43]

El citocromo P450_{scc} se encuentra formando agregados con otras proteínas de la membrana interna mitocondrial, ya que la formación del complejo ternario funcional con la NADPH-adrenoxina reductasa y la adrenoxina requiere del desplazamiento del citocromo P450_{scc} rompiendo estos agregados. Esta ruptura puede promoverse mediante un cambio en la concentración de potasio mitocondrial [44]. Al propiciar la agregación entre las enzimas que forman a la cadena de electrones asociada al citocromo P450_{scc} se favorece la transferencia de los electrones y protones que proceden del NADPH hasta el colesterol, y se estimula la vía de síntesis de progesterona.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

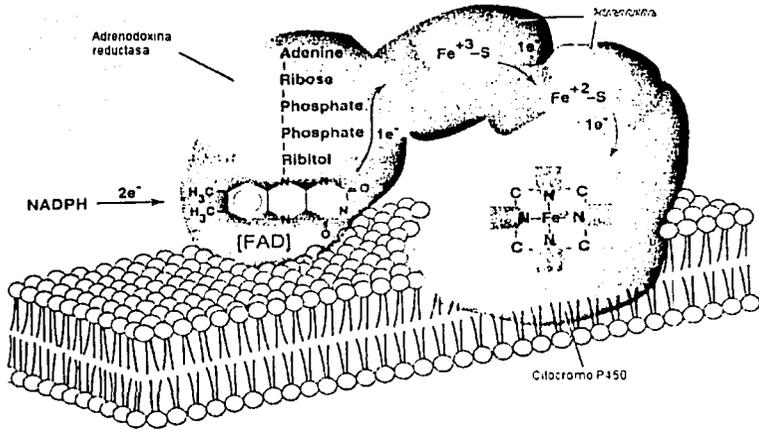


Figura 2. Adrenoxina reductasa, Adrenoxina y Citocromo P450.

Esteroidogénesis en la Placenta Humana

La placenta es un tejido esteroidogénico transitorio que se encarga del intercambio de una gran variedad de metabolitos entre la madre y el feto. La placenta cuenta con diversos sistemas de transporte que le permiten satisfacer las necesidades del feto. Asimismo, la placenta es capaz de sintetizar hormonas proteicas y esteroides. Entre las hormonas proteicas se encuentra la gonadotropina coriónica (hCG), que regula la síntesis de progesterona en el ovario durante el

primer trimestre del embarazo, así como la decidualización del endometrio y de esta forma permite la implantación del embrión [45,46]. Otra hormona proteica sintetizada por la placenta es el lactógeno placentario (hPL), que se encarga de regular el crecimiento fetal [47,48]. La prolactina decidual (dPRL) es una hormona proteica que se encarga de regular el volumen y la concentración iónica en el líquido amniótico, además de impedir que se lleve a cabo la contracción uterina [45].

Entre las hormonas esteroideas la placenta sintetiza más de 300 mg/día de progesterona durante el último trimestre del embarazo. En el inicio del embarazo, la progesterona actúa como un agente inmunosupresor, permitiendo la implantación del óvulo fecundado [49,50] y la continuidad del embarazo, por lo cual una disminución de la progesterona sanguínea trae consigo un aborto espontáneo. Durante el primer trimestre del embarazo el cuerpo lúteo es el principal productor de progesterona y a partir del segundo trimestre la placenta comienza a ser la fuente más importante de síntesis de progesterona, permitiendo el desarrollo fetal [51]. Al igual que en otros tejidos esteroideogénicos, en la placenta se considera al transporte de colesterol hacia el citocromo P450sc como el paso limitante de la síntesis hormonal.

En muchos tejidos, el transporte de colesterol en las gónadas y glándulas suprarrenales está mediado por la proteína STAR; sin embargo, las células del trofoblasto, que son las células activas de la placenta, no cuentan con la proteína STAR. La ausencia de esta proteína en la placenta se confirmó mediante el uso de técnicas de inmunohistoquímica y de biología molecular [19].

La ausencia placentaria de la proteína STAR se describió inclusive en embarazos cuyos productos presentaron el síndrome de hiperplasia adrenal lipóide, el cual se caracteriza por la incapacidad de la célula para movilizar el colesterol hacia

la mitocondria para su transformación en pregnenolona, presentándose una acumulación de colesterol en el citoplasma [52]. Estos resultados indican que la placenta humana no requiere de la proteína StAR para realizar sus funciones esteroidogénicas, y que la modulación de la síntesis de progesterona debe involucrar otros mecanismos.

Al igual que en los otros tejidos esteroideos, el transporte de colesterol en las células del trofoblasto es llevado a cabo por proteínas. Una de estas proteínas que pudiera tener un papel importante en la esteroidogénesis placentaria es la MLN64, la que probablemente sustituya a la proteína StAR transportando el colesterol [53]. La presencia de la proteína MLN64 se describió por primera vez en las células de cáncer de ovario y glándula mamaria [54] y presenta una alta identidad con la proteína StAR; las dos proteínas cuentan con un dominio llamado START, el cual se ha relacionado con la capacidad de fijar colesterol, facilitando su transporte hacia la membrana interna mitocondrial [55]. Al transfectar células COS-1 con la proteína MLN64 y la cadena del citocromo P450_{scc}, se observó un aumento en la síntesis de progesterona de casi el doble, con lo cual se demostró la participación de esta proteína en la esteroidogénesis [56].

Otra de las proteínas que se encuentra involucrada en el transporte de colesterol en las mitocondrias de la placenta humana es una porina, identificada con base a la secuencia que presenta en su amino terminal, la cual concuerda con la de las porinas de la membrana externa mitocondrial. Esta porina tiene un peso molecular aproximado de 30-34 kDa, [57]. Se ha descrito que algunas porinas unen colesterol facilitando su incorporación a las membranas mitocondriales [58], y su presencia ha sido descrita en los puntos de unión que ya se mencionaron. No

solamente se requiere de esta porina para llevar a cabo la incorporación de colesterol en las mitocondrias de la placenta humana, sino que también se ha descrito la participación de una ATP-difosfohidrolasa (apirasa). La apirasa se encuentra fuertemente unida a las membranas mitocondriales [59]. Su participación en la incorporación de colesterol se demostró cuando las mitocondrias fueron sometidas a un tratamiento con tripsina en la cual se perdió la actividad hidrolítica de esta enzima y la concentración de colesterol presente en las mitocondrias no aumentó al adicionar colesterol externo, sugiriendo que la apirasa podría participar en este proceso [59].

En la actualidad no se conoce el mecanismo mediante el cual se regula la síntesis de progesterona en la placenta humana ni la participación de cada una de las proteínas mencionadas en este proceso, ya que se desconoce si la placenta presenta una respuesta de tipo aguda a un estímulo hormonal como sucede en otros tejidos esteroideogénicos. Si dejar a un lado la respuesta al estímulo hormonal uno de los posibles mecanismos de modulación por el cual la síntesis de progesterona podría ser regulada es la concentración de cationes.

Al igual que en otros tejidos, la concentración de K^+ presente en la placenta está modulada por los diferentes tipos de canales. Se han descrito cambios de tipo morfológico en las mitocondrias de la placenta humana aisladas en un medio isoosmótico de K^+ en lugar de sacarosa como agente osmótico, por lo cual estos cambios morfológicos no están asociados con la osmolaridad de medio. Las mitocondrias de la placenta humana no presentan cambios en su actividad metabólica ni de transporte cuando se inducen cambios de osmolaridad por medio de sacarosa, sin embargo estos cambios sí se observan cuando se utiliza K^+ para variar

la osmolaridad. Esto ha permitido sugerir que el K^+ podría estar involucrado en el mecanismo de regulación de síntesis de progesterona *in vitro*.

HIPÓTESIS

Si la concentración de K^+ se encuentra modulada en las mitocondrias de la placenta humana entonces cambios en la misma podrían modificar su actividad y por lo tanto servir como un sistema regulatorio de la síntesis de progesterona.

OBJETIVO GENERAL

Establecer el papel que tiene el potasio en la esteroidogénesis mitocondrial de la placenta humana.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el papel del K^+ sobre la actividad hidrolítica de la ATP-difosfohidrolasa (apirasa).
- Evaluar el papel del K^+ sobre la respiración mitocondrial.
- Determinar el efecto del K^+ en la síntesis de progesterona.
- Determinar el papel del K^+ en la incorporación de colesterol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de las Mitocondrias de la Placenta Humana (MPH)

Las mitocondrias se obtuvieron de placentas humanas a término y fueron procesadas dentro de los primeros 30 minutos después de su expulsión según el método reportado por Martínez y cols. en 1987 [61]. El tejido se mantuvo en un baño de hielo y se lavó en un medio de sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM pH 7.4 (medio sacarosa-EDTA). Se extrajeron los cotiledones de la placenta y se homogenizó con un Polytron en dos pulsos de 45 segundos cada uno. El homogenado se centrifugó a 1,250 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se centrifugó a 4,068 x g durante 10 minutos para quitar las mitocondrias pesadas provenientes del citotrofoblasto. Nuevamente se recuperó el sobrenadante, el cual contenía las mitocondrias del sincitiotrofoblasto [62] y se centrifugó a 10,250 x g durante 12 minutos a 4°C para recuperar las mitocondrias, las cuales se resuspendieron en el medio de sacarosa-EDTA y se centrifugaron a 1,250 x g durante 2 minutos a 4°C para eliminar los eritrocitos contaminantes. Finalmente el sobrenadante se centrifugó a 11,220 x g durante 10 minutos a 4°C y el paquete mitocondrial se resuspendió en un volumen mínimo de sacarosa-EDTA. La proteína mitocondrial se cuantificó por el método de Lowry [63], utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

Hidrólisis de ATP y ADP en las MPH

La actividad de hidrólisis de ATP y ADP se determinó en las MPH en un medio que contenía 10 mM malato, 0.2% BSA, 1mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7.0, 1 mM MgCl₂ y concentraciones crecientes de K⁺ (20-100 mM). Para mantener constante la osmolaridad del medio (250 mOsm) se emplearon diferentes concentraciones de sacarosa. El volumen final de la mezcla de reacción fue 500 µl, la concentración de

proteína fue de 50 μg y la temperatura de 37°C. La reacción se inició adicionando 2 mM de ATP o ADP. Al cabo de 5 minutos se detuvo la reacción enzimática con ácido tricloroacético frío a una concentración final de 6%. La mezcla se centrifugó a 2,500 x g por 15 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó para cuantificar la cantidad de fosfato libre mediante el método de Sumner [64]

Consumo de Oxígeno de las MPH

El consumo de oxígeno de las MPH se cuantificó polarográficamente utilizando un electrodo tipo Clark y un oxímetro marca YSI, modelo 53. Se usó un medio que contenía 10 mM malato-glutamato, 0.2% BSA, 10 mM H_3PO_4 y concentraciones crecientes de K^+ (20-100 mM). La osmolaridad se ajustó a 250 mOsm con sacarosa. El estado 3 de la respiración se estimuló con la adición de 250 nmolas de ADP.

Incorporación de Colesterol a las MPH

Para medir la incorporación de colesterol en las mitocondrias de la placenta humana se utilizó el método reportado por el grupo de Martínez y cols. en 1988 [65]. Se preincubaron a las MPH por 10 min a 37°C en presencia de diferentes concentraciones de K^+ (20 a 100 mM) y 30 μg de colesterol/ mg de proteína del complejo colesterol-albúmina sérica bovina (C-BSA) en 200 μl del medio empleado para determinar la hidrólisis de nucleótidos.

Para detener la reacción de incorporación de colesterol a las mitocondrias, las muestras se diluyeron 5 veces con sacarosa-EDTA fría. La fracción mitocondrial se recuperó por centrifugación. La dilución de la muestra se realizó dos veces más para

eliminar el colesterol no incorporado y se determinó la concentración de proteína y colesterol en cada una de las muestras.

La cantidad de colesterol se cuantificó con un estuche comercial (Spinreact, S.A. Ctra Santa Coloma, España) que emplea colesterol esterasa y colesterol oxidasa, así como peroxidasa y 4-aminoantipirina como cromógeno, cuya longitud de onda de absorción es de 550 nm.

Síntesis de Progesterona

La síntesis de progesterona se realizó después de incubar por 5 min a 37°C un mg de proteína mitocondrial por ml en presencia de diferentes concentraciones de K^+ (20-100 mM) utilizando el mismo medio empleado para llevar a cabo la hidrólisis de nucleótidos. La reacción se inició adicionando las mitocondrias al medio de reacción. La concentración de progesterona se cuantificó con un estuche comercial de radioinmunoensayo donde se empleó ^{125}I -progesterona (Diagnostic Products Corporation, Los Ángeles, California).

Los reactivos empleados fueron de la mejor calidad disponible.

RESULTADOS

Hidrólisis de Nucleótidos

Se estudió el efecto del K^+ sobre la actividad de la ATP-difosfohidrolasa. Esta enzima se encuentra asociada a la membrana interna mitocondrial y se ha sugerido que el sitio catalítico está orientado hacia el espacio intermembranal [59].

Como se muestra en la figura 3 existe un aumento de un 140% en la actividad hidrolítica de esta enzima en presencia de ATP y 100 mM de KCl. Como se describió en la sección de Métodos, se mantuvo la osmolaridad constante a 250 mOsm, con lo cual se descartó un efecto producido por cambios de osmolaridad de la matriz mitocondrial. Al realizar el experimento en presencia de 10 mM de glutamato/malato se evita que el ATP sea hidrolizado por la F_1-F_0 , ya que se encuentra funcionando en el sentido de síntesis de ATP y no de la hidrólisis del mismo.

Asimismo, se determinó la hidrólisis del complejo $ATP-Mg^{2+}$ en presencia de concentraciones crecientes de Na^+ , se empleó este catión como un control para descartar un efecto debido a la fuerza iónica. Como se puede observar en la figura 4 no hubo cambios en la actividad hidrolítica de la enzima en presencia de Na^+ . Con este experimento se demuestra que el efecto del K^+ es específico y no se debido a la carga del catión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

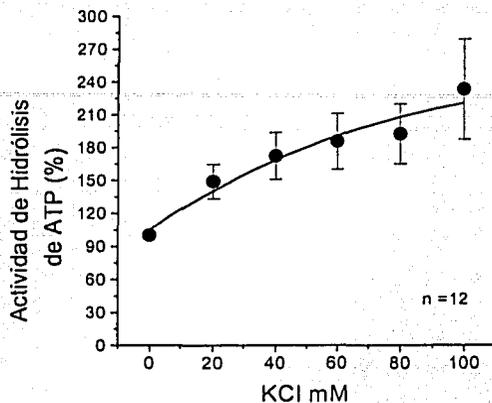


Figura 3. Efecto del K^+ sobre la actividad de hidrólisis del complejo $ATP-Mg^{2+}$ por la ATP -difosfohidrolasa. Se determinó la actividad en el medio que contenía 10 mM malato, 0.2% BSA, 1mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7.0, 1 mM $MgCl_2$ y concentraciones crecientes de K^+ (20-100 mM). Para mantener constante la osmolaridad del medio (250 mOsm) se emplearon diferentes concentraciones de sacarosa. El volumen final de la mezcla de reacción fue 500 μ l, la concentración de proteína fue de 50 μ g y la temperatura de 37°C. La reacción se inició adicionando 2 mM de ATP o ADP . Al cabo de 5 minutos se detuvo la reacción enzimática con ácido tricloroacético frío a una concentración final de 6%. La mezcla se centrifugó a 2,500 x g por 15 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó para cuantificar la cantidad de fosfato libre mediante el método de Sumner [64]. Las barras representan el error estándar. Los datos son el promedio de 12 experimentos realizados de manera independiente. La actividad del control fue de 85.6 nmolas de PI /mg/min.

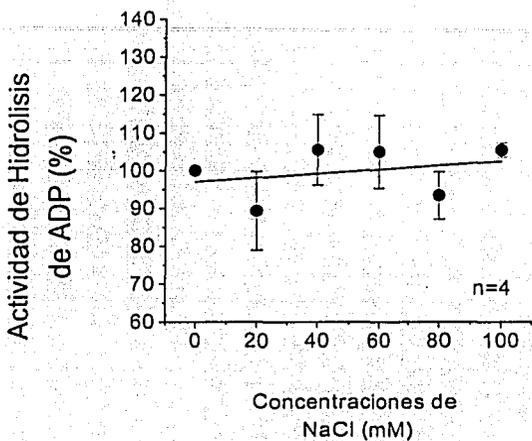


Figura 4. Efecto del Na^+ sobre la actividad de hidrólisis del complejo ATP-Mg^{2+} por la $\text{ATP-difosfohidrolasa}$. Se determinó la actividad en el medio descrito en la figura 3. Los datos son el promedio de 4 experimentos independientes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La ATP-difosfohidrolasa también hidroliza nucleótidos difosfatados [66] por lo cual se cuantificó su actividad hidrolítica en presencia de ADP como sustrato con concentraciones crecientes de potasio. Como se observa en la figura 5, la estimulación inducida por la presencia del K^+ fue solamente de un 25%. En el caso de la hidrólisis de ADP hay que tener en cuenta que no solamente la ATP-difosfohidrolasa es capaz de utilizar al nucleótido, sino que se encuentran otras proteínas que son capaces de competir por éste, entre las cuales se encuentra el traslocador de los adenín nucleótidos.

También en este caso se realizó el experimento en presencia de Na^+ , sin observar efectos sobre la actividad de hidrólisis del ADP por la ATP-difosfohidrolasa, como se muestra en la figura 6.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

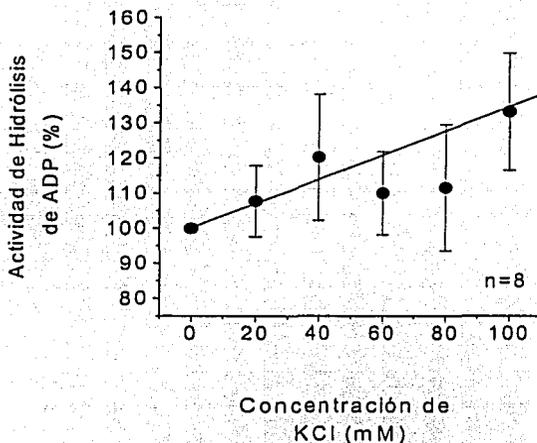


Figura 5. Efecto de la concentración de K^+ sobre la actividad de hidrólisis de ADP por la ATP-difosfohidrolasa. Se determinó la actividad en el medio descrito en la figura 3. Los datos son el promedio de 8 experimentos realizados de manera independiente y las barras representan su error estándar. La actividad del control fue de 70.87 nmolas $PI/mg/min$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

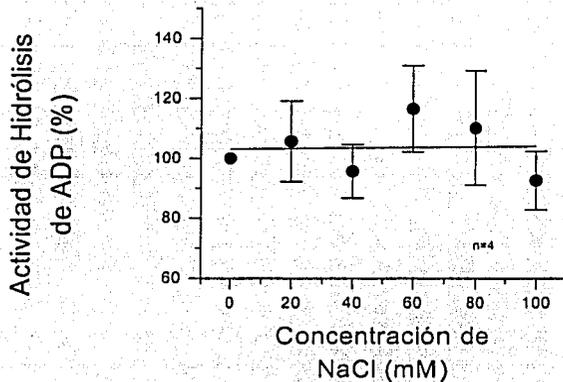


Figura 6. Efecto de la concentración de Na^+ sobre la actividad de hidrólisis de ADP por la ATP-difosfohidrolasa. Se determinó la actividad en el medio descrito en la figura 3. Las barras representan el error estándar. Los datos son el promedio de 4 experimentos independientes. La actividad del control fue de 55.56 nmolas $\text{Pi}/\text{mg}/\text{min}$.

Los cambios observados en la actividad de la apirasa podrían deberse a un efecto directo del K^+ sobre la enzima aunque se conoce que requiere la presencia de cationes divalentes para llevar a cabo hidrólisis de nucleótidos di y trifosfatados, bien podría tener un sitio para unir al K^+ y de esta forma modificar su actividad. En la figura 7 se trabajó con la fracción parcialmente pura de la apirasa y no se observó ningún cambio en la actividad de la apirasa al cambiar la concentración de K^+ .

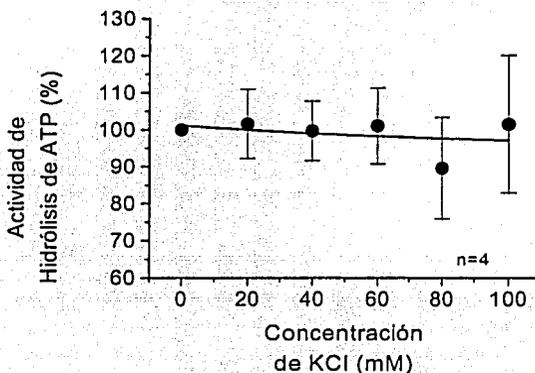


Figura 7. Efecto del K^+ sobre la hidrólisis de ATP en la fracción de la ATP-difosfohidrolasa parcialmente purificada. Se determinó la actividad en el medio descrito en la figura 3. Las barras representan el error estándar. Los datos son el promedio de 4 experimentos independientes. La actividad del control fue de 218 nmolas de PI/mg/min.

Consumo de Oxígeno

Los cambios en la concentración de potasio presente en la mitocondria han sido asociados con variaciones en su actividad respiratoria, en particular con un aumento en el consumo de oxígeno a partir de una estimulación del estado 3 de la respiración mitocondrial [35].

Las mitocondrias de la placenta humana en presencia de glutamato-malato como sustrato presentaron una estimulación de la velocidad de consumo de oxígeno en el estado 3 de un 11% en presencia de KCl 100 mM. Las variaciones que presentó el estado 4 son semejantes a las observadas en el estado 3 de la respiración, lo que permitió que el control respiratorio se mantuviese sin cambios. Al mantener la osmolaridad constante en 250 mOsm nos aseguramos que el efecto que se observa es debido al ión.

Una de las principales funciones de las mitocondrias de la placenta humana es la síntesis de progesterona, por lo cual cambios en los estados respiratorios pueden verse reflejados en variaciones de la síntesis de progesterona y pudiera ser que no se encuentren asociados específicamente con el sistema fosforilante de las mitocondrias, al contrario de lo que ocurre en las mitocondrias de hígado de rata.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

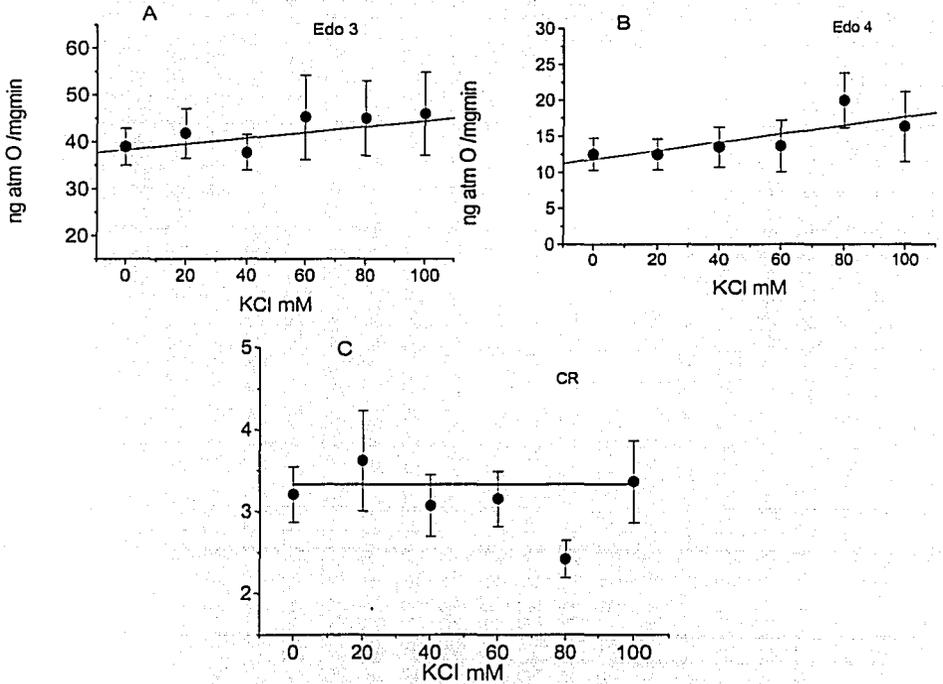


Figura 8. Efecto del K^+ sobre los parámetros respiratorios en las mitocondrias de la placenta. A) Consumo de oxígeno en el estado 3. B) Consumo de oxígeno en estado 4 de la respiración. C) Control respiratorio. Las barras indican el error estándar de una $n = 4$ determinaciones independientes.

Síntesis de Progesterona

Los cambios en la actividad de las mitocondrias de la placenta humana debido a la presencia de potasio se vieron reflejados en un aumento en la síntesis de progesterona. Como se observa en la figura 9, la sola presencia del potasio fue capaz de estimular la síntesis de progesterona hasta en un 28% con 100 mM de KCl.

La síntesis de progesterona se ve favorecida en presencia de nucleótidos, los cuales se han asociado como moléculas que dan la energía necesaria para que se lleve a cabo el transporte de colesterol entre las membranas mitocondriales [66].

En presencia de ATP se observó que la síntesis de progesterona aumentó de manera lineal conforme se aumentó la concentración de K^+ presente en el medio siendo esta de hasta un 66.7% con 100 mM de KCl se muestra en la figura 10 si se tiene en cuenta que la sola presencia de potasio fue capaz de aumentar la síntesis de progesterona, entonces la estimulación neta del ATP fue del 38.7% con 100 mM de KCl.

En presencia de ADP se observó un aumento del 62.97% con 100 mM de KCl en la síntesis de progesterona, pero si se toma en cuenta la estimulación producida por la sola presencia de 100 mM de KCl, el ADP indujo un incremento neto del 34.97% como se muestra en la figura 11.

La apirasa presente en las mitocondrias de la placenta humana hidroliza nucleótidos di y trifosfatados es llevada a cabo por la apirasa y se ha reportado que esta enzima pudiera estar relacionada con la síntesis de progesterona [67], la forma en el cual esta enzima pudiera estar involucrada en este proceso es que al hidrolizar a los nucleótidos se proporciona la energía necesaria para llevar a cabo el transporte de colesterol.

TEXTO CON
FALLA DE ORIGEN

Los sitios precisos en los cuales el K^+ fue capaz de producir la estimulación sobre la síntesis de progesterona y el efecto del nucleótido sobre ésta en presencia del catión no se determinaron todavía, aunque los datos sugieren que la estimulación no es sinérgica y posiblemente actúan de manera distinta.

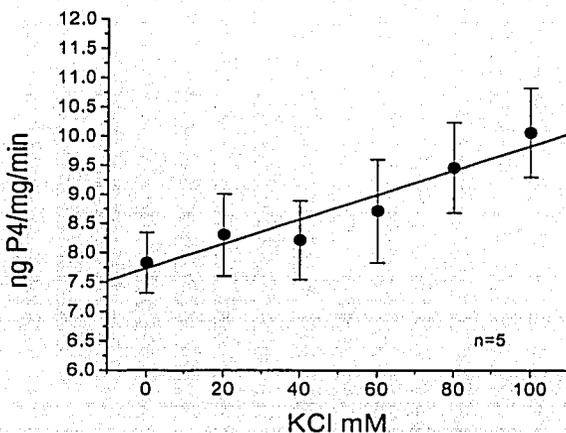


Figura 9. Efecto del K^+ sobre la síntesis de progesterona en las mitocondrias de la placenta humana. El medio de reacción se describió en la sección de Materiales y Métodos. Los datos son el promedio de 5 experimentos realizados de manera independiente. Los puntos representan la media de los mismos y la barra indica su error estándar.

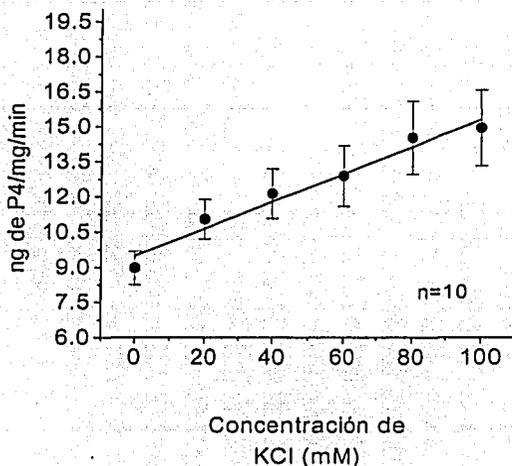


Figura 10. Síntesis de progesterona en presencia de ATP 2 mM. El medio de la reacción se describió en la sección de Métodos. Los datos son el promedio de 10 experimentos realizados de manera independientes. Los puntos son la media de los experimentos y las barras representan el error estándar.

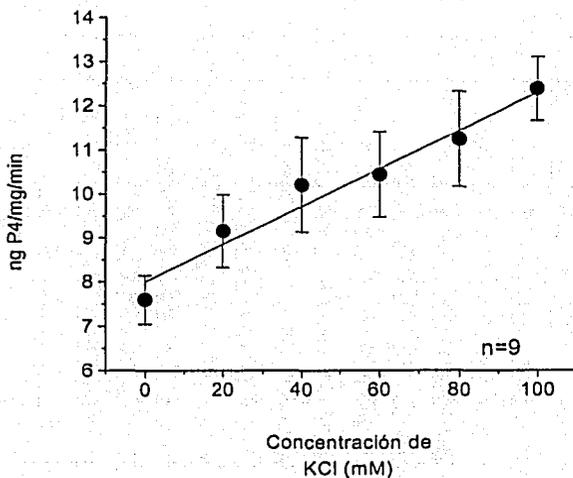


Figura 11. Efecto del K^+ en presencia de ADP 2 mM sobre la síntesis de progesterona El medio de la reacción de describió en la sección de Métodos. Las barras representan el error estándar y la media esta representada por los puntos. Los datos son 9 experimentos realizados de manera independiente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Incorporación de Colesterol

La incorporación de colesterol en las mitocondrias de la placenta se favorece por ATP o ADP. En trabajos previos se observó que al tratar las mitocondrias con tripsina, la actividad de hidrólisis de la apirasa disminuye significativamente y la cantidad de colesterol que se incorpora en la mitocondria se reduce [59].

La concentración de colesterol presente en las mitocondrias de la placenta humana fue de 35.6 μg de colesterol/mg de proteína; en presencia del complejo colesterol-albúmina y ATP la concentración mitocondrial de colesterol incrementó a 105.63 μg de colesterol/mg, lo que indica que la sola presencia del nucleótido estimuló aproximadamente 4 veces la concentración de colesterol. Conforme la concentración de potasio aumenta, la cantidad total de colesterol que se incorpora a las mitocondrias es de 130.58 μg de colesterol/mg con 100 mM de KCl, lo que significa que la sola presencia de potasio es capaz de facilitar en un 25% la incorporación de colesterol, como se muestra en la figura 12.

En presencia de ADP la cantidad de colesterol incorporada por las mitocondrias es de 84.36 μg de colesterol/mg, siendo esta cantidad 3 veces mayor con respecto a la concentración de colesterol que presentan las mitocondrias control. Como se muestra en la figura 13, los cambios en la concentración de potasio permiten una incorporación de colesterol de un 20% (98.77 μg de colesterol/mg) en presencia de 100 mM de KCl.

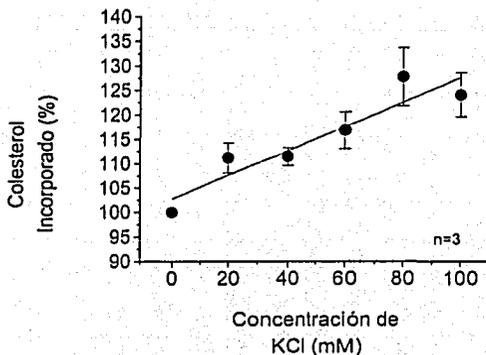


Figura 12. Incorporación de colesterol en presencia de 2 mM ATP. Las barras representan el error estándar y la media está representada por los puntos. Los datos indican 3 experimentos realizados de manera independiente.

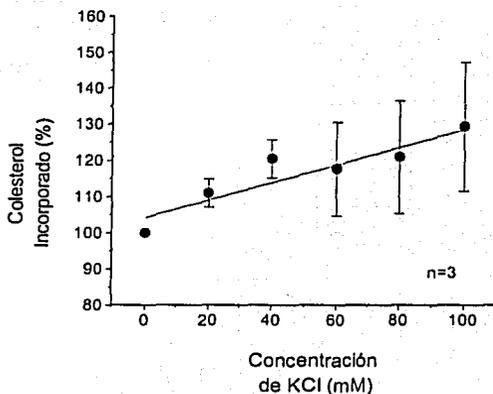


Figura 13. Efecto del K^+ sobre la incorporación de colesterol en presencia de ADP 2mM. Las barras representan el error estándar y la media está representada por los puntos. Los datos indican 3 experimentos realizados de manera independiente.

Para saber si el colesterol incorporado es empleado por las mitocondrias para la síntesis de progesterona, se llevó a cabo la determinación de progesterona en aquellas mitocondrias que fueron previamente incubadas en presencia del complejo colesterol-albúmina.

Las diferentes condiciones en las cuales se llevó a cabo la incubación, así como la síntesis de progesterona se muestran en la siguiente tabla.

Tabal 1. INCORPORACIÓN DE COLESTEROL Y SU TRANSFORMACIÓN EN P4

Condición	+ ATP		
	P4 ng/mg/min		Colesterol en $\mu\text{g}/\text{mg}$
Control	11.2 ± 1.3	16.6 ± 1.9	35.6 ± 8.4
Sacarosa	13.2 ± 1.8	24.6 ± 1.4	48.2 ± 9.8
KCl	16.6 ± 3.7	21 ± 1.8	61.1 ± 16.4
Sacarosa + ATP	14.4 ± 1.5	20 ± 2.8	89.1 ± 9.5
Sacarosa + ADP	15.8 ± 3.7	18.8 ± 3.0	77.0 ± 10.5
KCl + ADP	17.6 ± 4.1	15.4 ± 0.9	79.6 ± 9.4
KCl + ATP	22.2 ± 3.6	28.2 ± 2.5	102.5 ± 14.9
	n = 3	n = 3	n = 4

En la primera columna de la tabla 1 se muestra las diferentes condiciones en las que se incubaron las mitocondrias en presencia de KCl 100 mM y 30 μg del complejo colesterol-albúmina /mg de proteína y 2 mM de ATP o ADP. Después de lavar 3 veces las mitocondrias con sacarosa-EDTA para eliminar el colesterol no incorporado, las mitocondrias enriquecidas en colesterol se incuban para determinar la síntesis de progesterona y los resultados se muestran en la segunda columna de la tabla. En la tercera columna de la tabla se cuantificó la cantidad de progesterona

sintetizada en presencia de 2 mM ATP. El contenido de colesterol se determinó y se muestra en la cuarta columna de la tabla.

Cuando se incuban a las mitocondrias en presencia del complejo colesterol-albúmina y en un medio que contiene 100 mM de KCl el contenido de colesterol en las mitocondrias aumenta de 35 μg de colesterol/mg a 61 μg de colesterol/mg. El proceso de incorporación de colesterol se ve favorecido en presencia de ADP o ATP.

Si bien la síntesis de progesterona se ve favorecida en aquellas mitocondrias que fueron incubadas en presencia de un medio que contiene K^+ 100 mM, se muestra una mayor síntesis de progesterona cuando en el medio de reacción está presente el ATP, lo sugiere que el ATP participa no solamente en el proceso de incorporación de colesterol sino que también en su transformación hacia progesterona, contrario de lo que ocurre con el ADP, el cual al parecer facilita la incorporación de colesterol pero no promueve su transformación en progesterona.

DISCUSION

Las mitocondrias de la placenta humana cuentan con la presencia de una ATP-difosfohidrolasa que está fuertemente unida a la membrana interna mitocondrial. Esta enzima es capaz de hidrolizar diferentes tipos de nucleótidos, para lo cual requiere la presencia de cationes divalentes para formar junto con el nucleótido el sustrato propio de la enzima [58]. En presencia de concentraciones crecientes de K^+ existe una estimulación en la actividad hidrolítica de la ATP-difosfohidrolasa, siendo el efecto mayor en presencia de ATP que con ADP. El efecto estimulante que se observa en presencia de K^+ no es debido a una estimulación directa del catión sobre la enzima, ni un efecto de carga ya que al evaluarse la actividad hidrolítica en presencia de Na^+ no se modifica la actividad de la apirasa. La presencia de K^+ en el medio en el cual se aíslan las mitocondrias conlleva a cambios del tipo morfológico [60], mismos que pueden modificar las diferentes actividades mitocondriales.

Los cambios en la actividad mitocondrial asociados con variaciones en la concentración de K^+ ya habían sido observadas por Halestrap en las mitocondrias de hígado de rata [35], siendo registrados como un aumento en el consumo de oxígeno y determinado por un incremento en el estado 3 de la respiración, lo que se presume como un hinchamiento mitocondrial. Este hinchamiento esta dado por variaciones en la concentración de iones que modifican la osmolaridad. Pero a diferencia de lo observado por Halestrap, en las mitocondrias de la placenta la osmolaridad se mantuvo constante impidiendo el hinchamiento, descartando a éste como el factor que pudiera estar modificando los estados respiratorios, por lo cual el efecto observado es directo del catión sobre los parámetros mitocondriales estudiados.

En comparación con otros tejidos, las mitocondrias de la placenta humana presentan una menor actividad respiratoria, lo cual se ve reflejado como un potencial transmembranal disminuido [68-70], así como la mayor cantidad de colesterol presente en las mismas hacen suponer que el papel de estas mitocondrias es principalmente esteroidogénico y no fosforilante como ocurre en los otros tejidos como el hígado. Por lo cual, las diferencias de tipo morfológico, en las actividades respiratorias y la estimulación de la ATP-difosfohidrolasa que se observan en las mitocondrias de la placenta humana en presencia de K^+ pueden estimular la vía de síntesis de progesterona.

En estudios llevados a cabo en glándulas suprarrenal se observó que la cadena del citocromo P450_{scc} forma agregados con otras proteínas mitocondriales, mismos que se disgregan en presencia de K^+ , permitiendo la formación del complejo ternario de la cadena del citocromo P450_{scc} [44]. En las mitocondrias de la placenta se observó una estimulación en la síntesis de progesterona en presencia de K^+ , siendo esta estimulación mayor en presencia de los diferentes nucleótidos, lo cual puede estar relacionado con el aumento en la actividad de la ATP-difosfohidrolasa. Esta enzima se encuentra involucrada en el proceso de síntesis de progesterona favoreciendo el transporte de colesterol hacia la membrana interna mitocondrial y la cadena del citocromo P450_{scc}, ya que al inhibirse la actividad de la aprasa no se lleva a cabo la síntesis de progesterona [67].

Al igual que en otros tejidos, el transporte de colesterol hacia la mitocondria es considerado como el paso limitante en la vía y siendo mediado por una proteína encargada del transporte de colesterol. A diferencia de otros tejidos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

esteroidogénicos, la placenta no cuenta con la proteína StAR que transporta al colesterol de los depósitos citoplasmáticos hacia la mitocondria de las glándulas suprarrenales [52], pero cuenta con la presencia de una proteína denominada MNL64 que comparte al igual que muchas proteínas transportadoras de colesterol un dominio el cual podría estar involucrado en este proceso [52,54]. Aunque las células del trofoblasto no cuentan con depósitos de colesterol como ocurre en otros tipos celulares, este es captado de las LDL provenientes de la circulación materna, proporcionando de esta forma el sustrato para la vía esteroidogénica [48].

Las mitocondrias presentan una mayor capacidad de captar colesterol en presencia de K^+ siendo favorecida la incorporación al adicionar un nucleótido en el medio, mismo que al ser hidrolizado por la apirasa presente en las mitocondrias de la placenta proporciona la energía necesaria para llevar a cabo el transporte del colesterol hacia la membrana interna mitocondrial. Si bien la cantidad de colesterol que se incorpora cuando se encuentra ATP en el medio es mayor el papel que tiene este nucleótido dentro del proceso de síntesis de progesterona no ha sido todavía establecido.

En la placenta humana no se conoce los diversos estímulos que podrían estar favoreciendo el proceso de síntesis de la progesterona, a diferencia de lo que ocurre en otros tejidos esteroidogénicos en los cuales se conocen los estímulos. Si bien en cierto que aún no se conoce el mecanismo exacto mediante el cual el K^+ pudiera modular la síntesis de progesterona en las mitocondrias de la placenta humana, los datos obtenidos permiten suponer que este catión podría modificar la actividad respiratoria, la actividad de la apirasa, así como facilitar la captación de colesterol, lo que conlleva a una estimulación en la síntesis de progesterona. Esto nos sugiere que

el K^+ al igual que el ATP tiene un papel revelante en el metabolismo esteroideogénico de la placenta humana.

En la figura 14 se muestra los posibles sitios en los cuales podría estar interactuando de manera bioquímica el K^+ para modificar la síntesis de progesterona en las mitocondrias aisladas de la placenta humana.

El trabajar con las mitocondrias aisladas permite conocer de manera bioquímica uno de los posibles mecanismos que puede estar involucrado en el sistema de regulación de la síntesis de progesterona, todavía falta por conocer el papel fisiológico de los cambios en la concentración de K^+ en la placenta y como pudieran afectar estos a la síntesis de progesterona. Para lo cual es necesario realizar experimentos con células aisladas lo cual nos permitirá tener un conocimiento más profundo de cómo se regula la esteroideogénesis en la placenta.

CONCLUSIONES

- La actividad de hidrólisis de ATP por la apirasa es mas sensible al K^+ que la hidrólisis de ADP.
- La cantidad de colesterol incorporado es mayor en presencia de ATP que de ADP, siendo favorecido el proceso por la presencia de K^+ .
- La síntesis de progesterona se favorece en presencia de K^+ y por la hidrólisis de nucleótidos preferentemente de ATP.
- En condiciones *in vitro* el K^+ modifica la morfología y la actividad mitocondrial pudiendo de esta forma modular la síntesis de progesterona en las mitocondrias de la placenta humana.

Perspectivas

La estimulación del K^+ de la síntesis de progesterona en la mitocondrias aisladas permite establecer el papel bioquímico que tiene este catión dentro del sistema pero falta por conocer la importancia fisiológica del mismo. Por lo cual en un futuro se pretende realizar estudios es células en cultivo que si bien aún estas no representan al sistema *in vivo* permitirá establecer cambios en la concentración de K^+ mas cercano a las que se pueden dar en un sistema fisiológico.

Es claro que el mecanismo por el cual el K^+ ejerce su efecto no es directo sobre alguna de las enzimas específicas involucradas en el sistema esteroideogénico por lo cual se estudiara a este catión como un posible modulador y liberador de segundos mensajeros como son el Ca^{2+} y AMPc en la activación de la síntesis de progesterona.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chapman D (1975) Lipid dynamics in cell membranes, in: *Cell Membranes. Biology & Pathology* (G: Weismann and R. Clairborne, eds), pp. 13-22, HP Publishing Co., New York.
2. Ridway ND (2000) Interactions between metabolism and intracellular distribution of cholesterol and sphingomyelin. *Biochim. Biophys. Acta* **1484**: 129-141.
3. Simons K and Ikonen E (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**:569-572.
4. Liscum L and Underwood KW (1995). Intracellular cholesterol transport and compartmentation. *J.Bio.Chem.* **270** (26): 15443-15446.
5. De Pierre JW and Ernster L (1977). Enzyme topology of intracellular membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **46**:201-62.
6. Daum G (1985) Lipids of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **822**: 1-42.
7. Hanukoglu I, Rapoport R, Weiner L and Sklan D (1993). Electron leakage from the mitochondrial NADPH-adredoxin reductase-Adrenodoxin-P450_{sc} (cholesterol side chain cleavage) system. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**:489-498.
8. Sato H, Ashida N, Suhara K, Itagaki E, Takemori S and Katagiri M (1978) Properties of an adrenal cytochrome P-450 (P-450_{11beta}) for the hydroxylations of corticosteroids. *Arch. Biochem. Biophys.* **190**(1):307-14.

9. Privalle CT, Crivello JF, and Jefcoate CR (1983) Regulation of intramitochondrial cholesterol transfer to side-chain cleavage cytochrome P-450 in rat adrenal gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 702-706.
10. Orme-Johnson NR (1990) Distinctive properties of adrenal cortex mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1020: 213-231.
11. Niswender GD (2002) Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction* 123:333-339.
12. Cooke BA, Choi MC, Dirami G, López-Ruín MP and West AP (1992) Control of steroidogenesis in Leydig cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43:445-449.
13. Gwynne JT and Mahaffee DD (1989) Rat adrenal uptake and metabolism of high density lipoprotein cholesterol ester. *J. Biol. Chem.* 264: 8141-8150.
14. Jefcoate CR, McNamara BC, Artemenko I and Yamazaki T (1992) Regulation of cholesterol movement to mitochondrial cytochrome P450_{scc} in steroid hormone synthesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43(8) 751-767.
15. Seedorf U, Ellinghaus P and Nofer RJ (2000) Sterol carrier protein-2. *Biochim. Biophys. Acta* 1486: 42-54.
16. Trzeciak WH, Simpson ER, Scallen TJ, Vahouny GV and Waterman MR (1987) Studies on the synthesis of SCP-2 in rat adrenal cortical cells in monolayer culture. *J. Biol. Chem.* 262: 3713-3720.
17. Mertz LM and Pedersen RC (1989) The kinetics of steroidogenesis activator polypeptide in the rat adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* 264: 15274-15279.

18. Xu TS, Bowman EP, Glass DB and Lamberth JD (1997) Stimulation of adrenal mitochondrial cholesterol side-chain cleavage by GTP, steroidogenesis activator polypeptide (SAP), and sterol carrier protein2. GTP and SAP act synergistically. *J. Biol. Chem.* **266** (11): 6801-6807.
19. Pollack S, Furth E, Kallen B, Arakane F, Kiriakidou M, Kozarsky F and Strauss JF 3rd (1997) Localization of the steroidogenic acute regulatory protein in human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**(12): 4243-4251.
20. Stocco DM (2000) Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**:184-197.
21. Miller WL (1995) Mitochondrial specificity of the early steps in Steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **55** (5-6) 607-616.
22. Strauss J 3rd, Kallen CB, Christenson LK, Watarf H, Devote L, Arakane F, Kiriakidou M, and Sugawara T (1999) The Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR): A window into the complexities of intracellular cholesterol trafficking. *Recent Prog. Horm. Res.* **54**: 369-394.
23. Hackenbrock CR (1968) Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **61**:598-605.
24. Bakker A, Bernaert I, Ble De M, Ravingerova T, Ziegelhöffer A, Van Belle H and Jacob W (1994) The effect of calcium on mitochondrial contact sites: a study on isolated rat hearts. *Biochim. Biophys. Acta* **1224**: 583-588.
25. Kimura T (1986) Transduction of ACTH signal from plasma membrane to mitochondria in adrenocortical steroidogenesis. Effects of peptide, phospholip and calcium. *J. Steroid Biochem.* **25**: 711-716.

26. Igarashi Y and Kimura T (1984) Adrenocorticotrophic hormone mediated changes in rat adrenal mitochondrial phospholipids *J. Biol. Chem.* **259**: 10745-10753.
27. Jefcoate CR, McNamara BC, Artemenko I and Yamazaki T (1992) Regulation of cholesterol movement to mitochondrial cytochrome P450_{scc} in steroid hormone synthesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**: 751-767.
28. Rojo M, Hovius R, Demel RA, Nicolay K, and Wallimann T (1991) Mitochondrial creatine kinase mediates contact formation between mitochondrial membranes. *J. Biol. Chem.* **266**(30), 20290-20295.
29. Schlattner U, Dolder M, Wallimann T, and Tokarska-Schlattner (2001) Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show direct interaction that is modulated by calcium. *J. Biol. Chem.* **276** (61) 48027-48030.
30. Ruff MR, Pert CB, Weber RJ, Wahl LM, Wahl SM and Paul SM (1985) Benzodiazepine receptor mediated chemotaxis in human monocytes. *Science* **229** 1281-1283.
31. Papadopoulos V, Mari H, Boujrad N, Cascio C, Culty M, Garnier M, Hardwick M, Li H, Vidic B, Brown AS, Reversa JL, Bernassau JM and Drieu K (1997) Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroid* **62**:21-28.
32. Golani I, Weizman A, Leschiner S, Spanier I, Eckstein N, Limor R, Yanai J, Maaser K, Scherübl H, Weisinger G and Gavish M (2001) Hormonal regulation of peripheral benzodiazepine receptor binding properties is mediated by subunit interaction. *Biochemistry* **40**:10213-10222.

33. Stevens VL, Tribble DL and Lambeth DJ (1985) Regulation of mitochondrial compartment volumes in rat adrenal cortex by ether stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 242 (1): 324-327.
34. Holian A and Wilson DF (1980). Relationship of transmembrane pH and electrical gradients with respiration and adenosine 5'-triphosphate synthesis in mitochondria. *Biochemistry* 19(18):4213-4221.
35. Halestrap AP, Quinlan PT, Whipps DE and Armston AE (1986) Regulation of mitochondrial matrix volume *in vivo* and *in vitro*. The role of calcium. *Biochem. J.* 236:779-787.
36. Catt KJ, Carson MC, Hausdorff WP, Leach-Harper CM, Baukal AJ, Guillemette G, Balla T and Aguilera G (1987) Angiotensin II receptors and mechanisms of actino in adrenal glomerulosa cells. *J. Steroid. Biochem.* 27:915-927.
37. Clark BJ and Combs R (1999) Angiotensin II and cyclic adenosine 3',5' - monophosphate induce human steroidogenic acute regulatory protein transcription through a common steroidogenic factor-1 element. *Endocrinology* 140(10): 4390-4398.
38. Nakano S, Carballo P, Rocco S and Aguilera G (1990) Role of protein Kinase C on the steroidogenic effect of angiotensin II in the rat adrenal glomerulosa cell. *Endocrinology* 126:125-133.
39. Brandenburger Y, Kennedy ED, Plitón CP, Dossier MF, Vallontton ME, Wollheim CB and Capponi AM (1996) Possible role for mitochondrial calcium in angiotensin II and potassium-stimulated steroidogenesis in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 137:5544-5551.

RECIBO CON
FALLA DE ORIGEN

40. Yanagibashi K, Kawamura M and May P (1990) Voltage-dependent Ca^{2+} channels are involved in regulation of steroid synthesis by bovine but not rat fasciculata cells. *Endocrinology* 126:311-318.
41. Reuter H. (1983) Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature* 297:569-74.
42. Carbone W and Lux HD (1984) A low voltage-activated, fully inactivating Ca^{2+} channel in vertebrate sensory neurons. *Biophys J.* 46(3):413-8.
43. Ohta Y, Yanagibashi K, Hara T, Kawamura M and Kawato S. (1990) Protein rotation study of cytochrome P450 in submitochondrial particles: Effect of KCl and intermolecular interactions with redox partners. *J Biochem.* 109(4): 594-599.
44. Penzias AS (2002) Luteal phase support. *Fertil. Steril.* 77(2):318-323.
45. Kasahara K, Takakura K, Takebayashi K, Kimura F, Nakanishi K and Noda Y (2001) The role of human chorionic gonadotropin on decidualization of endometrial stromal cells *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 1281-1286
46. Linzer DI and Fisher SJ (1999) The placenta and the prolactin family of hormones: Regulation of the physiology of pregnancy. *Mol. Endocrinol.* 13(6): 837-840.
47. Peter TJ, Chapman BM, Wolfe MW and Soares MJ (2000) Placental lactogen-1 gene activation in differentiating trophoblast cells: extrinsic and intrinsic regulation involving mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J. Endocrinol.* 165: 443-456.

CON
FALLA DE ORIGEN

48. Strauss JF3rd, Martínez F and Kiriakidou M (1996) Placental steroid hormone synthesis: unique features and unanswered questions. *Biol. Reprod.* **54**: 303-311
49. Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A and Heinen E (2000) Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. *Curr. Opin. Immunol.* **12**:731-737.
50. Niswender GD (2002) Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction* **123**:333-339.
51. Strauss JF 3erd, Christenson LK, Devoto L and Martínez F (2000) Providing progesterone for pregnancy: control of cholesterol flux to the side side-chain cleavage system. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **55**:3-12.
52. Moog-Lutz C, Tomasetto C, Regnier CH, Wendlig C, Lutz Y, Muller D, Chenard MP, Basset P and Rio MC (1997) MNL64 exhibits homology with the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and is over-expressed in human breast carcinomas. *Int. J. Cancer* **71**: 183-191.
53. Zhang M, Liu P, Dwyer NK, Christenson LK, Fujimoto T, Martínez F, Comly M, Hanover JA, Blanchette- Mackiie EJ and Strauss JF 3rd (2002) MNL64 mediates mobilization of lysosomal cholesterol to steroidogenic mitochondria. *J Biol. Chem.* **277**, 33300-33310.
54. Watari H, Arakane F, Moog-Lutz C, Kallen CB, Tomasetto C, Gerton GL, Rio MC, Baker ME and Stauss JF 3rd.(1997) MNL64 contains a domain with homology to the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that stimulates steroidogenesis. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* **94**: 8462-8467

TRIPS CON
FALLA DE ORIGEN

55. Tsujishita Y and Hurley JH (2000) Structure and lipid transport mechanism of a STAR-related domain. *Nat. Struct. Biol.* 7: 408-414.
56. Espinosa-García MT, Strauss JF3rd and Martínez F (2000) A trypsin-sensitive protein is required for utilization of exogenous cholesterol for pregnenolone synthesis by placental mitochondria. *Placenta* 21: 654-660.
57. Popp B, Schmid A and Benz R (1995) Role of sterols in the functional reconstitution of water-soluble mitochondrial porins from different organisms. *Biochemistry* 34: 3351-3261.
58. Flores-Herrera O, Uribe A, Pardo JP, Espinosa-García MaT, Meaney A and Martínez F (1996) Characterization of the F₁-F₀-ATPase and the tightly-bound ATPase activities in the submitochondrial particles from human term placenta. *Placenta* 17: 345-350.
59. Navarrete J, Flores-Herrera O, Uribe A. and Martínez F (1999) Differences in cholesterol incorporation into mitochondria from hepatoma AS-30D and human term placenta. *Placenta* 20:285-291.
60. Martínez F, Pardo JP, Flores-Herrera O and Espinosa-García MaT (1995) The effect of osmolarity on human placental mitochondria function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27: 795-803.
61. Martínez F, Chavez E, Echegoyen S (1987) Decreased exchange of adenine nucleotides in human placental mitochondria. *Int. J. Biochem.* 19(3): 275-9
62. Martínez F, Kiriakidou M, and Strauss JF 3rd (1997) Structural and functional changes in mitochondria associated with trophoblast differentiation: Methods to isolate enriched preparations of syncytiotrophoblast mitochondria. *Endocrinology* 138:2172-2183.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

63. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1991) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
64. Sumner JB (1944) A method for the colorimetric determination of phosphorous. *Science* **100**:413-414.
65. Martínez F, Echegoyen S, Briones R and Cuellar A (1988) Cholesterol increase in mitochondria: a new method of cholesterol incorporation. *J. Lipid Res.* **29**:1005-1011.
66. Flores-Herrera O, Uribe A, Pardo JP and Martínez F (1999) A novel ATP-diphosphohydrolase from human term placental mitochondria. *Placenta* **20**:475-484.
67. Flores-Herrera O, Uribe A, García-Pérez C, Milán R and Martínez F (2002) 5'-p-Fluorosulfonylbenzoyladenine inhibits progesterone synthesis in human placental mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1585**:11-18.
68. Gellerich FN, Ulrich J and Kunz W (1994) Unusual properties of mitochondria from the human term placenta are caused by alkaline phosphatase. *Placenta* **15**, 299-310.
69. Zolnierowicz S, Swierczynski J and Zelewski L (1982) Tightly coupled mitochondria from human early placenta. *Placenta* **3**, 197-210.
70. Illsey NP, Coade SB and Harkness RA (1985) Human placental mitochondrial respiration and its regulation by adenine nucleotides. *Placenta* **6**, 187-197.