

11281

20



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**EFFECTO DEL  $Ca^{2+}$  SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS  
DESHIDROGENASAS MITOCONDRIALES Y LA SINTESIS  
DE PROGESTERONA EN LA PLACENTA HUMANA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS**  
P R E S E N T A:

*Beatrice de cast*

**M. en I.B.B. CECILIA / GARCIA PEREZ**

Facultad de Medicina



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**MEXICO, D. F.**

**2002**



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.

**PAGINACION  
DISCONTINUA**

# DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

El trabajo experimental de esta tesis se realizó en el Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M. bajo la dirección del Dr. Federico Martínez

## EFFECTO DEL $\text{Ca}^{2+}$ SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS DESHIDROGENASAS MITOCONDRIALES Y LA SÍNTESIS DE PROGESTERONA EN LA PLACENTA HUMANA

Los miembros del Jurado:

Dr. Armando Gómez Puyou

Dr. Antonio Peña Díaz

Dr. Salvador Uribe Carvajal

Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Dra. Irma Bernal Lugo

Dr. Vicente Díaz Sánchez

Dr. Federico Martínez Montes

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mis padres, por su amor y apoyo incondicional; mi ejemplo de vida. Mi mayor fuerza y debilidad: los adoro.**

**A mi familia, la mejor. ¿Debo decir más?**

**Al Dr. Edmundo Chávez Cossío, por creer en mí.**

**Al Dr. Federico Martínez, por darme la oportunidad de seguir en esto cuando las fuerzas flaqueaban y por todo su apoyo.**

**Al Dr. Juan Pablo Pardo, por su orientación y confianza.**

**A los miembros del Jurado, por el gentil detalle de corregir esta Tesis en tan pocos días.**

**La satisfacción del esfuerzo realizado...**

**La alegría de cerrar un ciclo...**

**El privilegio de trabajar en lo que nos apasiona.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## ABREVIATURAS

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>m</sub>	concentración del calcio libre mitocondrial
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub>	concentración del calcio libre citosólico
IC	isocitrato
α-KG	α-cetoglutarato
α-KGDH	α-cetoglutarato deshidrogenasa (EC 1.2.4.2)
NAD-ICDH	isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD <sup>+</sup> (EC 1.1.1.41)
NADP-ICDH	isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP <sup>+</sup> (EC 1.1.1.42)
NADH/NAD <sup>+</sup>	dinucleótidos de nicotinamida adenina reducidos/oxidados
NADPH/NADP <sup>+</sup>	dinucleótidos fosfato de nicotinamida adenina reducidos/oxidados
P450 <sub>scc</sub>	citocromo P450 <sub>scc</sub> ("side chain cleavage", rompimiento de la cadena lateral)
StAR	proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
HSD	Δ <sup>5</sup> -ene-3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa isomerasa
EDTA	tetra-acetato de etilendiamina
EGTA	tetra-acetato de etilen-bis-oxonitrilo
Mops	ácido sulfónico 3-[N-morfolino] propano
BSA	albúmina sérica bovina
DTT	ditiotreitolo
hCG	hormona gonadotrofina coriónica
CoA	coenzima A
PBS	solución salina de fosfatos
ACTH	hormona adrenocorticotrófica
K <sub>0.5</sub>	concentración con la que se obtiene la mitad de la respuesta máxima

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<b>ÍNDICE</b>	
<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
La síntesis de las hormonas esteroides	8
Los puntos de unión entre las membranas mitocondriales	9
La vía esteroidogénica	10
<b>ANTECEDENTES</b>	
El metabolismo esteroidogénico de las glándulas suprarrenales	12
-Respuesta mediada por el AMPc	12
-Respuesta mediada por el Ca <sup>2+</sup>	14
El metabolismo esteroidogénico de las gónadas	17
El metabolismo esteroidogénico de la placenta	18
-Respuesta mediada por el AMPc	18
-Respuesta mediada por el Ca <sup>2+</sup>	21
El papel del Ca <sup>2+</sup> en las mitocondrias esteroidogénicas	23
<b>OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>MÉTODOS</b>	<b>26</b>
<b>RESULTADOS</b>	
El efecto del Ca <sup>2+</sup> sobre la respiración mitocondrial	29
Actividades de la α-cetoglutarato y NAD-isocitrato deshidrogenasas	32
El efecto del Ca <sup>2+</sup> sobre la α-KGDH y NAD-ICDH	32
La actividad de la NADP-isocitrato deshidrogenasa (NADP-ICDH)	33
El efecto del Ca <sup>2+</sup> sobre la NADP-ICDH	35
El efecto del Ca <sup>2+</sup> sobre la síntesis de progesterona	38
<b>DISCUSIÓN</b>	
El efecto del Ca <sup>2+</sup> sobre las deshidrogenasas del ciclo de Krebs en la placenta humana	43
El efecto del Ca <sup>2+</sup> sobre la síntesis de progesterona de la placenta humana	43
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>48</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>49</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>51</b>
Carta de aceptación	61
Artículo publicado en Archives of Biochemistry and Biophysics	62

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## RESUMEN

Se estudió el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el metabolismo oxidativo y la actividad esteroidogénica de las mitocondrias de la placenta humana. Las concentraciones submicromolares de  $\text{Ca}^{2+}$  estimularon el consumo de  $\text{O}_2$  con  $\alpha$ -cetoglutarato e isocitrato como sustratos oxidables y activaron a la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa y a la NAD-isocitrato deshidrogenasa al disminuir sus constantes de Michaelis-Menten. El  $\text{Ca}^{2+}$  inhibió a la NADP-isocitrato deshidrogenasa y la síntesis de progesterona. La NADP-ICDH tuvo una velocidad máxima tres veces mayor y una Km tres veces menor que la NAD-ICDH. El isocitrato, pero no el malato ni el  $\alpha$ -cetoglutarato, favoreció la síntesis de progesterona. La inhibición de la síntesis de progesterona por el  $\text{Ca}^{2+}$  se observó con isocitrato, pero no con malato ni con  $\alpha$ -cetoglutarato. La regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la NADP-ICDH sugiere que esta enzima juega un papel importante en el metabolismo mitocondrial de la placenta humana.



## **ABSTRACT**

We investigated the effect of calcium on the oxidative metabolism and on the steroidogenic activity of human term placental mitochondria. Submicromolar  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations stimulated state-3 oxygen consumption with 2-oxoglutarate and isocitrate, and activated the 2-oxoglutarate and the NAD-isocitrate dehydrogenases by diminishing their Michaelis-Menten constants.  $\text{Ca}^{2+}$  inhibited NADP-isocitrate dehydrogenase and the synthesis of progesterone. The NADP-ICDH maximal velocity was three-fold higher than that of NAD-ICDH and had a three-fold lower  $K_m$  for isocitrate than NAD-ICDH. Isocitrate but not malate or 2-oxoglutarate supported progesterone synthesis. Calcium-mediated inhibition of progesterone synthesis was observed with isocitrate but not with malate or 2-oxoglutarate. Tight regulation of NADP-isocitrate dehydrogenase by calcium ions suggests that this enzyme plays an important role in placental mitochondrial metabolism.

## **INTRODUCCIÓN**

### **La síntesis de hormonas esteroideas**

La esteroidogénesis es el proceso por el cual se sintetizan hormonas esteroideas a partir del colesterol. Esto se lleva a cabo principalmente en las glándulas suprarrenales, gónadas, placenta y cerebro. Las glándulas suprarrenales producen los glucocorticoides y los mineralocorticoides. Los glucocorticoides regulan el metabolismo de los carbohidratos y las reacciones de estrés provocadas por eventos como la ansiedad o la agresión y que se caracterizan por la liberación de catecolaminas, cortisol y hormona del crecimiento. Los mineralocorticoides controlan el balance salino y, por lo tanto, la presión arterial. En los humanos, las células de Leydig en los testículos sintetizan los andrógenos, mientras que los ovarios sintetizan los estrógenos, hormonas encargadas de mantener los caracteres sexuales secundarios y la función reproductiva. La placenta sintetiza la progesterona, hormona encargada de mantener el embarazo a mediados del primer trimestre [1].

La esteroidogénesis en las glándulas suprarrenales y en las gónadas está sujeta a regulación crónica y aguda, mientras que en el cerebro y la placenta esta síntesis está sujeta a regulación crónica. La estimulación crónica de la esteroidogénesis es de horas a días y se da a nivel de la transcripción de genes y la proliferación de las células esteroidogénicas. La regulación aguda es de minutos y se da por la acción de las hormonas tróficas sobre la movilización y el flujo del colesterol hacia la mitocondria, donde se inicia la esteroidogénesis.

Existe el consenso de que el paso limitante en la síntesis de las hormonas esteroides en todos los tejidos esteroidogénicos es el transporte del colesterol, el cual se realiza a través de los puntos de unión entre las membranas mitocondriales [2,3].

El movimiento del colesterol de la membrana externa a la membrana interna mitocondrial en las glándulas suprarrenales y en las gónadas es facilitado por la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda, StAR, por sus siglas en inglés. En contraste, la proteína StAR no se expresa en la placenta.

### **Los puntos de unión entre las membranas mitocondriales**

Se ha propuesto que los puntos de unión o sitios de contacto entre las membranas mitocondriales son estructuras dinámicas con propósitos fisiológicos, como el hacer más eficiente la relación entre el ATP sintetizado por la fosforilación oxidativa y el trabajo celular que depende de ATP, propiciar la apoptosis o favorecer el transporte del colesterol en las células esteroidogénicas [4-6].

La formación de los puntos de unión depende del grado de acoplamiento mitocondrial, es sensible al desacoplante dinitrofenol, es resistente al tratamiento con el detergente digitonina, se favorece en el estado 3 de la respiración (síntesis de ATP) y responde al estímulo hormonal [4,6].

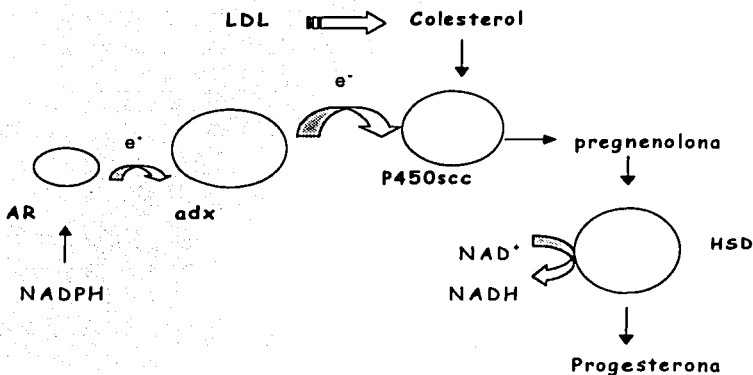
Se sugiere que los componentes proteicos de los puntos de unión, como la hexocinasa (HK), la porina (VDAC, canal aniónico dependiente de voltaje) y el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) son los mismos que generan el poro de transición a la permeabilidad (MTP) en condiciones patológicas [6].

Se ha descrito que la unión del receptor periférico a benzodiazepinas (PBR) al complejo VDAC/ANT [7,8] puede regular el transporte del colesterol desde la

membrana externa hacia la membrana interna mitocondrial de las células esteroidogénicas y facilitar su transformación a pregnenolona.

### **La vía esteroidogénica**

En todos los tejidos esteroidogénicos el precursor a partir del cual se sintetizan las hormonas esteroideas es el colesterol. En las mitocondrias, el citocromo P450<sub>sc</sub> se encarga del rompimiento de la cadena lateral del colesterol y da lugar a la pregnenolona (P5). El poder reductor para la reacción del citocromo P450<sub>sc</sub> se aporta en forma de NADPH mitocondrial a través de la enzima málica, la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup> (NADP-ICDH) y la transhidrogenasa (TH). El citocromo P450<sub>sc</sub> está acoplado a una cadena respiratoria que consta de una flavoproteína aceptora de electrones denominada adrenedoxina reductasa (AR), una proteína transportadora de electrones con centro hierroazufre, denominada adrenedoxina (adx) y el citocromo P450<sub>sc</sub>. La estequiometría de la reacción de transformación del colesterol a pregnenolona; colesterol:NADPH:O, es 1:3:3. De manera particular, en las mitocondrias de la placenta, la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa isomerasa (HSD), dependiente de NAD<sup>+</sup>, transforma la P5 en progesterona (P4) (Figura 1).



**Figura 1. Vía esteroidogénica en las mitocondrias.**

El colesterol proveniente de las LDL maternas, de las pozas citosólicas o de la síntesis *de novo* es el sustrato del citocromo P450scc que se localiza en la membrana interna mitocondrial. El rompimiento de la cadena lateral del colesterol por el P450scc requiere del transporte de electrones provenientes del NADPH, a través de las adrenodoxinas. La 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa isomerasa (HSD) transforma a la pregnenolona en progesterona. La HSD se localiza en el retículo endoplásmico de las glándulas suprarrenales y las gónadas y en las mitocondrias de la placenta.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

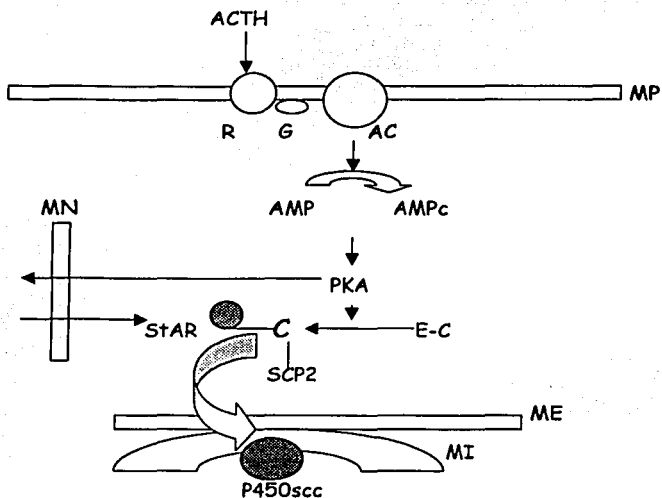
## ANTECEDENTES

### EL METABOLISMO ESTEROIDOGÉNICO EN LAS GLÁNDULAS SUPRARRENALES

La médula de las glándulas suprarrenales sintetiza catecolaminas, como son la noradrenalina, la adrenalina y la dopamina. La corteza de las glándulas suprarrenales está dividida por tres tipos celulares que forman la zona glomerular, fascicular y reticular. Las dos últimas sintetizan glucocorticoides (cortisol, desoxicorticosterona) y andrógenos (dehidroepiandrosterona) y la primera sintetiza mineralocorticoides (aldosterona). El metabolismo esteroideogénico de las zonas fascicular y reticular se regula principalmente por la cascada de señalización del ACTH a través del aumento en los niveles citoplásmicos del AMPc. La esteroidogénesis en la zona glomerulosa se regula principalmente por la cascada de la angiotensina II o el  $K^+$  extracelular, a través del aumento en los niveles del  $[Ca^{2+}]_c$ .

### Respuesta mediada por el AMPc en las glándulas suprarrenales

En los tejidos de respuesta aguda, el colesterol se almacena en el citosol en forma de ésteres de colesterol. La estimulación de las glándulas suprarrenales por la ACTH promueve que la proteína cinasa A (PKA) active a la hidrolasa que rompe los ésteres de colesterol propiciando que el colesterol libre se movilice a la mitocondria [9,10]. El aumento en la hidrólisis de los ésteres de colesterol va acompañado con la disminución en la esterificación y el incremento en la síntesis *de novo*, mediante la activación de la HMG-CoA reductasa [2] (Figura 2). Sin embargo, en la placenta el suministro continuo del colesterol hacia la mitocondria es aportado por las LDL maternas, ya que tanto la síntesis *de novo* como el almacenamiento del colesterol esterificado están disminuidos en comparación con los tejidos sometidos a una regulación aguda [1].



**Figura 2. Vía de señalización por AMPc en las glándulas suprarrenales.**

La estimulación de la esteroidogénesis aguda por la hormona ACTH se realiza a través de la interacción de esta hormona con su receptor (R). Las proteínas G (G) activan a la adenilato ciclasa (AC) promoviendo la síntesis del AMPc. La cascada de fosforilación involucra a la PKA y a la proteína StAR. La PKA activa a la hidrolasa, que rompe los ésteres de colesterol (E-C), promueve la transcripción del ARNm de la StAR y fosforila a la proteína StAR. El transporte del colesterol libre (C) hacia el citocromo P450sc está asociado con la proteína StAR. El transporte de colesterol (C) hacia el citocromo P450sc está asociado con la proteína SCP2. Se representa al citocromo P450sc asociado con los sitios de contacto o puntos de unión de ambas membranas mitocondriales.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Aunque no está aclarada la dinámica de la distribución del colesterol entre la membrana plasmática, las pozas citosólicas y las membranas de los organelos, existen 3 posibles mecanismos: la difusión acuosa, el transporte mediado por vesículas y la participación de acarreadores solubles [11,12].

El aumento en el transporte del colesterol hacia la mitocondria involucra a la proteína acarreadora de esteroides, SCP<sub>2</sub> [13-15] y la proteína StAR, estimulando la esteroidogénesis (Figura 2).

La proteína StAR es la responsable del incremento en el transporte del colesterol a través de las membranas mitocondriales hacia el P450<sub>sc</sub> en las glándulas suprarrenales y en las gónadas [1,12,16]. La evidencia directa proviene del estudio de la hiperplasia adrenal congénita lipoide, CAH, una enfermedad caracterizada por glándulas suprarrenales grandes con altos niveles de ésteres de colesterol y acumulación de lípidos. La CAH es una condición letal en la cual los recién nacidos prácticamente no sintetizan esteroides y presentan mutaciones en el gen que codifica a la StAR. El aumento en los niveles del AMPc promueve la transcripción del ARNm de la proteína StAR, el aumento en la concentración de la proteína e indirectamente la fosforilación de ésta, mecanismos que incrementan la esteroidogénesis [17].

### **Respuesta mediada por el Ca<sup>2+</sup> en las glándulas suprarrenales**

En las células de la glomerulosa de las glándulas suprarrenales la esteroidogénesis aguda se regula por la acción de la angiotensina II y el K<sup>+</sup>, a través del aumento en el [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> [18]. La zona fascicular también responde al mecanismo de señalización por Ca<sup>2+</sup> [19] (Figura 3).



El aumento en la  $[Ca^{2+}]_c$  que activa la respuesta mediada por la angiotensina II se realiza por la entrada del  $Ca^{2+}$  extracelular, a través de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo T sensibles a voltaje (VOC) [20,21], la liberación del  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico como respuesta al  $IP_3$  [22,23] y por la entrada capacitativa del  $Ca^{2+}$  extracelular, a través de los canales CRAC (del inglés, calcium release-activated calcium channel) [24]. La entrada del  $Ca^{2+}$  a través de los canales CRAC aumenta la síntesis del AMPc promovida por la ACTH en las células de la glomerulosa [24].

La estimulación de la síntesis de aldosterona por  $K^+$  involucra los canales sensibles a voltaje tipo T y L [20]. La entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales tipo L provoca un aumento rápido y transitorio ( $> 2 \mu M$ ) en la  $[Ca^{2+}]_c$  y es sensible al agonista BayK8644, al antagonista nifedipina y al  $Ni^{2+}$  que es un bloqueador específico para canales tipo L. La entrada del  $Ca^{2+}$  a través de los canales tipo T promueve un aumento del  $[Ca^{2+}]_c$  menor y sostenido y no presenta retroalimentación negativa por  $Ca^{2+}$  [20,25,26]. Se sugiere que el  $Ca^{2+}$  que entra a través de los canales tipo T alcanza directamente a la mitocondria, por un mecanismo tipo "tunneling", y estimula la síntesis de aldosterona, mientras que la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales tipo L llega a inhibir la esteroidogénesis [20,25] (Figura 3).

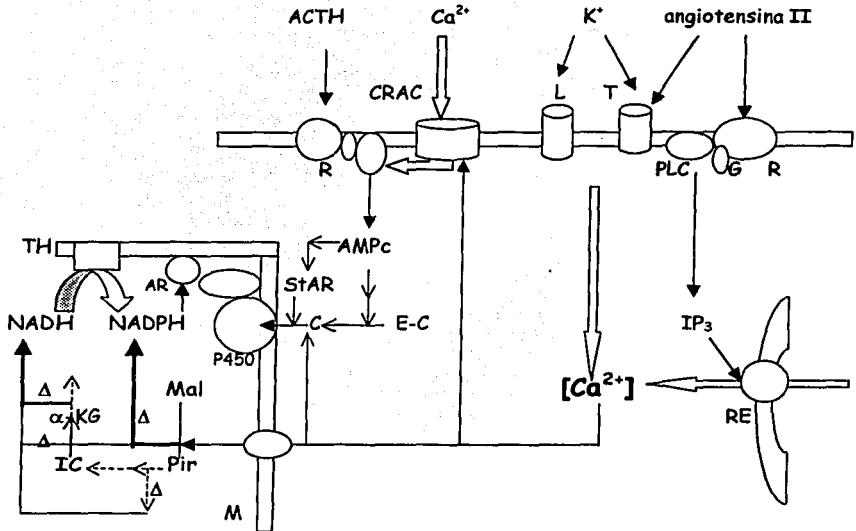


Figura 3. Vía de señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  en glándulas suprarrenales.

La angiotensina II y el  $\text{K}^+$  son los agonistas que estimulan la síntesis de mineralocorticoides en la zona glomerulosa de las glándulas suprarrenales. El aumento en los niveles citosólicos del  $\text{Ca}^{2+}$  se da a través de los canales de voltaje tipo L y T y la fosfolipasa C (PLC). El inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) estimula la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico (RE). El aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico incrementa: a) la entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, a través de los canales CRAC (entrada capacitativa); este  $\text{Ca}^{2+}$  activa a la adenilato ciclasa, aumentando los niveles del AMPc generado a través del estímulo por ACTH, b) las concentraciones mitocondriales (M) de la proteína StAR y del colesterol, c) aumenta los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial, que estimulan la actividad de la enzima málica y de las deshidrogenasas de la matriz mitocondrial dependientes de  $\text{NAD}^+$ , generando NADH. La transhidrogenasa (TH) interconvierte este NADH en NADPH. Los eventos mencionados provocan la estimulación en la síntesis de pregnenolona y aldosterona. Mal, malato; Pir, piruvato; IC, isocitrato;  $\alpha$ -KG,  $\alpha$ -cetoglutarato.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **EL METABOLISMO ESTEROIDOGÉNICO EN LAS GÓNADAS**

La hormona luteinizante (LH) es el principal agonista fisiológico de la esteroidogénesis de las células de Leydig (en testículo) a través del receptor acoplado a proteínas G, adenilato ciclasa, AMPc, PKA y StAR [16]. Sin embargo, el efecto del AMPc en la esteroidogénesis depende de la presencia del  $Ca^{2+}$  extracelular [27,28]: el incremento en la  $[Ca^{2+}]_c$  a través de los canales sensibles a voltaje estimula la salida de los iones  $Cl^-$  provocando un aumento en la síntesis de progesterona y en la concentración de StAR en las mitocondrias de estas células [29,30]. El estímulo por hCG que también eleva la  $[Ca^{2+}]_c$  promueve la transcripción de los ARNm de la proteína StAR y del factor de transcripción que regula a ésta, el SF-1 [31,32]. El aumento en ambos mensajeros incrementa la síntesis de progesterona [29].

Otro agonista fisiológico en este tipo celular es el ATP. La presencia de ATP en el medio de incubación incrementa el  $[Ca^{2+}]_c$ , que a su vez estimula la esteroidogénesis [33].

Lo anterior indica que la esteroidogénesis de las células de Leydig puede modularse por AMPc y/o  $Ca^{2+}$  como segundos mensajeros. Cabe señalar que para la acción del AMPc se requiere de la presencia de  $Ca^{2+}$ , mientras que el efecto de éste sobre la esteroidogénesis no requiere de AMPc. Esto incluye otro mecanismo de regulación además del transporte del colesterol mediado por la proteína StAR en este tipo celular.

## **EL METABOLISMO ESTEROIDOGÉNICO EN LA PLACENTA**

Durante el período de gestación, la concentración del calcio en la circulación fetal es de  $\approx 1.4$  mM, mientras que en la circulación materna de  $\approx 1.12$  mM, como consecuencia del transporte activo de las células del trofoblasto. Se espera que el movimiento masivo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del trofoblasto afecte los procesos celulares, sin embargo esto no sucede gracias a que las células placentarias presentan sistemas de amortiguamiento, como proteínas que unen  $\text{Ca}^{2+}$  [34,35] y organelos secuestradores. Esto le permite a las células del trofoblasto mantener, en el estado basal, una concentración citosólica de  $\approx 50$  nM de  $\text{Ca}^{2+}$ , que es similar a la de las células de hígado, corazón y cerebro de rata [36,37], indicando la eficiencia amortiguadora que tiene el trofoblasto a pesar de la alta movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  y sugiriendo que el aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol activa los procesos celulares que responden a concentraciones submicromolares y micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **Respuesta mediada por el AMPc en la placenta**

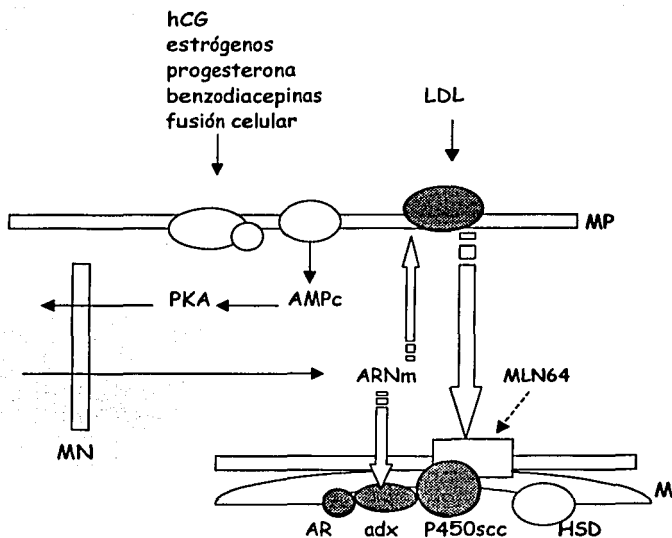
El sistema de señalización del AMPc se da principalmente a través de la adenilato ciclasa acoplada a las proteínas G. Los receptores involucrados en este sistema son varios, debido al gran número de agonistas que incrementan la síntesis de progesterona en las células del trofoblasto, como son: hCG [38], estrógenos [39,40], interleucinas [41], progesterona [40], benzodiazepinas [42] y la fusión celular para la formación del sinciotrofoblasto [43]. El AMPc activa a las cinasas de proteínas, como la PKA que activa a la hidrolasa de ésteres de colesterol [43]. Estas cinasas también interactúan con los factores de transcripción que promueven el aumento en los niveles de ARNm de

los componentes de la cadena del P450<sub>scc</sub> [43,44], estimulando la producción de progesterona [45].

La adición de lipoproteínas, como las LDL (lipoproteínas de baja densidad) [38] o HDL (lipoproteínas de alta densidad) [46] incrementa la síntesis de progesterona en las células del trofoblasto, sugiriendo que el contenido de colesterol en las membranas mitocondriales limita la síntesis de progesterona. Algunos agonistas, como los estrógenos, además de activar la cascada de señalización del AMPc, promueven la incorporación celular de las lipoproteínas al aumentar el número de receptores para LDL [39,40] (Figura 4).

Se ha propuesto que el alto contenido de colesterol en la membrana externa mitocondrial puede inducir la formación de sitios de contacto [47]. En el caso de la placenta humana, que tiene un alto contenido de colesterol, su movilización desde la membrana externa hacia la membrana interna puede ser un mecanismo de regulación que favorezca la formación de los sitios de contacto y la estimulación de la síntesis de esteroides [48].

Como se mencionó, la proteína StAR no se expresa en la placenta; sin embargo, el transporte del colesterol en este tejido es un proceso mediado por proteínas, ya que tanto la incorporación del colesterol como la síntesis de pregnenolona son sensibles al tratamiento con tripsina [49,50]. En este sentido, se han hecho esfuerzos por encontrar una proteína similar a la StAR. En la placenta y en otros tejidos se expresa la proteína MLN64, que tiene gran similitud con la región carboxilo terminal de la StAR y que podría ser el factor proteico que module la esteroidogénesis placentaria [51].



**Figura 4. Respuesta mediada por AMPc en la placenta.**

La unión de los agonistas a sus respectivos receptores en la membrana plasmática de las células del trofoblasto (MP) incrementa el AMPc a través de la adenilato ciclasa y las proteínas G. El AMPc activa a la proteína cinasa que promueve el incremento en la transcripción de los componentes de la cadena del P450scc. Aunque la proteína MLN64 se expresa en la placenta y comparte similitud con la StAR, el efecto activador sobre la síntesis de progesterona no se ha demostrado. El rectángulo de la membrana externa mitocondrial representa la caja negra que hay sobre el transporte del colesterol y los factores que lo modulan. Las LDL maternas suministran continuamente el colesterol a la membrana externa mitocondrial. Algunos agonistas, como los estrógenos favorecen este suministro al incrementar el número de receptores para LDL. MN, membrana nuclear; M, mitocondria.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

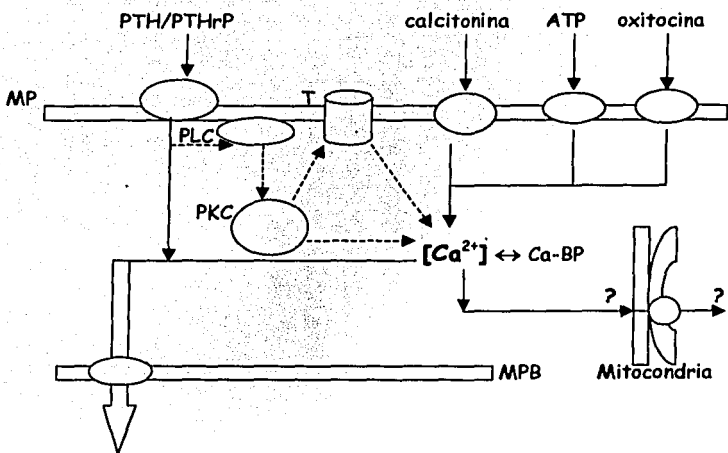
En las glándulas suprarrenales el transporte del colesterol mediado por proteínas, como la SCP<sub>2</sub>, se estimula en presencia de GTP [15], a través de la acción activadora de éste sobre las proteínas G mitocondriales. En la placenta se identificó la presencia de proteínas G [52] asociadas a la porina en los puntos de unión de las mitocondrias [53], lo cual favorece la evidencia de que el transporte del colesterol es un proceso mediado por proteínas en las mitocondrias de la placenta.

### **Mecanismo de señalización del Ca<sup>2+</sup> en la placenta**

La hormona paratiroide (PTH) y la hormona fetal tipo PTH (PTHrP) modulan el transporte del Ca<sup>2+</sup> a través de la placenta, utilizando varias rutas transductoras en el citosol del trofoblasto, como las de la fosfolipasa C y la adenilato ciclasa [54]. La interacción de la PTHrP con su receptor estimula la salida de Ca<sup>2+</sup> del lado basal (circulación fetal) del sinciotrofoblasto, pero no del lado de las microvellosidades (circulación materna) [55]. La salida del Ca<sup>2+</sup> por el lado basal es contra su gradiente, por lo que su naturaleza es de transporte activo [56] (Figura 5).

En las células osteoblásticas la cascada de señalización de la PKC por la acción de la PTH incrementa el [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> al activar canales de calcio sensibles a voltaje (VOC) tipo L [57] y se propone que esto puede ocurrir en la placenta [54]. La activación de la PKC con el éster de forbol TPA incrementa la síntesis de progesterona en la placenta [58].

Otros agonistas como la oxitocina [59], la calcitonina [60] y el ATP [61,62] incrementan el [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en las células del trofoblasto; sin embargo, no se ha relacionado este incremento con la actividad esteroideogénica.



**Figura 5. Mecanismo de señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  en la placenta.**

Se han descrito algunos agonistas que elevan la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  del trofoblasto, mediante la interacción con su receptor; sin embargo, no se vincula todavía este evento con la esteroidogénesis placentaria. La hormona paratiroide activa la salida del calcio, hacia la circulación fetal, a través de la ATPasa localizada en la membrana basal del sinciotrofoblasto (MPB). La placenta presenta múltiples proteínas citosólicas que unen calcio (CaBP), lo que amortigua la concentración libre de este catión a niveles nanomolares. Se señalan con flechas punteadas los mecanismos que se dan en otros tipos celulares y que podrían existir en las células del trofoblasto.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



## EL PAPEL DEL $\text{Ca}^{2+}$ EN LAS MITOCONDRIAS ESTEROIDOGÉNICAS

La elevación en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol ( $50 \text{ nM} \rightarrow 1\text{-}5 \text{ }\mu\text{M}$ ) es una de las señales utilizadas por las células de prácticamente todos los tejidos de mamífero para incrementar la fosforilación oxidativa a través de la activación de las  $\text{NAD}^+$ -deshidrogenasas de la matriz mitocondrial sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  activa a la piruvato deshidrogenasa fosfatasa y disminuye la  $K_m$  para los sustratos de la isocitrato y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasas [36,37]. Las actividades de estas deshidrogenasas también se modulan por ADP, ATP,  $\text{H}^+$ , NADH y  $\text{NAD}^+$ , indicando una regulación intrínseca del ciclo de Krebs [63].

El aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  en el músculo cardíaco se da por la acción de la adrenalina a través de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y en el hígado, por la acción de las hormonas que movilizan  $\text{Ca}^{2+}$ , como los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, la vasopresina y la angiotensina II. El incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  promueve un aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  ( $70 \text{ nM} \rightarrow 1\text{-}2 \text{ }\mu\text{M}$ ) a través de la entrada de este catión por el uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a rojo de rutenio, magnesio y lantánidos. Este uniportador tiene como función el reflejar los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  hacia la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  en la matriz mitocondrial [64].

La activación de las deshidrogenasas sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$  incrementa la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ , lo que estimula el consumo de  $\text{O}_2$  mitocondrial. Este aumento en la velocidad de la cadena respiratoria genera un mayor gradiente electroquímico de protones y por tanto, incrementa la síntesis de ATP. La estimulación del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre las deshidrogenasas del ciclo de Krebs es uno de los mecanismos de control de la fosforilación oxidativa [36,64].

Concebidas siempre como los organelos que generan la energía en la célula, las mitocondrias pueden presentar otras vías de importancia similar o aún mayor que la

fosforilación oxidativa. Este puede ser el caso de las mitocondrias de los tejidos esteroideogénicos. Además de la maquinaria energética convencional, estas mitocondrias tienen la maquinaria para sintetizar pregnenolona, esteroide precursor de las hormonas esteroideas. En el caso de las mitocondrias de la placenta, esta pregnenolona se transforma en progesterona, hormona fundamental para mantener el embarazo.

En las células de la glomerulosa de las glándulas suprarrenales en las que se fijó la  $[Ca^{2+}]_c$  con ionomicina, el  $Ca^{2+}$  estimuló la síntesis de aldosterona. Esta estimulación fue sensible a rojo de rutenio, indicando que era el  $[Ca^{2+}]_m$  el que provocaba el efecto activador. Como la disponibilidad por NADPH y la actividad del citocromo P450<sub>sc</sub> no fueron factores limitantes, se sugirió que el efecto del  $[Ca^{2+}]_m$  era a nivel del transporte del colesterol [26], específicamente el transporte mediado por la proteína StAR [65]. En las mitocondrias de este tipo celular el aumento en el  $[Ca^{2+}]_c$  incrementó la concentración del colesterol en la membrana interna y en los puntos de unión, así como la concentración de la proteína StAR. De igual forma, el  $[Ca^{2+}]_c$  indujo un mayor contenido del P450<sub>sc</sub> y de la HSD en los sitios de contacto, favoreciendo la síntesis de pregnenolona [66,67]. En las mitocondrias de la zona glomerulosa y fascicular, el citocromo P450<sub>sc</sub> y la HSD colocalizan en los sitios de contacto, es decir que estas mitocondrias son capaces de convertir la pregnenolona en progesterona [68]. Este aumento en la  $[Ca^{2+}]_c$  elevó la  $[Ca^{2+}]_m$  estimulando la síntesis de aldosterona mediante la activación de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs dependientes de  $NAD^+$  [69-71] y de la enzima málica mitocondrial [71]. El NADH generado por las  $NAD^+$ -deshidrogenasas se transformó en NADPH por acción de la transhidrogenasa, suministrando el sustrato de la AR [26].

Entonces, en las células y mitocondrias aisladas de la zona glomerulosa de las glándulas suprarrenales el papel del  $Ca^{2+}$  sobre la vía esteroideogénica se da a nivel citosólico, por la movilización del colesterol y de la proteína StAR hacia la membrana

externa mitocondrial y a nivel mitocondrial, por la activación de la enzima málica que genera directamente el NADPH para la adrenedoxina reductasa y por la activación de las deshidrogenasas, que generan el NADH que activa a la cadena respiratoria y también se transforma en NADPH por la reacción de la transhidrogenasa para la síntesis de pregnenolona [70] (Figura 3).

Se desconoce el papel que tiene el  $\text{Ca}^{2+}$  en el metabolismo mitocondrial de la placenta, en funciones tales como la fosforilación oxidativa y la síntesis de progesterona. No se ha caracterizado el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre las  $\text{NAD}^+$ -deshidrogenasas para la formación del NADH (activación de la cadena respiratoria), transformación del NADH en NADPH (actividad de la transhidrogenasa) o generación directa del NADPH (enzima málica, NADP-ICDH) para la síntesis de progesterona.

## **OBJETIVOS**

Determinar el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la respiración mitocondrial en presencia de los sustratos de las  $\text{NAD}^+$ -deshidrogenasas en las mitocondrias de la placenta humana.

Evaluar el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre estas deshidrogenasas.

Determinar el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en la síntesis de progesterona.

## **MÉTODOS**

**Aislamiento de las mitocondrias de la placenta humana.** Las mitocondrias se aislaron como se describe en [72]: la placenta se procesó dentro de los primeros 30 minutos después del parto. Se cortaron y lavaron los cotiledones con la solución de sacarosa 250 mM y EDTA 1 mM a pH 7.3. El tejido se homogenizó en un Polytrón con dos pulsos de 45 s cada uno a 3,000 rpm. El pH del homogenado se ajustó a 7.3 con Trizma base. El homogenado se centrifugó a 1,250 x g durante 15 minutos, en una centrífuga Sorvall RC 5B. El sobrenadante se centrifugó a 4,000 x g durante 10 minutos. De esta centrifugación se obtuvo una fracción de mitocondrias pesadas, que fue eliminada. El sobrenadante se centrifugó a 10,250 x g. El precipitado se resuspendió en 20 ml de la

solución de sacarosa-EDTA. La concentración de proteína mitocondrial se determinó por el método de Lowry [73], utilizando BSA como estándar.

**Determinación del consumo de oxígeno.** La respiración mitocondrial o consumo de oxígeno se detectó por el método polarográfico, utilizando un electrodo tipo Clark, en un medio saturado con aire, consistente en KCl 120 mM, Mops 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.2 mM, Pi 2 mM, EGTA 5 mM, isocitrato 0.1 mM o  $\alpha$ -cetoglutarato 0.5 mM como sustratos. Las mitocondrias se incubaron a 34°C durante 7 minutos (estado 4 de la respiración mitocondrial); el estado 3 se obtuvo con la adición de 200-500 nmol de ADP.

**Mitocondrias permeabilizadas.** Las mitocondrias se resuspendieron en el medio modificado de [74]: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, ADP 2 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 1.5 mM, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, MnCl<sub>2</sub> 2 mM, 0.2% BSA, a una concentración final de 5 mg/ml. Estas mitocondrias se permeabilizaron con 0.3% del detergente Zwittergent 3-14 o se sonicaron en un sonicador Soniprep por 4 pulsos de 10 microns de 60s cada uno. El 90% de la actividad de las enzimas del ciclo de Krebs se detectó en el precipitado obtenido al centrifugar a 10,250 x g durante 10 minutos.

**Determinación de las actividades enzimáticas.** Las mitocondrias permeabilizadas (140  $\mu$ l de 5 mg/ml) se incubaron a temperatura ambiente en 2.5 ml del medio modificado de [75,76]: KCl 120 mM, Mops 10 mM, DTT 1 mM, NAD<sup>+</sup> 2 mM, ADP 2 mM, rotenona 1  $\mu$ M y EGTA 5 mM. El  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG)(+ CoA 0.25 mM) o el isocitrato (IC), así como el CaCl<sub>2</sub> se añadieron como se indica en la sección de Resultados. La actividad de la NADP-ICDH se determinó en el medio con KCl 120 mM, Mops 10 mM, EGTA 5 mM, DTT 1 mM, rotenona 1  $\mu$ M, NADP<sup>+</sup> 2 mM y la concentración de IC indicada en Resultados. Las

actividades de la  $\alpha$ -KGDH e ICDH se obtuvieron siguiendo la reducción del NAD(P)<sup>+</sup> a 340 nm, en un espectrofotómetro de arreglo de diodos Hewlett Packard 8453. Los parámetros cinéticos se obtuvieron por regresión no lineal ajustada a la ecuación de Hill:  $v = [V_m \cdot x^n / (k + x^n)] + V_o$ , utilizando el programa de software Microcal Origin.

**Amortiguadores de Ca/EGTA y Mg/EGTA.** Las relaciones metal/quelante se utilizaron para amortiguar las concentraciones libres extra mitocondriales de calcio y magnesio, como se describe en [77]. Las concentraciones finales de EGTA 5 mM y EDTA 1 mM se utilizaron en los medios de incubación. El programa de cómputo "Chelator" se empleó para calcular las concentraciones libres de ambos cationes [78].

**Cuantificación de la progesterona.** Las mitocondrias (0.1mg/0.5ml) se incubaron durante 3 minutos a 25°C en el medio KCl 120 mM, Mops 10 mM, EGTA 5 mM, Pi 2 mM, BSA 0.2% y ADP 2 mM. Los sustratos  $\alpha$ -KG, malato o IC así como el  $CaCl_2$  se agregaron como se indica en la sección de Resultados. El complejo BSA-colesterol se preparó como se describe en [79]. La reacción se detuvo con 150  $\mu$ l de metanol en un baño frío. La extracción de la fase orgánica se realizó con 5 ml de éter etílico agitados vigorosamente durante 3 minutos, seguidos de una congelación rápida con  $N_2$  líquido. La fase orgánica se llevó a sequedad para ser utilizada posteriormente. El día del ensayo, la fase orgánica se resuspendió en 1 ml de PBS. El contenido de progesterona se cuantificó con un kit comercial de radioinmunoensayo con  $^{125}I$ -progesterona, fabricado por Diagnostic Products Corporation, Los Ángeles, California.

**Análisis estadístico.** Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de al menos 3 placentas. Las diferencias significativas se obtuvieron con la prueba de T de Student para muestras apareadas.

## RESULTADOS

### Efecto del $\text{Ca}^{2+}$ sobre la respiración mitocondrial

La Figura 6A muestra el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el consumo de oxígeno en el estado 3 de la respiración en las mitocondrias incubadas con  $\alpha$ -cetoglutarato 0.5 mM como sustrato oxidable. La respiración en ausencia del  $\text{Ca}^{2+}$  fue de  $34.7 \pm 4.2$  ngat O/min/mg. Con 560 nM de  $\text{Ca}^{2+}$  la respiración aumentó hasta  $50.6 \pm 9.6$  ngat O/min/mg; es decir, un  $48 \pm 10\%$  de incremento sobre el control.

La respiración con isocitrato 0.1 mM fue de  $19.8 \pm 3.8$  ngat O/min/mg (Figura 7A). Con 360 nM de  $\text{Ca}^{2+}$  la respiración obtuvo un máximo de  $41.5 \pm 12.3$  ngat O/min/mg, es decir,  $108 \pm 34\%$  de estimulación (Figura 7A).

El efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la respiración mitocondrial puede deberse a la estimulación sobre uno o varios componentes de la fosforilación oxidativa (transportadores de sustratos, deshidrogenasas del ciclo de Krebs, cadena respiratoria, sistema fosforilante) y no al desacoplamiento, ya que el estado 4 de la respiración no se estimuló en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

La cinética de las enzimas así como la síntesis de P4 presentaron diferencias en cada preparación ya que el modelo de la placenta humana implica variables impredecibles como el estado nutricional de la madre, calidad de vida, enfermedades inherentes, tipo de embarazo (normal, alto riesgo, preclampsia, eclampsia, etc). Por ejemplo, la actividad de la NAD-ICDH en la Figura 7B presentó un número de Hill y una  $V_{\text{max}}$  mayores que la actividad de la enzima control de la Figura 7D. Las Figuras muestran experimentos únicos, pero el análisis numérico de las medias y desviaciones involucró a todas las preparaciones para obtener la representatividad del comportamiento de la población.

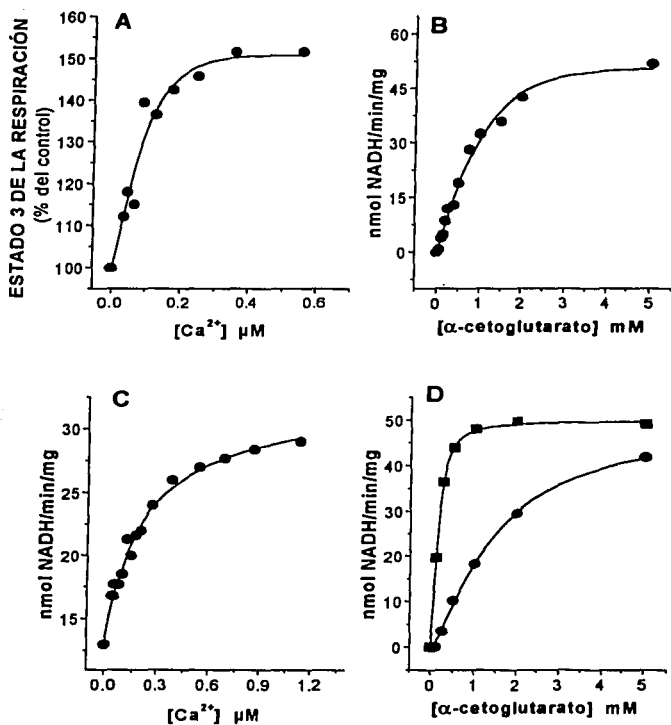


Figura 6. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el metabolismo mitocondrial dependiente de  $\alpha$ -cetoglutarato. (A) Consumo de  $\text{O}_2$  en el estado 3 en las mitocondrias intactas como por ciento del control. Se muestra la media de 4 preparaciones. (B) Actividad de la  $\alpha$ -KGDH en mitocondrias permeabilizadas. (C) Activación del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la  $\alpha$ -KGDH en mitocondrias permeabilizadas,  $\alpha$ -KG 0.1 mM. (D) La activación del  $\text{Ca}^{2+}$  disminuye la Km de la  $\alpha$ -KGDH por  $\alpha$ -KG; círculos, control; cuadrados,  $\text{Ca}^{2+} = 1.3 \mu\text{M}$ . Las Figuras B, C y D muestran experimentos representativos de una  $n = 3$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



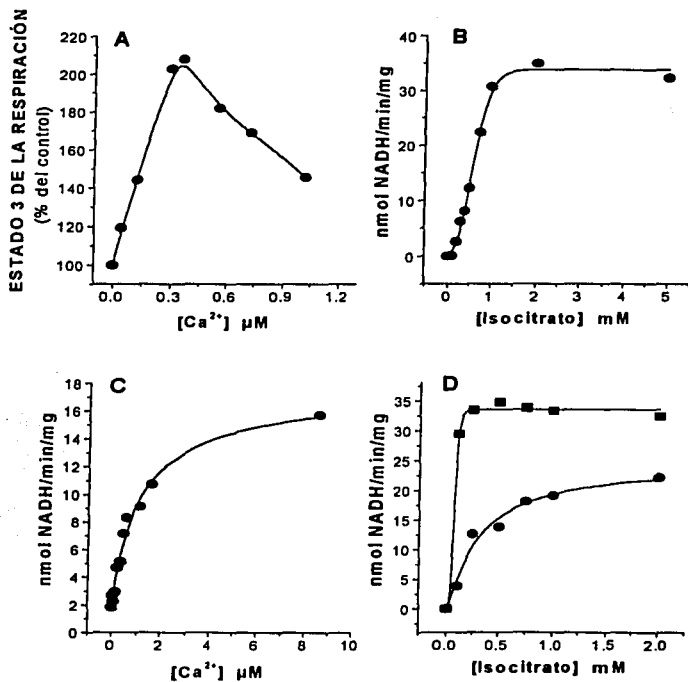


Figura 7. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el metabolismo mitocondrial dependiente de isocitrato. (A) Consumo de  $\text{O}_2$  en el estado 3 en las mitocondrias intactas como por ciento del control. Se muestra la media de 4 preparaciones. (B) Actividad de la NAD-ICDH en mitocondrias permeabilizadas. (C) Activación del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la NAD-ICDH en mitocondrias permeabilizadas, IC 0.1 mM. (D) La activación del  $\text{Ca}^{2+}$  disminuye la  $K_m$  de la NAD-ICDH por IC; círculos, control; cuadrados,  $\text{Ca}^{2+} = 1.3 \mu\text{M}$ . Las Figuras B, C y D muestran experimentos representativos de una  $n = 3$ .

### **Actividades de la $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa y de la NAD-isocitrato deshidrogenasa**

Las Figuras 6B y 7B muestran respectivamente las actividades de ambas enzimas en las mitocondrias que fueron permeabilizadas con el detergente Zwittergent 3-14. En ambos casos las enzimas mostraron una cinética cooperativa al variar la concentración de los sustratos respectivos. La cooperatividad fue mayor para la NAD-ICDH. Los parámetros cinéticos se obtuvieron por análisis de regresión no lineal, utilizando la ecuación de Hill como modelo. Los parámetros para la  $\alpha$ -KGDH fueron:  $V_{max} = 84 \pm 37$  nmol NADH/min/mg,  $K_m = 0.93 \pm 0.47$  mM y un coeficiente de Hill =  $1.2 \pm 0.1$ . Cabe señalar que la  $V_{max}$  puede estar subestimada ya que la actividad máxima para la  $\alpha$ -KGDH de corazón de cerdo se obtuvo en presencia de pirofosfato de tiamina como cofactor [80].

Los parámetros cinéticos para la NAD-ICDH fueron:  $V_{max} = 36 \pm 16$  nmol NADH/min/mg,  $K_m = 0.68 \pm 0.3$  mM y un coeficiente de Hill =  $2.9 \pm 1.5$ .

### **El efecto del $Ca^{2+}$ sobre la $\alpha$ -KGDH y la NAD-ICDH**

El efecto del  $Ca^{2+}$  sobre el estado 3 de la respiración mitocondrial correspondió con la activación de las enzimas  $\alpha$ -KGDH y NAD-ICDH en las mitocondrias permeabilizadas.

La actividad de la  $\alpha$ -KGDH ( $\alpha$ -KG 0.1 mM) se incrementó con concentraciones submicromolares de  $Ca^{2+}$  (Figura 6C). El 50% de la estimulación máxima se obtuvo con  $0.2 \pm 0.1$   $\mu$ M de este catión. La  $V_{max}$  aparente fue menor ( $35 \pm 17$  nmol NADH/min/mg) en presencia de  $Ca^{2+}$  a concentraciones subsaturantes de  $\alpha$ -KG que la  $V_{max}$  obtenida con concentraciones saturantes de sustrato (Figura 6B). Este efecto también se observó en las mitocondrias de hígado de rata [81], demostrando que a pesar del efecto estimulador del  $Ca^{2+}$  sobre las deshidrogenasas del ciclo de Krebs, la disponibilidad del sustrato sigue siendo limitante para la activación completa de la enzima.

La Figura 6D muestra que el  $\text{Ca}^{2+}$  disminuye la  $K_m$  de la  $\alpha$ -KGDH por su sustrato; *i.e.* la  $K_m$  para el  $\alpha$ -cetoglutarato en la Figura 6D (círculos) es de 1.3 mM y disminuye en presencia del  $\text{Ca}^{2+}$  hasta 0.13 mM (cuadrados), sin alterar la  $V_{max}$ .

El  $\text{Ca}^{2+}$  estimuló a la NAD-ICDH (IC 0.1 mM) con una  $K_{0.5} = 0.95 \pm 0.1 \mu\text{M}$  (Figura 7C). La  $V_{max}$  aparente obtenida con  $\text{Ca}^{2+}$  fue de  $30 \pm 17$  nmol NADH/min/mg. El  $\text{Ca}^{2+}$  disminuyó la  $K_m$  de la NAD-ICDH por su sustrato; *i.e.* la  $K_m$  para isocitrato en la Figura 7D (círculos) fue de 0.37 mM y se redujo a 0.013 mM (cuadrados) en presencia del  $\text{Ca}^{2+}$ , sin que se alterara la  $V_{max}$ , que fue de  $27 \pm 10$  en los controles vs.  $23 \pm 9$  con  $1.3 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### **La actividad de la NADP-isocitrato deshidrogenasa**

La Figura 8A muestra la actividad de la NADP-ICDH en las mitocondrias permeabilizadas con Zwittergent. Con el ajuste de los datos al modelo de la ecuación de Hill se obtuvo una  $V_{max} = 99 \pm 17$  nmol NADPH/min/mg, una  $K_m$  para isocitrato de  $0.26 \pm 0.08$  mM y un coeficiente de Hill de  $1.62 \pm 0.2$ . La actividad de la NADP-ICDH en las mitocondrias sonicadas mostró parámetros cinéticos similares que en las permeabilizadas con el detergente.

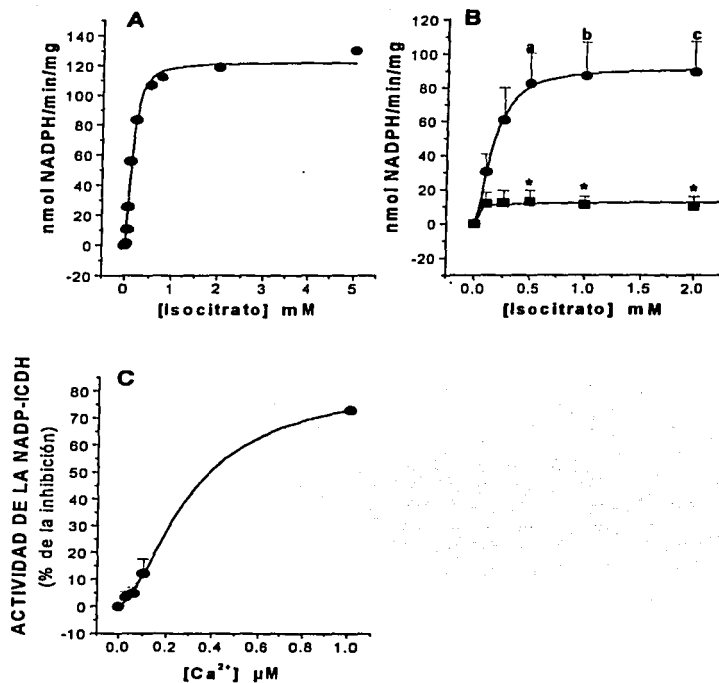


Figura 8. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la NADP-isocitrato deshidrogenasa en mitocondrias permeabilizadas. (A) Actividad de la NADP-ICDH, se muestra un experimento representativo de una  $n = 6$ . (B) Inhibición del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la NADP-ICDH. círculos, control (IC 10 mM); cuadrados,  $\text{Ca}^{2+}$  1  $\mu\text{M}$ . a,  $p < 0.01$ ; b,  $p < 0.025$ ; c,  $p < 0.025$  ( $n = 6$ ; media  $\pm$  D.S.). (C) Por ciento de la inhibición de la NADP-ICDH (IC 10 mM);  $K_{0.5} = 0.33 \mu\text{M}$  ( $n = 6$ , media  $\pm$  D.S.).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La actividad de la NADP-ICDH fue 3 veces mayor y su Km 3 veces menor que la actividad de la NAD-ICDH (Tabla 1). En comparación con esta última, la actividad de la NADP-ICDH no depende de ADP. Estos resultados indican que la NADP-ICDH es más eficiente que la NAD-ICDH, lo cual sugiere que el metabolismo dependiente de isocitrato en las mitocondrias de la placenta promueve las reacciones dependientes de NADPH sobre las dependientes de NADH; es decir, la esteroidogénesis sobre la actividad de la cadena respiratoria.

	Km	Vmax	n
$\alpha$ -KGDH	$0.93 \pm 0.47$	$84 \pm 37$	$1.2 \pm 0.1$
NAD-ICDH	$0.68 \pm 0.3$	$36 \pm 16$	$2.9 \pm 1.5$
NADP-ICDH	$0.26 \pm 0.08$	$99 \pm 17$	$1.6 \pm 0.2$

Tabla 1. Parámetros cinéticos de las tres enzimas estudiadas. Km en mM; Vmax (nmoles NAD(P)H/min/mg); n, coeficiente de Hill.

#### El efecto del $Ca^{2+}$ sobre la actividad de la NADP-ICDH

En las mitocondrias permeabilizadas, el  $Ca^{2+}$   $1 \mu M$  inhibió el 90% de la actividad de la NADP-ICDH (Figura 8B y 9A). El ajuste por regresión no lineal del por ciento de inhibición vs.  $[Ca^{2+}]$  proporcionó una  $K_{0.5} = 0.33 \pm 0.2 \mu M$  para  $Ca^{2+}$  (Figura 8C).

La inhibición por  $Ca^{2+}$  de la NADP-ICDH se observó también en presencia de  $Mg^{2+}$ , ATP y/o ADP. Esta inhibición correspondió con la disminución en la síntesis de progesterona en presencia de  $Ca^{2+}$ , en la mitocondrias intactas (Tabla 5) y sonicadas (Tabla 6) (ver adelante).

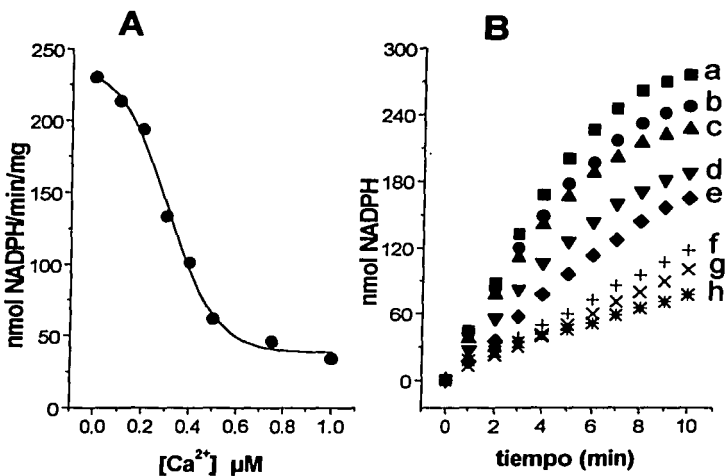


Figura 9. Efecto del Ca<sup>2+</sup> sobre la NADP-ICDH en las mitocondrias sonicadas. La actividad se determinó como se indica en "Métodos", en presencia de IC 5 mM. (A) Inhibición de la NADP-ICDH por Ca<sup>2+</sup>. Se muestra un experimento de una n = 3. (B) Curso temporal en la producción de NADPH por la NADP-ICDH en presencia de Ca<sup>2+</sup>. Se muestra la media de 3 preparaciones. Ca<sup>2+</sup> (μM): a, control; b, 0.1; c, 0.2; d, 0.3; e, 0.4; f, 0.5; g, 0.75 y h, 1.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Se ha reportado que el sustrato de la NADP-ICDH es el isocitrato con un metal divalente [82], por tal motivo, se evaluó el papel del  $Mg^{2+}$  y el  $Mn^{2+}$  en la actividad de la NADP-ICDH. Tanto el  $Mg^{2+}$  como el  $Mn^{2+}$  estimularon la actividad de la NADP-ICDH. La Tabla 2 muestra los parámetros cinéticos de los tres cationes. La curva de velocidad contra la [sustrato] (Figura 8B) en presencia de  $Ca^{2+}$  fue difícil de ajustar a las ecuaciones para obtener las constantes cinéticas, por lo que, sólo se muestra la  $V_{max}$ . El  $Mg^{2+}$  provocó una cinética de cooperatividad negativa ( $n < 1$ ). El  $Mg^{2+}$  activó a la enzima al disminuir la  $K_{0.5}$  por isocitrato, sin alterar la  $V_{max}$ . El  $Mn^{2+}$  incrementó la cooperatividad positiva, aumentando la  $V_{max}$  sin afectar la  $K_{0.5}$ .

Cabe señalar que los reportes en la literatura indican que el  $Ca^{2+}$  no afecta la actividad de esta enzima en las mitocondrias de los tejidos de mamíferos. Este es el primer reporte del efecto inhibitor del  $Ca^{2+}$  sobre la NADP-ICDH.

	$K_{0.5}$ (mM)	$V_{max}$	n
Control	$0.26 \pm 0.08$	$99 \pm 17$	$1.62 \pm 0.2$
$Ca^{2+}$		$13 \pm 0.9$	
$Mg^{2+}$	0.075	$91.3 \pm 13.2$	$0.49 \pm 0.22$
$Mn^{2+}$	0.30	$145.6 \pm 4$	$2.6 \pm 0.3$

Tabla 2. Efecto de los cationes divalentes sobre los parámetros cinéticos de la NADP-ICDH.  $n = 3 \pm D.S.$

### El efecto del $\text{Ca}^{2+}$ en la síntesis de progesterona

El isocitrato y el citrato son los sustratos preferentes en la síntesis de progesterona [83,84]. En las mitocondrias intactas, la síntesis de P4 con isocitrato 10 mM fue 3 veces mayor que con  $\alpha$ -cetoglutarato 10 mM (Tabla 3). La síntesis se determinó para ambos sustratos en condiciones de estado 3, es decir, las condiciones de síntesis de ATP requeridas para que las reacciones de la transhidrogenasa se lleven a cabo. En las mitocondrias permeabilizadas ambos sustratos tuvieron aproximadamente la misma velocidad de formación de nucleótidos de piridina reducidos durante los primeros 3 minutos de la reacción (100 nmol/min/mg aproximadamente).

[sustrato] mM	$\alpha$ -cetoglutarato	Isocitrato	Isocitrato
	nmol P4/min/mg		
	ADP 2 mM		
0.1	3.6 $\pm$ 2.5	3.7 $\pm$ 1.6	4.9 $\pm$ 2.7
0.5	3.8 $\pm$ 2.2	5.7 $\pm$ 1.8	6.4 $\pm$ 1.1
10	3.6 $\pm$ 2.6	11.7 $\pm$ 6.7	17 $\pm$ 11.6

Tabla 3. Síntesis de progesterona en presencia de  $\alpha$ -cetoglutarato e isocitrato en las mitocondrias intactas. n = 4, por triplicado  $\pm$  D.S.

La síntesis de P4 dependió de la concentración de isocitrato pero no de las concentraciones de  $\alpha$ -cetoglutarato o malato (Tabla 4).



Síntesis de progesterona (nmol / min / mg)			
	Isocitrato 10 mM	Malato 10 mM	$\alpha$ -cetoglutarato 10 mM
Control	9.2 $\pm$ 4.4	2.7 $\pm$ 2.1	3.8 $\pm$ 3.4
Ca <sup>2+</sup> 1 $\mu$ M	3.1 $\pm$ 0.9	3.3 $\pm$ 2.3	2.7 $\pm$ 1.9

**Tabla 4. Efecto del Ca<sup>2+</sup> sobre la síntesis de progesterona en mitocondrias intactas. El NADPH es generado por la acción de la NADP-ICDH (isocitrato), enzima málica (malato) o transhidrogenasa ( $\alpha$ -cetoglutarato).**

Las Tablas 3 y 4 muestran que la disponibilidad por el isocitrato es un factor limitante en la síntesis de P4; ya que la disminución en su concentración provoca una reducción en la síntesis de P4 (Tabla 3) y la sensibilidad por Ca<sup>2+</sup> indica que es susceptible a modularse al variar la [Ca<sup>2+</sup>] disminuyendo considerablemente la síntesis de P4 (Tabla 4). En conjunto, estos resultados sugieren que la actividad de la transhidrogenasa en la placenta humana es baja. De acuerdo con esta interpretación, se ha descrito que la actividad de esta enzima es menor en la placenta en comparación con la NADP-ICDH (100 nmol NADPH/min/mg) y la enzima málica (1-6 nmol NADPH/min/mg) [85].

El Ca<sup>2+</sup> inhibió la síntesis de progesterona en las mitocondrias de la placenta humana (Tablas 4-6). Esta inhibición se observó con isocitrato pero no con malato o  $\alpha$ -cetoglutarato, indicando que el efecto del Ca<sup>2+</sup> sobre el flujo esteroidogénico se da a nivel de la NADP-ICDH y descartando a la transhidrogenasa (flujo del  $\alpha$ -cetoglutarato) y a la enzima málica como posibles sitios de inhibición.

La baja síntesis de P4 obtenida con malato o  $\alpha$ -cetoglutarato es poco probable que se deba a un efecto inhibitor del NADH sobre la HSD. Se ha reportado que en las

mitocondrias de la placenta humana la HSD cataliza la reacción más rápida en la cadena del P450<sub>sc</sub>, y que la baja concentración de AR es el factor enzimático limitante en el flujo [86].

En relación con el isocitrato, la inhibición del NADH sobre la HSD también es poco factible, ya que se observó la misma síntesis de P4 en presencia o ausencia de ADP (activador de la NAD-ICDH) en la mitocondria intacta (Tabla 3). De hecho, en las mitocondrias de la corteza suprarrenal, la 11 $\beta$ -hidroxilación de la desoxicorticosterona, que es el paso subsecuente a la formación de progesterona, se llevó a cabo eficientemente al utilizar malato como sustrato [71].

El 22-hidroxicolesterol (22-OHC) es un análogo del colesterol que tiene acceso directo al P450<sub>sc</sub>, evitando el paso limitante del transporte del colesterol. De hecho, es uno de los intermediarios que se forman durante la reacción del P450<sub>sc</sub>. La inhibición por Ca<sup>2+</sup> en la vía esteroideogénica de la placenta se observó también en presencia del 22-hidroxicolesterol y del colesterol, añadido en forma del complejo albúmina-colesterol (BSA-C) (Tabla 5). Este resultado sugiere que el efecto del Ca<sup>2+</sup> en la síntesis de P4 no es sobre el transporte del colesterol hacia el P450<sub>sc</sub>.

Síntesis de progesterona (% de inhibición con Ca <sup>2+</sup> 1 $\mu$ M)		
Control	22-OH-colesterol 25 $\mu$ M	Complejo BSA-colesterol 40 $\mu$ g
62 $\pm$ 18	65 $\pm$ 29	65 $\pm$ 11

Tabla 5. Efecto del Ca<sup>2+</sup> en la síntesis de progesterona en mitocondrias intactas. El 22-hidroxicolesterol y el complejo albúmina colesterol se añadieron en el medio de incubación en presencia de isocitrato 10 mM, Pi 2 mM, BSA 0.2%, ADP 2 mM, EGTA 5 mM y CaCl<sub>2</sub> 4.2 mM ( $\approx$  1  $\mu$ M de Ca<sup>2+</sup> libre). n = 4, por cuadruplicado  $\pm$  D.S.

La presencia de ambos sustratos no incrementó la síntesis de P4, durante los primeros 3 minutos de la reacción. Las síntesis de P4, en nmol/min/mg fueron:  $8.8 \pm 4.4$  (control),  $8.4 \pm 6$  (22-OHC) y  $8.3 \pm 7.7$  (BSA-C).

Nuestros resultados coinciden con los de Tuckey *et al.*, (1997) [87] que reportaron que el contenido de colesterol en las membranas mitocondriales de la placenta humana es saturante durante los primeros 10 minutos de la síntesis de pregnenolona.

En las mitocondrias sonicadas el NADPH producido por la NADP-ICDH a los 10 minutos de incubación ( $240 \text{ nmol NADPH/mg} \approx 100 \text{ } \mu\text{M}$ ; Tabla 6) generó una síntesis de  $\approx 50 \text{ nmol P4/mg}$ . Contrariamente, la síntesis de progesterona en presencia de NADPH  $2 \text{ mM}$  fue 5 veces menor ( $\approx 10 \text{ nmol P4/mg}$ ).

	NADP-ICDH	Síntesis de P4 en presencia de NADP <sup>+</sup> 2 mM y IC 5 mM	Síntesis de P4 en presencia de NADPH 2 mM
	nmol/mg		
Ca <sup>2+</sup> (μM)	NADPH	P4	
0	240 ± 69	57 ± 29	8.6 ± 5
0.1	206 ± 76	20 ± 6	8 ± 4
0.5	90 ± 11	12 ± 7	8.3 ± 4
1.0	78 ± 24	9 ± 5	9.4 ± 4.5

Tabla 6. Efecto del Ca<sup>2+</sup> en la producción de NADPH y progesterona en las mitocondrias sonicadas. Las mitocondrias se sonicaron con 4 pulsos de 60s cada uno, a 12 microns de intensidad. Se muestra la cantidad de NADPH Y P4 producidos en 10 minutos, en presencia de 22-OH-colesterol  $25 \text{ } \mu\text{M}$ . (n=3±D.S.).

Este resultado sugiere la presencia de un mecanismo de canalización ("channelling") entre la NADP-ICDH y la AR, que provoca que el transporte de electrones sea propicio. El  $\text{Ca}^{2+}$  inhibió tanto la producción de NADPH como la síntesis de P4 (Figura 9B y Tabla 6). Esta inhibición sólo se observa en las condiciones de participación de la NADP-ICDH, ya que al agregar el NADPH exógeno no se observó el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  (Tabla 6). Lo anterior indica que la disminución de la síntesis de P4 por el  $\text{Ca}^{2+}$  se debe a la inhibición de éste sobre la NADP-ICDH.

## DISCUSIÓN

### **El efecto del $\text{Ca}^{2+}$ sobre las deshidrogenasas del ciclo de Krebs de la placenta humana**

La estimulación hormonal o eléctrica de las células de la mayoría de los tejidos de los mamíferos eleva la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  tanto en el citosol como en las mitocondrias. En la mitocondria, el  $\text{Ca}^{2+}$  modula las actividades de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs, al activar a la fosfatasa del complejo piruvato deshidrogenasa y disminuir la  $K_m$  de los sustratos respectivos de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa y la NAD-isocitrato deshidrogenasa [36,37,80]. La activación de estas enzimas aumenta la relación intramitocondrial de  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  y promueve el flujo electrónico de la cadena respiratoria y por lo tanto, la síntesis de ATP. La modulación de estas enzimas por el  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  a través del  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  es uno de los mecanismos propuestos para el control de la fosforilación oxidativa.

Aunque las células de la placenta movilizan grandes cantidades de calcio, la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  se mantiene en el orden nanomolar [61,62]. Esto implica que bajo un estímulo fisiológico es probable que la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  aumente y module los procesos citosólicos y mitocondriales. En este trabajo, el  $\text{Ca}^{2+}$  estimuló la respiración (Figuras 6A y 7A) de las mitocondrias aisladas y activó a la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa y a la NAD-isocitrato deshidrogenasa en las mitocondrias permeabilizadas (Figuras 6C y 7C). El  $\text{Ca}^{2+}$  no estimuló la respiración con succinato como sustrato oxidable [88], descartando la participación de los componentes de la cadena respiratoria y el sistema fosforilante como blancos del efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  en las mitocondrias de la placenta.

Las actividades de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa y la NAD-isocitrato deshidrogenasa, así como su respuesta al  $\text{Ca}^{2+}$ , fueron similares a las de otros tejidos

de mamífero [36,37,80]. De hecho, la NAD-ICDH también fue menos sensible al  $\text{Ca}^{2+}$ , requiriendo concentraciones micromolares de este catión para su máxima activación. Por tanto, es posible que en las células del trofoblasto la activación máxima de esta enzima se observe en las mitocondrias que están próximas a los sitios de alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  [89,90], como en la vecindad del retículo endoplásmico o de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje de la membrana plasmática.

Estos resultados implican que, como en los otros tejidos, en la placenta uno de los factores que regulan la respiración mitocondrial es el  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la modulación de las NAD-deshidrogenasas. Esto también implica que estas enzimas son blanco de regulación por cofactores ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , CoA, TPP) y relaciones ATP/ADP y NADH/NAD<sup>+</sup> [80,91].

En comparación con las mitocondrias de otros tejidos, las mitocondrias de la placenta tienen un bajo contenido de nucleótidos y citocromos [92,93] y menor actividad respiratoria [94,95, este estudio] que genera un potencial transmembranal disminuido [96]. Además, poseen un mayor contenido de colesterol ( $\approx 20 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) que las mitocondrias de los tejidos no esteroideogénicos, como el hígado ( $\approx 5 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) [97,98]. Con base en lo anterior, se sugiere que en las mitocondrias de la placenta se favorece la síntesis de hormonas esteroides sobre la síntesis de ATP.

### **El efecto del $\text{Ca}^{2+}$ en la síntesis de progesterona de la placenta humana**

El citrato e isocitrato son los sustratos preferentes para la síntesis de progesterona en las mitocondrias aisladas de la placenta humana [83,84]. Nuestros resultados coinciden con lo anterior, ya que se observó la dependencia de la síntesis de P4 por el isocitrato (Tablas 3 y 4).

La cadena respiratoria del citocromo P450<sub>sc</sub> requiere del poder reductor mitocondrial en forma de NADPH. Este último se genera por la acción de tres sistemas:

la enzima málica, la transhidrogenasa y la NADP-isocitrato deshidrogenasa. Tanto la síntesis de P4 (Tablas 3 y 4) como el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre ésta (Tablas 4-6) dependió de la presencia de isocitrato pero no de malato (enzima málica) o  $\alpha$ -cetoglutarato (transhidrogenasa), involucrando a la NADP-ICDH como la enzima responsable del aporte del NADPH para la síntesis de P4. De hecho, sólo en la placenta humana el contenido de la adrenedoxina reductasa (AR) limita al 16% la actividad del P450sc [86]. Esto indica que los cambios pequeños en la concentración del NADPH pueden provocar cambios grandes en la actividad de AR y por tanto, en el flujo de la vía (Figura 1). Este razonamiento puede explicar por qué con  $0.1 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  se inhibió un 14% la actividad de la enzima en las mitocondrias sonicadas, mientras que la síntesis de P4 cayó un 65% (Tabla 6). La explicación anterior supone que la  $K_m$  de la AR por el NADPH no es del orden micromolar sino milimolar. Las reportes que sugieren una  $K_m$  en el orden micromolar utilizaron a los componentes de la cadena del citocromo P450sc en sistemas reconstituidos, donde la  $K_m$  puede estar subestimada en relación con el sistema *in situ* [99].

Como se mencionó, el  $\text{Ca}^{2+}$  inhibió la síntesis de progesterona en las mitocondrias de la placenta humana (Tablas 4-6). Esta inhibición correspondió con la inhibición por  $\text{Ca}^{2+}$  de la NADP-ICDH en las mitocondrias permeabilizadas (Figuras 8B y 9). Nuestros resultados coinciden con previos reportes del laboratorio (Garduño *et al.*, 1992; Flores-Herrera *et al.*, 1995) [88,100] en los cuales se utilizaron concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  submicromolares y micromolares en las mitocondrias de la placenta humana.

En los tejidos esteroideogénicos, el paso limitante de la síntesis de hormonas esteroides es el transporte del colesterol a través de las membranas mitocondriales. Las proteínas acarreadoras del colesterol como la SCP<sub>2</sub> [13-15] y la StAR [1,12,16] activan este transporte y estimulan la esteroideogénesis. En la placenta, el transporte del colesterol depende de factores proteicos [50,51]; sin embargo, la concentración del

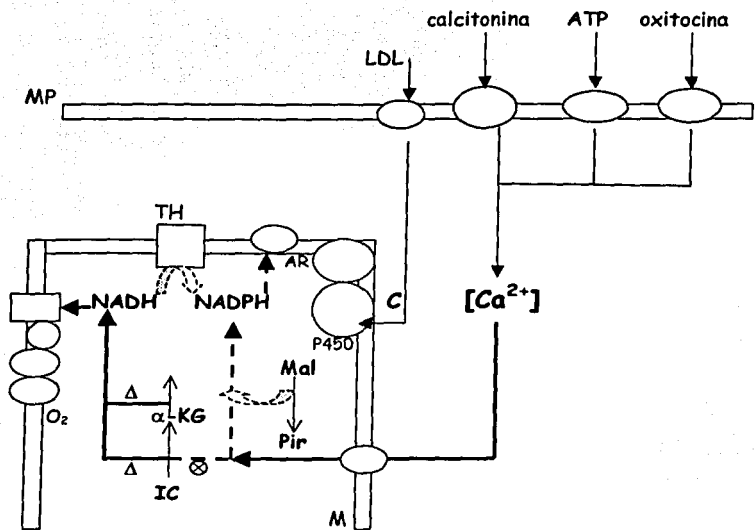
colecsterol en la membrana externa mitocondrial no es limitante durante los primeros 10 minutos de la reacción [87]. De hecho, el análogo permeable del colecsterol, el 22-hidroxicolecsterol o el colecsterol añadido como complejo albúmina-colecsterol [49] no estimularon la síntesis de P4 en nuestro sistema. El efecto inhibitor del  $\text{Ca}^{2+}$  en la síntesis de P4 también se observó con 22-hidroxicolecsterol y albúmina-colecsterol (Tabla 5); esto indica que la inhibición por  $\text{Ca}^{2+}$  no se da a nivel del transporte del colecsterol.

Existen pocos reportes en la literatura que indiquen un efecto inhibitor del  $\text{Ca}^{2+}$  en la esteroidogénesis de las glándulas suprarrenales y las gónadas [101]. De hecho, en la placenta de bovino la modulación del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la esteroidogénesis es análoga a la modulación en la zona glomerulosa de las suprarrenales [102].

La esteroidogénesis en la placenta difiere de la esteroidogénesis suprarrenal y gonadal. Los agonistas específicos, como la ACTH (suprarrenales) o LH (gónadas) no se han establecido en la placenta, donde el colecsterol se obtiene principalmente a partir de las LDL maternas. Más aún, la placenta no expresa a la proteína STAR que activa la esteroidogénesis aguda en esos tejidos.

El efecto de las concentraciones fisiológicas del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre las deshidrogenasas mitocondriales sugiere un papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en el metabolismo mitocondrial de la placenta: la activación de las NAD-deshidrogenasas del ciclo de Krebs que estimulan el consumo de oxígeno y la disminución de la síntesis de progesterona por la inhibición de la NADP-ICDH (Figura 10).





**Figura 10.** El papel del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales y la síntesis de progesterona en la placenta humana.

El aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  estimula las actividades de la NAD-ICDH y  $\alpha$ -KGDH generando el NADH que estimula la cadena respiratoria mitocondrial. Al mismo tiempo, el  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  disminuye la actividad de síntesis de P4 al inhibir a la NADP-ICDH que es la enzima que aporta principalmente el NADPH a la adrenedoxina reductasa (AR) para la reacción del citocromo P450sc. Se señala con flechas punteadas la baja participación de la enzima málica y transhidrogenasa en la generación del NADPH mitocondrial.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONCLUSIONES

- La modulación del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre las deshidrogenasas mitocondriales sugiere que estas mitocondrias no funcionan como reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  sino como blanco de la acción hormonal a través del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico.
- Las concentraciones submicromolares de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial favorecen la respiración mediante la activación de las NAD-deshidrogenasas al tiempo que restringen el flujo esteroidogénico al disminuir la disponibilidad del cofactor, en la forma de NADPH, vía la inhibición de la NADP-ICDH. Entonces, es posible que la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  en el trofoblasto regule la producción de progesterona a través de la modulación de la NADP-ICDH.
- Debido a que una de las funciones principales de las mitocondrias de la placenta humana es la síntesis de progesterona, proponemos que el  $\text{Ca}^{2+}$  regula la esteroidogénesis y la respiración mitocondrial de manera opuesta, vía la modulación de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs.

## PERSPECTIVAS

- 1) La activación por  $\text{Ca}^{2+}$  del metabolismo oxidativo mitocondrial a través de las NAD-deshidrogenasas es un evento generalizado en los tejidos de los mamíferos [36,37], (Figuras 6 y 7). Sin embargo, es una perspectiva a considerar la demostración directa de que el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  en la respiración se debe a la activación de estas enzimas. El estudio de las actividades de las deshidrogenasas en las mitocondrias intactas se puede realizar determinando, por fluorescencia, la reducción de los nucleótidos de piridina a 460 nm.
- 2) La  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  del trofoblasto es de 50 nM [61,62]. La interpretación fisiológica del efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sugerida en este trabajo se basa en la suposición de que la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  es similar a la citosólica. La presencia de un exceso de EGTA 5 mM en el medio de incubación fue necesaria para asegurar que la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  está en el orden nanomolar. Sin embargo, se debe determinar experimentalmente esta concentración. Se pueden utilizar indicadores fluorescentes como el Fluo-3AM cuya longitud de onda de excitación es a 506 nm y la de emisión a 526 nm.
- 3) La purificación y caracterización cinética de la NADP-ICDH es pertinente, ya que los resultados de este trabajo sugieren que esta enzima tiene un papel preponderante en el metabolismo esteroideogénico de la placenta humana.
- 4) La falta de evidencia experimental del papel que tiene el  $\text{Ca}^{2+}$  en el metabolismo esteroideogénico de las células de la placenta es todo un reto. Encontrar a los agonistas que incrementan la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  y afectan la esteroideogénesis en las células aisladas del trofoblasto abre toda una línea de investigación en el estudio de la regulación de la esteroideogénesis en la placenta humana.
- 5) En algunos tejidos la activación del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre las deshidrogenasas depende de la presencia de  $\text{Mg}^{2+}$ . Por ejemplo, en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , la síntesis de pregnenolona

en las mitocondrias de las suprarrenales se regula por  $Mg^{2+}$  y la transhidrogenasa ocupa el lugar de la enzima málica en cuanto a formación del NADPH para la reacción del citocromo P450<sub>sc</sub> [71]. En las mitocondrias de corazón de rata, la activación del  $Ca^{2+}$  sobre la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa se potencia con  $Mg^{2+}$  siempre y cuando se agregue un exceso de tiamina pirofosfato [80]. En nuestro estudio, la modulación de estos dos cationes sobre la NADP-ICDH fue antagónica, lo cual sugiere que el  $Mg^{2+}$  podría participar en el proceso esteroideogénico, siempre y cuando se demuestre que existen cambios significativos en la concentración de  $Mg^{2+}$  dado un estímulo hormonal o eléctrico en las células de la placenta, como se dan en otros tipos celulares [103,104].

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## BIBLIOGRAFÍA

1. Strauss III JF, Christenson LK, Devoto L y Martínez F (2000) Providing progesterone for pregnancy: control of cholesterol flux to the side-chain cleavage system. *J Reprod Fertil suppl* 55, 3-12.
2. Hall PF (1985) Trophic stimulation of steroidogenesis: In search of the elusive trigger. *Recent Prog Horm Res* 41, 1-39.
3. Jefcoate CR, McNamara BC, Artemenko I y Yamazaki T (1992) Regulation of cholesterol movement to mitochondrial cytochrome P450<sub>scc</sub> in steroid hormone synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43, 751-767.
4. Brdiczka D (1991) Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy- and protein- transfer. *Biochim Biophys Acta* 1071, 291-312.
5. Beutner G, Ruck A, Riede B, Welte W y Brdiczka D (1996) Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain mitochondria resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett* 396, 189-195.
6. Crompton M (2000) Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J Physiol* 529.1, 11-21.
7. McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR y Snyder SH (1992) Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: Association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3170-3174.
8. Papadopoulos V (1998) Structure and function of the peripheral-type benzodiazepine receptor in Steroidogenic cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 217, 130-142.
9. Trzeciak WH y Boyd GS (1973) The effects of stress induced by ether anaesthesia on cholesterol content and cholesteryl esterase activity in the adrenal cortex. *Eur J Biochem* 37, 327-333.
10. Behrman HR y Greep RO (1972) Hormonal dependence of cholesterol ester hydrolase in the corpus luteum and adrenal. *Horm Metab Res* 4, 206-209.

11. Liscum L y Underwood K W (1995) Intracellular cholesterol transport and compartmentation. *J Biol Chem* 270, 15443-15446.
12. Stocco DM (2000) Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim Biophys Acta* 1486: 184-197.
13. Pfeifer SM, Furth EE, Ohba T, Chang YJ, Rennert H, Sakuragi N, Billheimer JT y Strauss JF (1993) Sterol carrier protein 2: a role in steroid hormone synthesis?. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 47, 167-172.
14. Chanderbhan R, Noland BJ, Scallen TJ y Vahouny GV (1982) Sterol carrier protein<sub>2</sub>: Delivery of cholesterol from adrenal lipid droplets to mitochondria for pregnenolone synthesis. *J Biol Chem* 257, 8928-8934.
15. Xu X, Xu T, Robertson DG y Lambeth JD (1989) GTP stimulates pregnenolone generation in isolated rat adrenal mitochondria. *J Biol Chem* 264, 17674-17680.
16. Saez JM (1994) Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Endocr Rev* 15, 574-626.
17. Stocco DM (2001) StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol* 63, 193-213.
18. Quinn SJ y Williams GH (1988) Regulation of aldosterone secretion. *Annu Rev Physiol* 50, 409-426.
19. Barbara JG y Takeda K (1995) Voltage-dependent currents and modulation of calcium channel expression in zona fasciculata cells from rat adrenal gland. *J Physiol* 488.3, 609-622.
20. Rossier MF, Burnay MM, Vallotton MB y Capponi AM (1996) Distinct functions of T- and L- type calcium channels during activation of bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 137, 4817-4826.
21. Lu HK, Fern RJ, Luthin D, Linden J, Liu LP, Cohen CJ y Barret PQ (1996) Angiotensin II stimulates T- type Ca<sup>2+</sup> channel currents via activation of a G protein. *Gi. Am J Physiol* 271, C1340-C1349.

22. Rossier MF, Capponi AM y Vallotton MB (1988) Inositol triphosphate isomers in angiotensin II-stimulated adrenal glomerulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 57, 163-168.
23. Rossier MF, Krause KH, Lew PD, Capponi AM y Vallotton MB (1987) Control of cytosolic free calcium by intracellular organelles in bovine adrenal glomerulosa cells. Effects of sodium and inositol 1,4,5-triphosphate. *J Biol. Chem* 262, 4053-4058.
24. Burnay MM, Vallotton MB, Capponi AM y Rossier MF (1998) Angiotensin II potentiates adrenocorticotrophic hormone-induced cAMP formation in bovine adrenal glomerulosa cells through a capacitative calcium influx. *Biochem J* 330, 21-27.
25. Barrett PQ, Ertel EA, Smith MM, Nee JJ, Cohen CJ (1995) Voltage-gated calcium currents have two opposing effects on the secretion of aldosterone. *Am J Physiol* 268, C985-C992.
26. Python CP, Laban OP, Rossier MF, Vallotton MB y Capponi AM (1995) The site of action of calcium in the activation of steroidogenesis: studies in calcium clamped bovine adrenal zona glomerulosa cells. *Biochem J* 305, 569-576.
27. Kumar S, Blumberg DL, Canas JA, Maddaiah VT (1994) Human chorionic gonadotropin (hCG) increases cytosolic free calcium in adult rat Leydig cells. *Cell Calcium* 15, 349-355.
28. Foresta C, Mioni R, Bordon P, Gottardello F, Nogara A y Rossato M (1995) Erythropoietin and testicular steroidogenesis: the role of second messengers. *Eur Endocrinol* 132, 103-108.
29. Manna PR, Pakarinen P, El-Hefnawy T y Huhtaniemi IT (1999) Functional assessment of the calcium messenger system in cultured mouse Leydig tumor cells: regulation of human chorionic gonadotropin-induced expression of the steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology* 140, 1739-1751.
30. Ramnath HI, Peterson S, Michael AE, Stocco DM y Cooke BA (1997) Modulation of steroidogenesis by chloride ions in MA-10 mouse tumor Leydig cells: roles of calcium, protein synthesis and the steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology* 138, 2308-2314.

31. Dupre-Aucouturier S, Penhoat A, Rougier O, Bilbaut A (2002) ACTH-induced Cl(-) current in bovine adrenocortical cells: correlation with cortisol secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E355-E365.
32. Enyeart JJ, Mlinar B y Enyeart JA (1993) T-type Ca<sup>2+</sup> channels are required for adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by bovine adrenal zona fasciculata cells. *J Mol Endocrinol* 7, 1031-1040.
33. Foresta C, Rossatto M, Nogara A, Gottardello F, Bordon P y Di Virgilio F (1996) Role of P2-purinergic receptors in rat Leydig cell steroidogenesis. *Biochem J* 320, 499-504.
34. MacManus JP, Brewer LM, Whitfield JF (1985) The widely-distributed tumour protein oncomodulin, is a normal constituent of human and rodent placentas. *Cancer Lett* 27, 145-151.
35. Emoto Y, Kobayashi R, Akatsuka H y Hidaka H (1992) Purification and characterization of a new method of the S-100 protein family from human placenta. *Biochem Biophys Res Commun* 182, 1246-1253.
36. Hansford RG (1985) Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 102, 1-72.
37. McCormack JG, Halestrap A y Denton RM (1990) Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev* 70, 391-425.
38. Chaudhary J, Bhattacharyya S y Das C (1992) Regulation of progesterone secretion in human syncytiotrophoblast in culture by human chorionic gonadotropin. *J Steroid Biochem Mol Biol* 42, 425-432.
39. Wunsch DM, Anderson LD, Pepe GJ y Albrecht ED (1986) Regulation of progesterone formation by human placental cells in culture. *Endocrinology* 119, 998-1003.
40. Shanker YG y Rao AJ (1997) Regulation of progesterone biosynthesis in the human placenta by estradiol 17 $\beta$  and progesterone. *Biochem Molec Biol Int* 43, 591-599.



41. Seki H, Zosmer A, Elder MG y Sullivan MHF (1997) The regulation of progesterone and hCG production from placental cells by interleukin-1 $\beta$ . *Biochim Biophys Acta* 1336, 342-348.
42. Barnea ER, Fares F, Gavish M (1989) Modulatory action of benzodiazepines on human term placental steroidogenesis in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 64, 155-159.
43. Strauss III J F, Kido S, Sayegh R, Sakuragi N y Gafvels M E (1992) The cAMP signalling system and human trophoblast function. *Placenta* 13, 389-403.
44. Beaudoin C, Blomquist CH, Bonenfant M y Tremblay Y (1997) Expression of the genes for 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and cytochrome P450scc during syncytium formation by human placental cytotrophoblast cells in culture and the regulation by progesterone and estradiol. *J Endocrinol* 154, 379-387.
45. Ringler GE, Kao LC, Miller WL y Strauss III JF (1989) Effects of 8-bromo-cAMP on expression of endocrine functions by cultured human trophoblast cells. Regulation of specific mRNAs. *Mol Cell Endocrinol* 61, 13-21.
46. Lasunción MA, Bonet B y Knopp RH (1991) Mechanism of the HDL<sub>2</sub> stimulation of progesterone secretion in culture placental trophoblast. *J Lipid Res* 32, 1073-1086.
47. Kimura T (1986) Transduction of ACTH signal from plasma membrane to mitochondria in adrenocortical steroidogenesis. Effects of peptide, phospholipid and calcium. *J Steroid Biochem* 25, 711-716.
48. Martínez F y Strauss III J F (1997) Regulation of mitochondrial cholesterol metabolism. En: *Cholesterol: Its functions and Metabolism in Biology and Medicine*. Editor: Robert Bittman. Plenum Press, N.Y., pp 205-231.
49. Martínez F, Echegoyen S, Briones R y Cuellar A (1988) Cholesterol increase in mitochondria: a new method of cholesterol incorporation. *J Lipid Res* 29: 1005-1011.
50. Espinosa-García MT, Strauss JF III y Martínez F (2000) A trypsin-sensitive protein is required for utilization of exogenous cholesterol transfer for pregnenolone synthesis by placental mitochondria. *Placenta* 21, 654-660.

51. Watari H, Arakane F, Moog-Lutz C, Kallen CB, Tomasetto C, Gerton GL, Rio MC, Baker ME y Strauss JF (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94, 8462-8467.
52. Thomson M, Lim G, Hall PF y Kuzniewic I (1998) Overlay blot identification of GTP-binding proteins in mitochondria from human placenta. Placenta 19, 209-215.
53. Kuzniewic I y Thomson M (2002) GTP-binding proteins *Gsa*, *Gia*, and *ran* identified in mitochondria of human placenta. Cell Biol Int 26, 99-108.
54. Lafond J, Goyer-O'Reilly I, Larameé M y Simoneau L (2001) Hormonal regulation and implication of cell signaling in calcium transfer by placenta. Endocrine 14, 285-294.
55. Farrugia W, Gooyer T, Rice GE, Moseley JM y Wlodek ME (2000) Parathyroid hormone (1-34) and parathyroid hormone-related protein (1-34) stimulate calcium release from human syncytiotrophoblast basal membranes via a common receptor. J Endocrinol 166, 689-695.
56. Tuan RS y Kushner T (1987) Calcium-activated ATPase fo the human placenta: identification, characterization and functional involvement in calcium transport. Placenta 8, 53-64.
57. Fritsch J y Chesnoy Marchais D (1994) Dual modulation of the L-type calcium current of rat osteoblastic cells by parathyroid hormone: opposite effects of protein kinase C and cyclic nucleotides. Cell Signal 6, 645-655.
58. Ritvos O, Butzow R, Jalkanen J, Stenman UH, Huhtaniemi I y Ranta T (1988) Differential regulation of hCG and progesterone secretion by cholera toxin phorbol ester in human cytotrophoblasts. Mol Cell Endocrinol 56, 165.
59. Cassoni P, Sapino A, Munaron L, Deaglio S, Chini B, Graziani A, Ahmed A y Bussolati G (2001) Activation of functional oxytocin receptors stimulates cell proliferation in human trophoblast and choriocarcinoma cell lines. Endocrinology 142, 1130-1136.
60. Kuestner RE, Elrod RD, Grant FJ (1994) Cloning and characterization of an abundant subtype of the human calcitonin receptor. Mol Pharmacol 46,246-255.
61. Karl PI, Chusid J, Tagoe C, Fisher SE (1997)  $Ca^{2+}$  flux in human placental trophoblast. Am J Physiol 41, C1776-C1780.

62. Petit A y Belisle S (1995) Stimulation of intracellular calcium concentration by adenosine triphosphate and uridine 5'-triphosphate in human term placental cells: evidence for purinergic receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 1809-1815.
63. McCormack JG y Denton RM (1981) A comparative study of the regulation by  $Ca^{2+}$  on the activities of the 2-oxoglutarate complex and NAD<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase from a variety of sources. *Biochem J* 196, 619-624.
64. Denton RM y McCormack JG (1985)  $Ca^{2+}$  transport by mammalian mitochondria and its role in hormone action. *Am J Physiol* 249, E543-E554.
65. Brandenburger Y, Kennedy ED, Python CP, Rossier MF, Vallotton MB, Wollheim CB y Capponi AM (1996) Possible role for mitochondrial calcium in Angiotensin II- and Potassium-stimulated steroidogenesis in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 137, 5544-5551.
66. Cherradi N, Rossier MF, Vallotton MB, Timberg R, Friedberg I, Orly , Wang XJ, Stocco DM y Capponi AM (1997) Submitochondrial distribution of three key steroidogenic proteins (steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome P450<sub>sc</sub> and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase isomerase enzymes) upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem* 272, 7899-7907.
67. Cherradi N y Capponi AM (1998) The acute regulation of mineralocorticoid biosynthesis: scenarios for the StAR system. *Trends Endocrinol Metab* 9, 412-418.
68. Cherradi N, Defaye G, Chambaz EM (1994) Characterization of the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity associated with bovine adrenocortical mitochondria. *Endocrinology* 134, 1358-1364.
69. Capponi AM, Rossier MF, Davies E y Vallotton MB (1988) Calcium stimulates steroidogenesis in permeabilized bovine adrenal cortical cells. *J Biol Chem* 263, 16113-16117.
70. Pralong WF, Hunyady L, Varnai P, Wollheim CB y Spat A (1992) Pyridine nucleotide redox state parallels production of aldosterone in potassium-stimulated adrenal glomerulosa cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 132-136.

71. Pfeiffer DR y Tchen TT (1975) The activation of adrenal cortex mitochondrial malic enzyme by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ . *Biochemistry* 14, 89-96.
72. Martínez F, Chávez E y Echegoyen S (1987) Decreased exchange of adenine nucleotides in human term placental mitochondria. *Int J Biochem* 19, 275-279.
73. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ (1951) Proton measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
74. McCormack JG y Denton RM (1980) Role of calcium ions in the regulation of mitochondrial metabolism. *Biochem J* 190, 95-105.
75. Denton RM, Richards DA y Chin JG (1978) Calcium ions and the regulation of  $\text{NAD}^+$ -linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues. *Biochem J* 176, 899-906.
76. Scislowsky PWD, Zolnierowicz S y Zelewski L (1983) Subcellular distribution of isocitrate dehydrogenase in early and term human placenta. *Biochem J* 214, 339-343.
77. Moreno-Sánchez R, Torres-Márquez ME y López-Gómez FJ (1993) La determinación de la concentración de calcio libre en células y mitocondrias con indicadores fluorescentes. *Ciencia* 44, 383-396.
78. Schoenmakers TJM, Visser GJ, Flik G y Theuvenet APR (1992) CHELATOR: an improved method for computing metal ion concentrations in physiological solutions. *BioTechniques* 12, 870-879.
79. Martínez F, Echegoyen S, Briones R y Cuellar A (1988) Cholesterol increase in mitochondria: a new method for cholesterol incorporation. *J Lipid Res* 29, 1005-1011.
80. Panov A y Scarpa A (1996) Independent modulation of the activity of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ . *Biochemistry* 35, 427-432.
81. McCormack JG (1985) Characterization of the effects of  $\text{Ca}^{2+}$  on the intramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive enzymes from rat liver and within rat liver mitochondria. *Biochem J* 231, 581-595.

82. Soundar S y Colman RF (1993) Identification of metal-isocitrate binding site of pig heart NADP-specific isocitrate dehydrogenase by affinity cleavage of the enzyme by  $Fe^{2+}$ -isocitrate. *J Biol Chem* 268, 5264-5271.
83. Meigs RA y Sheehan LA (1977) *Biochim Biophys Acta* 489, 225-235.
84. Klimek J, Boguslawski W, Thalowska B y Zelewski L (1976) Regulation of progesterone biosynthesis in human placental mitochondria by Krebs cycle metabolites. *Acta Biochim Polon* 23, 185-192.
85. Swierczynski J, Scislawski P, Aleksandrowicz Z y Zelewski L (1982) NAD(P)-dependent malic enzyme in human term placental mitochondria. *Biochem Med* 28, 247-255.
86. Tuckey R C, McKinley A J y Headlam M J (2001) Oxidized adrenodoxin acts as a competitive inhibitor of cytochrome P450<sub>scc</sub> in mitochondria from the human placenta. *Eur J Biochem* 268: 2338-2343.
87. Tuckey RC, Woods ST y Tajbakhsh M (1997) Electron transfer to cytochrome P-450<sub>scc</sub> limits cholesterol side chain cleavage activity in the human placenta. *Eur J Biochem* 244, 835-839.
88. Garduño JP, Espinosa-García MT, Pardo JP y Martínez F (1992) Effect of calcium on mitochondria from human term placenta. *Placenta* 13, 535-544.
89. Rizzuto R, Brini M, Murgia M y Pozzan T (1993) Microdomains with high  $Ca^{2+}$  close to  $IP_3$ -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 262, 744-747.
90. Robb-Gaspers LD, Rutter GA, Burnett P, Hajnoczky G, Denton RM y Thomas AP (1998) Coupling between cytosolic and mitochondrial calcium oscillations: role in the regulation of hepatic metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1366, 17-32.
91. Rodríguez-Zavala JS y Moreno-Sánchez R (1998) Modulation of oxidative phosphorylation by  $Mg^{2+}$  in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 273, 7850-7855.
92. Gellerich FN, Ulrich J y Kunz W (1994) Unusual properties of mitochondria from the human term placenta are caused by alkaline phosphatase. *Placenta* 15, 299-310.

93. Illsey NP, Coade SB y Harkness RA (1983) *Biochem Soc Trans* 11, 294
94. Zolnierowicz S, Swierczynski J y Zelewski L (1982) Tightly coupled mitochondria from human early placenta. *Placenta* 3, 197-210.
95. Illsey NP, Coade SB y Harkness RA (1985) Human placental mitochondrial respiration and its regulation by adenine nucleotides. *Placenta* 6, 187-197.
96. Martínez F, Pardo JP, Flores-Herrera O y Espinosa-García MT (1995) The effect of osmolarity on human placental mitochondria function. *Int J Biochem Cell Biol* 27, 795-803.
97. Navarrete J, Flores-Herrera O, Uribe A y Martínez F (1999) Differences in cholesterol incorporation into mitochondria from hepatoma AS-30D and human term placenta. *Placenta* 20, 285-291.
98. Daum G (1985) Lipids of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 822, 1-42.
99. Lambeth JD y Kamin H (1979) Adrenodoxin reductase•Adrenodoxin complex. *J Biol Chem* 254, 2766-2774.
100. Flores-Herrera O, Pardo JP, Espinosa-García MT y Martínez F (1995) Calcium transport in human term placental mitochondria. *Biochem Mol Biol Int* 35, 793-801.
101. Yamazaki T, Kowluru R, McNamara BC y Jefcoate CR (1995) P450<sub>scc</sub>-dependent cholesterol metabolism in rat adrenal mitochondria is inhibited by low concentrations of matrix Ca<sup>2+</sup>. *Arch Biochem Biophys* 318, 131-139.
102. Shemesh M, Hansel W y Strauss III JF (1984) Calcium-dependent, cyclic nucleotide-independent steroidogenesis in the bovine placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 6403-6407.
103. Jung DW y Brierley GP (1994) Magnesium transport by mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 26, 527-535.
104. Jung DW, Apel L y Brierley GP (1990) Matrix free Mg<sup>2+</sup> changes with metabolic state in isolated heart mitochondria. *Biochemistry* 29, 4121-4128.

Date: Wed, 5 Jun 2002 17:05:05 -0400  
From: "ABB, (ELS)" <ABB@elsevier.com>  
To: "fedem@servidor.unam.mx" <fedem@servidor.unam.mx>  
Subject: ACCEPTED MANUSCRIPT ABB12002-0235/yabbi2942

Title: Ca(superscript2+) modulates respiratory and steroidogenic activities in human-term placenta mitochondria  
Ms./Prod. Nos.: ABB12002-0235/yabbi2942

Dear Dr. Martinez,

Thank you for your recent submission to ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS. On behalf of the editors, this letter serves as official notice of the acceptance of your paper for publication in the journal. Please write the production number (noted above) on all correspondence to our office for easy reference.

If you have not sent a disk containing electronic files of the different elements of your paper (not in PDF, instead files for the text, tables, and figures separately), please e-mail us with these files, or mail us a disk at this time to the address below, to the attention of Rowena Prasad, Thank you.

We will need a completed index form before we can process your paper for publication. Please note that the completion of this form is mandatory for us to fully process your paper for publication. The form is found online at the link <http://www.academicpress.com/www/journal/aidtoindex.htm>

THE INDEX FORM SHOULD BE FAXED AS SOON AS POSSIBLE (WITHIN TWO WEEKS) TO THE LOG-IN DEPARTMENT, ROWENA PRASAD, AT: 619 699 6859.

If you have any further questions about these forms or anything else about your paper, please feel free to contact us.

Thank your for your contribution to the Journal. We hope to receive more manuscripts from you in the future.

Sincerely,

Kristen Merritt  
Archives of Biochemistry and Biophysics Editorial Office  
525 B Street, Ste. 1900  
San Diego, CA 92101  
USA

619 699 6337 (voice)

619 699 6700 (fax)

NEW EMAIL - [abb@elsevier.com](mailto:abb@elsevier.com) - NEW EMAIL

\*\*For the latest updates on journal procedures, please go to [www.academicpress.com/abb](http://www.academicpress.com/abb) \*\*

**Ca<sup>2+</sup> MODULATES RESPIRATORY AND STEROIDGENIC ACTIVITIES OF HUMAN  
TERM PLACENTAL MITOCHONDRIA**

**Cecilia GARCÍA-PÉREZ, Juan Pablo PARDO, and Federico MARTÍNEZ**

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

Running title: Ca<sup>2+</sup> inhibits progesterone synthesis in human placenta

Author to whom correspondence should be addressed:

**Dr. Federico Martínez**  
Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina, UNAM  
Apdo. Postal 70-159  
04510, México, D.F.  
Phone: (5)-6232168  
Fax: (5)-6162419  
E-mail: fedem@servidor.unam.mx



## **ABSTRACT**

We investigated the effect of calcium on the oxidative metabolism and steroidogenic activity of human term placental mitochondria. Submicromolar  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations stimulated state-3 oxygen consumption with 2-oxoglutarate and isocitrate, and activated the 2-oxoglutarate and the NAD-isocitrate dehydrogenases by diminishing their Michaelis-Menten constants.  $\text{Ca}^{2+}$  inhibited NADP-isocitrate dehydrogenase (NADP-ICDH) and the synthesis of progesterone. The NADP-ICDH maximal velocity was three-fold higher than that of NAD-ICDH and had a three-fold lower  $K_m$  for isocitrate than NAD-ICDH. Isocitrate but not malate or 2-oxoglutarate supported progesterone synthesis. Calcium inhibition of progesterone synthesis was observed with isocitrate but not with malate or 2-oxoglutarate. Tight regulation of NADP-isocitrate dehydrogenase by calcium ions suggests that this enzyme plays an important role in placental mitochondrial metabolism.

**Key words:** mitochondria, steroidogenesis, placenta, respiration, NADP-isocitrate dehydrogenase, calcium

## **INTRODUCTION**

Hormonal and electrical stimulation of several cell types bring about changes in the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  in the cytosol and the mitochondrial matrix.  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  activates 2-oxoglutarate dehydrogenase (2-OGDH) and stimulates ATP synthesis [1].  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  also stimulates NAD-isocitrate dehydrogenase (NAD-ICDH) and the phosphate-phosphatase of the pyruvate dehydrogenase complex (for a review see: [2,3]). The activation of these enzymes raises the mitochondrial  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  ratio and promotes respiratory chain flux

and ATP synthesis [2,3]. The modulation of these enzymes by  $[Ca^{2+}]_c$ , via the  $[Ca^{2+}]_m$ , is one of the candidate mechanisms for the control of oxidative phosphorylation.

Steroidogenic tissues such as adrenals, gonads, brain, and placenta, transform cholesterol into pregnenolone through the action of cytochrome P450<sub>scc</sub>, localized in the inner mitochondrial membrane. P450<sub>scc</sub> requires oxygen and reduced pyridine nucleotide in the form of NADPH to catalyze the side-chain cleavage reaction. Malic enzyme, transhydrogenase and NADP-ICDH generate the NADPH used by P450<sub>scc</sub> (Figure 1).

The rate-limiting step in steroidogenesis is the transfer of cholesterol to the inner mitochondrial membrane. Several research groups demonstrated that the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) mediates cholesterol translocation from the outer to the inner mitochondrial membrane in adrenal cortex and gonads [4]. In both tissues,  $Ca^{2+}$  is involved in steroidogenesis [5-8] by stimulating the Ca-sensitive dehydrogenases in the mitochondrial matrix [6,9], or by increasing StAR levels in the cytosol, which in turn enhances cholesterol transport between the mitochondrial membranes [5].  $Ca^{2+}$  also is thought to promote contact site formation between inner and outer mitochondrial membranes [10,11], favoring cholesterol transfer and thus steroidogenesis.

Human placenta does not express StAR protein [4]. It has been suggested that cholesterol transfer in placental mitochondria is a protein-mediated process, probably involving a novel porin-like protein [12]. In addition, a protein named MLN64 with StAR-like features has also been implicated in the cholesterol transfer in placental mitochondria [13]. These results suggest that the rate-limiting step in placenta steroidogenesis is also the translocation of cholesterol between the mitochondrial membranes.

The  $[Ca^{2+}]_c$  in the unstimulated trophoblast cell is maintained around 50 nM; upon hormonal stimulation  $[Ca^{2+}]_c$  increases up to 2-5  $\mu M$  [14,15]. In addition, the mitochondrial calcium transport system shows a kinetic behavior similar to that found in other mammalian tissues [16], suggesting a possible role for calcium in mitochondrial metabolism in placenta.

Placental mitochondria have low state-3 respiratory rates [17,18] and low cytochrome and nucleotide contents [19,20], suggesting that ATP synthesis in these mitochondria is low, but sufficient to sustain mitochondrial function. However, neither the effect of  $Ca^{2+}$  on progesterone synthesis in placental mitochondria nor the effect of this ion on Krebs-cycle dehydrogenase activities has been described.  $Ca^{2+}$  did not stimulate state-3 respiration with succinate as the oxidable substrate in placenta mitochondria [21], but succinate oxidation in the presence of rotenone does not involve NAD-dehydrogenase activity.

Progesterone is produced in placental mitochondria from cholesterol through the P450<sub>scc</sub> electron transport chain and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase isomerase type I (HSD), which converts pregnenolone into progesterone. Although progesterone synthesis does not depend on  $\Delta\mu_H$ , [22], it does require membrane integrity [23]. There is a consensus that the main mitochondrial substrates for placental progesterone synthesis in *in vitro* studies are citrate and isocitrate [22].

The effect of  $Ca^{2+}$  ions on steroidogenic mitochondria, through cholesterol transfer or activation of Ca-sensitive dehydrogenases seems possible. The aim of our study was to determine, in isolated placental mitochondria, the effect of  $Ca^{2+}$  on the activity of pyridine

nucleotide dehydrogenases, oxygen consumption, and progesterone synthesis to gain further understanding of placental mitochondrial metabolism.

## **MATERIALS AND METHODS**

*Chemicals.* Mops,  $\beta$ -mercaptoethanol, EDTA, EGTA,  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ , isocitrate and 2-oxoglutarate were from Sigma. Zwittergent 3-14 was from Calbiochem. Other reagents were analytical grade.

*Isolation of human placental mitochondria.* Human placenta mitochondria were prepared essentially as described by Martínez *et al.* [24]. Briefly, human term placentas were processed within 30 min after delivery. Cotyledons were separated and washed with ice-cold 250 mM sucrose and 1 mM EDTA, adjusted to pH 7.3 with Tris-base. The tissue was homogenized in an ice cold bath by two disintegrating pulses of 45 s each, in a Polytron apparatus at 3,000 rpm. pH was adjusted to 7.3 with Tris-base and centrifuged at 1,250 x g for 15 min at 4°C in a refrigerated Sorvall RC 5B centrifuge. The supernatant was centrifuged at 4,000 x g for 10 min. Heavy mitochondria obtained by this centrifugation were discarded. The supernatant was centrifuged at 10,250 x g for 12 min. The pellet was suspended in 20 ml of sucrose-EDTA medium and centrifuged at 1,250 x g for 3 min to remove erythrocyte contamination. Finally, the supernatant was centrifuged at 11,220 x g for 12 min. The mitochondrial pellet was suspended in a small volume of sucrose-EDTA. Protein concentration was determined by the method of Lowry using BSA as standard [25].

*Oxygen consumption.* Oxygen consumption was detected polarographically using a Clark type electrode in air-saturated medium containing KCl 120 mM, Mops 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  0.2

mM, Pi 2 mM with isocitrate (IC) 0.1 mM or 2-oxoglutarate (2-OG) 0.5 mM as substrates, EGTA 5 mM and CaCl<sub>2</sub> as indicated in Results section. Mitochondria (1 mg/ml) were incubated at 34°C for 7 min (state 4); state-3 respiration was obtained by ADP addition (200-500 nmol).

*Permeabilized mitochondria.* Mitochondria were sonicated or solubilized with 0.3% Zwittergent 3-14 in a modified medium [26] containing KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, ADP 2 mM, β-mercaptoethanol 1.5 mM, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, MnCl<sub>2</sub> 2 mM, 0.2% BSA and a final protein concentration of 5 mg/ml. This preparation was centrifuged at 11,000 x g for 10 min. 90% of Krebs-cycle dehydrogenase activities were found in the pellet fraction, demonstrating that sonication or solubilization treatment retains soluble enzymes within the pellet fraction.

*Enzyme Activities.* Permeabilized mitochondria (140 μl) were incubated at room temperature in 2.5 ml of modified medium [27,28] containing KCl 120 mM, Mops 10 mM, DTT 1 mM, NAD<sup>+</sup> 2 mM, ADP 2 mM, rotenone 1 μM and EGTA 5 mM. 2-OG (plus CoA 0.25 mM) or IC and CaCl<sub>2</sub> were added as indicated in Results section. NADP-ICDH activity was assayed in a medium containing KCl 120 mM, Mops 10 mM, DTT 1 mM, NADP<sup>+</sup> 2 mM, rotenone 1 μM, EGTA 5 mM and IC. 2-OGDH or ICDH activities were assayed as NAD(P)<sup>+</sup> reduction using a Hewlett Packard 8453 diode array spectrophotometer at 340 nm. Kinetic parameters were obtained by non-linear curve fitting to the Hill equation:  $v = [V_m \cdot X^n / (K + X^n)] + V_o$ , using the Microcal™ Origin™ software.

*Ca/EGTA and Mg/EDTA buffers.* Ca/EGTA and Mg/EDTA buffers were prepared to buffer the extramitochondrial free calcium and magnesium concentrations as described in [29]. A final EGTA concentration of 5 mM and EDTA 1 mM were used in the incubation media.

The computer program "Chelator" was used to calculate free calcium and magnesium concentration [30].

*Measurement of progesterone.* Intact mitochondria (0.1 mg / 500  $\mu$ l) were incubated for 3 min at 25°C in KCl 120 mM, Mops 10 mM, EGTA 5 mM, Pi 2 mM, BSA 0.2%, ADP 2 mM, 2-OG, malic acid or IC and CaCl<sub>2</sub>, as indicated in the Results section. BSA-cholesterol complex was prepared as in [31]. The reaction was stopped with 150  $\mu$ l of methanol in an ice-cold bath. Extraction was carried on with diethyl ether 5 ml and vigorous vortexing during 3 min, followed by freezing in liquid N<sub>2</sub>. The organic phase was dried and stored until the day of the assay, when it was suspended in PBS. Progesterone was determined by radioimmunoassay using <sup>125</sup>I-progesterone Kit (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA. USA).

*Statistical analysis.* Data are expressed as mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments carried out with three different placental preparations. Significant differences were detected by Student's t test for paired samples.

## RESULTS

### *Effect of calcium on state-3 oxygen consumption*

Figure 2A shows the stimulation of state-3 oxygen consumption by extramitochondrial calcium in the presence of 0.5 mM 2-OG as substrate. Placental mitochondria state-3 basal respiration was 34.7  $\pm$  4.2 ngat O/min/mg. At 560 nM free calcium, respiration was increased to 50.6  $\pm$  9.6 ngat O/min/mg (48  $\pm$  10%). State-3 respiration with 0.1 mM IC was 19.8  $\pm$  3.8 ngat O/min/mg (Figure 3A). Maximal respiration (41.5  $\pm$  12.3 ngat O/mg/min) was obtained at 360 nM free calcium (108  $\pm$  34%). The effect of calcium on state-3

respiration was probably due to the stimulation of one or several components of the Krebs cycle and/or the respiratory chain, but not by uncoupling, since state-4 oxygen consumption was not affected (not shown).

#### *2-OGDH and NAD-ICDH activity in placental mitochondria*

Figures 2B and 3B show the 2-OGDH and NAD-ICDH activities, respectively, in Zwittergent-permeabilized mitochondria. In both cases, the enzymes showed cooperative kinetics when their respective substrates were varied, although the cooperativity was higher for NAD-ICDH. The kinetic parameters were obtained by non-linear regression analysis using the Hill equation. The results show that 2-OGDH has a  $V_{max}$  of  $84 \pm 37$  nmol NADH/min/mg, a  $K_m$  of  $0.93 \pm 0.47$  mM, and a Hill coefficient of  $1.2 \pm 0.1$ . We have to point out that  $V_{max}$  may be underestimated, since it was reported that purified porcine heart 2-OGDH achieved the maximal activity in the presence of thiamine pyrophosphate [1]. The NAD-ICDH displayed a  $V_{max}$  of  $36 \pm 16$  nmol NADH/min/mg, a  $K_m$  for IC of  $0.68 \pm 0.3$  mM, and a Hill coefficient of  $2.9 \pm 1.5$ .

#### *Effect of calcium on 2-OGDH and NAD-ICDH*

Calcium stimulation of state-3 respiration correlated with the activation of Krebs-cycle dehydrogenases. The 2-OGDH activity was stimulated at submicromolar concentrations of  $Ca^{2+}$  (Figure 2C). Half maximal stimulation was achieved at  $0.2 \pm 0.1$   $\mu M$  free calcium. Despite the stimulation of dehydrogenase activity by  $Ca^{2+}$  ( $V_{max_{app}} = 35 \pm 17$  nmol NADH/min/mg; Figure 2C), substrate availability was rate-limiting for full activation of the enzyme (Figure 2B). This effect was also observed in rat liver mitochondria [32]. Figure 2D shows that calcium decreased the  $K_m$  of the 2-OGDH for its substrate without altering the  $V_{max}$ .

Submicromolar calcium concentrations stimulated NAD-ICDH with a  $K_{0.5} = 0.95 \pm 0.1 \mu\text{M}$  and a  $V_{\text{max,app}} = 21 \pm 3 \text{ nmol NADH/min/mg}$  (Figure 3C). Figure 3D shows that calcium decreased the  $K_m$  of the NAD-ICDH for its substrate (*i.e.*  $0.37 \rightarrow 0.013 \text{ mM}$ ) without altering the  $V_{\text{max}}$  ( $27 \pm 10$  in controls vs.  $23 \pm 9$  with  $1.3 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ;  $n=3 \pm \text{SD}$ ).

#### *NADP-ICDH activity*

Figure 4A shows the NADP-ICDH activity in solubilized mitochondria. Curve fitting of the data to the Hill equation gave a  $V_{\text{max}}$  of  $99 \pm 17 \text{ nmol NADPH/min/mg}$ , a  $K_m$  for IC of  $0.26 \pm 0.08 \text{ mM}$ , and a Hill coefficient of  $1.62 \pm 0.2$ . NADP-ICDH activity from sonicated mitochondria showed similar kinetics as in solubilized mitochondria. The activity of NADP-ICDH was 3-fold greater with a  $K_m$  3-fold lower than the activity of NAD-ICDH, and did not require ADP. These results indicate that NADP-ICDH is more efficient than the NAD-ICDH, suggesting that isocitrate-dependent metabolism in placental mitochondria promotes NADPH-dependent reactions over NADH-consuming ones; *i.e.* steroidogenesis over respiratory chain activity.

#### *Effect of calcium on NADP-ICDH activity*

$1 \mu\text{M Ca}^{2+}$  inhibited 90% the activity of the NADP-ICDH in solubilized mitochondria (Figure 4B) and in sonicated mitochondria (Figure 5A). This inhibition correlated with a decrease in progesterone synthesis in the presence of calcium in intact mitochondria (see below). Non-linear curve fitting of % inhibition vs.  $[\text{Ca}^{2+}]$  gave a  $K_{0.5} = 0.33 \pm 0.2 \mu\text{M}$  for  $\text{Ca}^{2+}$  ( $n=6$ ) (Figure 4C). The inhibition of NADP-ICDH by calcium was the same regardless of the presence of  $\text{MgCl}_2$ , ATP and/or ADP in the incubation medium.

Interestingly,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  stimulated NADP-ICDH activity with a  $K_{0.5} = 75 \mu\text{M}$ , Hill coefficient =  $0.49 \pm 0.22$  and  $V_{\text{max}} = 91.3 \pm 13.2 \text{ nmol NADPH/min/mg}$  ( $n = 6$ ), and  $K_{0.5} =$



300  $\mu$ M, Hill coefficient =  $2.6 \pm 0.3$  and  $V_{max} = 145.6 \pm 4$  nmol NADPH/min/mg ( $n = 4$ ), respectively.

*Effect of calcium on progesterone synthesis*

It has been reported that isocitrate and citrate are better substrates than malate for progesterone synthesis [22,33]. In agreement with these results, progesterone synthesis supported by IC was three-fold higher than P4 synthesis in the presence of 2-OG (Table 1). Both substrates were used at saturating concentrations and in state-3 conditions, in which ATP is being produced and transhydrogenase reactions can take place. Both substrates produced almost the same amount of reduced pyridine nucleotides in permeabilized mitochondria during the first three min of incubation. P4 synthesis strongly depended on the isocitrate concentration but was independent of the concentrations of 2-OG or malate. P4 synthesis with saturating concentrations of these substrates was  $9.2 \pm 4.4$  (IC),  $2.7 \pm 2$  (malate),  $2.5 \pm 0.9$  (2-OG) nmol P4/min/mg ( $n = 4$ , by triplicate). Table I shows that substrate availability is rate-limiting for progesterone flux when it refers to isocitrate. Taken together, these results suggest that the activity of the transhydrogenase in placenta mitochondria is low. In agreement with this explanation, it has been reported that the activity of the transhydrogenase in placenta mitochondria is low compared with that of the NADP-ICDH (100 nmol/min/mg) and the malic enzyme (1-6 nmol/min/mg, [34]).

$Ca^{2+}$  inhibited steroidogenesis in placental mitochondria (Tables 2 and 3). This inhibition was observed with IC but not in the presence of malate or 2-OG, pointing out that the effect of calcium on the steroidogenic flux targets NADP-ICDH and not the transhydrogenase (2-OG flux) and the malic enzyme. Low rates of P4 synthesis with malate or 2-OG due to NADH inhibition of HSD is unlikely since HSD has been reported to

catalyze the fastest step in the placental P450<sub>scc</sub> flux, while adrenodoxin reductase content seems to be the limiting step [35]. Low P4 synthesis due to NADH inhibition of HSD is also unlikely when IC is the substrate, since the same synthesis was obtained with or without ADP (an activator of NAD-ICDH) in intact mitochondria (Table 1). Furthermore, in adrenal cortex mitochondria, 11 $\beta$ -hydroxylation of deoxycorticosterone, the step subsequent to progesterone formation, is efficiently supported by malate [36].

The inhibition of placental steroidogenesis by Ca<sup>2+</sup> was still observed with the more soluble sterol precursor 22-hydroxycholesterol, or with cholesterol added as BSA-cholesterol complex (Table 2), suggesting that the target of Ca<sup>2+</sup> in the inhibition of P4 synthesis was not the transport of cholesterol between the mitochondrial membranes. There was no increment in P4 synthesis above the control value in the first three min of the incubation with 22-hydroxycholesterol and BSA-cholesterol complex ( $8.8 \pm 4.4$ ,  $8.4 \pm 6$  and  $8.3 \pm 7.7$ , respectively). In placental mitochondria, Tuckey *et al.* [37] found no difference in pregnenolone synthesis between the control and the membrane-permeant cholesterol sulphate in the first 10 min of incubation. They argued that mitochondrial cholesterol content was saturating during the first 10 min of the reaction in isolated mitochondria and during the first 3 hours of incubation in trophoblast cells.

NADPH produced by NADP-ICDH in the first 10 min ( $\approx 100 \mu\text{M}$ ; Table 3, control value: 215 nmol/mg), supported the synthesis of  $\approx 40$  nmol P4/mg (Table 3). In contrast, P4 synthesis was 4-fold lower in the presence of 2 mM NADPH ( $\approx 10$  nmol P4/mg). This result suggests the presence of a channeling mechanism between NADP-ICDH and AR that makes electron transfer more propitious. Ca<sup>2+</sup> inhibited both the production of NADPH and P4 synthesis (Figure 5B and Table 3), with the following correlation ratios,

respectively (In % of inhibition):  $\text{Ca}^{2+}$  0.1  $\mu\text{M}$ , 18/50;  $\text{Ca}^{2+}$  0.5  $\mu\text{M}$ , 61/60 and  $\text{Ca}^{2+}$  1  $\mu\text{M}$ , 70/68.

## DISCUSSION

Several kinetic parameters and the  $K_{0.5}$  values for the effect of extramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  on the Krebs cycle dehydrogenase activities measured in the present study were similar to those reported for other mammalian tissues [38]; indeed, NAD-ICDH was also less sensitive to calcium ions, requiring micromolar concentrations for maximal stimulation in placental mitochondria. Therefore, it is possible that in trophoblast cells the maximal activity of the NAD-ICDH can be achieved when mitochondria are exposed to high concentrations of calcium in very specific domains [39,40], like the vicinity of either the endoplasmic reticulum or the voltage-dependent channels in plasma membrane.

Oxygen consumption in state 3 conditions, either with IC or 2-OG, was low compared with that observed in the ATP-demanding mammalian tissues like heart, brain or liver. The effect of calcium on steady-state fluxes, like respiration, describes a biphasic behavior: first, an acute activation at very low  $\text{Ca}^{2+}$  levels, followed by inhibition at higher concentrations of calcium. This pattern was also observed by Moreno-Sánchez [41] in rat liver mitochondria.

$\text{Ca}^{2+}$  concentration above 0.5  $\mu\text{M}$  diminished state-3 stimulation (Figures 2A and 3A) probably due to  $\text{Ca}^{2+}$  inhibition of some components of the respiratory chain or/and phosphorylating system. The same effect was found in rat liver mitochondria where extramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  below 0.8  $\mu\text{M}$  stimulated succinate-supported state-3 oxygen consumption and ATP synthesis. Higher calcium concentrations caused diminution of both

fluxes, while  $\Delta\mu_H^+$ , measured as  $\Delta\Psi$ , was not affected, dismissing a possible uncoupling effect by calcium (unpublished data).  $K_{0.5}$  values for the effect of  $Ca^{2+}$  on respiratory activities were smaller than the  $K_{0.5}$  values for its effect on the dehydrogenases, but it is worth mentioning that state-3 oxygen consumption in intact well-coupled mitochondria comprises several enzymes.

Steroid hormone synthesis requires NADPH as an electron donor for the mitochondrial cytochrome P450scc system. Three enzyme systems, matrix mitochondrial malic enzyme, NADH/NADPH transhydrogenase and NADP-ICDH may generate the NADPH used in the transformation of cholesterol into pregnenolone by cytochrome P450scc [42]. In adrenal mitochondria it was found that malic enzyme was activated by calcium ions [36] while in adrenal cells, aldosterone production was associated with an elevation of both the  $[Ca^{2+}]_c$  and the concentration of reduced pyridine nucleotide [9]. While Yamazaki *et al.* [43] found an inhibitory effect of  $Ca^{2+}$  (0.4 – 4  $\mu M$ ) on the cholesterol availability to P450scc in rat adrenal mitochondria, Cherradi *et al.* [5,6] reported that  $Ca^{2+}$  promotes STAR action in adrenal tissue.

The activation of matrix-dehydrogenases in placental mitochondria by physiological concentrations of  $Ca^{2+}$  suggests a possible role for  $Ca^{2+}$  in placental metabolism: an activation in Krebs cycle NADH-dehydrogenases (Figures 2C and 3C) will result in a larger oxygen consumption (Figures 2A and 3A), while lower NADP-ICDH activity will decrease progesterone synthesis. Indeed, Table 1 shows that progesterone synthesis strongly depends on NADPH availability, which in turn is related to the NADP-ICDH activity, since the limitation of this enzyme (from IC 10 mM to 0.1 mM or from IC 10 mM without  $Ca^{2+}$  to IC 10 mM plus  $Ca^{2+}$ ) greatly diminished the synthesis of progesterone.

$\text{Ca}^{2+}$  did not inhibit P4 synthesis in the presence of added NADPH (Table 3), implicating that  $\text{Ca}^{2+}$  effect on P4 synthesis involves NADP-ICDH activity. Although high rates and production of NADPH by NADP-ICDH are still maintained with  $0.1 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , P4 synthesis is already inhibited by 50% (Figure 5 and Table 3). Correlation ratios of % of inhibition between NADPH production and P4 synthesis (see Results and Table 3) for higher calcium concentrations indicate that P4 synthesis diminution is due to calcium inhibition of NADP-ICDH activity. Correlation ratio for  $\text{Ca}^{2+}$   $0.1 \mu\text{M}$  (NADP-ICDH inhibition 20% vs. P4 synthesis inhibition 50%; Table 3) may indicate that, although catalytic activity of NADP-ICDH is hardly affected, electron flux to AR may be compromised. Calcium is thought to promote electron diversion from AR to oxygen [43,44], favoring free radical production while diminishing cholesterol hydroxylation. Indeed, P450 systems are source of oxygen radicals, mainly superoxide anion, in steroidogenic cells [45].

Placental steroidogenesis differs from adrenal and gonadal steroidogenesis. Specific agonists, like ACTH (for adrenal tissue) or LH (for gonads) have not been established for placental steroidogenesis, where cholesterol is obtained mainly from maternal LDL (for a review, see: [46]). Moreover, the placenta does not express the STAR protein that stimulates steroidogenesis in adrenal tissue.

The human placenta produces  $\approx 300$  mg P4/day [47] and mobilizes large amounts of calcium from the mother to the fetus against a concentration gradient. However, in the cytosol of the trophoblast cell, free calcium concentrations are under  $100$  nM and respond to hormonal stimulation. The kinetic behavior of mitochondrial calcium uniport and calcium-sensitive dehydrogenases (this study) suggest that mitochondria do not function as calcium reservoirs but as targets of agonist action through  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Submicromolar  $\text{Ca}^{2+}$

concentration in the mitochondrial matrix favors respiratory activity through NAD-dehydrogenase activation while it restrains steroidogenic flux by decreasing the co-factor availability, in the form of NADPH, via NADP-ICDH inhibition. Thus, it seems possible that  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization across the trophoblast may regulate progesterone production through NADP-ICDH modulation.

Since one of the main functions of placental mitochondria is the synthesis of progesterone, we propose that  $\text{Ca}^{2+}$  regulates progesterone synthesis and mitochondrial respiration in an opposite manner, via the modulation of at least two NAD-dependent enzymes and the NADP-isocitrate dehydrogenase.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by Grants 26096-M and 37263-M from CONACyT, IN200399 from DGAPA, UNAM, and 102325 from DGEP-PAEP, UNAM. CGP has a full scholarship for Ph.D. supported by Grants 130011 from CONACyT and by UNAM-DGEP.

#### REFERENCES

- 1 Panov, A. and Scarpa, A. (1996) *Biochemistry* **35**, 427-432.
- 2 McCormack, J.G., Halestrap, A.P. and Denton, R.M. (1990) *Physiol. Rev.* **70**, 391-425
- 3 Hansford, R.G. (1985) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **102**, 1-72.
- 4 Pollack, S.E., Furth, E.E., Kallen, C.B., Arakane, F., Kiriakidou, M., Kozarsky, K.F. and Strauss III, J.F. (1997) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 4243-4251.

- 5 Cherradi, N., Rossier, M.F., Vallotton, M.B., Timberg, R., Friedberg, I., Orly, J., Wang, X.J., Stocco, D.M. & Capponi, A.M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 7899-7907.
- 6 Cherradi, N., Brandenburger, Y. and Capponi, A.M. (1998) *Eur. J. Endocrinol.* **139**, 249-256.
- 7 Brandenburger, Y., Arrighi, J.F., Rossier, M.F., Maturana, A., Vallotton, M.B. y Capponi, A.M. (1999) *Biochem. J.* **341**, 745-753.
- 8 Jayes, F.C.L., Day, R.N., Gamey, J.C., Urban, R.J., Zhang, G. and Veldhuis, J.D. (2000) *Endocrinology* **141**, 2377-2384.
- 9 Pralong, W.F., Hunyady, L., Varnai, P., Wollheim, C.B. and Spät, A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 132-136.
- 10 Kimura, T. (1986) *J. Steroid. Biochem.* **25**, 711-716.
- 11 Mahaffee, D., Reitz, R. and Ney, R.L. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 227-233.
- 12 Espinosa-García, M.T., Strauss III, J.F. and Martínez, F. (2000) *Placenta* **21**, 654-660.
- 13 Sugawara, T., Holt, J.A., Driscoll, D., Strauss III, J.F., Lin, D., Miller, W.L., Patterson, D., Clancy, K.P., Hart, I.M., Clark, B.J., et al., (1995) *Proc. Nac. Acad. Sci. USA* **92**, 4778-4782.
- 14 Petit, A. and Bélisle, S. (1995) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**, 1809-1815.
- 15 Karl, P.I., Chusid, J., Tagoe, C. and Fisher, S.E. (1997) *Am. J. Physiol.* **272**, C1776-C1780.
- 16 Flores-Herrera, O., Pardo, J.P., Espinosa-García, M.T. and Martínez, F. (1995) *Biochem. Mol. Biol. Int.* **35**, 793-801.
- 17 Zolnierowicz, S., Swierczynski, J. and Zelewski, L. (1982) *Placenta* **3**, 197-210.

- 18 Illsey, N.P., Coade, S.B. and Harkness, R.A. (1985) *Placenta* **6**, 187-198.
- 19 Gellerich, F.N., Ulrich, J. and Kunz, W. (1994) *Placenta* **15**, 299-310.
- 20 Illsey, N.P., Coade, S.B. and Harkness, R.A. (1983) *Biochem. Soc. Trans.* **11**, 294.
- 21 Garduño, J.P., Espinosa-García, M.T., Pardo, J.P. and Martínez, F. (1992) *Placenta* **13**, 535-544.
- 22 Meigs, R.A. and Sheean, L.A. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **489**, 225-235.
- 23 Black, S.M., Harikrishna, J.A., Szklarz G.D. and Miller W.L. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7247-7251.
- 24 Martínez, F., Chávez, E. and Echegoyen, S. (1987) *Int. J. Biochem.* **19**, 275-279.
- 25 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- 26 McCormack, J.G. and Denton, R.M. (1980) *Biochem. J.*, **190**, 95-105.
- 27 Denton, R.M., Richards, D.A. and Chin, J.G. (1978) *Biochem. J.* **176**, 899-906.
- 28 Scislowsky, P.W.D., Zolnierowicz, S. and Zelewski, L. (1983) *Biochem. J.* **214**, 33-343.
- 29 Moreno-Sánchez, R., Torres-Márquez, M.E. and López-Gómez, F.J. (1993) *Ciencia* **44**, 383-396.
- 30 Schoenmakers, T.J.M., Visser, G.J., Flik, G. and Theuvenet, A.P.R. (1992) *BioTechniques* **12**, 870-879.
- 31 Martínez, F., Eschegoyen, S., Briones, R. and Cuellar, A. (1988) *J. Lipid. Res.* **29**, 1005-1011.
- 32 McCormack, J.G. (1985) *Biochem. J.* **231**, 581-595.



- 33 Klimek, J., Boguslawski, W., Thalowska, B. and Zelewski, L. (1976) *Acta Biochim. Polon.* **23**, 185-192.
- 34 Swierczynski J., Scislowski P., Aleksandrowicz Z. and Zelewski L. (1982) *Biochem. Med.* **28**, 247-255.
- 35 Tuckey R.C., McKinley A.J. and Headlam M.J. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 2338-2343.
- 36 Pfeiffer, D.R. and Tchen, T.T. (1975) *Biochemistry* **14**, 89-96.
- 37 Tuckey, R.C., Woods, S.T. and Tajbakhsh, M. (1997) *Eur. J. Biochem.* **244**, 835-839.
- 38 Denton, R.M. and McCormack, J.G. (1990) *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 451-466.
- 39 Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M. and Pozzan, T. (1993) *Science* **262**, 744-747.
- 40 Robb-Gaspers, L.D., Rutter, G.A., Burnelt, P., Hajnóczy, G., Denton, R.M. and Thomas, A.P. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1366**, 17-32.
- 41 Moreno-Sánchez, R. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 4028-4034.
- 42 Swierczynski, J., Klimek, J. and Zelewski, L. (1985) *J. Steroid. Biochem.* **22**, 415-418.
- 43 Yamazaki, T., Kowluru, R., McNamara, B.C. and Jefcoate, C.R. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* **318**, 131-139.
- 44 Hanukoglu I., Rapoport R., Weiner L. and Sklan D. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 489-498.
- 45 Rapoport R., Sklan D. and Hanukoglu I. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* **317**, 412-416.
- 46 Martínez, F. and Strauss III, J.F. (1997) *in: subcellular Biochemistry Vol. 28*, edited by Robert Bittman. Plenum Press, New York, pp. 205-234.

Abbreviations used:  $[Ca^{2+}]_m$ , free mitochondrial calcium;  $[Ca^{2+}]_c$ , free cytosolic calcium; 2-OGDH, 2-oxoglutarate dehydrogenase (EC 1.2.4.2); NAD-ICDH, Isocitrate dehydrogenase NAD<sup>+</sup>-dependent (EC 1.1.1.41); NADP-ICDH, Isocitrate dehydrogenase NADP<sup>+</sup>-dependent (EC 1.1.1.42); NAD<sup>+</sup>/NADH, oxidized and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide; NADP<sup>+</sup>/NADPH, oxidized and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate; P450<sub>scc</sub>, Cytochrome P450 side chain cleavage; STAR, steroidogenic acute regulatory protein; HSD,  $\Delta^5$ -ene- $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase;  $\Delta\mu_{H^+}$ , proton electrochemical gradient;  $\Delta\psi$ , membranal potential; EDTA, ethylenediaminetetra-acetate; EGTA, [ethylenbis(oxonitrilo)]tetra-acetate; Mops, 3-[N-Morpholino]propane-sulfonic acid; BSA, bovine serum albumin; DTT, dithiothreitol; CoA, Coenzyme A; PBS, phosphate buffer saline; ACTH, adrenocorticotrophic hormone; LH, luteinizing hormone; LDL, low density lipoprotein;  $K_{0.5}$ , concentration giving half-maximal response.

#### FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** Steroidogenic pathway in placental mitochondria. Cholesterol supplied by maternal LDL is cleaved by cytochrome P450<sub>scc</sub> localized in inner membrane. Transhydrogenase reaction, matrix mitochondrial malic enzyme and NADP-isocitrate dehydrogenase provide the NADPH required by adrenodoxin reductase reaction (AR).  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase isomerase (HSD) localized in placental mitochondria transforms pregnenolone in progesterone.

**Fig. 2.** Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on 2-oxoglutarate-dependent mitochondrial metabolism. (A) State-3 oxygen consumption in intact mitochondria as percent of control. It is shown average media of four preparations; a,  $p < 0.05$  and b,  $p < 0.025$ ). (B) 2-OGDH activity in zwittergent-permeabilized mitochondria. (C)  $\text{Ca}^{2+}$  activation of 2-OGDH in permeabilized mitochondria. (D)  $\text{Ca}^{2+}$  activation of 2-OGDH decreases the  $K_m$  of the enzyme for 2-OG. Circles = control; squares =  $\text{Ca}^{2+} \approx 1.3 \mu\text{M}$ . Panels B, C and D show representative experiments of  $n = 3$ .

**Fig. 3.** Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on  $\text{NAD}^+$ -isocitrate-dependent mitochondrial metabolism. (A) State-3 oxygen consumption in intact mitochondria as percent of control. It is shown average media of four preparations; a,  $p < 0.025$ ). (B) NAD-ICDH activity in Zwittergent-permeabilized mitochondria. (C)  $\text{Ca}^{2+}$  activation of NAD-ICDH in permeabilized-mitochondria. (D)  $\text{Ca}^{2+}$  activation of NAD-ICDH decreases the  $K_m$  of the enzyme for IC. Circles = control; squares =  $\text{Ca}^{2+} \approx 1.3 \mu\text{M}$ . Panels B, C and D show representative experiments of  $n = 3$ .

**Fig. 4.** Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on NADP-isocitrate dehydrogenase in permeabilized mitochondria. (A) NADP-ICDH activity in zwittergent-permeabilized mitochondria; it is shown one representative experiment of six. (B)  $\text{Ca}^{2+}$  inhibition of NADP-ICDH activity; circles = control (IC 10 mM); squares = IC 10 mM +  $\text{Ca}^{2+}$  1  $\mu\text{M}$  ( $n = 6$ ; mean  $\pm$  SD); a,  $p < 0.01$ ; b,  $p < 0.025$  and c,  $p < 0.025$ . (C)  $\text{Ca}^{2+}$  inhibition of NADP-ICDH as percent of control,  $K_{0.5} = 0.33 \mu\text{M}$  ( $n = 6$ ; mean  $\pm$  SD). NADP-ICDH activity (in C) was assayed as

described in "Materials and Methods" plus  $MgCl_2$  1 mM, ATP 0.75 mM, ADP 0.75 mM and oligomycin 1  $\mu g/ml$ .

**Fig. 5.** Effect of  $Ca^{2+}$  on NADP-isocitrate dehydrogenase in sonicated mitochondria. (A)  $Ca^{2+}$  inhibition of NADP-ICDH activity; it is shown one representative experiment of three. (B) Time-course of NADPH production by NADP-ICDH in the presence of  $Ca^{2+}$ , it is shown average media of three preparations. NADP-ICDH was assayed as described in "Materials and Methods" plus isocitrate 5 mM.  $Ca^{2+}$  ( $\mu M$ ): a, control; b, 0.1; c, 0.2; d, 0.3; e, 0.4; f, 0.5; g, 0.75; h, 1.

#### TABLE 1

Progesterone synthesis in placental mitochondria supported by 2-oxoglutarate or isocitrate. The incubation conditions are described in "Materials and Methods". The data represent the average of four different experiments done by triplicate.

#### TABLE 2

Effect of  $Ca^{2+}$  on progesterone synthesis. 22-hydroxycholesterol and BSA-cholesterol were added to the incubation medium in the presence of isocitrate 10 mM and  $CaCl_2$  4.2 mM (that yielded  $\approx 1 \mu M$  free calcium);  $n = 4$  by quadruplicate.

**TABLE 3**

**Ca<sup>2+</sup> inhibition on progesterone synthesis. The effect of calcium on the production of NADPH and progesterone in sonicated mitochondria. Mitochondria were sonicated, on ice, in 60-s x 4 bursts. It is shown the amount of NADPH and P4 produced in 10 minutes, in the presence of 22-hydroxycholesterol 25  $\mu$ M. NADPH production by NADP-ICDH is the average of two placentas done by triplicate and their respective P4 synthesis.**

**Table 1**

[Substrate] mM	2-oxoglutarate	Isocitrate	Isocitrate
	nmol P4/min/mg		
	ADP 2 mM		
0.1	3.6 ± 2.5	3.7 ± 1.6	4.9 ± 2.7
0.5	3.8 ± 2.2	5.7 ± 1.8	6.4 ± 1.1
10	3.6 ± 2.6	11.7 ± 6.7	17.0 ± 11.6

**Table 2**

Progesterone synthesis (% Inhibition with Ca <sup>2+</sup> 1 μM)		
Control	22-OH-cholesterol 25 μM	BSA-cholesterol complex 40 μg
62 ± 18	65 ± 29	65 ± 11

**Table 3**

	NADP-ICDH production	P4 synthesis in the presence of 2 mM NADP* and 5 mM IC	P4 synthesis in the presence of 2 mM NADPH
	nmol/mg		
Ca <sup>2+</sup> (μM)	NADPH	P4	
0	215	40	11
0.1	177	20	9
0.5	83	16	10
1.0	64	13	12

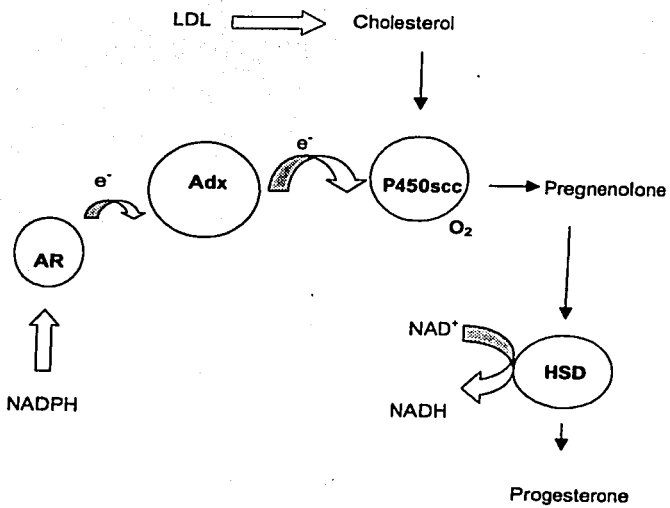


Figure 1. García-Pérez et al.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



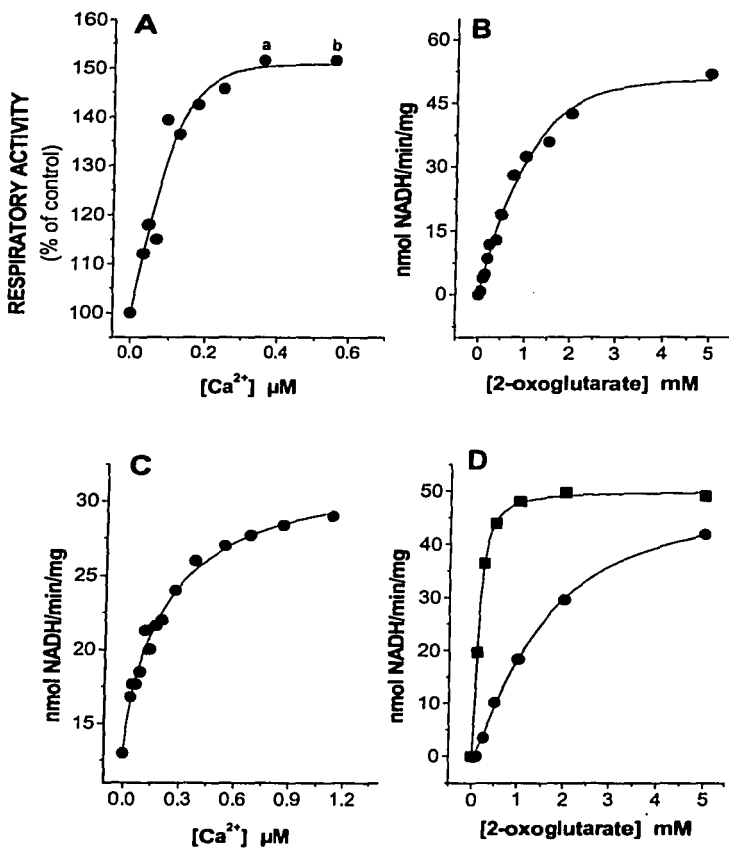


Figure 2. García-Pérez et al., ABBI2002-0235

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

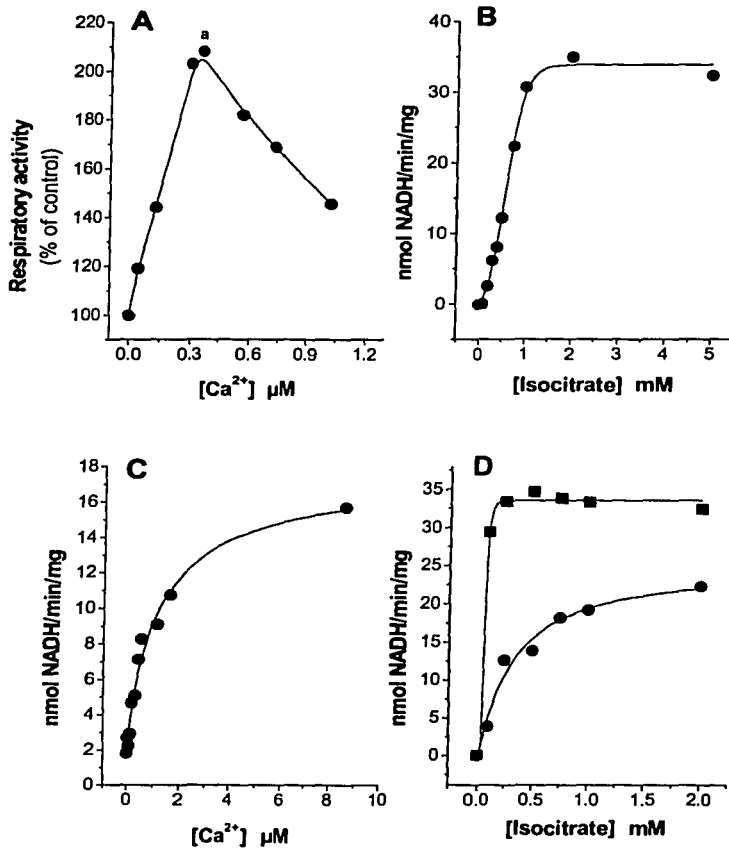
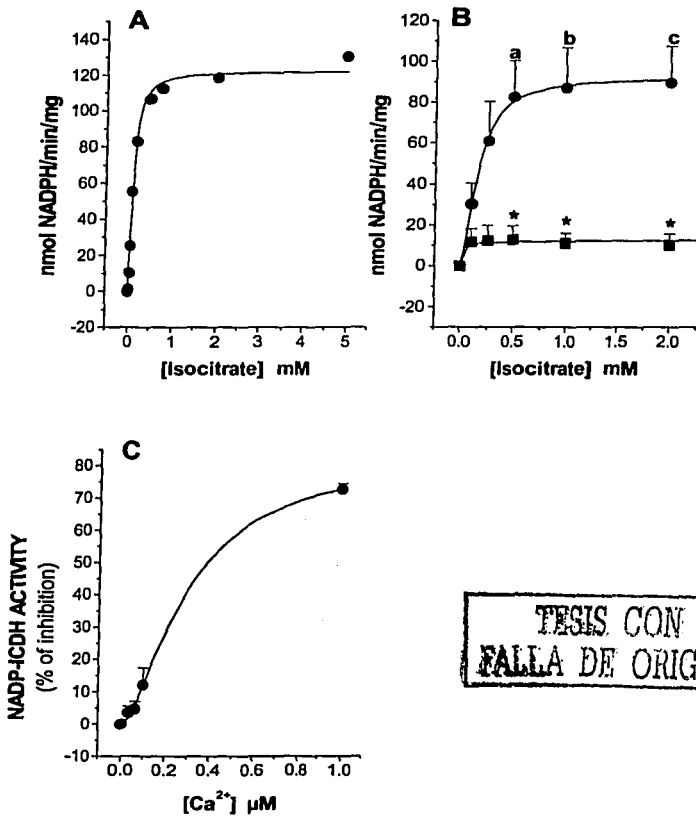


Figure 3, García-Pérez et al., ABBI2002-0235

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figure 4, García-Pérez et al., ABB12002-0235

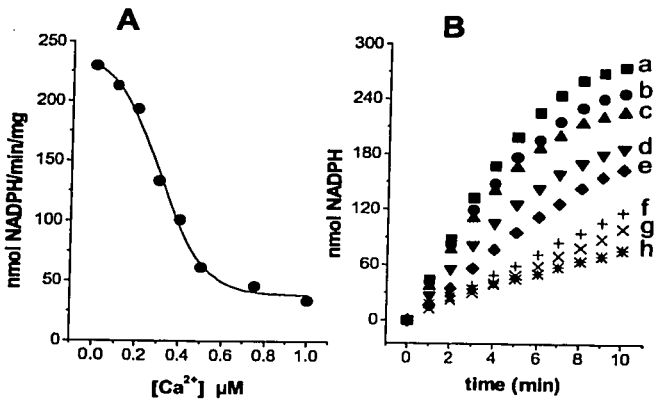


Figure 5, García-Pérez et al, ABBI2002-0235

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN