

Efecto de aniones orgánicos colefílicos sobre el transporte atp-dependiente de ácidos biliares en la membrana apical el trofoblasto de placenta humana a término

Effect of cholephilic organic anions on atp-dependent bile acid transport across the apical membrane of human term trophoblast

SERRANO, M. A. *; BRAVO, P.; GUTIÉRREZ, M.; VILLANUEVA, G. R. y MARÍN, J. J. G.
Departamentos de Fisiología y Farmacología.

RESUMEN

La transferencia de ácidos biliares (ABs) del feto a la madre a través de la placenta implica una captación por parte del trofoblasto y una salida hacia la sangre materna a través de la membrana apical de este tejido. Este proceso presenta un componente dependiente de la hidrólisis de ATP (ATPdep) y otro independiente de esta energía (ATPindep). En este estudio realizado sobre vesículas de membrana apical de trofoblasto humano se ha investigado la sensibilidad de la captación de glicocolato (GC) por ambos sistemas a la presencia de varios aniones orgánicos colefílicos (AOCs). Los ABs ursodesoxicolato y desoxicolato no tienen efecto sobre la captación ATPindep de GC pero producen una marcada estimulación de la captación ATPdep del mismo. En presencia de otros AOCs tales como ácido fusídico, rifampicina y verde de indocianina, la captación ATPdep de GC se ve fuertemente estimulada. Este aumento del transporte ATPdep de GC no se produce por una mayor tasa de la hidrólisis de ATP. Todo ello sugiere que los AOCs utilizados actúan interaccionando con la función translocadora del transportador más que con la energética del proceso. La sensibilidad a inhibidores de la proteínaquinasa C, como la estaurosporina, sugiere que el efecto estimulador de algunos AOCs implica la intervención de dicha quinasa, y por lo tanto la existencia de formas del transportador con distinta actividad en función de su nivel de fosforilación.

Palabras clave: Placenta. Transporte. Ácidos biliares. Adenosina trifosfato.

ABSTRACT

Bile acid (BA) transfer from the fetus to the mother across the placenta involves trophoblastic uptake and extrusion through the apical membrane to reach the maternal blood. The later process involves two components one dependent on the ATP hydrolysis

* Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Edificio Departamental. Avda. del Campo Charro, s/n. 37007. Salamanca.

(ATPdep) and another one independent on this energy (ATPindep). Using apical plasma membrane vesicles obtained from human term placenta, the sensitivity of both components of glycocholate (GC) uptake to the presence of several cholephilic organic anions (COAs) was investigated. No effect was found on ATPindep GC transport in the presence of the BAs ursodeoxycholate and deoxycholate, while they induced a marked stimulation of the ATPdep GC uptake. Moreover, in the presence of COAs such as fusidic acid, rifampicin and indocyanin green, ATPdep GC uptake was also strongly increased. Stimulation of ATPdep GC transport induced by some BAs and COAs, did not directly depend upon enhancement in the rate of ATP hydrolysis. Therefore an interaction with the translocating function of the carrier rather than with its energetic is suggested. The existence of sensibility of ATPdep GC transport to staurosporin, an inhibitor of the protein kinase C, suggests that the stimulation produced by some COAs on GC uptake involves somehow the action of protein kinase C, and hence the existence of different degree of phosphorylation and activity of the carrier protein.

Key words: Placenta. Transport. Bile Acids. Adenosine triphosphate.

Recibido: 28-11-96.

Aceptado: 18-12-96.

BIBLID [0004-2927(1996) 37:4; 863-870]

INTRODUCCIÓN

El hígado y la placenta son capaces de transportar ácidos biliares (ABs) a través de la membrana plasmática apical (MPa) de los hepatocitos y trofocitos, respectivamente, gracias a la existencia en estas membranas de sistemas de transporte dependientes de ATP (ATP-dep) (1-3) que pueden considerarse miembros de la superfamilia de las denominadas "traffic"-ATP-asas (4). En la membrana canalicular de hepatocitos de rata se han caracterizado al menos dos sistemas de transporte ATPdep de los cuales uno es específico para ABs y otro para aniones orgánicos, entre los que se incluyen algunos colefilicos como la bromosulfoftaleína (BSP) y el glutation (5). Asimismo, parecen existir en la membrana canalicular del hepatocito los correspondientes sistemas de transporte independientes de ATP (ATPindep) para ABs y aniones orgánicos colefilicos (AOCs) (5).

Como ha demostrado nuestro grupo, los mecanismos implicados en el transporte vectorial de ABs desde el trofoblasto a la sangre materna y desde el hepatocito hacia el canaliculo biliar presentan muchas similitudes funcionales y algunas estructurales (6). En este sentido, en el transporte de ABs a través de MPa de trofoblasto parecen estar implicados dos mecanismos, uno ATPdep y otro ATPindep o un solo mecanismo que puede funcionar con menor eficacia en ausencia de ATP. Por otro lado, en relación con la especificidad de las entidades de transporte ATPdep y ATPindep, se observó que ABs como el taurocolato, tauroquenodesoxicolato y glicoquenodesoxicolato,

(ATPdep) and another one independent on this energy (ATPindep). Using apical plasma membrane vesicles obtained from human term placenta, the sensitivity of both components of glycocholate (GC) uptake to the presence of several cholephilic organic anions (COAs) was investigated. No effect was found on ATPindep GC transport in the presence of the BAs ursodeoxycholate and deoxycholate, while they induced a marked stimulation of the ATPdep GC uptake. Moreover, in the presence of COAs such as fusidic acid, rifampicin and indocyanin green, ATPdep GC uptake was also strongly increased. Stimulation of ATPdep GC transport induced by some BAs and COAs, did not directly depend upon enhancement in the rate of ATP hydrolysis. Therefore an interaction with the translocating function of the carrier rather than with its energetic is suggested. The existence of sensibility of ATPdep GC transport to staurosporin, an inhibitor of the protein kinase C, suggests that the stimulation produced by some COAs on GC uptake involves somehow the action of protein kinase C, and hence the existence of different degree of phosphorylation and activity of the carrier protein.

Key words: Placenta. Transport. Bile Acids. Adenosine triphosphate.

Recibido: 28-11-96.

Aceptado: 18-12-96.

BIBLID [0004-2927(1996) 37:4; 863-870]

INTRODUCCIÓN

El hígado y la placenta son capaces de transportar ácidos biliares (ABs) a través de la membrana plasmática apical (MPa) de los hepatocitos y trofocitos, respectivamente, gracias a la existencia en estas membranas de sistemas de transporte dependientes de ATP (ATP-dep) (1-3) que pueden considerarse miembros de la superfamilia de las denominadas "traffic"-ATP-ases (4). En la membrana canalicular de hepatocitos de rata se han caracterizado al menos dos sistemas de transporte ATPdep de los cuales uno es específico para ABs y otro para aniones orgánicos, entre los que se incluyen algunos colefilicos como la bromosulfotaleína (BSP) y el glutatión (5). Asimismo, parecen existir en la membrana canalicular del hepatocito los correspondientes sistemas de transporte independientes de ATP (ATPindep) para ABs y aniones orgánicos colefilicos (AOCs) (5).

Como ha demostrado nuestro grupo, los mecanismos implicados en el transporte vectorial de ABs desde el trofoblasto a la sangre materna y desde el hepatocito hacia el canaliculo biliar presentan muchas similitudes funcionales y algunas estructurales (6). En este sentido, en el transporte de ABs a través de MPa de trofoblasto parecen estar implicados dos mecanismos, uno ATPdep y otro ATPindep o un solo mecanismo que puede funcionar con menor eficacia en ausencia de ATP. Por otro lado, en relación con la especificidad de las entidades de transporte ATPdep y ATPindep, se observó que ABs como el taurocolato, tauroquenodesoxicolato y glicoquenodesoxicolato,

pero no AOCs como BSP, rojo de fenol y rosa de bengala inhiben significativamente el transporte ATPdep de GC (3).

El objetivo de este trabajo fue profundizar en la capacidad de otros ABs secundarios y terciarios, así como de algunos AOCs de interaccionar en el transporte ATPdep y ATPindep de ABs de la MPa del trofoblasto de placenta humana, con especial interés en los compuestos que tenían la peculiaridad de estimular el componente ATPdep.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de Vesículas de Membrana Plasmática

Se obtuvieron preparaciones de vesículas de MPa de placenta humana a término, recogidas en el Hospital Clínico Universitario y en el Hospital "Virgen de la Vega" de Salamanca, procedentes de mujeres sanas, cuyo parto tuvo lugar por vía vaginal o cesárea tras 36 a 40 semanas de gestación, siguiendo una modificación (3) del método de Booth (7). La pureza y contaminación de las preparaciones de vesículas se cuantificó como se indica en un trabajo previo (8) valorando la actividad fosfatasa alcalina, como marcadora de la MPa y el binding de dihidroalprenolol, como marcador de receptores β -adrenérgicos presentes en la membrana plasmática basal. Las proteínas se determinaron por una modificación del método de Lowry (9). Los resultados de pureza obtenidos para las preparaciones de vesículas utilizadas en nuestro estudio fueron similares a los previamente descritos (8).

Desarrollo de los Experimentos de Captación de ABs

La retención de GC por las vesículas de membrana se estudió mediante la técnica de filtración rápida (10). Los experimentos de captación se realizaron como se describe en trabajos previos (3, 8). La composición y condiciones de los diferentes medios de carga y medios de incubación empleados se indican en las leyendas de cada una de las figuras y Tablas.

Determinación de la Tasa de Hidrólisis de ATP

El efecto de la presencia de diferentes aniones colefilicos y no colefilicos sobre la tasa de hidrólisis de ATP en la suspensión de vesículas de MPa se estudió valorando la concentración de ATP en presencia de MPa incubadas con los diferentes aniones durante 2 ó 10 min, por el método de Trautshold (11) como se describe en trabajos anteriores (3).

Análisis Estadístico de los Resultados

Excepto cuando se indique otra cosa, todos las determinaciones han sido realizadas por duplicado o triplicado y todos los resultados se han comprobado en tres o más preparaciones de MPa. Los valores se expresan como medias \pm EEM. El método de comparación múltiple de Bonferroni se usó para calcular la significación estadística de las diferencias entre grupos experimentales. Los análisis estadísticos se realizaron con un ordenador personal Macintosh SE (Apple Computer Inc., Cupertino, CA).

RESULTADOS

Efecto de Diferentes ABs y AOCs sobre la Captación de GC

Como se ha indicado en trabajos anteriores, los ABs taurocolato, tauroquenodesoxicolato y glicoquenodesoxicolato inhiben significativamente el transporte ATPdep de GC. Sin embargo, no se observaba ningún efecto en presencia de los AOCs bromosulfoftaleína (BSP), rojo de fenol y rosa de bengala en MPa del trofoblasto de placenta humana (3). Respecto a la captación ATPindep de GC, sólo los ABs ensayados y los AOCs BSP y rosa de bengala se comportan como inhibidores (3). En este trabajo se ha estudiado la sensibilidad del transporte de ABs ATPdep y ATPindep a AOCs como el verde indocianina, ácido fusídico y rifampicina y ABs tales como el desoxicolato (DC) y el ursodesoxicolato (UDC). En la Tabla 1 se representan los valores del porcentaje de captación de GC ATPdep y ATPindep de GC en presencia de los AOCs y ABs ensayados respecto al valor control en ausencia de estos compuestos. El transporte ATPindep de GC sólo se inhibía en presencia de verde de indocianina mientras que en presencia de otros AOCs como ácido fusídico y rifampicina, no sólo no se inhibía sino que se vio significativamente estimulado. Los ABs DC y UDC no modificaron la captación ATPindep de GC de manera significativa respecto al valor control. En relación a la captación ATPdep de GC, se observa en la Tabla 1, que todos los AOCs ensayados y en especial el ácido fusídico, estimulaban esta captación al igual que el DC y el UDC.

Efecto de Diferentes ABs y AOCs sobre la Hidrólisis de ATP

En estudios preliminares se descartó que la presencia de los diferentes aniones modificara significativamente el análisis de la concentración de ATP. Estos experimentos revelaron que no existen diferencias en la determinación

Tabla 1.—Efecto de diferentes AOCs y ABs sobre la captación ATPdep y ATPindep de GC en vesículas de MPa de placenta humana.

Anión	ATPindep	ATPdep
Control	100.0±2.4	100.0±3.0
V. Indocianina	76.9±4.4***	136.2±4.7***
A. Fusídico	109.2±2.2*	273.5±15.8***
Rifampicina.....	136.0±3.2***	152.9±6.7***
Desoxicolato	106.0±4.5	165.8±5.5***
Ursodesoxicolato	99.3±3.0	191.6±15.6***

La captación de GC en vesículas (20 μ l) se midió después de una incubación de 1 min a 37 °C con 80 μ l de tampón (250 mM de sacarosa, 0.2 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 100 mM KNO₃, 10 mM Hepes/Tris, pH 7.40) que contenía 50 μ M en GC y 300 μ M de los diferentes aniones en ausencia o en presencia de 3 mM de ATP más un sistema regenerante de ATP (3 mM de creatinina fosfato y 0.1 mg/ml de creatinina kinasa). Los resultados se expresan como media±EEM de los datos de captación en porcentaje del valor control determinado en ausencia de aniones colefilicos o ácidos biliares diferentes del GC. Los datos se obtuvieron por triplicado en un número total de preparaciones diferentes de 6. * p< 0.05, ** p< 0.01, *** p< 0.001 al comparar los valores de captación con el valor control según el test de comparación múltiple de Bonferroni.

de la concentración de ATP en el medio de incubación cuando los aniones se añadían al medio una vez desnaturalizadas las proteínas de las vesículas de MPa mediante la adición de ácido perclórico al 10% (Tabla 2).

La determinación de la tasa de hidrólisis de ATP expresado como ATP remanente (% del ATP inicial) se llevó a cabo tras 10 min de incubación en presencia de los diferentes aniones. Los resultados indican que no existe una reducción significativa en los niveles de ATP remanente en presencia de los diferentes aniones y ABs ensayados (Tabla 2). Sólo para el caso del verde de indocianina aparecía una marcada inhibición de la hidrólisis del ATP. Sin embargo, esta inhibición de la hidrólisis del ATP no se corresponde con un efecto negativo del verde de indocianina en el transporte de GC ATPdep, ya que este colorante también produjo un efecto estimulador de dicho fenómeno (Tabla 1).

Papel de la Proteína Quinasa C en el Transporte ATPdep de GC

Para investigar el mecanismo por el cual ABs y AOCs ensayados inducen el transporte ATPdep de GC, examinamos el efecto de un inhibidor de la proteína quinasa C, como la estaurosporina, sobre la estimulación producida por el ácido fusídico y UDC. En la Tabla 3 se observa que la estaurosporina, reduce significativamente la captación ATPdep de GC estimulada por estos compuestos.

Tabla 2.—Efecto de diferentes AOCs sobre el método de determinación de la cantidad de ATP (A) y sobre la hidrólisis de ATP por vesículas de MPa de trofoblasto de placenta humana (B).

Anión	A	B
Ninguno	21.1±8.4	100.0±51.2
V. Indocianina	23.1±6.9	310.5±89.5***
A.Fusídico	21.1±5.3	136.8±26.3
Rifampicina	28.4±8.2	84.2±16.3
Desoxicolato	22.1±8.9	89.5±15.8
Ursodesoxicolato	18.9±7.3	150.0±53.2
Azida Sódica	26.3±9.7	115.8±21.2

La concentración de ATP en el medio de incubación se midió después de incubar 10 min a 37 °C, 20 µl de vesículas de MPa con 80 µl de tampón (250 mM de sacarosa, 0.2 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 100 mM KNO₃, 10 mM Hepes/Tris, pH 7.40) más 3 mM ATP en presencia o ausencia de 300 µM de ácido fusídico, rifampicina, verde de indocianina, UDC, DC o azida sódica (Columna B). Al finalizar la incubación la actividad ATPásica se desnaturizaba con ácido perclórico al 10% antes de llevar a cabo la reacción utilizada en la determinación de la concentración de ATP. El efecto de los diferentes aniones orgánicos sobre el método de análisis (Columna A) se realizaba añadiendo 300 µM de ácido fusídico, rifampicina, verde de indocianina, UDC, DC o azida sódica después de la incubación de las vesículas en presencia de ATP, antes de su determinación. Los resultados se expresan como media±EEM de los valores obtenidos por duplicado sobre tres preparaciones diferentes de vesículas de MPa. *** p < 0.001 al comparar los valores de concentración de ATP con el valor control según el test de comparación múltiple de Bonferroni.

DISCUSIÓN

El sistema de transporte ATPindep de ABs es capaz de interactuar con un amplio rango de AOCs como se ha observado en la membrana basolateral de trofocitos de placenta humana (12). Sin embargo, en el caso del transporte ATPindep de la MPa, quizá no se trate sólo de una multiespecificidad por diferentes sustratos, sino de complejas respuestas a la presencia de estos compuestos ya que no todos los AOCs ensayados interactúan con el transportador de ABs ATPindep de la misma manera. Así, el glutation, rojo fenol, fenoftaleína y rifamicina-SV no modificaron la captación de GC ATPindep (3), la BSP, rosa de bengala (3) y verde de indocianina la inhiben (Tabla 1), el ácido fusídico y la rifampicina la estimulan, mientras que los ABs DC y UDC no afectan el transporte ATPindep de GC (Tabla 1).

El hecho de encontrar un efecto estimulador de la captación ATPdep de GC es sorprendente. Esto sugiere que la presencia de estos compuestos produce una activación del transporte capaz de superponerse a la inhibición competitiva y superarla. Una de las posibilidades que se pueden contemplar para explicar estos resultados es una estimulación en la hidrólisis de ATP o que el activador del transporte de GC, sea el ADP o AMP y que su mayor producción por hidrólisis de ATP estimulada por la presencia de estos com-

puestos, repercute en una mayor activación del transporte de GC ya que se ha comprobado la existencia de un acoplamiento entre el transporte de ABs y la hidrólisis del nucleótido (3). La determinación del efecto de los compuestos estudiados sobre la hidrólisis de ATP reveló (Tabla 2), que no existe una relación aparente entre la estimulación observada de la actividad transportadora de GC y un aumento en la hidrólisis de ATP. La ausencia de esta relación puede deberse a que la actividad del transportador de ABs de esta membrana esté controlada por un mecanismo complejo en el que la hidrólisis del ATP y la unión a un activador no tengan una relación directa, como se ha sugerido que ocurre con la glicoproteína P en células de ovario de hamster (13).

De entre los posibles mecanismos responsables de la estimulación del transporte ATPdep de GC por algunos ABs y AOCs, no puede descartarse la implicación de la proteína quinasa C, en base a que la estaurosporina reduce, aunque no elimina totalmente, el efecto activador del ácido fusídico y del UDC (Tabla 3). Podría sugerirse por tanto, que estos aniones modulan la actividad transportadora de GC en la MPa interaccionando con algún componente de la ruta de señalización de la proteína quinasa C, como ya se ha sugerido previamente (15). No obstante el esclarecimiento de la implicación exacta de esta u otras quinastas en la transferencia feto-placentaria de ABs está siendo objeto de estudio por parte de nuestro grupo.

Tabla 3.—Efecto de un inhibidor de la proteína quinasa C, la estaurosporina (EST) sobre la estimulación de la captación ATPdep de GC ejercida por Ácido fusídico (AF) y UDC en vesículas de MPa de trofoblasto de placenta humana.

<i>Componentes del medio de preincubación</i>	<i>% de captación de GC respecto al control</i>
Control (en ausencia de ATP)	100±10
ATP	210±5 (* vs control)
UDC	98±3 (* vs ATP)
UDC+ATP	285±24 (* vs UDC, * vs ATP)
UDC+ATP+EST	155±40 (* vs UDC, * vs UDC+ATP)
AF	109±2 (* vs ATP)
AF+ATP	333±50 (* vs AF, *vs ATP)
AF+ATP+EST	122±25 (* vs AF, *vs AF+ATP)

La captación de GC se midió después de una preincubación de 15 min a 37 °C de las vesículas (20 µl) con 40 µl de tampón (250 mM de sacarosa, 0.2 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 100 mM KNO₃, 10 mM Hepes/Tris, pH 7.40) en ausencia o presencia de ATP (6 mM de ATP más un sistema regenerante de ATP, 6 mM de creatinina fosfato y 0.2 mg/ml de creatinina kinasa), con o sin 600 µM de ácido fusídico (AF) o UDC, y en presencia o ausencia de estaurosporina (EST, 100 µM final) y posterior incubación de 5 min a 37 °C con 40 µl del tampón que contenía GC marcado 100 µM. Los resultados se expresan como media±EEM de los datos de captación calculados como porcentaje del valor control determinado en ausencia de ATP (Control). Los datos se obtuvieron por triplicado. El número total de preparaciones diferentes utilizadas fue de 3. * p < 0.05 según el test de comparación múltiple de Bonferroni.

La capacidad de los AOCs ensayados, así como del DC y el UDC de estimular el transporte ATPdep de ABs tiene un considerable interés debido a su potencial aplicación terapéutica para acelerar la eliminación de estas moléculas del compartimento fetal en situaciones de alteración de la homeostasis materno-fetal de ABs, tales como las que se dan en la colestasis gravídica (14).

ABREVIATURAS

Glicocolato (GC), ácidos biliares (ABs), ATP-dependiente (ATPdep), ATP-independiente (ATP indep), membrana plasmática apical (PMA), aniones orgánicos colefilicos (AOCs).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) NISHIDA, T., GATMAITAN, Z., CHE, M. X., ARIAS, I. M.: *Proc Natl Acad Sci USA* (1991), **88**:6590-6594.
- (2) STIEGER, B., O'NEILL, B., MEIER, P. J.: *Biochem J* (1992), **284**:67-74.
- (3) MARÍN, J. J. G., BRAVO, P., EL-MIR, M. Y. A., SERRANO, M. A.: *Am J Physiol* (1995), **268**:G685-G694.
- (4) DOIGE, C. A., AMES, G. F. I.: *Annu Rev Microbiol* (1993), **47**:291-319.
- (5) GATMAITAN, Z. C., ARIAS, I. M. *Physiological Reviews* (1995), **65**:261-275.
- (6) BRAVO, P., MARÍN, J. J. G., BEVERIDGE, M. J., NOVAK, D. A.: *Biochem J* (1995), **311**:479-485.
- (7) BOOTH, A. G., OLANIYAN, R. O., VANDERPUYE, O. A.: *Placenta* (1980), **1**:327-336.
- (8) SERRANO, M.A., BRAVO, P., EL-MIR, M.Y., MARÍN, J.J.G. *Biochim Biophys Acta* (1993), **1151**:28-34.
- (9) MARKWELL, M. A. K., HAAS, S. M., BEIBER, L. L., TOLBERT, N. E.: *Anal Biochem* (1978), **87**:206-210.
- (10) HOPFER, U., NELSON, K., PERROTTO, J., ISSELBACHER, K. J. J.: *Biol Chem* (1973), **248**:225-230.
- (11) TRAUTSCHOLD, I., LAMPRECHT, W., SCHWEITZER, G. In: *Methods of Enzymatic Analysis* (1985), 3ª Ed, pp.: 346-357. Verlag Chemie, Weinheim.
- (12) BRAVO, P., EL-MIR, M. Y. A., SERRANO, M. A., BOYD, C. A. R., MARÍN, J. J. G.: *Am J Physiol* (1993), **265**, G242-G250.
- (13) SHAPIRO, A. B., LING, V. J.: *Biol Chem* (1994), **269**:3745-3754.
- (14) PALMA, J., REYES, H., RIBALTA, J., IGLESIAS, J., GONZÁLEZ, M. C., HERNÁNDEZ, I., ÁLVAREZ, J., MOLINA, C., DANITZ, A. M.: *Hepatology* (1992), **15**:1043-1047.
- (15) WARD, N. E., O'BRIEN, C. A.: *Carcinogenesis* (1988), **9**:1451-1454.