



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

PROFESOR PATROCINANTE:

Dr. Felipe Barros O.

Centro de Estudios Científicos

PROFESOR CO-
PATROCINANTE:

Dr. Alejandro Reyes P.

Instituto de Bioquímica

Facultad de Ciencias

EI Na⁺ ACTIVA A LA GLICOLISIS EN CELULAS HeLa-Luc⁺

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al grado de **Licenciado en
Ciencias Biológicas.**

ASTRID MARIA SCHMIED VASQUEZ

VALDIVIA – CHILE

2006

AGRADECIMIENTOS

Esta memoria fue realizada en las dependencias del Centro de Estudios Científicos de Valdivia (CECS), específicamente en el laboratorio de Biofísica y Fisiología Molecular, y fue financiada por el proyecto Fondecyt 1051082. Mi gratitud para todos los que habitan esta casa de estudio que imparte ciencia del más alto nivel.

INDICE DE CONTENIDOS

Capítulo		Página
1.	RESUMEN	1
1.1.	Abstract	2
2.	INTRODUCCION	3
2.1.	Hipótesis de trabajo	6
2.2.	Objetivo general	6
2.2.1.	Objetivos específicos	6
3.	MATERIAL Y METODOS	7
3.1.	Materiales	7
3.2.	Métodos	7
3.2.1.	Cultivo celular	7
3.2.2.	Mediciones de fluorescencia	8
3.2.2.1.	Mediciones de Na ⁺	9
3.2.2.2.	Mediciones de pH	9
3.2.3.	Mediciones de luminiscencia	9
3.2.3.1.	Mediciones <i>in vitro</i>	10
3.2.3.2.	Mediciones <i>in vivo</i>	10
3.2.4.	Análisis de datos	10

4.	RESULTADOS	11
4.1.	Descripción, caracterización y estandarización de la técnica de la luciferina-luciferasa en células HeLa-Luc ⁺	11
4.1.1.	Aspectos generales de la técnica	11
4.1.1.1.	Modificaciones del espectro de emisión de la luciferasa	12
4.1.2.	Células HeLa-Luc ⁺ , luminiscencia y luminómetro	14
4.1.2.1.	Artefactos	17
4.1.2.2.	Manipulación de las muestras experimentales	24
4.2.	Estudio de las consecuencias de un influjo de Na ⁺ sobre el ATP en células HeLa-Luc ⁺	28
4.2.1.	Experimentación	28
4.2.2.	El Na ⁺ produce un aumento en la señal de ATP	39
4.2.3.	¿Media la Na ⁺ /K ⁺ ATPasa la activación metabólica evocada por el Na ⁺ ?	40
4.3.	Evaluación del rol de la Na ⁺ /K ⁺ ATPasa en el metabolismo energético de células HeLa-Luc ⁺	42
4.3.1.	Experimentación	43
4.3.2.	La bomba de Na ⁺ y el metabolismo energético de células HeLa-Luc ⁺	52
4.3.3.	La actividad de la Na ⁺ /K ⁺ ATPasa no media la activación metabólica energética gatillada por el Na ⁺	54
4.4.	Discriminación de las vías metabólicas energéticas activadas	56

	por el Na ⁺	
4.4.1.	El metabolismo energético y células HeLa	56
4.4.2.	Experimentación	57
4.4.3.	El Na ⁺ activa la vía glicolítica	66
5.	DISCUSION	68
5.1.	Sensor celular de ATP	68
5.2.	Mecanismo de regulación anticipatorio o <i>feed-forward</i>	69
5.3.	Conclusiones	70
	ANEXOS	
A.1.	El metabolismo energético de células HeLa-Luc ⁺	72
A.2.	Aproximaciones de las rutas de generación de ATP favorecidas por las células HeLa-Luc ⁺	74
B.1.	Procesamiento de datos	77
C.1.	Experimentos analizados en la figura 19	80
6.	BIBLIOGRAFIA	83

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Modelo aceptado de activación metabólica por el Na ⁺ .	5
Figura 2	Células HeLa-Luc ⁺ .	8
Figura 3	Reacción bioluminiscente catalizada por la luciferasa.	12
Figura 4	Cursos temporales de la reacción luciferina-luciferasa <i>in vitro</i> (a) e <i>in vivo</i> (b).	15
Figura 5	Duración de la señal estable en células HeLa-Luc ⁺ .	16
Figura 6	Inestabilidad de la señal de la reacción a 25° C <i>in vivo</i> .	17
Figura 7	Variaciones de pH afectan la señal <i>in vitro</i> .	19
Figura 8	Variaciones de pH afectan la señal <i>in vivo</i> .	21
Figura 9	Efecto de variaciones de la razón Na ⁺ /K ⁺ a fuerzas iónicas constantes sobre la señal <i>in vitro</i> .	24
Figura 10	Pérdidas de señal por manipulación <i>in vivo</i> .	25
Figura 11	La dilución de la luciferina disminuye la señal <i>in vivo</i> .	26
Figura 12	Efecto de la gramicidina sobre la señal de ATP.	29
Figura 13	Efecto de la monensina sobre la señal de ATP.	30
Figura 14	La gramicidina produce un incremento del Na ⁺ intracelular.	31
Figura 15	La monensina produce un incremento del Na ⁺ intracelular.	32
Figura 16	Efecto de la gramicidina sobre el pH intracelular.	33
Figura 17	Efecto de la monensina sobre el pH intracelular.	34
Figura 18	Efecto de la gramicidina sobre la señal de ATP en ausencia de	36

	Na ⁺ extracelular.	
Figura 19	Variaciones en la señal de ATP (a) y de la razón de SBFI (b) provocadas por la gramicidina a concentraciones decrecientes.	37
Figura 20	El Na ⁺ produce un incremento en la señal de ATP.	38
Figura 21	Funcionamiento de la Na ⁺ /K ⁺ ATPasa.	42
Figura 22	Efecto de la ouabaína sobre el Na ⁺ citosólico.	44
Figura 23	Efecto de la ouabaína sobre la señal de ATP.	45
Figura 24	El Na ⁺ produce un incremento en la señal de ATP en células pretratadas con la ouabaína.	46
Figura 25	La gramicidina produce incremento de Na ⁺ intracelular en células pretratadas con la ouabaína.	47
Figura 26	Efecto de la ouabaína sobre el aumento de ATP inducido por la gramicidina.	48
Figura 27	La ouabaína produce un incremento en la señal de ATP en células pretratadas con la monensina.	49
Figura 28	Efecto de la gramicidina sobre la señal de ATP en ausencia de K ⁺ extracelular.	50
Figura 29	La gramicidina produce un alza del Na ⁺ en células carentes de K ⁺ extracelular.	51
Figura 30	La actividad de la Na ⁺ /K ⁺ ATPasa no interfiere en el incremento de señal de ATP producido por el Na ⁺ .	52
Figura 31	Efecto del Na ⁺ en la producción de ATP en presencia de	59

	inhibidores de la fosforilación oxidativa.	
Figura 32	Efecto de la gramicidina sobre el pH y el Na ⁺ en células pretratadas con la oligomicina y la rotenona.	60
Figura 33	Efecto del Na ⁺ sobre la producción de ATP en presencia de un desacoplador mitocondrial.	61
Figura 34	Efecto de la gramicidina sobre el pH y el Na ⁺ en células pretratadas con el FCCP.	62
Figura 35	Efecto del Na ⁺ en la producción de ATP en presencia de un inhibidor de la glicólisis.	63
Figura 36	Efecto de la gramicidina sobre el pH en células pretratadas con IAA.	64
Figura 37	El Na ⁺ produce un aumento en la producción de ATP glicolítico.	66
Figura 38	Modelo propuesto de activación metabólica por el Na ⁺ .	68
Figura A 1	Efecto de la rotenona (a), el FCCP (b) y el ácido iodoacético (c) sobre la señal de ATP.	73
Figura A 2	Variaciones en la señal de ATP producidas en respuesta a los distintos venenos metabólicos.	74
Figura B 1	Procesamiento de datos de un experimento tipo.	79
Figura C 1	Cursos temporales de la gramicidina a distintas concentraciones realizados en el luminómetro.	81
Figura C 2	Cursos temporales de la gramicidina a distintas concentraciones realizados con la sonda fluorescente SBFI.	82

ABREVIATURAS

AM	Acetoximetilester
BCECF	<i>2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein ester</i>
FCCP	<i>Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone</i>
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HeLa	Henrietta Lacks
IAA	Ácido iodoacético
KRH	<i>Krebs Ringer Hepes</i>
KRH-glc	<i>Krebs Ringer Hepes</i> suplementado con 25 mM de glucosa
L	Lavado
Luc ⁺	Gen reportero de la luciferasa modificado
Luc-luc	Luciferina-luciferasa
MEM	Medio de Eagle
<i>N</i>	Número de experimentos
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
NMDG ⁺	N-metil-D-glucamina
PBS	Tampón fosfato salino
ROI	Región observada de interés
SBFI	<i>Sodium-binding benzofuran isophthalate</i>
SFB	Suero fetal bovino
U.R.L.	Unidades Relativas de Luz
°C	Grados Celsius

1. RESUMEN

El modelo de activación del metabolismo energético celular por parte del Na^+ propone como mediador a la Na^+/K^+ ATPasa, sugiriendo que influjos del catión aumentan la producción de ATP para suplir la demanda de la proteína, que alcanza hasta un 80% del ATP celular. De esta manera, la Na^+/K^+ ATPasa articula la activación del metabolismo provocado por el Na^+ según el modelo aceptado.

Utilizando una línea celular epitelial que expresa constitutivamente el gen reportero de la luciferasa (HeLa-Luc⁺) para medir la concentración de ATP citosólico en tiempo real, observamos que la gramicidina, un ionóforo de Na^+ , indujo un alza inmediata de la luminiscencia, con una tasa de $2,8 \pm 0,5\%/min$. El efecto del ionóforo, sin embargo, no fue anulado por la ouabaína, un inhibidor específico de la bomba de Na^+ , arrojando valores cercanos a la tasa control ($3,4 \pm 1,0\%/min$). Para confirmar la participación del Na^+ , se efectuaron experimentos en donde éste se reemplazó equimolarmente por el NMDG⁺, un catión no permeable, advirtiéndose una disminución en la luminiscencia a razón de $-2,1 \pm 0,3\%/min$ en respuesta a la gramicidina.

Con el objetivo de discriminar la vía metabólica sensible al Na^+ , se realizaron experimentos utilizando la oligomicina-rotenona como inhibidores mitocondriales y el ácido iodoacético (IAA) para detener a la glicólisis. La supresión mitocondrial no abolió la respuesta generada por la gramicidina, aumentando la luminiscencia a razón de $3,5 \pm 0,6\%/min$; mientras que la respuesta a la inhibición glicolítica fue variable.

Estos resultados son inconsistentes con el modelo aceptado, y en cambio sugieren, que el Na^+ es capaz de activar la producción glicolítica de ATP por un mecanismo independiente a la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa.

1.1. Abstract

The model of activation of energetic cellular metabolism by Na^+ proposes to Na^+/K^+ ATPase as mediator, suggesting that influxes of the cation increases the ATP production to supply the demand of the protein, that reach until an 80% of the cellular ATP. In this way, the Na^+/K^+ ATPase articulates the activation of metabolism evoked by Na^+ according to the accepted model.

Using an epithelial cellular line that constitutently expresses the luciferase reporter gen (HeLa-Luc⁺) to measure cytosolic ATP concentration in real time, we observed that gramicidin, a Na^+ ionophore, induces an immediately raise of luminescence, with a rate of $2.8 \pm 0.5\%/min$. The effect of the ionophore, nevertheless, was not abolished by ouabain, a specific inhibitor of the sodium pump, throwing near values to the control rate ($3.4 \pm 1.0\%/min$). In order to confirm the participation of Na^+ , there were done experiments where the cation was replaced by NMDG⁺, a no permeable cation, warning a diminution in the luminescence to rate of $-2.1 \pm 0.3\%/min$ in response to gramicidin.

With the objective to discriminate the metabolic path sensitive to Na^+ , there were made experiments using oligomycin-rotenone as mitochondrial inhibitors and iodoacetic acid to stop glycolysis. The mitochondrial suppression did not annul the response generated by gramicidin, increasing the luminescence to rate of $3.5 \pm 0.6\%/min$; while the answer to glycolitic inhibition was variable.

These results are inconsistent with the accepted model, and on the contrary suggest, that Na^+ is able to activate the glycolitic ATP production by an independent mecanism of the Na^+/K^+ ATPase activity.

2. INTRODUCCION

La concentración del Na^+ en el interior de la célula animal es diez veces menor que en el espacio extracelular. La proteína encargada de mantener este gradiente es la Na^+/K^+ ATPasa, denominada también bomba de Na^+ .

La bomba de Na^+ , miembro de la superfamilia de ATPasas de tipo P, es una proteína de membrana compuesta por 3 subunidades, α , β y γ (Jorgensen *et al.*, 2003; Pu *et al.*, 2002) cuya función consiste en transportar tres iones Na^+ al espacio extracelular e ingresar dos iones K^+ al citosol, utilizando la energía proporcionada por la hidrólisis de una molécula de ATP (figura 21).

El adenosín trifosfato (ATP), es una molécula extremadamente versátil constituida por adenina, D-ribosa y tres grupos fosfatos unidos linealmente a la posición 5' del azúcar en cuyos enlaces químicos subyace su naturaleza como combustible universal. La energía proporcionada por la hidrólisis del nucleótido es utilizada por la célula principalmente en la mantención de los gradientes iónicos, síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, y duplicación celular. Las concentraciones de ATP presentes en las células fluctúan entre 1 y 10 mM (Barros *et al.*, 2003; Szewczyk y Pikula, 1998) y resultan del balance entre los mecanismos que gastan el ATP y los que lo producen. Los principales bloques generadores de energía son la glicólisis y la fosforilación oxidativa.

La glicólisis es un proceso altamente regulado que acontece en el citosol e involucra la partición y oxidación de la glucosa a piruvato en diez etapas enzimáticas consecutivas, con la producción neta de dos moléculas de ATP. En la fosforilación

oxidativa, que se desarrolla en la mitocondria, el piruvato es oxidado a CO_2 generándose hasta treinta y cuatro moléculas de ATP.

Entre las concentraciones de Na^+ y los niveles de ATP presentes en la célula, en la literatura tanto de textos de estudio como de diversas revisiones científicas, se establece la existencia de un vínculo indirecto, y se sitúa a la Na^+/K^+ ATPasa como intermediario en el proceso. Así, la activación del metabolismo energético por parte del Na^+ se explica de la siguiente manera: aumentos en la concentración del catión en el citosol activan a la bomba de Na^+ (Therien y Blostein, 2000), produciendo un aumento en la velocidad de bombeo y por ende, de gasto de ATP. Teniendo como antecedente que la demanda de la proteína fluctúa entre un 20 y un 80% del ATP celular (Attwell y Laughlin, 2001; Jorgensen *et al.*, 2003), la consecuente disminución en la razón ATP/ADP sería detectada por los sistemas de producción del nucleótido, incitando su activación. Ciertos tipos celulares utilizan como sistema generador preferentemente a la glicólisis, mientras que otros, a la fosforilación oxidativa (Donnelly y Scheffler, 1976; Soltoff y Mandel, 1984; Kalbacova *et al.*, 2003). Independiente de la fuente empleada, la bomba de Na^+ es abastecida de la energía requerida, y finalmente los niveles del Na^+ se reestablecen en un nuevo estado estacionario. De esta forma, en el modelo aceptado (figura 1) se ha establecido que la activación metabólica incitada por el Na^+ tiene como modulador a la Na^+/K^+ ATPasa (Balaban *et al.*, 1980).

La siguiente memoria trata aspectos relevantes de la bioquímica clásica y trae al presente, procesos metabólicos que hace más de 50 años encendieron la mente de numerosos científicos. Basa su desarrollo en estudios de biología celular con la tecnología actual y tiene como personajes principales a ejecutores de la viabilidad

celular: el Na^+ , la bomba de Na^+ , el ATP y las rutas generadoras de energía. Intenta no solo relacionarlos, sino que también pretende ordenarlos causalmente. Los frutos del presente trabajo sugieren un mecanismo nuevo para la activación metabólica por parte del Na^+ .

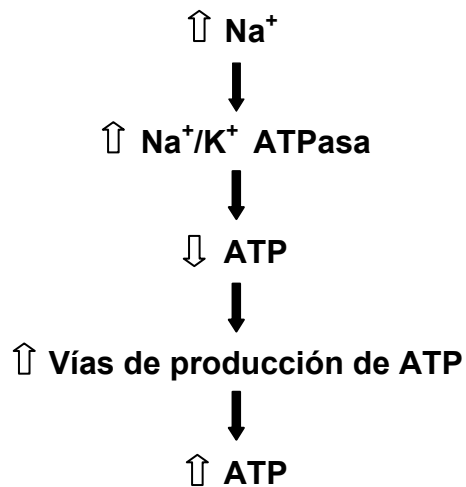


Figura 1. Modelo aceptado de activación metabólica por el Na^+ . Influjos de Na^+ activan a la Na^+/K^+ ATPasa, lo que trae como consecuencia una disminución de los niveles de ATP citosólicos. Las rutas de producción de ATP son activadas y los niveles restaurados. Finalmente, la concentración de Na^+ retorna a sus niveles basales.

2.1. Hipótesis de trabajo

El Na^+ incrementa la producción de ATP por un mecanismo independiente a la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa.

2.2. Objetivo general

Evaluar el papel del Na^+ en el metabolismo energético de células HeLa-Luc⁺.

2.2.1. Objetivos específicos

- Descripción, caracterización y estandarización de la técnica de la luciferina-luciferasa en células HeLa-Luc⁺.
- Estudio de las consecuencias de un influjo de Na^+ sobre el ATP en células HeLa-Luc⁺.
- Evaluación del rol de la Na^+/K^+ ATPasa en el metabolismo energético de células HeLa-Luc⁺.
- Discriminación de las vías metabólicas energéticas activadas por el Na^+ en células HeLa-Luc⁺.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Materiales

La luciferina, la luciferina-luciferasa, el adenosín 5'-trifosfato (sal de sodio) ATP, la N-metil-d-glucamina (NMDG⁺), el etilen glicol-bis(aminoetil éter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético (FCCP), el ácido iodoacético (IAA), la ouabaína, la monensina (sal de sodio), la rotenona, la oligomicina, la nigericina y la gramicidina D fueron adquiridos desde Sigma (St. Louis, MO, EEUU). El ácido plurónico y las sondas fluorescentes SBFI-AM y BCECF-AM fueron obtenidas en Molecular Probes (Eugene, OR, EEUU). El HEPES (sal de sodio) y el cloruro de amonio se compraron en J. T. Baker (Xalostoc, México) y el dimetil sulfóxido en Calbiochem (Darmstadt, Alemania).

3.2. Métodos

3.2.1. Cultivo celular

La línea celular epitelial humana de carcinoma cervical HeLa, transfectada con el plásmido pOPRSVI/Luc⁺, que expresa establemente el gen reportero citosólico de la luciferasa, fue traída desde Okazaki, Japón, cortesía del Dr. Yasunobu Okada (Barros *et al.*, 2003) . Los cultivos celulares fueron mantenidos en medio MEM (Gibco, Gran Island, NY, EEUU), suplementado con 10% SBF (HyClone, South Logan, UT, EEUU), geneticina 500 µg/ml (Gibco, Gran Island, NY, EEUU) e higromicina B 100 µg/ml (Sigma, St. Louis, MO, EEUU). Las células fueron crecidas a 37° C en 5% CO₂ /95% aire en una atmósfera húmeda. Cuando se alcanzó una confluencia de aproximadamente 80 %, las células, previamente lavadas 3 veces con 5 ml de PBS al

1%, fueron subcultivadas utilizando una solución de tripsina al 0,05% por 5 minutos a 37 °C; proceso que fue neutralizado agregando 6 ml de medio MEM suplementado con SBF 10%. Las células HeLa-Luc⁺ (figura 2) fueron utilizadas entre 2 y 4 días de crecidas con pasajes que fluctuaron entre el 6 y el 25.

Los experimentos fueron realizados en el tampón Krebs-Ringer-HEPES (KRH) que contiene en mM: 136 NaCl, 10 HEPES, 4,7 KCl, 1,25 MgSO₄, y 1,25 CaCl₂, a pH 7,4. En la experimentación *in vivo* se suplementó con 25 mM de glucosa (KRH-glc).

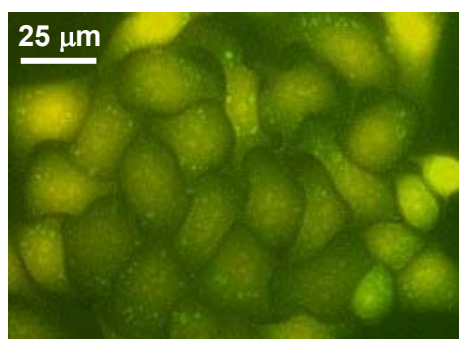


Figura 2. Células HeLa-Luc⁺. Se muestra una fotografía de células cargadas con la sonda fluorescente BCECF que se obtuvo antes de comenzar un experimento.

3.2.2. Mediciones de fluorescencia

Para la cuantificación de la señal se utilizó un microscopio Olympus IX70, equipado con un monocromador Cairn y una cámara digital Hamamatsu, bajo control del software Kinetic Imaging. La fluorescencia fue medida en regiones de interés (ROIs) y la señal de fondo fue registrada en aquellas regiones del campo desprovistas de células, valor que fue sustraído a las mediciones. Para todos los experimentos se usó un objetivo 40x con una apertura numérica de 1,3.

Las células sembradas en cubreobjetos de vidrio circulares de 25 mm de diámetro (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, EEUU) fueron montadas sobre una cámara abierta construida por Bio JSP (Santiago, Chile), y cargadas con las respectivas sondas en su forma acetoximetilester (AM). Transcurrido el tiempo de carga, la preparación fue lavada y los experimentos comenzaron 30 minutos después, una vez finalizado el proceso de desesterificación de las sondas. Los registros se llevaron a cabo en tampón KRH-glc (500 μ l) a temperatura ambiente (20-24 °C).

3.2.2.1. Mediciones de Na⁺

La sonda SBFI fue excitada a las longitudes de onda 340 y 380 nm, computándose la razón entre las emisiones detectadas a 535 ± 40 nm. La carga se extendió por 30 minutos a concentraciones de 1 μ M.

3.2.2.2. Mediciones de pH

La sonda BCECF fue excitada a dos longitudes de onda, 440 y 495 nm. Se registró la razón entre las emisiones a 535 ± 40 nm. La carga se extendió por 10 minutos a concentraciones de 0,1 μ M.

3.2.3. Mediciones de luminiscencia

La luminiscencia fue medida con un Luminómetro Sirius, controlado por el software FB12 Sirius, en unidades relativas de luz (U.R.L.), equivalentes a las cuentas por segundo obtenidas por el detector en el rango 370-630 nm. El equipo entrega una salida lineal en un rango mínimo de cinco ordenes de magnitud de emisión lumínica.

Los experimentos se realizaron en tubos *ependorf* de 2 ml (Andes Import, Santiago, Chile) a 28 °C, temperatura que fue controlada por un baño termorregulador acoplado al equipo. Se trabajó en un cuarto oscuro.

3.2.3.1. Mediciones *in vitro*

Los experimentos se realizaron en presencia de KRH (500 μ l), ATP-Mg⁺² 2 mM y luciferina-luciferasa 6 μ g/ml (los dos últimos alicuotados en KRH).

Las mediciones fueron obtenidas e integradas cada 1 segundo.

3.2.3.2. Mediciones *in vivo*

Las células HeLa-Luc⁺ fueron crecidas en cubreobjetos de vidrio rectangulares de 5 por 22 mm aproximadamente (Hirschmann laborgerate, Eberstadt, Alemania) e incubadas en KRH-glc (1700 μ l) con luciferina 100 μ M (aliquotada en HEPES/Na⁺ 10 mM a pH 7,4), en el baño termorregulador por periodos de tiempos de 30 minutos a 2 horas. Luego de la estabilización de la señal, se aplicaron los tratamientos respectivos.

Las mediciones fueron obtenidas e integradas cada 15 segundos.

3.2.4. Análisis de datos

Los datos se indican como promedio \pm error estándar de n número de experimentos independientes. Se realizaron pruebas de t de *student* para comparar dos muestras y los datos obtenidos de múltiples grupos fueron evaluados por ANOVA. Se consideró que las diferencias eran significativas cuando el $P < 0,05$. La construcción de los gráficos y el análisis de los datos se hicieron utilizando el programa Sigma Plot 9.0.

4. RESULTADOS

4.1. Descripción, caracterización y estandarización de la técnica de la luciferina-luciferasa en células HeLa-Luc⁺

4.1.1. Aspectos generales de la técnica

La técnica de la luciferina-luciferasa constituye hoy en día una herramienta poderosa para medir el ATP en células de mamíferos (Manfredi *et al.*, 2002). Presenta fundamentalmente tres ventajas frente a los otros métodos utilizados hasta ahora. La primera, se refiere a la alta sensibilidad del ensayo, debido a que su producción de cuantos de luz es la más eficiente conocida para cualquier reacción de quimioluminiscencia (Seliger y McElroy, 1960). La segunda, tiene relación con la medición en tiempo real, es decir, mediante ella se puede monitorear el ATP por períodos de tiempo prolongado, ya sea hasta que la enzima se denature o simplemente hasta que las células mueran. La tercera, y más importante aún, se remite a la integridad celular, permitiendo hacer mediciones en cultivos intactos, respetándose la organización celular.

El ensayo tiene sus bases en una compleja reacción química catalizada por la luciferasa, una proteína monomérica de 61 kDa extraída de la luciérnaga norteamericana *Photinus pyralis*. La luciferasa tiene como sustrato a la luciferina, además de ATP y oxígeno molecular (O₂), y genera como productos oxiluciferina, AMP, fosfato inorgánico (PPi), CO₂ y luz visible (figura 3).

La utilidad de la técnica radica en la dependencia de ATP de la reacción y en la consecuente producción de luz; hechos que se relacionan de manera directa y que

permiten, en su defecto, tener una medida del nucleótido en base a la luminiscencia obtenida.

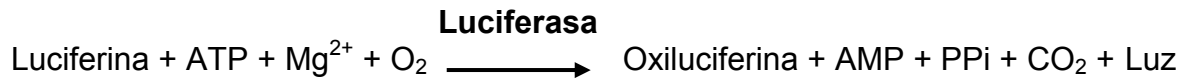


Figura 3. Reacción bioluminiscente catalizada por la luciferasa. La luminiscencia obtenida, representa una medida directa y proporcional a la concentración de ATP citosólico presente en la célula.

De la ecuación de la figura 3 se desprende que la luciferasa gasta ATP. En principio, esta situación podría afectar la variable que se pretende medir, pero la tasa de producción de fotones en la línea celular HeLa-Luc⁺ es despreciable en comparación con la tasa de recambio de ATP, situación que admite la visualización de señales estables en el tiempo (figura 5, por ejemplo), y que permite afirmar, que la presencia de la enzima no perturba el metabolismo energético en forma significativa.

4.1.1.1. Modificaciones del espectro de emisión de la luciferasa

La enzima de *Photinus pyralis* ha sido caracterizada como pH dependiente (Viviani, 2002) debido a que el espectro de emisión normal de la reacción, *in vitro*, se desplaza desde un color amarillo-verde con una emisión máxima a 562 nm a una banda roja con un máximo a 620 nm en presencia de medios ácidos (Seliger y McElroy, 1960), observándose una mezcla de los dos espectros a pHs neutros (White *et al.*, 1971). Además, porque el número de cuantos de luz emitidos por molécula de luciferina

oxidada disminuye, haciéndose menor que uno a medida que el medio se acidifica (Seliger y McElroy, 1960). *In vivo*, el espectro de emisión no ha mostrado diferencias con el determinado *in vitro*, al menos a pH 7,6 (Seliger y McElroy, 1964).

La temperatura es otro factor que afecta la eficiencia de la enzima y por ende, a los dos posibles espectros de emisión (Seliger y McElroy, 1964). A pH 7,6, el óptimo para la emisión amarillo-verde es de 21 °C, mientras que el de la banda roja está aproximadamente en 29 °C. La luciferasa se ve inactivada de manera irreversible por sobre los 35 °C (Green y McElroy, 1956).

No solo el pH y la temperatura repercuten en el espectro de luz emitida, sino que también la modificación de las fuerzas iónicas del medio. Tanto el Na⁺ como el K⁺ inhiben la producción de luz (Green y McElroy, 1956), y el efecto puede observarse aún en condiciones experimentales en las cuales las fuerzas iónicas se mantienen constantes con variaciones de la razón Na⁺/K⁺. Otros cationes y aniones, en distintas proporciones, igualmente deprimen la producción de luz (Aledort *et al.*, 1966).

Entre las hipótesis que han sido postuladas para explicar el sistema de espectros que presenta la reacción, dos son las que presentan mayor evidencia. La primera guarda relación con los estados conformacionales de la oxiluciferina (White *et al.*, 1971), y establece básicamente que cambios desde la forma protonada, que presenta un grupo ceto con un máximo de emisión a 610 nm, a la forma deprotonada, que tiene un grupo enol con un *peak* a 560 nm explicarían el fenómeno (Aflalo, 1991). La segunda esta basada en la presencia de dos sitios de unión para nucleótidos (DeLuca y McElroy, 1984), uno para ATP y otro para dATP. Dependiendo del nucleótido que conforme el complejo de emisión se observan dos espectros distintos: uno con un

máximo de emisión a 575 nm para el caso del primero, y otro con un *peak* a 610 nm para el segundo caso (Steghens *et al.*, 1998).

Mas allá de las explicaciones que puedan encontrar las modificaciones que presenta el espectro de emisión por los factores fisicoquímicos expuestos (pH, temperatura, iones, etc.), cabe destacar que el proceso de luminiscencia ocurre en una célula viva y la complejidad de los mecanismos que puedan estar involucrados en su regulación se desconocen.

4.1.2. Células HeLa-Luc⁺, luminiscencia y luminómetro

Este trabajo fue realizado utilizando una línea celular HeLa que presenta una transfección estable que codifica para el gen de la luciferasa (*luc⁺*) de *Photinus pyralis*, a la cual se le ha escindido la secuencia de destinación al peroxisoma, y el equipo utilizado para registrar la luminiscencia celular fue un luminómetro. Considerando que no existen mayores informes que detallen las cinéticas que desprende la reacción en este instrumento, tanto para experimentación *in vitro* como *in vivo*, y mucho menos que tomen en cuenta la magnitud de las variaciones que pudieran presentarse debido a los factores que afectan el espectro de emisión, fue necesario, en primera instancia, caracterizar los registros bajo distintas condiciones.

La figura 4a muestra la curva característica que desprende la reacción en un gran porcentaje de los experimentos realizados *in vitro*. El curso puede definirse como bifásico, con una señal inicial máxima instantánea y un posterior descenso lento y prolongado. Utilizando las mismas condiciones de experimentación, no siempre pudo observarse la misma curva y la cantidad de Unidades Relativas de Luz (U.R.L.)

registrada también fluctuó. Con respecto a la primera fase, la magnitud del *peak* varió considerablemente; en algunos ensayos se presentó dos veces, y en otros simplemente desapareció. Durante la segunda fase, en algunos experimentos no se obtuvo una señal estable, y en su defecto se observó ya sea una curva en forma de campana o una caída irreversible en el tiempo.

Los cursos temporales *in vivo* (figura 4b) no distaron mayormente de los registrados *in vitro*, y presentaron básicamente las mismas variantes descritas en el párrafo anterior. Esta vez, las diferencias en las cinéticas y en las U.R.L. detectadas se ven directamente afectadas por el número de células presentes en el cubreobjeto.

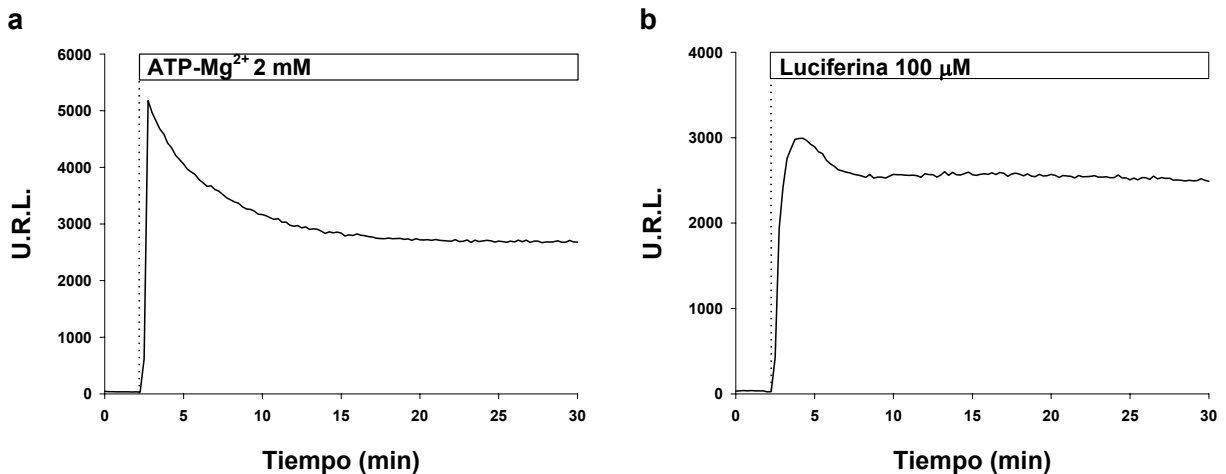


Figura 4. Cursos temporales de la reacción luciferina-luciferasa *in vitro* (a) e *in vivo* (b). (a) 6 μg/ml de luciferina-luciferasa fueron agregadas al tiempo 0. Los experimentos (a) y (b) fueron realizados como se explica en Materiales y Métodos. Las líneas punteadas indican el inicio de los tratamientos que se detallan en los recuadros.

In vivo, la estabilización de la señal (requisito para iniciar cualquier experimento)

no siempre pudo observarse a los 5 minutos de haber adicionado la luciferina como muestra la figura 4b, y dependiendo del experimento, el lapso de tiempo llego a extenderse por hasta 2 horas (figura 5, por ejemplo). Como una manera de obviar la fase de estabilización común para todos los experimentos y una vez realizado el control que indica que la duración de la línea base se extiende por aproximadamente 4 horas (ver figura 5), las células fueron preincubadas con luciferina 100 μ M en un baño a 28 °C por períodos de tiempo de 30 minutos hasta 2 horas, luego de lo cual comenzaron los registros.

La concentración de luciferina utilizada fue escogida ya que no producía saturación de la señal en el equipo, pudiéndose observar señales considerables y líneas bases estables en el tiempo.

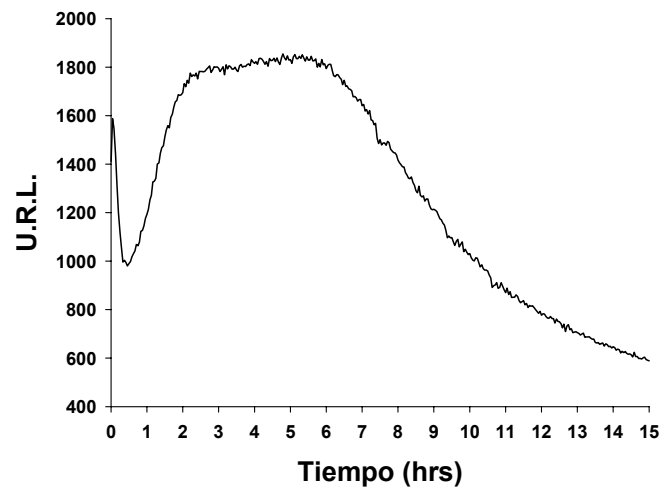


Figura 5. Duración de la señal estable en células HeLa-Luc⁺. La luciferina fue agregada al tiempo 0. Se registraron tomas cada 15 segundos con un tiempo de integración de 2 minutos 30 segundos, ver Materiales y Métodos.

Con respecto a la temperatura empleada para realizar las mediciones, es importante aludir que se intentaron hacer experimentos a temperatura ambiente (establecida como óptima para la actividad de la luciferasa según nuestro proveedor Promega), con la finalidad de hacerlos comparables con los de fluorescencia. La figura 6 muestra que no se lograron obtener señales estables en el tiempo a 25 °C, por lo que se decidió trabajar a 28° C, temperatura que Sigma advierte como ideal y a la cual si se logró la estabilización de la reacción (figura 4b, por ejemplo).

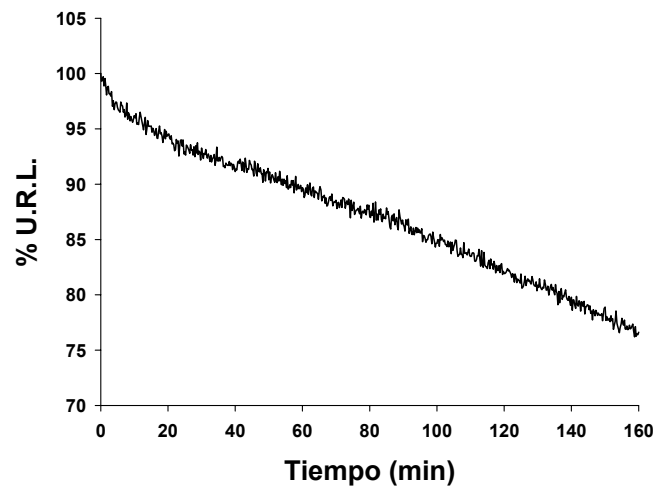


Figura 6. Inestabilidad de la señal de la reacción a 25° C *in vivo*. La luciferina fue agregada al tiempo 0. El experimento se llevó a cabo como se explica en Materiales y Métodos.

4.1.2.1. Artefactos

Para el caso de mediciones *in vitro* realizadas en un luminómetro existe una publicación que manifiesta los efectos del pH, observándose una mayor producción de

luz a pHs alcalinos y una disminución a pHs ácidos (Fraga *et al.*, 2003). Con el objetivo de verificar la magnitud del fenómeno se realizaron controles tanto *in vitro* como *in vivo*.

In vitro, el mayor efecto de pH, como muestra la figura 7a, se da a los 30 minutos de haber iniciado el experimento. Efectivamente a pH 6,0 se observa una disminución en la cantidad de luz emitida, mientras que a pH 8,0 un considerable aumento, con respecto a pH 7,0. Las variaciones se hacen menos perceptibles con el tiempo, aunque igual es posible observar una tendencia. Los distintos tratamientos arrojaron diferencias significativas (figura 7b), observándose un óptimo para la actividad de la enzima a pH neutro (figura 7d) y una clara inactivación a pH ácido (figura 7c). La exposición de la enzima a pH 8,0 no sólo acentúa la producción de luz, sino que también afecta el patrón de distribución, aumentando su dispersión (figura 7e).

Para la realización de los experimentos *in vivo* los registros se llevaron a cabo en condiciones de *clamp* de pH, protocolo que involucra la utilización de un buffer KRH alto K^+ , de nigericina como intercambiador de H^+ por K^+ y de gramicidina como ionóforo de K^+ (ver página 28). En la grafica 8 se puede notar que los datos *in vivo* se correlacionan con los presentados *in vitro*, existiendo una mayor producción de luz a pHs alcalinos y una señal menor a pHs ácidos, aún en presencia de un *clamp* de H^+ . Haciendo alusión al diseño experimental en sí, es preciso aclarar que la estrategia presenta varios problemas de manipulación, ya que al momento de ser traspasada la muestra de tubo en tubo muchas células podrían morir por la sujeción del cubreobjeto o bien desprenderse de él. Debido a esto, y al resto de las aprensiones que se detallan más adelante, sólo es posible ver tendencias.

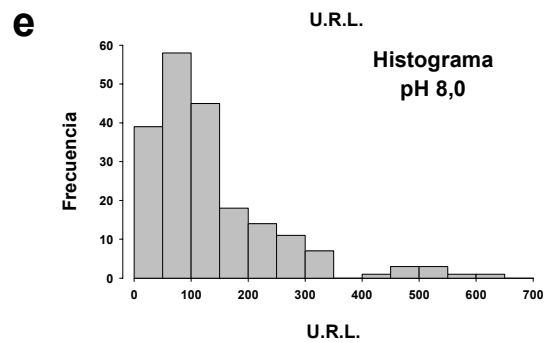
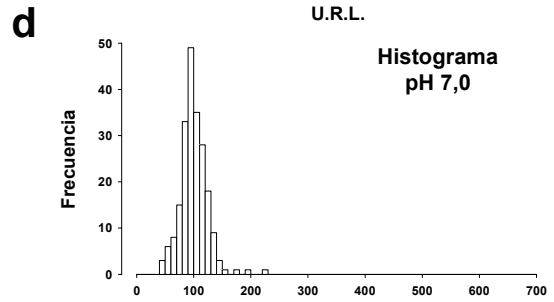
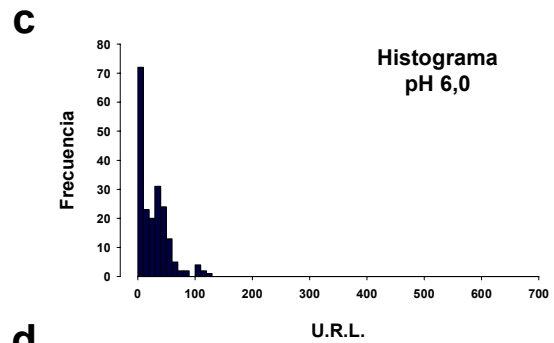
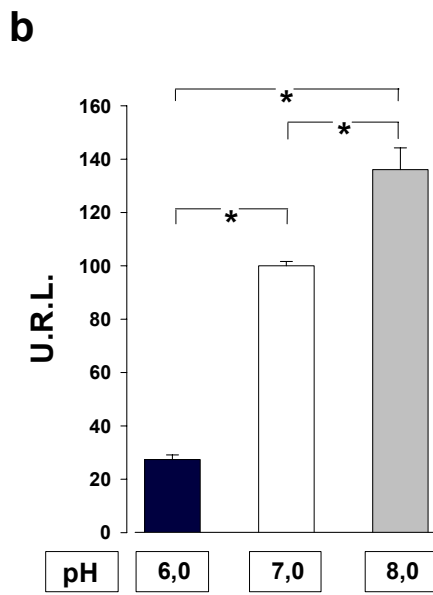
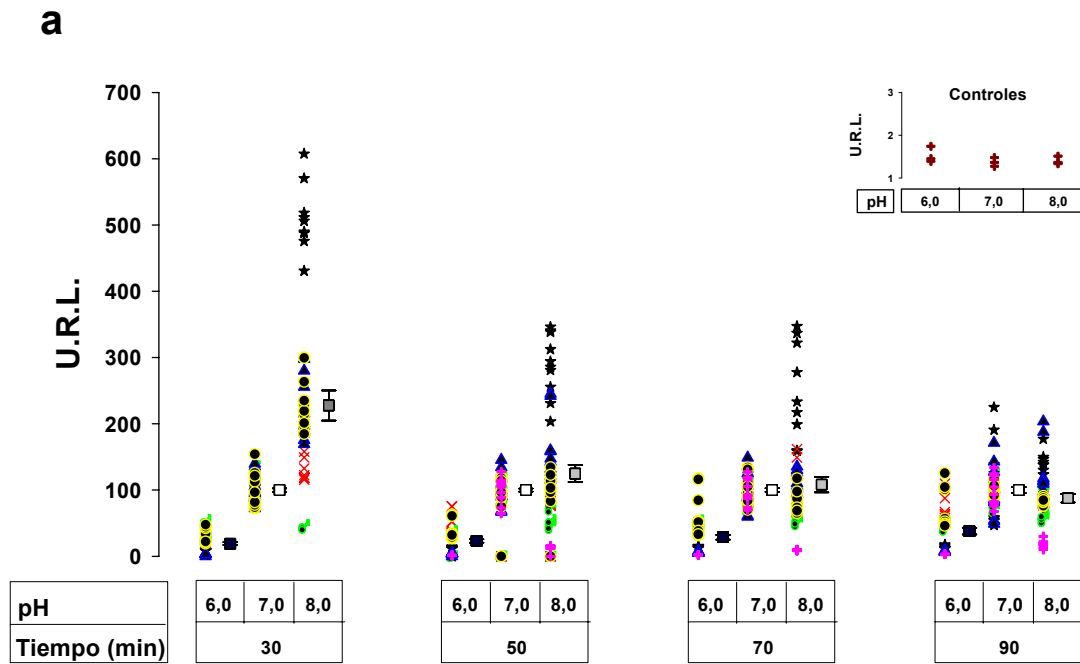


Figura 7. Variaciones del pH afectan la señal *in vitro*. (a) se muestra la agrupación de 6 experimentos independientes denotados con diferentes figuras. Cada uno de los ensayos consistió en registrar la señal en un solo punto (integración de 15 segundos) de 30 tubos *ependorf* conteniendo soluciones de KRH a pHs 6,0, 7,0, y 8,0 (10 tubos de cada solución) a 30, 50, 70 y 90 minutos de haber iniciado el experimento (ver Materiales y Métodos). Cada punto representa una determinación independiente. Los registros que presentaron más de 2 desviaciones estándar con respecto al promedio fueron eliminados. Los datos fueron normalizados en base al promedio de pH 7,0 para cada tiempo. A la derecha de cada set de puntos se ven expresados en gráficos de cajas los promedios de los datos con sus respectivos errores estándar. En el extremo superior derecho se muestran los controles que no contenían luciferina-luciferasa. (b) se observa un gráfico de barras en donde fueron promediados todos los set de puntos por pH (6,0, 7,0 y 8,0) para todos los tiempos analizados. Los asteriscos indican diferencias significativas, $P < 0,05$. Se realizó un análisis ANOVA (*post-hoc* Holm-Sidak). En (c), (d) y (e) se presentan las distribuciones de los datos de la figura (b).

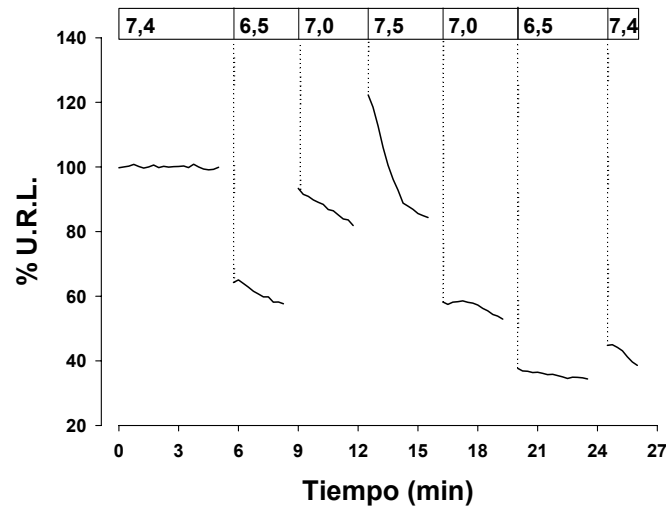


Figura 8. Variaciones del pH afectan la señal *in vivo*. El experimento consistió en hacer traspasos sucesivos del cubreobjeto con células a distintos tubos *ependorf* conteniendo soluciones de KRH en condiciones de *clamp* (130 mM de K^+ , 10 mM de Na^+ , nigericina 100 μM y gramicidina 10 $\mu g/ml$) a pHs 7,5, 7,4 y 6,5. Los tubos fueron preincubados al mismo tiempo con iguales concentraciones de luciferina. Las líneas punteadas indican los cambios.

No fue posible encontrar ningún trabajo previo que indique artefactos por variaciones en las concentraciones de iones para el caso de experimentos realizados en un luminómetro, pero si se advirtió de un reporte próximo efectuado *in vitro* en un contador de centelleo líquido cuyos resultados establecen, básicamente, que cambios en la razón Na^+/K^+ generan alteraciones en la luminiscencia (Aledort *et al.*, 1966). A fuerza iónica constante (110 mM), los autores observaron mayor producción de luz ante aumentos en la concentración del Na^+ (104 mM $Na^+/6$ mM K^+) y una disminución de la señal ante alzas del K^+ (7 mM $Na^+/103$ mM K^+), cuando compararon con iguales

concentraciones de Na^+ y K^+ (55 mM). Esta situación motivo la realización de controles extraordinarios, ya que como se verá más adelante, en este trabajo se inducirán cambios importantes en la concentración de ciertos iones.

En el experimento de la figura 9 se pueden apreciar las consecuencias de la variación de la razón Na^+/K^+ sobre la reacción. A diferencia de lo citado en el párrafo anterior, tanto cuando se aumentó el Na^+ como el K^+ se incrementó la producción de luz para todos los tiempos contemplados (figura 9a), además de dispersar el patrón de distribución (comparar figura 9c y e con d); observándose diferencias significativas cuando los datos fueron comparados con iguales concentraciones de Na^+ y K^+ (figura 9b). El experimento, sin embargo, no permite discriminar si es el incremento de un ion el que produce el efecto o la disminución en la concentración del otro.

Debido a que las interferencias de los factores fisicoquímicos que se han descrito para el espectro de emisión también traen repercusiones en mediciones realizadas con un luminómetro, tanto *in vitro* como *in vivo*, fue necesario realizar controles anexos que se irán introduciendo en concordancia con la explicación del manuscrito.

De antemano es preciso aclarar que por lo estipulado no es posible determinar cuantitativamente el ATP, como habría sido idealmente, y esta tesis basa su desarrollo en aspectos, más bien, cualitativos.

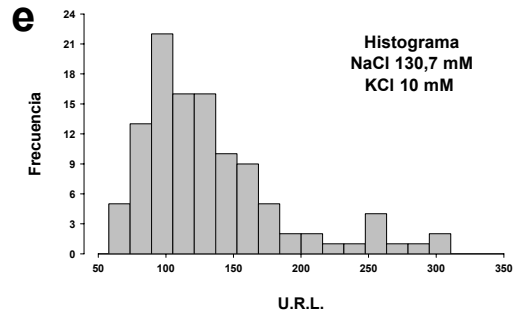
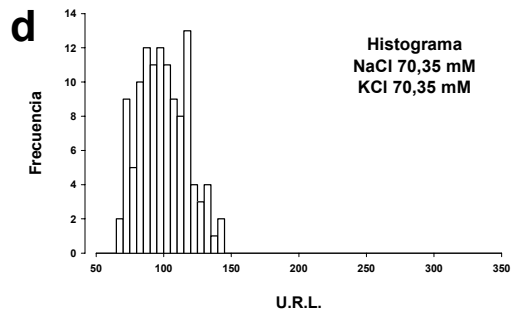
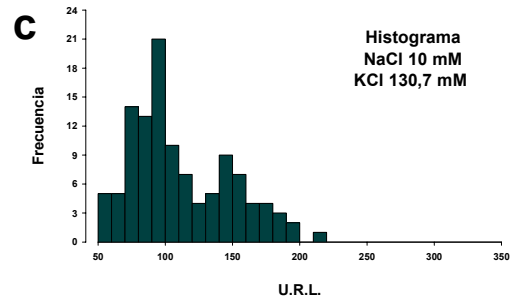
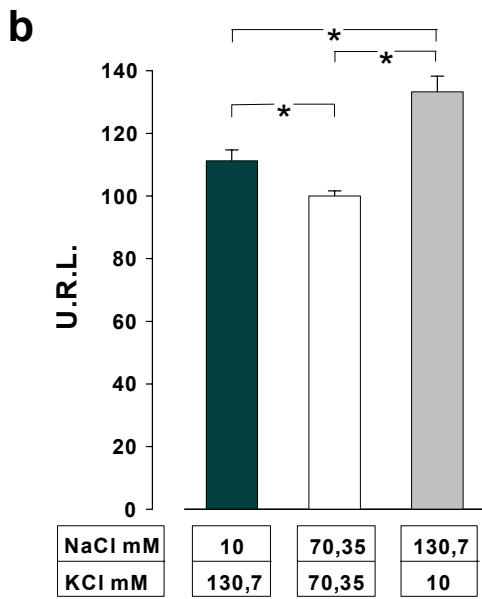
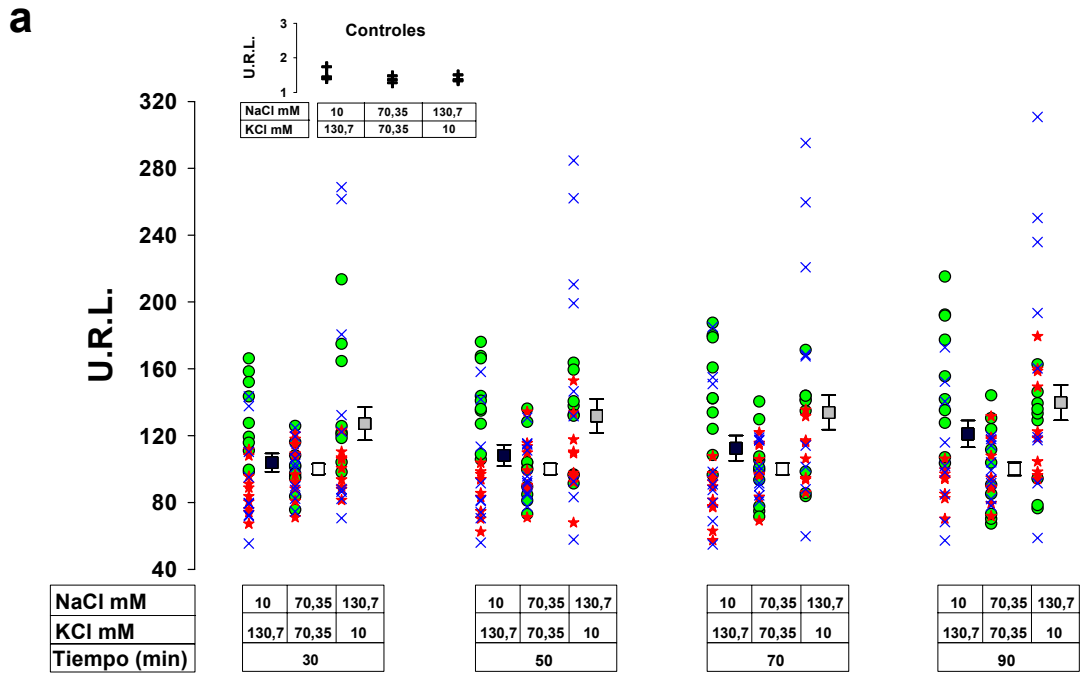


Figura 9. Efecto de variaciones de la razón Na^+/K^+ a fuerzas iónicas constantes sobre la señal *in vitro*. (a) se muestran agrupados 3 experimentos independientes denotados con diferentes signos, cada uno de los cuales consistió en registrar la señal en un solo punto (integración de 15 segundos) de 30 tubos *ependorf* conteniendo soluciones de KRH pH 7,4 con distintas concentraciones de Na^+ y K^+ : 10 mM Na^+ /130,7 mM K^+ , 70,35 mM Na^+ /70,35 mM K^+ y 130,7 mM Na^+ /10 mM K^+ (10 tubos por solución) a 30, 50, 70 y 90 minutos de haber iniciado el experimento (ver Materiales y Métodos). Cada punto representa una determinación independiente. Los registros que presentaron más de 2 desviaciones estándar con respecto al promedio fueron eliminados. Los datos fueron normalizados en base al promedio de la razón 70,35 mM Na^+ /70,35 mM K^+ para cada tiempo. A la derecha de cada set de puntos se ven graficados en cajas los respectivos promedios con sus errores estándar. En el extremo superior izquierdo se muestran los controles que no contenían luciferina-luciferasa. (b) se observa un gráfico de barras en donde fueron promediados todos los set de puntos por razón (10 mM Na^+ /130,7 mM K^+ , 70,35 mM Na^+ /70,35 mM K^+ y 130,7 mM Na^+ /10 mM K^+) para todos los tiempos analizados. Los asteriscos indican diferencias significativas, $P < 0,05$. Se realizó un análisis ANOVA (*post-hoc* Holm-Sidak). En (c), (d) y (e) se presentan las distribuciones de los datos de la figura (b).

4.1.2.2. Manipulación de las muestras experimentales

Dado que no hay acceso directo a las células durante la medición, la adición de reactivos requirió del siguiente ejercicio: sacar al tubo de la cámara del luminómetro, adicionar el tratamiento, homogeneizar y, finalmente, retornar el tubo a la cámara.

Debido a que la acción implicaba una maniobra delicada, se evaluaron las consecuencias de cada uno de los pasos.

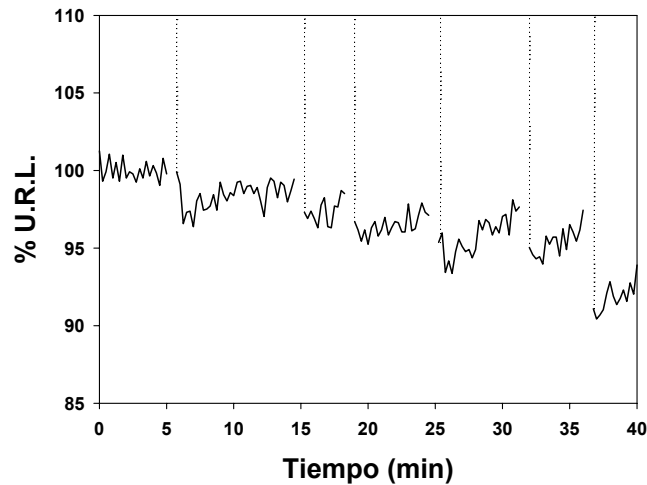


Figura 10. Pérdidas de señal por manipulación *in vivo*. El experimento consistió en simular sucesivas intervenciones (líneas punteadas) sin agregar ningún tratamiento. Para las condiciones experimentales ver Materiales y Métodos.

En la figura 10 se pueden observar los efectos sobre la señal de una serie de intervenciones en las cuales no se adicionó ningún tratamiento. Se puede notar que el sólo hecho de manipular el tubo, simulando un cambio en la muestra, provoca una disminución de la señal del orden de un 3%, fenómeno que podría deberse a lo siguiente: la manera de homogenizar y a fluctuaciones de temperatura. Con respecto a lo primero, se evaluaron una serie de procedimientos que fueron desde utilizar una pipeta hasta un *vortex*, estableciéndose como lo menos invasivo el invertir dos veces el tubo *ependorf*, método que se escogió para homogeneizar después de cada cambio.

Es importante también, el tiempo que transcurre desde que el tubo es retirado de la cámara hasta que retorna a ella, que fluctúa entre 30 y 45 segundos; lapsos durante los cuales el tubo está sometido a la temperatura ambiental.

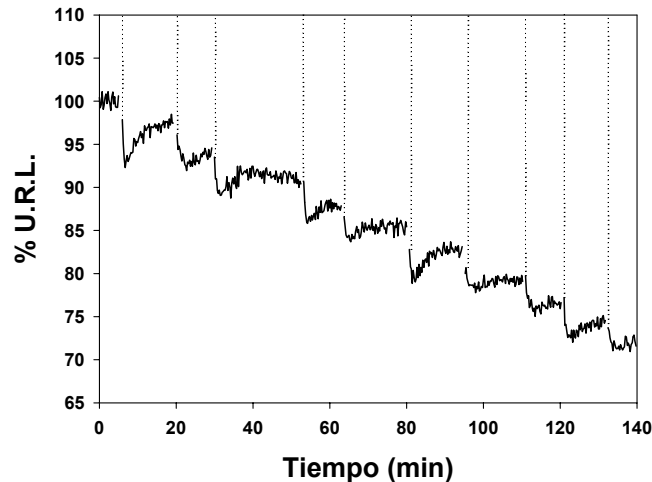


Figura 11. La dilución de la luciferina disminuye la señal *in vivo*. El experimento consistió en retirar 40 μ l de sobrenadante de un volumen total de 1,2 ml y reemplazarlo por KRH desprovisto de luciferina, provocando diluciones progresivas de aproximadamente un 3,4% en cada cambio (líneas punteadas). Las condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

Las pérdidas de señal se ven acentuadas cuando el sustrato es diluído. La figura 11 muestra las repercusiones que acarrea la dilución de un 3,4% de la luciferina (el experimento fue realizado conteniendo un volumen de 1,2 ml en vez de 1,7 ml, ver Materiales y Métodos). De este experimento se puede inferir que los *stocks* de todos los tratamientos utilizados debieron ser lo más concentrados posibles para evitar, dentro de

lo posible, las pérdidas artefactuales, sobre todo en aquellos experimentos que recibieron más de un tratamiento.

En conjunto, de las figuras 10 y 11, se desprende que la manipulación es una etapa crítica en la experimentación, ya que pérdidas considerables en la señal podrían conducir a interpretaciones erróneas.

4.2. Estudio de las consecuencias de un influjo de Na⁺ sobre el ATP en células HeLa-Luc⁺

En la introducción se ha descrito el modelo aceptado para la regulación metabólica por parte del Na⁺ y la figura 1 muestra en un esquema simple la serie de eventos que involucran el proceso. Aplicándolo específicamente a células HeLa, se sabe que leves incrementos de Na⁺ activan fuertemente a la Na⁺/K⁺ ATPasa (Pollack *et al.*, 1981; Ikehara *et al.*, 1984) y se ha demostrado que las concentraciones del catión se restauran cuando aumenta el nivel de ATP, existiendo una correlación directa entre la magnitud del estímulo generado por el influjo de Na⁺ y la cantidad de nucleótido demandado por la bomba de Na⁺ (Ikehara *et al.*, 1984). Las alteraciones en la razón ATP/ADP citosólico una vez estimulada la Na⁺/K⁺ ATPasa también han sido reportadas (Soltoff, 2004).

4.2.1. Experimentación

Con el objetivo de poner a prueba lo postulado en el modelo aceptado, se utilizaron dos ionóforos ampliamente requeridos para producir influjos de Na⁺ y activar, de esta manera, a la Na⁺/K⁺ ATPasa: la gramicidina y la monensina.

La gramicidina es una mezcla de seis antibióticos extraídos de *Bacillus brevis*, que en conjunto se conocen como gramicidina D. El compuesto actúa a nivel de membrana plasmática formando canales selectivos para cationes monovalentes cuyas características de permeabilidad se encuentran bien definidas (Andersen *et al.*, 2005). La monensina, un antibiótico producido por *Streptomyces cinnamonensis*, se sitúa en la membrana plasmática permitiendo el intercambio de protones y cationes con los cuales

forma complejos estables. El flujo se prolonga hasta que los potenciales electroquímicos de los iones participantes se igualan (Ben-Tal *et al.*, 2000).

La figura 12 muestra el efecto producido por la gramicidina sobre la señal de ATP. Luego de una disminución artefactual instantánea de un 3-4% en la señal (ver sección 4.1.2.2.), el tratamiento resultó en un aumento rápido y sostenido que alcanzó un máximo aproximadamente a los 10 minutos para luego decaer lentamente de manera irreversible. Esta última fase, que suscitó la caída de la señal hasta valores cercanos a cero, no es de interés para los objetivos de esta memoria y posiblemente se deba a toxicidad celular (Pressman, 1965; Rottenberg y Koeppe, 1989).

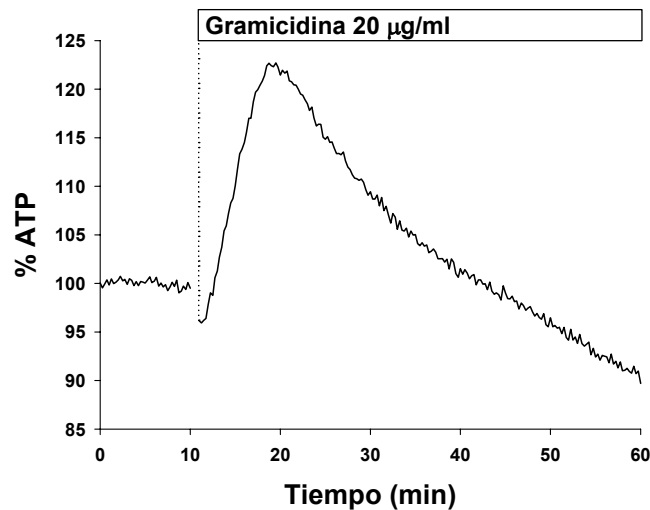


Figura 12. Efecto de la gramicidina sobre la señal de ATP. Curso temporal de células expuestas al ionóforo. La línea puntada indica la adición del tratamiento que se indica en el recuadro. $N = 7$. Ver figura C1.

La respuesta frente a la monensina (figura 13) fue más aguda aún, y presentó

claras diferencias con las cinéticas de la gramicidina. La curva alcanzó un máximo inicial aproximadamente a los 2 minutos post-tratamiento y presentó un segundo hombro que se extendió por alrededor de 30 minutos, luego de lo cual y a diferencia del tratamiento con la gramicidina, se pudo observar la estabilización de la señal.

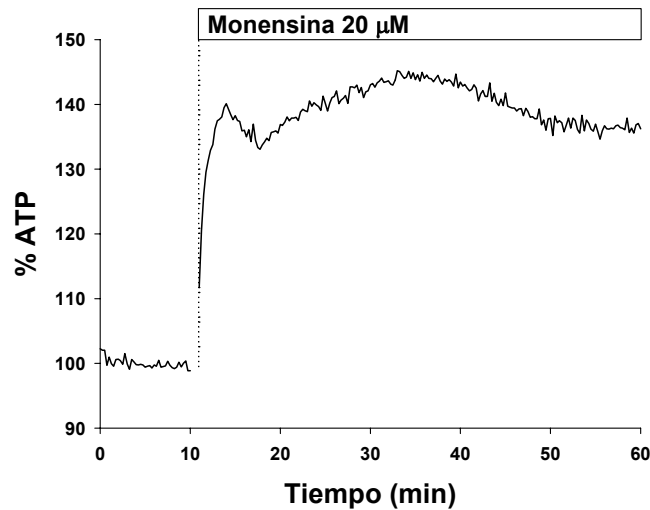


Figura 13. Efecto de la monensina sobre la señal de ATP. Curso temporal de células expuestas al ionóforo. La línea puntada indica la adición del tratamiento que se indica en la barra. $N = 5$.

Para corroborar que tanto gramicidina como monensina estuvieran produciendo una entrada de Na^+ a la célula, se efectuaron controles utilizando la sonda fluorescente SBFI, que funciona básicamente de la siguiente manera: cuando el fluoróforo une selectivamente al Na^+ , el espectro de emisión se ve afectado cambiando la razón entre las emisiones obtenidas al excitar a 340 y 380 nm. El efecto se traduce finalmente en un incremento en la fluorescencia.

En las figuras 14 y 15 se puede notar que ambos tratamientos produjeron una entrada rápida de Na^+ al citosol. Para el caso de la gramicidina el *plateau* se alcanzó a los 5 minutos luego de haber agregado el ionóforo, mientras que para la monensina fueron necesarios 15 minutos. Esta situación indica que a las dosis utilizadas, el primer procedimiento fue más efectivo que el segundo como ionóforo del catión. La magnitud del cambio en la fluorescencia fue semejante para los dos experimentos. La cinética de vaciamiento una vez aplicado el KRH sin Na^+ se prolongó por mucho más tiempo en aquellas células que recibieron el tratamiento con la monensina, y se pueden distinguir claramente dos poblaciones celulares, unas más resistentes y otras más sensibles, aunque cabe aclarar que hubo variabilidad entre experimentos.

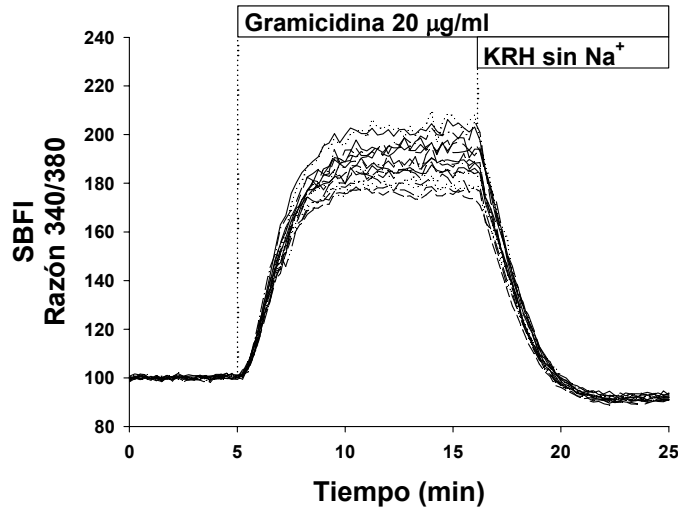


Figura 14. La gramicidina produce un incremento del Na^+ intracelular. Curso temporal de 15 células cargadas con la sonda fluorescente SBF1. Se utilizó como control un *buffer* KRH en donde el Na^+ fue reemplazado equimolarmente por el K^+ . $N = 4$, ver figura C 2.

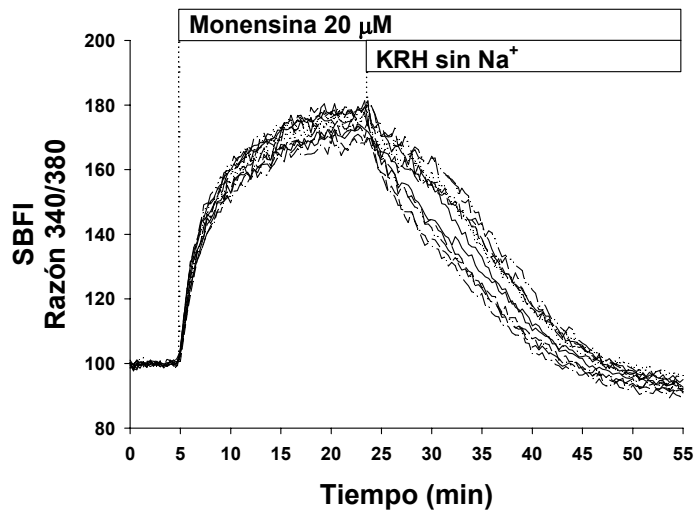


Figura 15. La monensina produce un incremento del Na^+ intracelular. Curso temporal de 12 células cargadas con la sonda fluorescente SBFI. Se utilizó como control un *buffer* KRH en donde el Na^+ fue reemplazado equimolarmente por el K^+ . $N = 4$.

Se debieron ejecutar controles excepcionales de pH, debido a los artefactos descritos en el capítulo anterior, para descartar fortuitas interferencias en las respuestas originadas por los ionóforos. Para tal efecto, se empleó la sonda BCECF que es una fluoresceína cuyo espectro de emisión se ve afectado por el pH, incrementando su fluorescencia a medida que el medio se alcaliniza.

La gramicidina causó dos tipos de respuesta. En la figura 16a y c se puede observar que en una primera etapa, provocó una leve depresión de la razón de fluorescencia que transcurridos 15 minutos se revirtió, llegando a registrarse en algunas células señales un poco más altas que la línea base. En la figura 16b se muestra el segundo patrón en donde se puede notar que el tratamiento no generó prácticamente ningún cambio en la señal. La variación global de la señal una vez aplicado el ionóforo

se puede ver en la barra de la gráfica 16d.

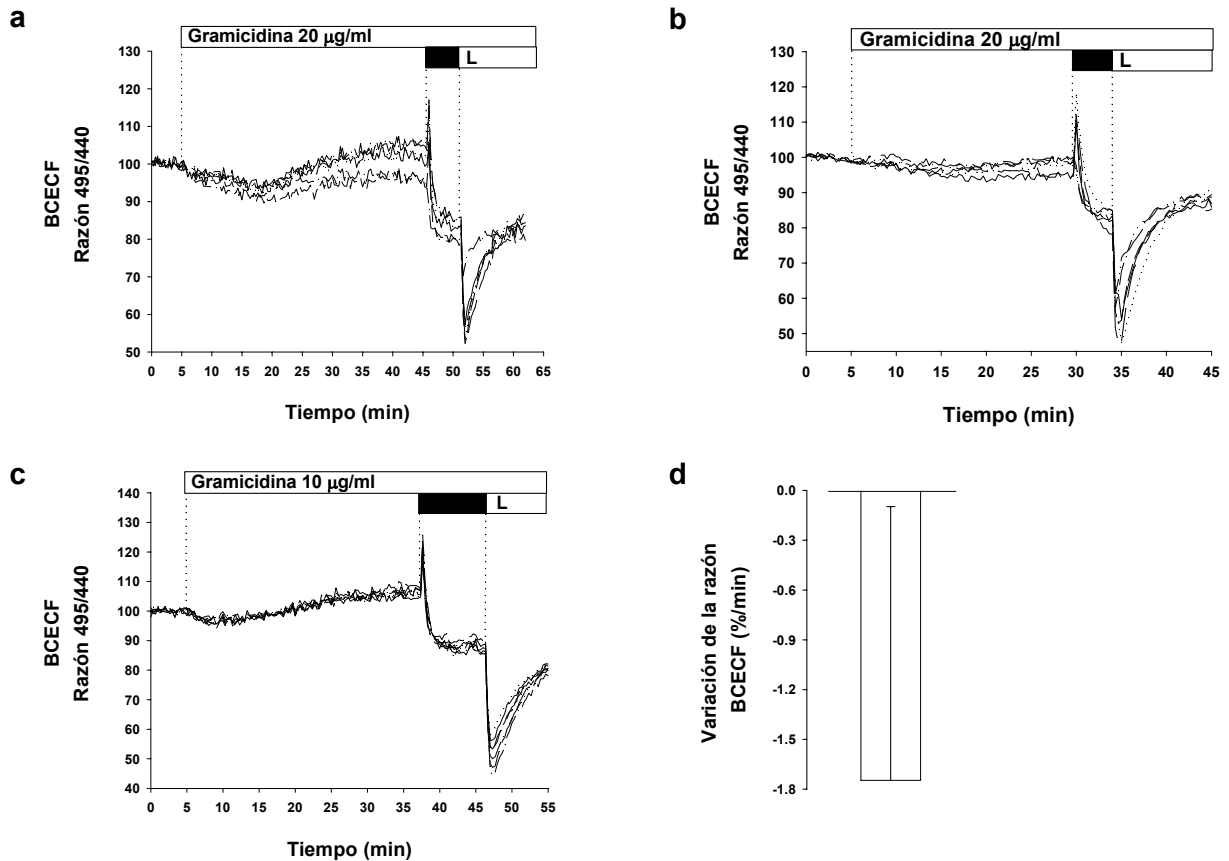


Figura 16. Efecto de la gramicidina sobre el pH intracelular. En (a), (b) y (c) se observan cursos temporales de células (6, 6 y 7 respectivamente) cargadas con la sonda fluorescente BCECF. Los rectángulos negros indican la adición del NH₄Cl 25 mM utilizado como control positivo. L, lavado, señala la remoción del NH₄Cl con un *buffer* KRH normal. (d) muestra el promedio de la variación de la razón de la sonda de 3 experimentos independientes una vez adicionado el ionóforo (20 µg/ml) con su respectivo error estándar. Los datos fueron analizados como se indica en anexo B.

La monensina, al contrario de lo observado con la gramicidina, ocasionó un aumento agudo en la señal que posteriormente decayó lentamente sin llegar a alcanzar la señal basal por al menos 30 minutos (figura 17).

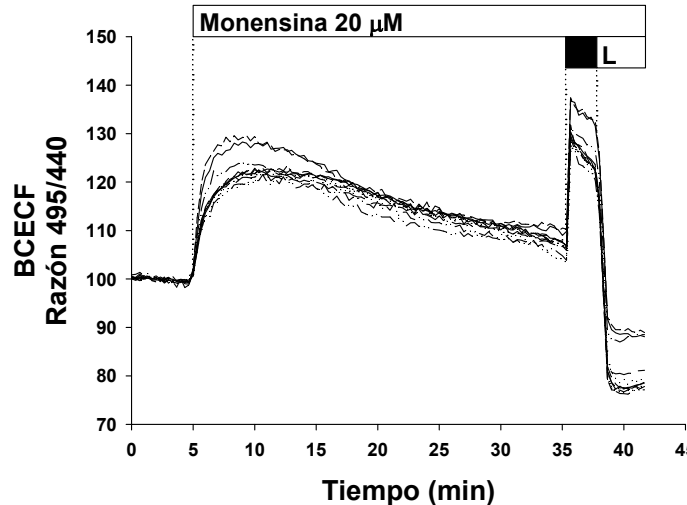


Figura 17. Efecto de la monensina sobre el pH intracelular. Curso temporal de 13 células cargadas con la sonda fluorescente BCECF. El cuadrado negro indica la adición de NH_4Cl 25 mM utilizado como control positivo. L, lavado, señala la remoción del NH_4Cl con un *buffer* KRH normal. $N = 3$.

Existe una clara correlación entre la respuesta generada por la monensina en la señal de ATP (figura 13) y en el alza producida del pH (figura 17). En concordancia con los artefactos descritos en la sección 4.1.2.1, el aumento producido por el ionóforo en la luminiscencia pudiera ser, en gran parte, artefactual y deberse a la basificación que causa el tratamiento. Debido a esto, se descartó el uso de la monensina y en los experimentos restantes se utilizó sólo la gramicidina.

La utilización del NH_4Cl como control para la sonda se justifica en lo siguiente: el NH_4^+ en el medio se disocia a NH_3 que difunde a la célula. Una vez dentro, el NH_3 se transforma en NH_4^+ por la ganancia de un protón, efecto que provoca una alcalinización del citosol, o sea, un alza en la fluorescencia. La remoción de la solución del NH_4Cl ejecuta lo contrario; el NH_4^+ formado dentro de la célula se disocia a NH_3 con la liberación de un protón, situación que se traduce en una acidificación intracelular, es decir, una disminución de la fluorescencia (Bevensee *et al.*, 2000). Las diferencias en las cinéticas que se presentaron al adicionar el NH_4Cl , entre los experimentos de las figuras 16 (a, b y c) y 17, sugieren que la gramicidina estaría actuando como ionóforo de NH_4^+ (Pressman, 1976)

Una vez realizados los ensayos que demuestran la entrada del Na^+ con el tratamiento de la gramicidina, y habiendo descartado una posible basificación que pudiera confundir la interpretación de la señal luminiscente (figura 16d), se ejecutaron experimentos con la finalidad de confirmar la participación del catión en particular, y desechar la posible intervención del K^+ en las respuestas examinadas en el luminómetro. El protocolo consistió en reemplazar las concentraciones de Na^+ presentes en el *buffer* KRH, 136 mM, por un catión que no permea la célula, el NMDG^+ ; en la figura 18 se muestra el efecto. La curva postratamiento con la gramicidina en células que carecían de Na^+ en el medio varió considerablemente con respecto a las que estaban en presencia del catión (figura 12); el alza en la señal desapareció y fue sustituida desde un comienzo por una disminución de la luminiscencia que se extendió hasta el final del experimento.

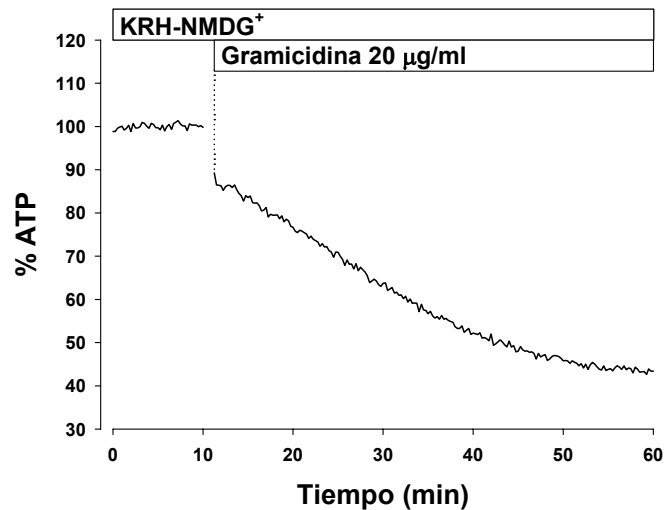


Figura 18. Efecto de la gramicidina sobre la señal de ATP en ausencia de Na^+ extracelular. Curso temporal de células preincubadas por 50 minutos en un *buffer* KRH en donde el Na^+ fue reemplazado equimolarmente por el NMDG^+ , antes de adicionar el ionóforo. $N = 6$.

Se elaboraron experimentos para conocer las respuestas generadas en el luminómetro a distintas concentraciones de gramicidina y compararlas con las entradas de Na^+ medido con SBF1 (figura 19). Para ninguno de los dos casos (figuras 19a y b) se observó una correlación directa entre la concentración del ionóforo y la señal. Las máximas variaciones de ATP y de razón de fluorescencia de SBF1 se obtuvieron a concentraciones de 0,75 y 20 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente; mientras que las mínimas variaciones se produjeron a 0,1 $\mu\text{g/ml}$ para ambas mediciones. Es posible concluir que tanto el aumento del Na^+ como el del nivel de ATP pueden ser inducidos con dosis muy pequeñas del ionóforo.

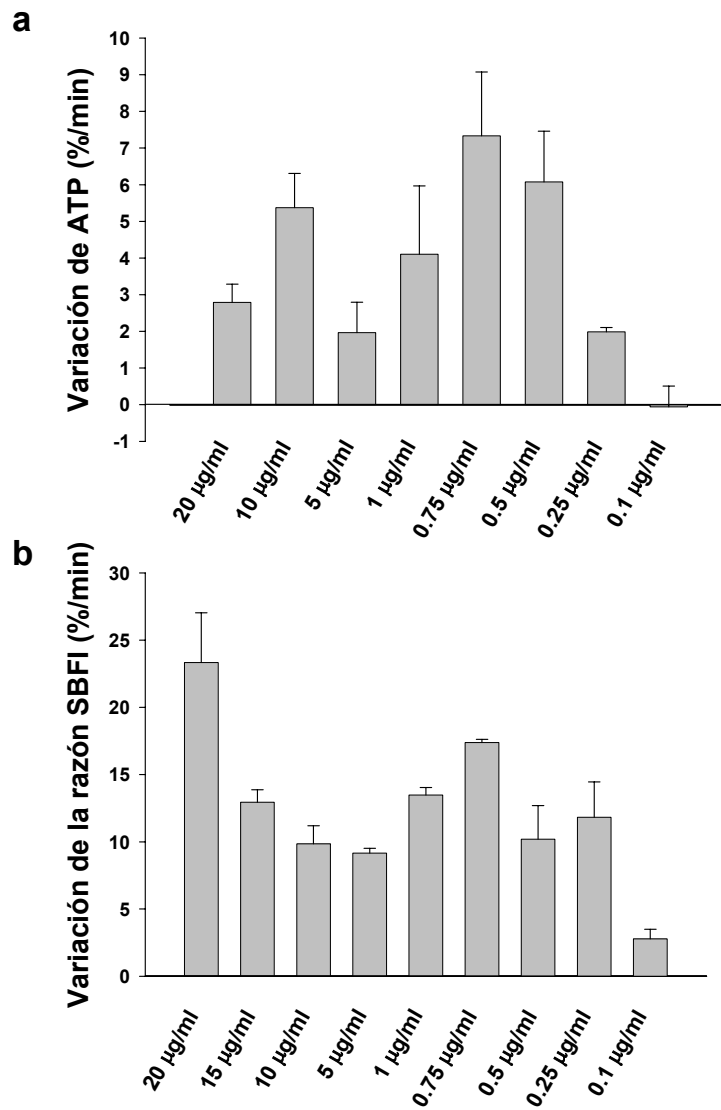


Figura 19. Variaciones en la señal de ATP (a) y de la razón de SBFI (b) provocadas por la gramicidina a concentraciones decrecientes. Cada barra indica el promedio de al menos 3 experimentos (anexo C) con sus respectivos errores estándar. Los datos fueron analizados como se indica en anexo B.

Por último, se evaluaron las pendientes de los primeros 2 minutos postratamiento con la gramicidina, tanto de experimentos elaborados en presencia (figura 12) como en ausencia (figura 18) del Na^+ extracelular, tal como se indica en anexo B. La figura 20 muestra que las células que fueron preincubadas en KRH normal arrojaron un variación en la señal de ATP de $2,8 \pm 0,5$ en $\%/min$, mientras que aquellas que estaban en presencia de KRH-NMDG⁺ una tasa de $-2,1 \pm 0,4$ en $\%/min$.

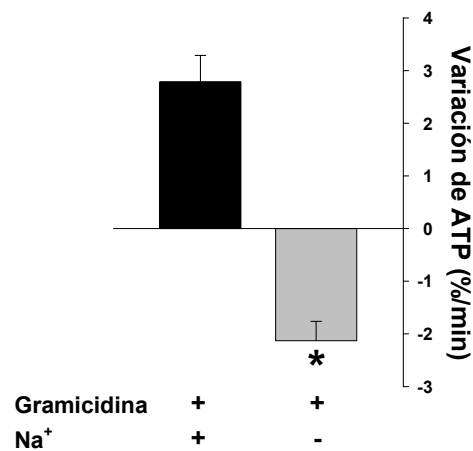


Figura 20. El Na^+ produce un incremento en la señal de ATP. La barra negra indica el promedio \pm error estándar de 7 experimentos de células tratadas con la gramicidina $20 \mu\text{g/ml}$ preincubadas en KRH normal. La barra gris muestra el promedio \pm error estándar de 6 experimentos de células preincubadas entre 15 minutos y 2 horas 10 minutos en un *buffer* KRH en donde el Na^+ fue reemplazado equimolarmente por el NMDG⁺ antes de agregar el ionóforo. Los datos fueron tratados como se especifica en anexo B. El asterisco indica diferencias significativas, $P < 0,05$. Se realizó una prueba *t* de *student*.

4.2.2. El Na⁺ produce un aumento en la señal de ATP

Los experimentos analizados en este capítulo nos permiten decir con cierto grado de certeza que el Na⁺ efectivamente provoca un aumento en la señal de ATP en base a lo siguiente: la gramicidina induce una entrada masiva de Na⁺ al citosol (figura 14), efecto que se correlaciona con un alza en la luminiscencia (figura 12), y que no se debe a efectos de pH (figura 16). Además, la ausencia del Na⁺, resulta en la abolición total del incremento en la señal de ATP producido por el ionóforo (figura 18 y 20).

Con respecto al alza en la señal luminiscente que provoca el Na⁺ *in vitro* (figura 9), bien se podría pensar que la cinética que desprende la gramicidina pudiera ser un artefacto dada la influencia que ejerce el catión sobre la reacción. Dicha interrogante queda descartada, ya que *in vivo* las células para cargarse completamente de Na⁺ (efecto inducido por la gramicidina a altas dosis), lo hacen de manera paulatina. Esta situación se ve simulada en la figura 9b, en donde se puede notar que la entrada de Na⁺ involucraría una disminución de la luminiscencia antes de observarse el artefacto, y apoyados en la figura 14, al menos en los primeros 3 minutos de tratamiento con la gramicidina, las células estarían alcanzando concentraciones intermedias del catión. De esta manera, no se estaría tomando en cuenta el artefacto del Na⁺ para el análisis de los experimentos (ya que se procesaron los primeros 2 minutos, ver anexo B), pero sí incurriendo en una subestimación de los datos.

La interpretación de la magnitud del efecto de la gramicidina no sólo se ve dificultada por lo descrito en el párrafo anterior, también, porque el ionóforo tiende a acidificar levemente la célula (figura 16d), aunque cabe destacar que cuando se produce el efecto máximo (aproximadamente a los 15 minutos postratamiento, figura

16a), ya se ha observado el *peak* de luminiscencia (figura 12), y se ha alcanzado un nuevo estado estacionario para el Na^+ (figura 14). Además, de los experimentos realizados con el NMDG^+ es posible inferir que la gramicidina tiene un efecto *per se* sobre la señal *in vivo*, debido a que el tratamiento en ausencia del Na^+ resulta en una disminución inmediata de la señal de alrededor de un 12% (figura 18). En ambos casos se estaría incurriendo en una subestimación de las repuestas generadas por el ionóforo.

En función de la técnica utilizada, que no mide la producción de ATP sino su concentración, cabe la posibilidad de que el alza en la luminiscencia inducida por el Na^+ no sea producto de un aumento en la elaboración del nucleótido, sino que esté dada por una disminución en el consumo. Esta segunda explicación no se ve favorecida pues se ha demostrado previamente que la entrada del Na^+ induce un aumento de la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa, proteína que según hemos discutido, es uno de los principales sitio de gasto del ATP celular.

4.2.3. ¿Media la Na^+/K^+ ATPasa la activación metabólica evocada por el Na^+ ?

Con respecto al modelo indirecto de activación metabólica aceptado para el Na^+ (figura 1), en los experimentos realizados nunca fue posible observar una disminución en la señal de ATP como se esperaría ante incrementos en la actividad de la bomba de Na^+ producidos por influjos del catión y por el contrario, siempre se advirtió una elevación de la señal. Frente a esto, cuatro son las posibles explicaciones que surgieron en discusión. Primero, cabe la posibilidad que la “conversación” entre la bomba de Na^+ y las vías de producción de ATP sea de tal velocidad que no sea posible

medirla con este tipo de instrumento, en cuyo caso el proceso debería ocurrir en menos de 15 segundos, que es el período de tiempo que se pierde de registro (lapso que demora el tubo en volver a la cámara una vez adicionado el ionóforo). Segundo, que el efecto de disminución de ATP realmente ocurra, pero que se vea solapado por el gran incremento que produce el Na^+ . Tercero, que exista un “pool” de ATP de reserva que supla requerimientos extraordinarios de nucleótido; fuente que se estaría utilizando mientras las vías de producción son activadas. Y cuarto, que influjos del Na^+ activen directamente, por algún mecanismo desconocido, las vías de producción de ATP, adelantándose la célula de esta manera a los gastos extra que acarrearían el volver a recuperar los niveles basales del catión.

En el siguiente capítulo se abordará el papel de la bomba de Na^+ en el metabolismo energético celular y se intentará dar respuesta a lo discutido en el párrafo anterior.

4.3. Evaluación del rol de la Na^+/K^+ ATPasa en el metabolismo energético de células HeLa-Luc⁺

La bomba de Na^+ en células HeLa se encuentra bien caracterizada. Se ha estimado que existe una población de alrededor de 10^6 proteínas por célula bajo condiciones normales, y se ha calculado que 2800 subunidades catalíticas son sintetizadas por minuto, existiendo un tiempo aproximado de 4 horas desde su producción hasta su inserción en la membrana, mientras que 2100 son recicladas (Pollack *et al.*, 1981a). La K_m para el K^+ tendría un valor de 0,8 mM (Vaughan y Cook, 1972) y para el Na^+ uno aproximado entre 10-15 mM (Pollack *et al.*, 1981a). El trabajo de la bomba de Na^+ es regulado principalmente por el Na^+ y en menor grado por el K^+ y el ATP (Therien y Blostein, 2000).

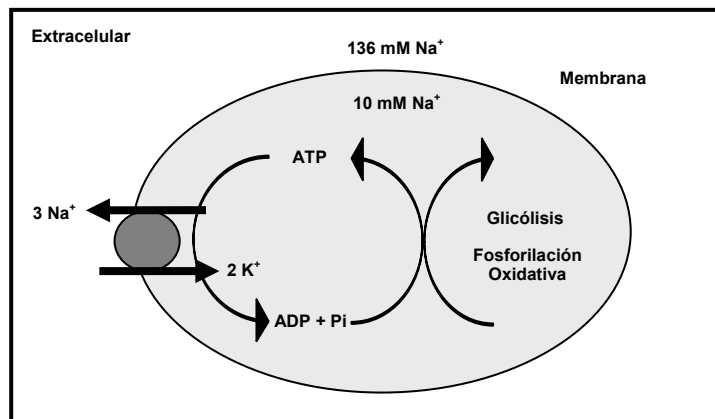


Figura 21. Funcionamiento de la Na^+/K^+ ATPasa. La bomba (círculo) transporta, en contra del gradiente electroquímico, 3 iones Na^+ al espacio extracelular e ingresa 2 iones K^+ al citosol gracias a la energía proporcionada por la hidrólisis de una molécula de ATP.

En cuanto a la demanda energética de la Na^+/K^+ ATPasa en estas células, al parecer, no ha sido cuantificada, pero se ha estimado que su actividad es relativamente alta (Pollack *et al.*, 1981b), por lo que se considera que la exigencia de ATP para el bombeo debe ser parte importante de la energía total (Ikehara *et al.*, 1984). Como referencia, en otras líneas celulares cancerígenas el consumo se ha estimado aproximadamente en un 20% (Balaban y Bader, 1983).

Aludiendo a la mantención de la Na^+/K^+ ATPasa en células HeLa, se ha descrito que la fuente generadora de ATP que estaría siendo requerida para abastecer su actividad (figura 21) sería la glicólisis (Wickson-Ginzburg y Solomon, 1963).

4.3.1. Experimentación

Dados los resultados descritos para la gramicidina en el capítulo anterior y con la finalidad de evaluar el papel de la bomba de Na^+ como intermediario en la regulación metabólica gatillada por el Na^+ , se ejecutaron una serie de experimentos utilizando la ouabaína.

La ouabaína, un glucósido extraído de *Strophantus gratus*, es un inhibidor específico de la Na^+/K^+ ATPasa. Actúa bloqueando el movimiento de los dominios transmembrana H5 y H6, localizados en la parte externa de la proteína, afectando residuos que coordinan la unión a iones K^+ (Feng y Lingrel, 1994; Palasis *et al.*, 1996).

En células HeLa esta descrito que ouabaína 1 mM inhibe completamente la actividad de la bomba de Na^+ (Palasis *et al.*, 1996), pero al examinar las pendientes de entrada del Na^+ (figura 22a) y compararlas con las pendientes en presencia de concentraciones de ouabaína 100 μM (figura 25), no se advirtieron diferencias

significativas. Esta situación estaría indicando que ambas cantidades inducen el mismo efecto y provocan incrementos semejantes del catión (figura 22b).

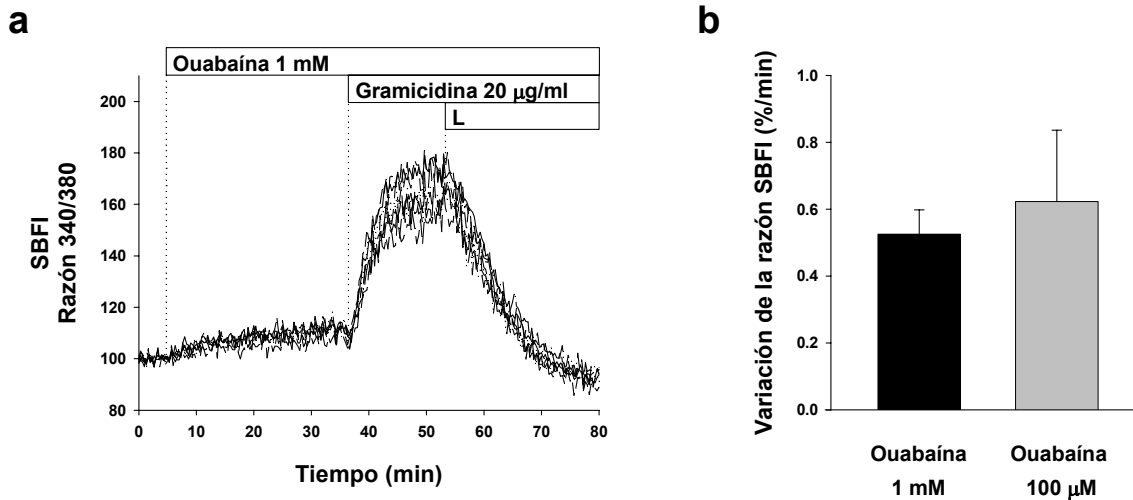


Figura 22. Efecto de la ouabaína sobre el Na^+ citosólico. (a) curso temporal de 7 células cargadas con la sonda SBFI. L, lavado, señala la utilización de un *buffer* sin Na^+ como control. (b) cada barra muestra el promedio \pm error estándar de 3 experimentos independientes de células que fueron expuestas al inhibidor a las concentraciones indicadas. Los datos fueron analizados como se explica en anexo B.

De manera inmediata se procedió a evaluar el efecto de la ouabaína sobre la señal de ATP, a ambas concentraciones, como una manera de dimensionar la importancia de la Na^+/K^+ ATPasa en el metabolismo. En las figuras 23a y b se puede advertir que el tratamiento no suscitó ningún cambio en la luminiscencia, al menos por los siguientes 8 minutos postratamiento, sin observarse diferencias significativas para las distintas dosis (figura 23c). En conjunto los resultados de las gráficas 22 y 23 determinaron la utilización de ouabaína 100 μM para el desarrollo de esta sección.

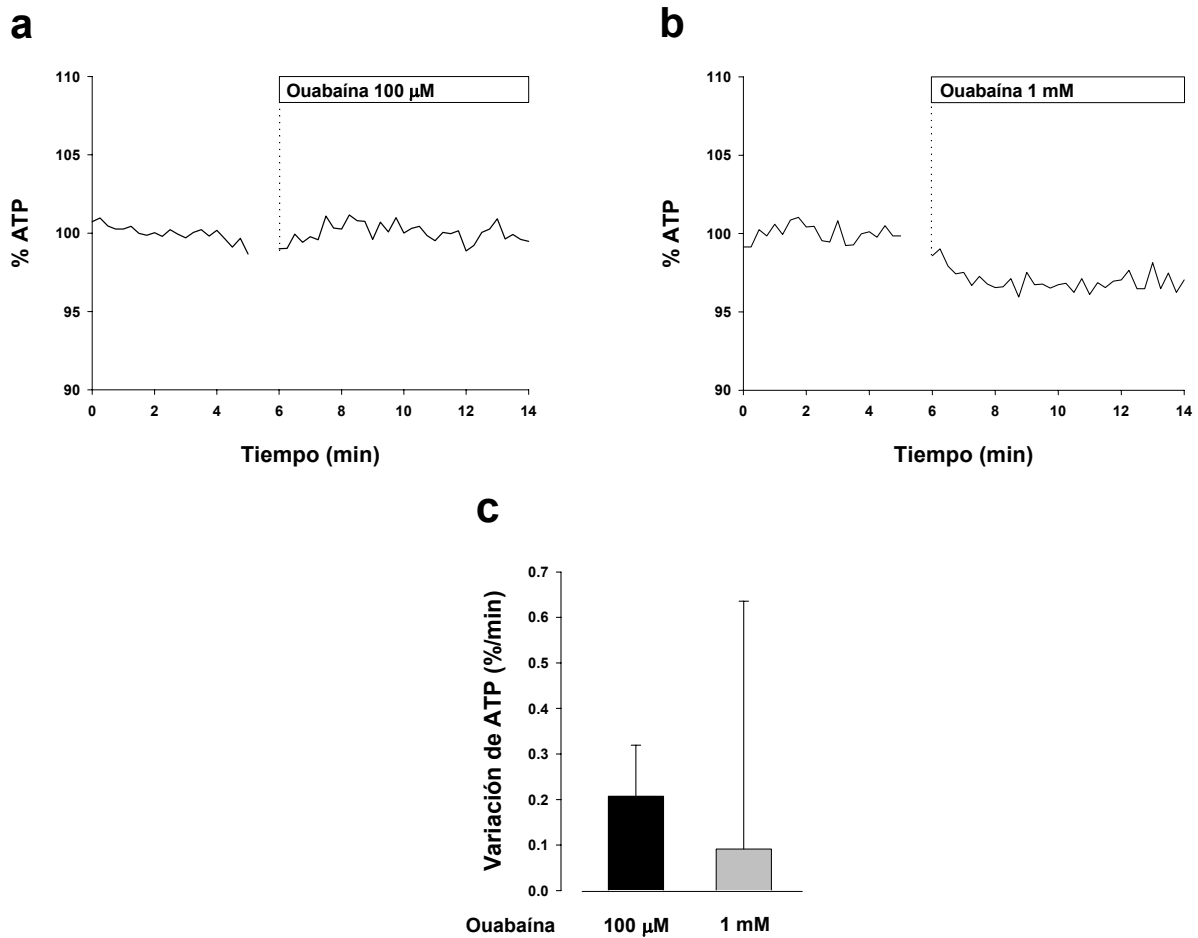


Figura 23. Efecto de la ouabaína sobre la señal de ATP. (a) y (b), cursos temporales de células expuestas al tratamiento que se indica. (c) las barras muestran el promedio \pm error estándar de 4 (negra) y 3 (gris) experimentos una vez aplicado el inhibidor a las concentraciones señaladas. Los datos fueron analizados como se explica en anexo B.

Se efectuaron experimentos con la gramicidina en presencia de la ouabaína con la intención de atribuir el alza en la señal de ATP ocasionado por el Na^+ al consumo de la Na^+/K^+ ATPasa, y como se puede examinar en la figura 24, la curva registrada no distó, en absoluto, de la obtenida en experimentos en los cuales no se aplicó el inhibidor (figura 12).

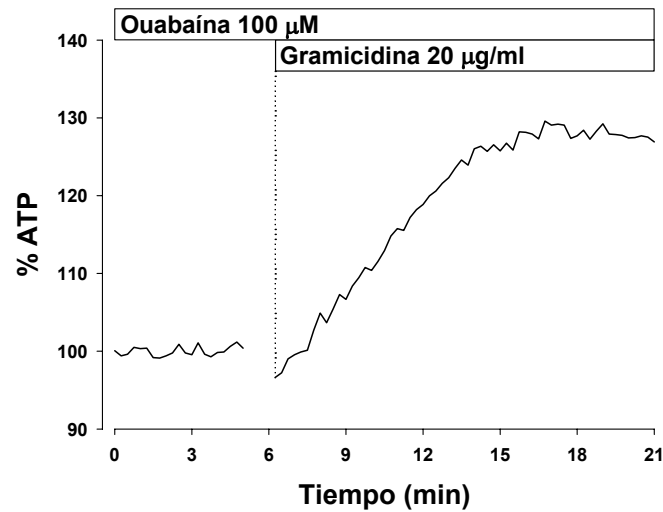


Figura 24. El Na^+ produce un incremento en la señal de ATP en células pretratadas con la ouabaína. Curso temporal de células que estuvieron expuestas al inhibidor por 50 minutos antes de adicionar el ionóforo. Se muestra un experimento representativo de 8.

Como era de esperar una acumulación del Na^+ citosólico por el tratamiento con la ouabaína, para confirmar que la gramicidina continuara provocando entradas del catión aún después del tratamiento, se hicieron experimentos con la sonda SBFI (figura 25). La presencia de la ouabaína por 30 minutos no acarrió mayores cambios en la razón de fluorescencia de la sonda, y el ionóforo originó los mismos efectos mostrados en la figura 14.

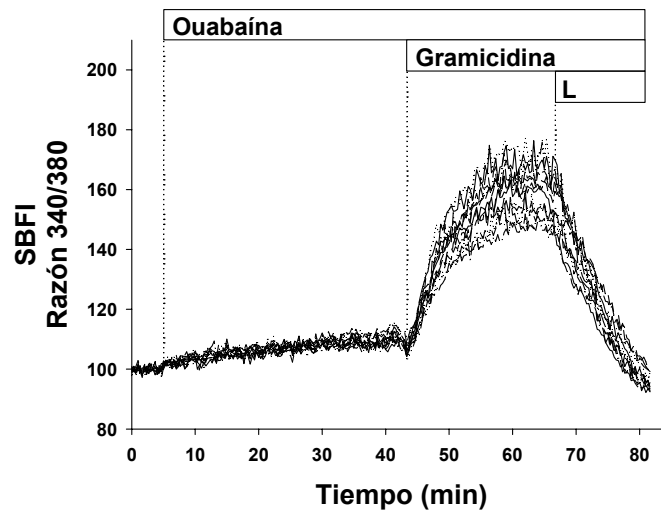


Figura 25. La gramicidina produce un incremento del Na^+ intracelular en células pretratadas con la ouabaína. Curso temporal de células que estuvieron expuestas al inhibidor ($100 \mu\text{M}$) antes de ser tratadas con el ionóforo ($20 \mu\text{g/ml}$). L, lavado, señala la aplicación de un *buffer* sin Na^+ utilizado control. $N = 3$.

El papel de la bomba de Na^+ en el metabolismo energético se analizó a otros dos tiempos de exposición a ionóforos de Na^+ : cerca del máximo de la señal de ATP obtenido con la gramicidina (figura 26), tiempo que coincide con el nuevo *plateau* alcanzado por el Na^+ (figura 14), y en donde la Na^+/K^+ ATPasa debería estar ejerciendo una actividad máxima. También, luego de tres horas de haberla estimulado con la monensina (figura 27), ya que se sabe que ante exposiciones prolongadas de Na^+ las células HeLa responden poniendo en marcha mecanismos de síntesis de proteínas reclutando nuevas bombas de Na^+ a la membrana plasmática, postulándose incluso, que el nivel del catión es la señal para la regulación genética de la proteína (Boardman *et al.*, 1974). Para el primer caso, la adición de la ouabaína no ocasionó ninguna

variación en la curva normal descrita para la gramicidina (comparar con la figura 12); por el contrario, cuando el inhibidor fue agregado tiempo después de haber impulsado a la bomba de Na^+ , sí fue posible observar un incremento agudo y transitorio en la señal. Cabe destacar que este experimento fue realizado con la monensina ya que es factible obtener señales estables luego de su aplicación (figura 13), situación que no ocurre con la gramicidina (figura 12).

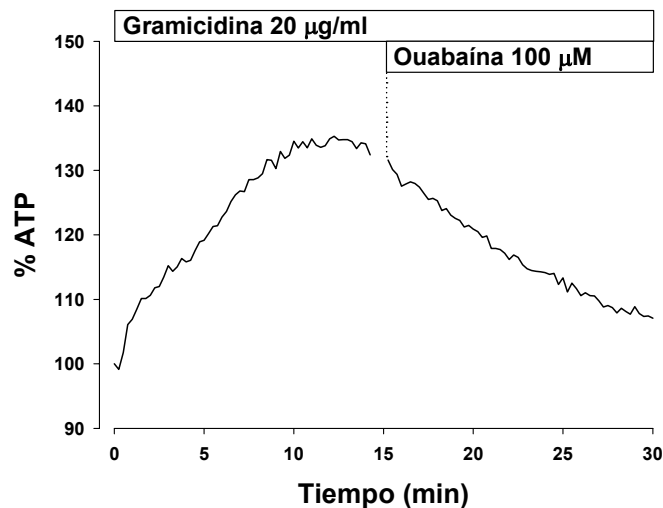


Figura 26. Efecto de la ouabaína sobre el aumento de ATP inducido por la gramicidina. Curso temporal de células que estuvieron expuestas al ionóforo por aproximadamente 15 minutos antes de adicionar el inhibidor, $n = 2$.

El resultado conseguido en el experimento de la figura 27, ayudó a sostener que las alzas en la señal de ATP producidas por el Na^+ se deben a un aumento en la producción de ATP y no a una disminución en el consumo. Tal afirmación se puede inferir al interpretar que la elevación de la señal que se suscitó una vez detenida la

Na^+/K^+ ATPasa equivale exclusivamente al ATP utilizado para el bombeo, indicando que en ningún caso la activación de la proteína inducida por el Na^+ podría causar una falta de consumo.

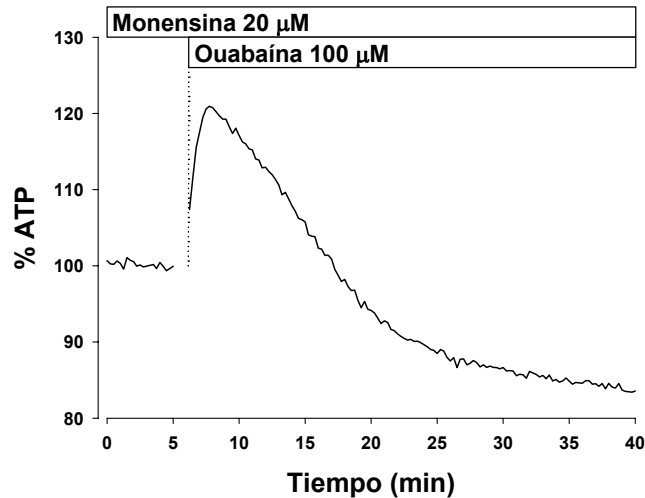


Figura 27. La ouabaína produce un incremento en la señal de ATP en células pretratadas con la monensina. Curso temporal de células que estuvieron expuestas al ionóforo por 3 horas antes de ser tratadas con el inhibidor, $n = 2$.

La privación del K^+ del medio extracelular se utilizó como una manera alternativa de detener a la bomba de Na^+ , y se realizaron experimentos con distintos tiempos de exposición al *buffer* antes de tratar las células con la gramicidina. La figura 28a muestra que el ionóforo provocó un alza en la luminiscencia comparable con la incitada en células pretratadas con la ouabaína (figura 24). El efecto, sin embargo, se disipó cuando el tratamiento sin el K^+ se prolongó por más tiempo, pudiendo observarse una disminución de la señal con una posterior recuperación que no superó la línea base

(figura 28b).

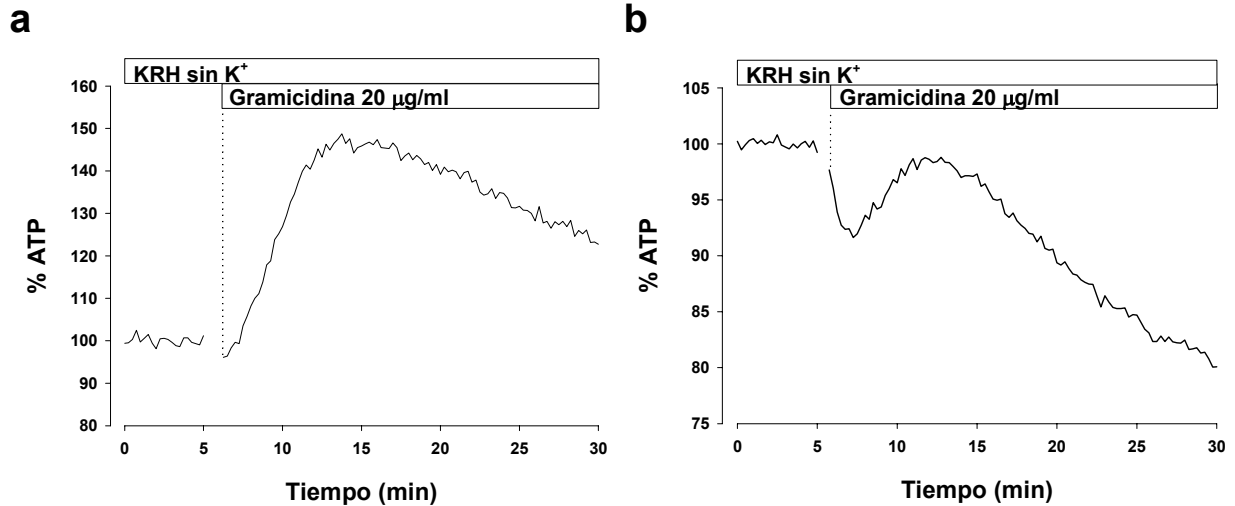


Figura 28. Efecto de la gramicidina sobre la señal de ATP en ausencia de K^+ extracelular. **(a)** curso temporal de células preincubadas por 5 minutos en un *buffer* KRH en donde el K^+ fue reemplazado equimolarmente por el Na^+ antes de agregar el ionóforo. **(b)** mismo protocolo que en (a) pero esta vez las células fueron preincubadas por 1 hora 40 minutos.

Se realizó un control extraordinario con la sonda fluorescente SBF1 con el objetivo de discriminar si la falta de efecto que se observó en la gráfica 28b se debía al tiempo de exposición al *buffer* sin K^+ , ya que es de esperar, al igual que el tratamiento con la ouabaína, que las células se carguen de Na^+ dada la detención de la Na^+/K^+ ATPasa. La figura 29 muestra que, efectivamente, la fluorescencia se incrementa paulatinamente en células que han sido privadas del K^+ , y la respuesta es más aguda si se compara con células que han sido inhibidas con la ouabaína (figura 25).

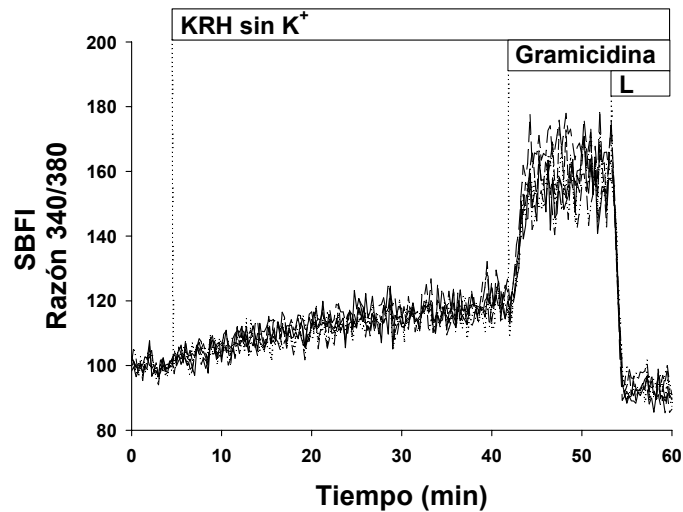


Figura 29. La gramicidina produce un alza del Na^+ en células carentes de K^+ extracelular. Curso temporal de células 6 células expuestas a un *buffer* KRH en donde el K^+ fue reemplazado equimolarmente por el Na^+ antes de agregar el ionóforo (20 $\mu\text{g/ml}$). L, lavado, indica la adición de un KRH desprovisto de Na^+ , utilizado como control.

Finalmente, en la figura 30 se muestra un resumen de múltiples experimentos revisados en la figuras 12, 24 y 28a en los cuales se analizaron las pendientes de los primeros 2 minutos postratamiento con la gramicidina, tal como se explica en anexo B. Las células que fueron expuestas a la ouabaína presentaron una variación en la señal de ATP de $4,4 \pm 0,8 \text{ \%/min}$ y aquellas que fueron preincubadas en un KRH desprovisto de K^+ una tasa de $4,4 \pm 1,1 \text{ \%/min}$. Los cambios de las células controles alcanzaron un valor de $2,8 \pm 0,5 \text{ \%/min}$. No se obtuvieron diferencias significativas cuando se realizó un análisis ANOVA.

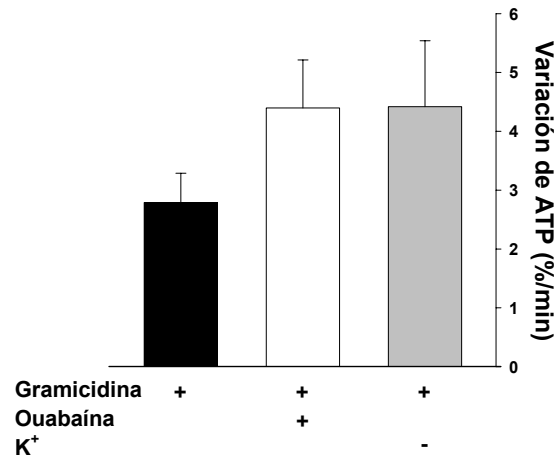


Figura 30. La actividad de la Na⁺/K⁺ ATPasa no interfiere en el incremento de señal de ATP producido por el Na⁺. La barra negra indica el promedio \pm error estándar de 7 experimentos de células tratadas con la gramicidina (20 μ g/ml) preincubadas en KRH normal. La barra blanca muestra el promedio \pm error estándar de 8 experimentos de células pretratadas entre 12 minutos y 1 hora 40 minutos con la ouabaína (100 μ M) antes de agregar el ionóforo. Por último, la barra gris señala el promedio de 4 experimentos de células preincubadas entre 5 y 40 minutos en un *buffer* KRH en donde el K⁺ fue reemplazado equimolarmente por el Na⁺ antes de adicionar el ionóforo. Los datos se analizaron como se indica en anexo B.

4.3.2. La bomba de Na⁺ y el metabolismo energético de células HeLa-Luc⁺

Haciendo referencia al alto consumo energético por parte de la Na⁺/K⁺ ATPasa, era posible esperar que su detención repentina resultara en un aumento en la señal de ATP dada una acumulación del nucleótido en el citosol que no estaría siendo utilizado para el bombeo, pero dicha predicción no ocurrió. La ouabaína no incitó ningún cambio

en la luminiscencia (figura 23). El acontecimiento podría explicarse de dos maneras: por la presencia de una retroalimentación muy rápida entre la bomba de Na^+ y las vías de producción de ATP; así, la paralización de la bomba no originaría ningún cambio en el nivel de ATP. O bien, porque la actividad basal de la bomba de Na^+ en estas células es baja, y por ende, su requerimiento de ATP también lo es; hecho que se vería respaldado en la acumulación paulatina del Na^+ que ocurre luego de adicionar la ouabaína (figura 22 y 25) (Marín-Hernández *et al.*, 2006).

El rol de la bomba de Na^+ en el metabolismo energético se estudió, también, durante y después de activarla fuertemente utilizando ionóforos de Na^+ . La detención abrupta de la Na^+/K^+ ATPasa durante el máximo de la curva de la gramicidina debería haberse visto reflejada en un aumento de la señal de ATP, pero al contrario de lo esperado, no resultó en ningún efecto (figura 26); dato curioso, si se piensa que durante este período la bomba de Na^+ debería estar ejerciendo su actividad máxima, y por ende, demandando una mayor cantidad de energía. El efecto del nivel de ATP utilizado por la Na^+/K^+ ATPasa sólo fue posible observarlo cuando se provocó su interrupción después de un tiempo considerable de haber inducido su activación (figura 27), aunque cabe destacar que no se probaron tiempos más cortos.

¿Por qué, entonces, fue factible observar el efecto del ATP utilizado por la bomba de Na^+ tiempo después de haberla activado y no durante su actividad máxima? En base a lo revisado es posible postular lo siguiente: la energía demandada por la bomba de Na^+ no pudo ser visualizada durante el *peak* de luminiscencia inducido con la gramicidina porque el efecto fue solapado por la gran producción de ATP generada por el Na^+ ; y la energía utilizada en el bombeo sólo fue posible observarla tiempo después,

una vez que el catión ya había producido todo el efecto posible.

4.3.3. La actividad de la Na^+/K^+ ATPasa no media la activación metabólica energética gatillada por el Na^+

De manera inesperada, y después de corroborar que el tratamiento con la gramicidina resultaba en un incremento citosólico del Na^+ por sobre la acumulación inducida por la ouabaína (figura 25), se reparó que el catión era capaz de originar un aumento en la producción de ATP aún cuando la Na^+/K^+ ATPasa estaba detenida (figura 24). Se realizaron experimentos adicionales inhibiendo a la bomba de Na^+ depletando de K^+ el medio extracelular, impidiendo de esta manera el ciclaje normal de la proteína (figura 28a), y la respuesta se confirmó. Aunque cabe destacar que este tipo de tratamiento trae como consecuencia una hiperpolarización.

Estos resultados abren la posibilidad de la existencia de un nuevo mecanismo de activación metabólica gatillado por el Na^+ , y descartan la participación de la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa como intermediario en la activación metabólica según el modelo aceptado (figura 1 y 30).

Es preciso aclarar que el papel de la bomba de Na^+ no puede ser desestimado de manera absoluta en este trabajo, y tal afirmación recae en el hecho de la evidencia creciente que estipula que la proteína no sólo desempeña una función de bombeo, sino que además, ejecuta múltiples procesos anexos, entre los que destacan señalización celular involucrando interacciones proteína-proteína que son independientes (Xie y Askari, 2002; Xie y Cai, 2003). Por este motivo, en este trabajo es posible descartar la

actividad, haciendo referencia al bombeo de la proteína, ya que no se realizó ningún tipo de ensayo que despreciara a la Na^+/K^+ ATPasa como señalizadora.

Habiendo confirmado la producción de ATP generada por el Na^+ , se procedió a estudiar en el capítulo siguiente las vías de producción de ATP que podrían estar siendo impulsadas por el catión.

4.4. Discriminación de las vías metabólicas energéticas activadas por el Na⁺

4.4.1. El metabolismo energético y células HeLa

Una característica particular en el metabolismo de células tumorales, como lo es la línea HeLa, corresponde al elevado flujo glicolítico que presentan aún en condiciones aeróbicas (Baggetto, 1992). El efecto se atribuye al aumento en la expresión de genes que codifican tanto para las enzimas de la glicólisis como para el transportador de glucosa GLUT (Osthus *et al.*, 2000); condición que ha sido respaldado al verse nueve de las diez enzimas glicolíticas sobreexpresadas en este tipo celular (Marín-Hernández *et al.*, 2006).

Algunos autores confirman a la glicólisis como la mayor ruta de generación de ATP en células HeLa (Vrbacky *et al.*, 2003) y otros además precisan que la situación se vería volcada a metabolismo oxidativo, exclusivamente, en aquellos casos en que la vía fuese dañada (Jouaville *et al.*, 1999). De hecho, se ha observado que la privación de la vía glicolítica genera una modificación en la composición y forma de las mitocondrias permitiendo a las células solventar su existencia (Rossignol *et al.*, 2004). Por otra parte, en células tratadas con distintos inhibidores de la fosforilación oxidativa, la glicólisis ha sostenido totalmente la demanda de ATP (Lyamzaev *et al.*, 2004) y la supresión del metabolismo oxidativo, induciendo hiperoxia, ha resultado en un incremento en el consumo de glucosa, indicando que ante fallas de la ruta, la célula responde generando más ATP glicolítico por una activación alostérica de las enzimas (Schoonen *et al.*, 1990).

En una postura intermedia están las investigaciones que sugieren que la

fosforilación oxidativa también contribuye en la producción de ATP, siendo ambas fuentes necesarias para que las células vivan (Shchepina *et al.*, 2002), y se ha sugerido incluso, que la mitocondria aportaría cerca del 50% del ATP sintetizado (Piechota *et al.*, 2006)

Finalmente, están los estudios que manifiestan que las células HeLa satisfacen sus requerimientos energéticos inclinándose por la fosforilación oxidativa. Esta última aseveración, se basa en estudios que indican que del 80% de la glucosa que es metabolizada por la glicólisis sólo un 5% del azúcar entra al ciclo del ácido cítrico, y específicamente establecen que la glutamina provee más del 50% de la energía total, aún en presencia de altas concentraciones de glucosa (Reitzer *et al.*, 1979; Baggetto, 1992). Otros trabajos también confirman la alta actividad respiratoria por sobre la glicólisis en estas células (Gregg *et al.*, 1968).

Independiente de las distintas posiciones que han sido expuestas para el metabolismo energético de las células HeLa, la principal fuente exógena de carbono para la glicólisis es la glucosa, como la glutamina lo es para la fosforilación oxidativa. Con respecto al combustible endógeno, el sustrato para la glicólisis sería el glicógeno (Wu, 1959) y el piruvato para el metabolismo oxidativo. Las concentraciones de ATP han sido calculadas en 1 mM (Barros *et al.*, 2003), 4,4 mM (Reitzer *et al.*, 1979) y 9,2 mM (Marín-Hernández *et al.*, 2006).

4.4.2. Experimentación

Con la finalidad de esclarecer la ruta metabólica que estaba siendo activada por el Na^+ se realizaron una serie de experimentos bloqueando las dos grandes vías de

producción: la fosforilación oxidativa y la glicólisis.

Para interrumpir la fosforilación oxidativa se emplearon dos compuestos: la oligomicina y la rotenona. La oligomicina es un antibiótico, extraído de *Streptomyces diastatochromogenes*, que se une a la subunidad F_0 de la ATP sintasa de la mitocondria inhabilitándola para generar ATP, y la rotenona es un derivado de plantas de los géneros *Lonchocarpus* y *Derris* que bloquea la cadena transportadora de electrones, impidiendo la transferencia desde el complejo I a la coenzima Q. Adicionalmente se utilizó el FCCP que actúa como un protonóforo en la membrana interna de la mitocondria e induce la disipación del potencial de membrana, aboliendo el gradiente de protones que permite la síntesis del ATP.

Para el caso de la glicólisis se inhibió la ruta precisamente en la reacción previa a la generación del primer ATP, a nivel de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) utilizando el ácido iodoacético (IAA). El compuesto actúa como un inhibidor enzimático que reacciona específicamente con grupos cisteína presentes en el sitio activo de la GAPDH.

Continuando con los experimentos, se procedió a evaluar la respuesta del Na^+ generada por la gramicidina en presencia de los distintos inhibidores metabólicos (ver anexo A). En células que fueron pretratadas con la oligomicina y la rotenona, el Na^+ ocasionó, desde el inicio, un ascenso de la señal luminiscente (figura 31). A diferencia de la figura 12, no se notaron pérdidas de señal y el decaimiento post máxima luminiscencia se prolongó por más tiempo.

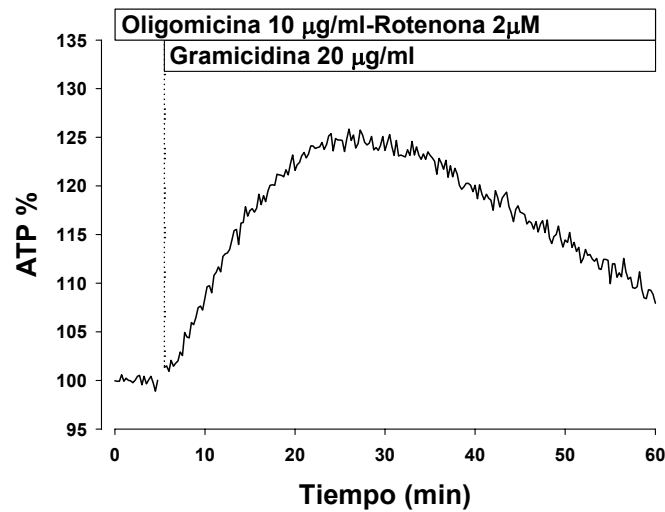


Figura 31. Efecto del Na^+ en la producción de ATP en presencia de inhibidores de la fosforilación oxidativa. Curso temporal de células que fueron pretratadas con el cóctel de inhibidores por 2 horas antes de agregar el ionóforo. Resultados semejantes se observaron en otros 5 experimentos de células preincubadas con el tratamiento por períodos de 1 a 2 horas 30 minutos antes de adicionar la gramicidina.

Se realizaron controles de pH por causa de los artefactos descritos en el capítulo 4.1.2.1. para el experimento con el cóctel de oligomicina-rottenona, con la finalidad de determinar si el efecto de la gramicidina analizado en la figura 16 se veía alterado luego del tratamiento. En la figura 32a se puede notar que los inhibidores originaron, con cierta demora, una gran disminución de la fluorescencia que pasados unos 30 minutos se estabilizó. La señal, luego de la aplicación del ionóforo, permaneció inalterada por aproximadamente cuatro minutos para luego ascender a valores cercanos al basal. También se monitoreó el nivel del Na^+ ante la exposición prolongada de la oligomicina y la rotenona sobre las células, y en la gráfica 32b se muestra que la fluorescencia

aumento paulatinamente, pero aún después de 2 horas, la gramicidina continuó provocando entradas del catión.

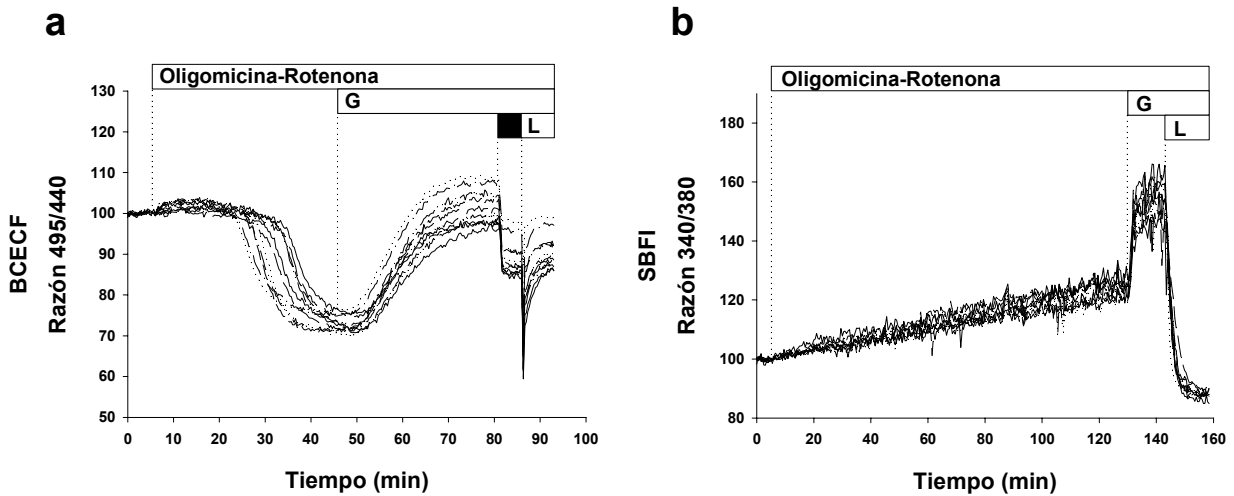


Figura 32. Efecto de la gramicidina sobre el pH y el Na⁺ en células pretratadas con la oligomicina y la rotenona. Curso temporal de 11 células cargadas con la sonda fluorescente BCECF (a) y de 10 células cargadas con SBFI (b). Se utilizaron concentraciones de 10 µg/ml-2 µM para los inhibidores y 20 µg/ml de gramicidina (G). El rectángulo negro indica la adición del NH₄Cl 25 mM utilizado como control positivo. L, lavado, señala la remoción del NH₄Cl con un *buffer* KRH normal para el caso del BCECF y para el SBFI se utilizó como control un KRH desprovisto de Na⁺. *N* = 5 y 2, respectivamente.

Se prosiguió utilizando el FCCP como una manera alternativa de abolir a la mitocondria como productora de ATP. El tratamiento con la gramicidina, en células preincubadas con el desacoplador, causó una deflexión inmediata de la luminiscencia que pasados tres minutos revirtió para generar la respuesta típica (figura 33).

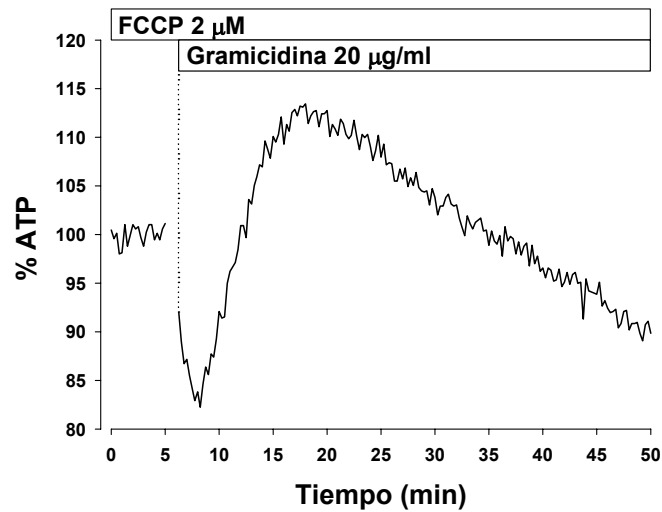


Figura 33. Efecto del Na^+ sobre la producción de ATP en presencia de un desacoplador mitocondrial. Curso temporal de células que fueron pretratadas con el FCCP por 35 minutos antes de agregar el ionóforo. Respuestas parecidas se obtuvieron en otros 5 experimentos de células que estuvieron expuestas al tratamiento por entre 20 y 80 minutos previa adición de la gramicidina.

Se realizaron, asimismo, los respectivos controles de pH y de carga de Na^+ . En la figura 34a se puede notar que la aplicación del FCCP suscitó una deflexión instantánea en la fluorescencia que tras un intento leve de recuperación continuó decayendo lentamente. La adición de la gramicidina provocó una disminución extra en la señal, que luego de unos 20 minutos se recuperó para alcanzar el basal. Con respecto al Na^+ , el tratamiento con el desacoplador no generó ningún cambio en la señal fluorescente por al menos 80 minutos, y el ionóforo causó la entrada típica del catión (figura 34b).

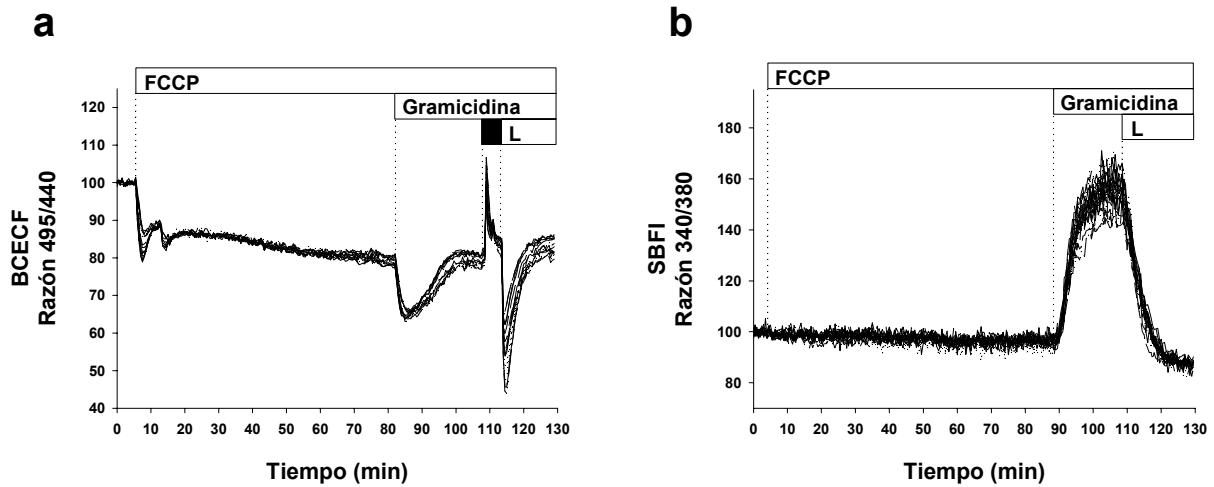


Figura 34. Efecto de la gramicidina sobre el pH y el Na^+ en células pretratadas con el FCCP. Curso temporal de 14 células cargadas con la sonda fluorescente BCECF (a) y de 21 células cargadas con SBFI (b). Se utilizaron concentraciones de $2 \mu\text{M}$ del desacoplador y $20 \mu\text{g/ml}$ del ionóforo. El rectángulo negro indica la adición del NH_4Cl 25 mM utilizado como control positivo. L, lavado, señala la remoción del NH_4Cl con un *buffer* KRH normal para el caso del BCECF y para el SBFI se utilizó como control un KRH desprovisto de Na^+ . $N = 1$ y 3, respectivamente.

Por último, se evaluó la respuesta generada por la gramicidina en la señal de ATP en células preincubadas con el ácido iodoacético (figura 35). El tratamiento no suscitó un patrón común en los resultados, y por el contrario, mostró una variación de efectos que fueron desde no provocar prácticamente ningún cambio en la luminiscencia (figura 35a), hasta lograr alzas importantes de la señal (figura 35b).

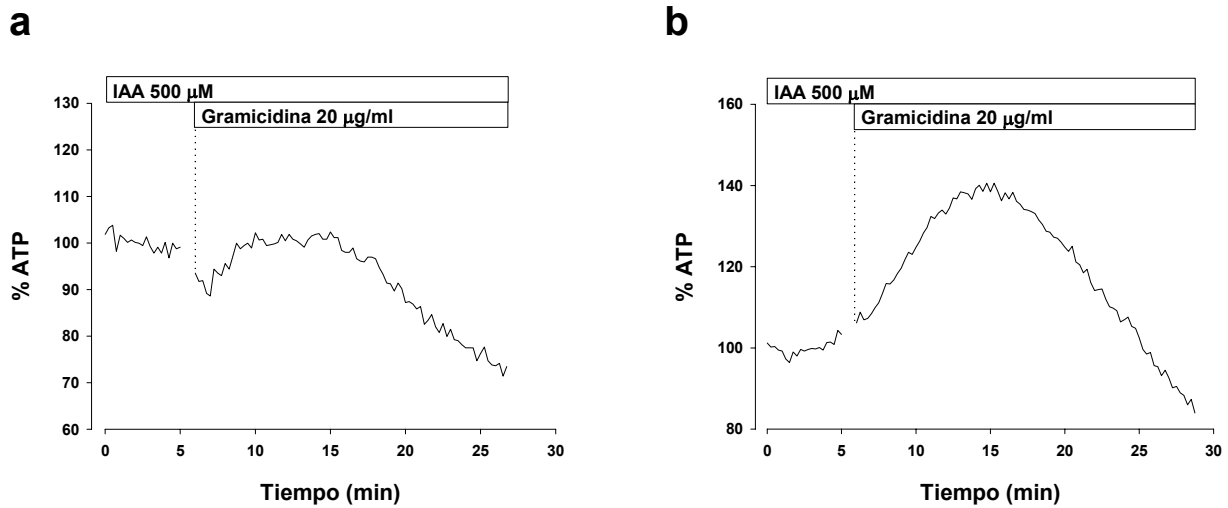


Figura 35. Efecto del Na^+ en la producción de ATP en presencia de un inhibidor de la glicólisis. Curso temporal de células que fueron pretratadas con el ácido iodoacético por 15 **(a)** y 12 **(b)** minutos antes de agregar el ionóforo. Similares resultados se obtuvieron en otros 5 y 6 ensayos respectivos, en donde las células fueron preincubadas con el inhibidor por períodos de tiempo de 10 a 85 minutos antes de agregar la gramicidina.

Se efectuaron los debidos controles de pH, y al igual que el tratamiento con el cóctel de inhibidores de la mitocondria, el ácido iodoacético provocó una gran disminución de la fluorescencia, pero en este caso fue instantánea (figura 36a). La adición de la gramicidina, luego de la estabilización de la señal, no generó cambios por aproximadamente cuatro minutos, y luego revirtió sin lograr sobrepasar la señal basal, al menos por el tiempo medido. Con respecto al Na^+ , en el gráfico de la figura 36b se puede notar que la exposición a tiempos prolongados del ácido iodoacético ocasionó un alza constante de la fluorescencia del SBF1, que después de dos horas suprimió

completamente el efecto de la gramicidina como ionóforo del catión.

El resultado obtenido en la gráfica 36b en particular, avalaría el hecho de que la bomba de Na^+ es abastecida de energía principalmente por la glicólisis, ya que ante la inhibición de la fosforilación oxidativa, no se observó el mismo fenómeno de carga de Na^+ (figura 32b y 34b).

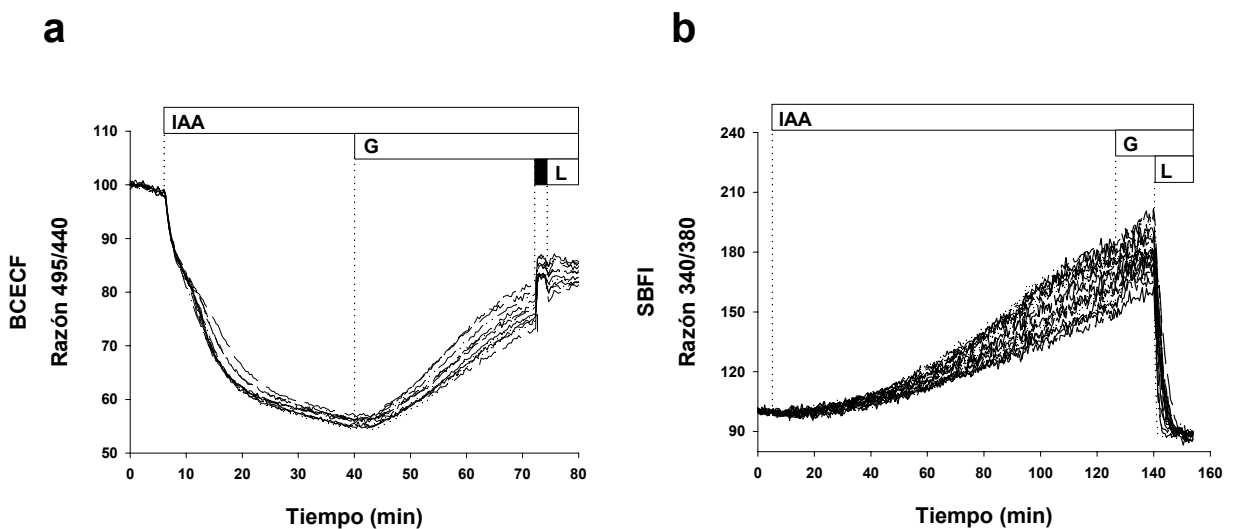


Figura 36. Efecto de la gramicidina sobre el pH en células pretratadas con IAA.

Curso temporal de 12 células cargadas con la sonda fluorescente BCECF (a) y de 22 células cargadas con SBFI (b). Se utilizaron concentraciones de 500 μM del ácido iodoacético y 20 $\mu\text{g/ml}$ de gramicidina (G). El rectángulo negro indica la adición del NH_4Cl 25 mM utilizado como control positivo. L, lavado, señala la remoción del NH_4Cl con un *buffer* KRH normal para el caso del BCECF; mientras que para el SBFI se utilizó como control un KRH desprovisto de Na^+ . $N = 3$ y 2, respectivamente.

En cuanto al análisis de los datos, el resultado obtenido en el experimento de la

figura 32a fue otro factor que limitó el procesamiento, ya que poco tiempo después de agregar la gramicidina se pudo advertir una alcalinización de las células que podría estar interfiriendo en las respuesta examinada en la figura 31. Con la finalidad de entregar resultados interpretables, todos los experimentos fueron procesados analizando los primeros minutos postratamiento con el ionóforo, que es el tiempo durante el cual el pH permanece inalterado (anexo B). Lamentablemente, los ensayos realizados con el desacoplador mitocondrial no podrán ser analizados ya que el control de pH (figura 34a) muestra una acidificación instantánea de las células ante la exposición de la gramicidina, que estaría dando cuenta de la deflexión en la luminiscencia revisada en la figura 33. Tampoco se pudieron promediar los experimentos en los cuales se utilizó el ácido iodoacético, principalmente porque arrojaron respuestas variadas, sin observarse una consistencia en los resultados (figura 35).

Para finalizar los resultados entregados en esta tesis, se muestra un resumen de experimentos analizados en las figuras 12 y 31, en los cuales se procesaron las pendientes de los primeros 2 minutos postratamiento con la gramicidina. Las células que fueron expuestas a la oligomicina y la rotenona presentaron una variación en la señal de ATP de $3,5 \pm 0,6$ %/min, y no presentaron diferencias significativas con los cambios de las células controles que alcanzaron un valor de $2,8 \pm 0,5$ %/min (figura 36).

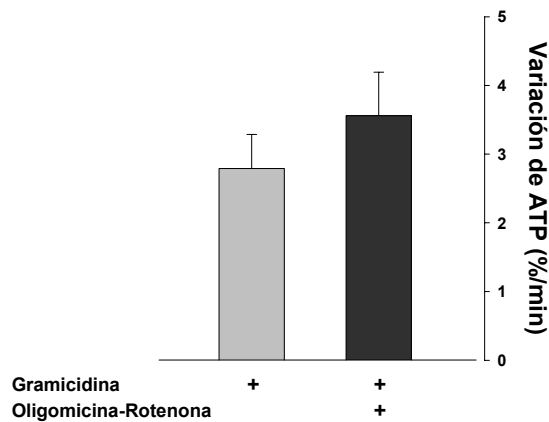


Figura 37. El Na^+ produce un aumento en la producción de ATP glicolítico. La barra gris indica el promedio \pm error estándar de 7 experimentos de células tratadas con la gramicidina 20 $\mu\text{g/ml}$ preincubadas en KRH normal. La barra negra muestra el promedio \pm error estándar de 5 experimentos de células pretratadas con el cóctel de inhibidores, 10 $\mu\text{g/ml}$ y 2 μM , respectivamente entre 1 y 2 horas 30 minutos antes de agregar el ionóforo. Los datos fueron procesados como se explica en anexo B.

4.4.3. El Na^+ activa la vía glicolítica.

Los resultados de este último capítulo sugieren que el Na^+ estaría activando la producción de ATP glicolítico, y no es factible decir lo mismo de la fosforilación oxidativa. La aseveración se justifica en las respuestas evaluadas en las figuras 31 y 35, en donde básicamente se observa que en células privadas de fosforilación oxidativa el catión suscitó prácticamente el mismo efecto que en células integra, en ausencia de cualquier tratamiento (figura 12); a diferencia de las que tenían bloqueada la glicólisis, en donde todas las réplicas no concluyeron de una misma manera. El

efecto puede separarse de las interferencias de pH por al menos 3 minutos para ambos tratamientos (figuras 32a y 36a).

Con respecto a las variaciones de las respuestas que arrojaron los experimentos con el ácido iodoacético, no fue posible encontrar una explicación acorde, ya que a pesar que la medición de la luminiscencia (figura 35) se realizó cuando las células estaban siendo acidificadas severamente (figura 36a), se produjeron respuestas totalmente opuestas. La falta de efecto tampoco puede ser justificada por una carga celular de Na^+ (figura 36b), por lo que no es congruente establecer una conclusión de estos ensayos.

5. DISCUSION

De manera general los resultados revisados en este trabajo de tesis concluyen la existencia de un mecanismo nuevo de activación metabólica celular por parte del Na^+ , y el desenlace más sorprendente radica en el hecho de que la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa no sería la responsable de dicho fenómeno (figura 38). Surge, entonces, la interrogante de los sucesos que involucraría el mecanismo en sí, y las razones que justificarían su accionar por parte de las células.

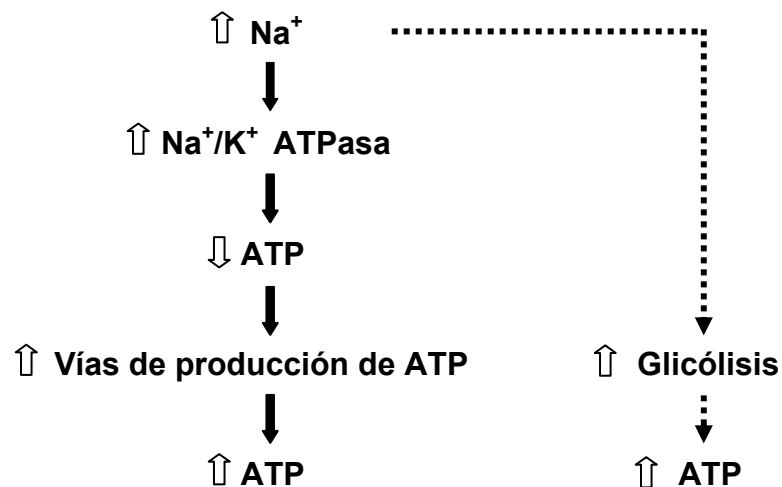


Figura 38. Modelo propuesto de activación metabólica por el Na^+ . En líneas punteadas, influjos de Na^+ activan la producción glicolítica de ATP.

5.1. Sensor celular de ATP

La idea de la existencia de proteínas capaces de monitorear el ATP en células de mamíferos se ha planteado en algunos trabajos, y ejemplos concretos lo constituyen

dos miembros de la familia de proteínas quinasas: mTOR y AMPK (Dennis *et al.*, 2001; Rutter *et al.*, 2003).

Proyectando este trabajo, la concepción de un sensor putativo de ATP bien podría articular el modelo propuesto de activación metabólica por parte del Na^+ . La posible proteína debiera, en principio, poseer un sitio alostérico para el catión, en caso de que fuera la misma proteína la que sensara el ATP, o bien, el mecanismo podría ser mucho más complejo contando con la participación de múltiples intermediarios entre los cuales uno de ellos active la producción de ATP. La proteína podría sin duda corresponder a alguna enzima conocida de los bloques generadores del nucleótido, a la cual no se le haya encontrado un sitio alostérico para el Na^+ , como también ser la misma bomba de Na^+ la que estuviera ejecutando alguna cascada desconocida de señalización.

5.2. Mecanismo de regulación anticipatorio o *feed-forward*

Más allá del mecanismo en sí que estaría implicando la activación metabólica por parte del Na^+ , la pregunta más importante que se levanta tiene relación con la funcionalidad celular de dicho fenómeno. ¿Para qué el Na^+ incrementa la producción de ATP?, y ¿cuales son las consecuencias que acarrea el mecanismo?

Siendo la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa un proceso ejecutor de viabilidad, es factible pensar que la célula cuente con mecanismos de regulación anticipatorios, que ante eventuales situaciones de estrés, se pongan en marcha, y suplan el alto costo energético que demandaría retomar la homeostasis del sistema. Esta aproximación se ve respaldada en los experimentos realizados en esta tesis, en los cuales a pesar de

haber inhibido completamente la actividad de la proteína, el Na^+ fue capaz de inducir una activación metabólica. Así es como el mecanismo contaría con sus tres componentes, en donde el Na^+ sería el ejecutor, el ATP el integrador y la bomba de Na^+ el efector, completando de esta manera sus elementos.

Desafortunadamente, en este trabajo no se realizó ningún experimento que pudiera confirmar a la Na^+/K^+ ATPasa como el componente efector, y tal como se manifestó en el punto anterior, puede que el mecanismo involucre una serie de sensores alternativos que descarten en absoluto un fenómeno anticipatorio, y por ende, a la bomba de Na^+ .

5.3. Conclusiones

En resumen, las conclusiones de esta tesis, con respecto a la técnica utilizada son:

- El pH afecta la luminiscencia *in vitro*, incrementándola a pH 8,0 y disminuyéndola a pH 6,0.
- Variaciones de la razón Na^+/K^+ , a fuerzas iónicas constantes, afectan la luminiscencia *in vitro*, observándose alzas cuando se aumentó la concentración tanto del Na^+ como del K^+ .

En cuanto al resto del trabajo:

- El Na^+ produce un incremento del ATP celular.
- La actividad de la Na^+/K^+ ATPasa no es la responsable de la activación metabólica energética mediada por el Na^+ .

- El Na^+ activa la producción de ATP glicolítico.

ANEXO A

A. 1. El metabolismo energético de células HeLa-Luc⁺

Se evaluaron las respuestas sobre la señal de ATP de cada uno de los inhibidores metabólicos utilizados. Tanto la oligomicina (figura A 2) como la rotenona (figura A 1a), incitaron un incremento de la señal con una posterior estabilización. El primer tratamiento a diferencia del segundo, no deprimió levemente la señal en un comienzo, provocó un cambio de enormes proporciones llegando a doblar la señal, y el efecto se extendió por mucho más tiempo. El FCCP condujo a una caída rápida de la señal que a los pocos minutos se estabilizó (figura A 1b).

El tratamiento con el ácido iodoacético resultó en una disminución considerable de la señal que se extendió en dos etapas, luego de lo cual pudo observarse una estabilidad (figura A 1c).

La figura A 2 muestra un curso temporal en donde se ven inactivadas de manera sucesiva las distintas vías de producción de ATP. Con los primeros tres tratamientos se logra la abolición absoluta de la mitocondria como productora de energía. La adición del último tratamiento, detiene la maquinaria glicolítica, y lleva la señal hasta cero. Las cinéticas de los venenos metabólicos no distaron mayormente de las obtenidas por separado, a excepción de la rotenona que produjo un pequeño hombro que declinó para luego recuperarse.

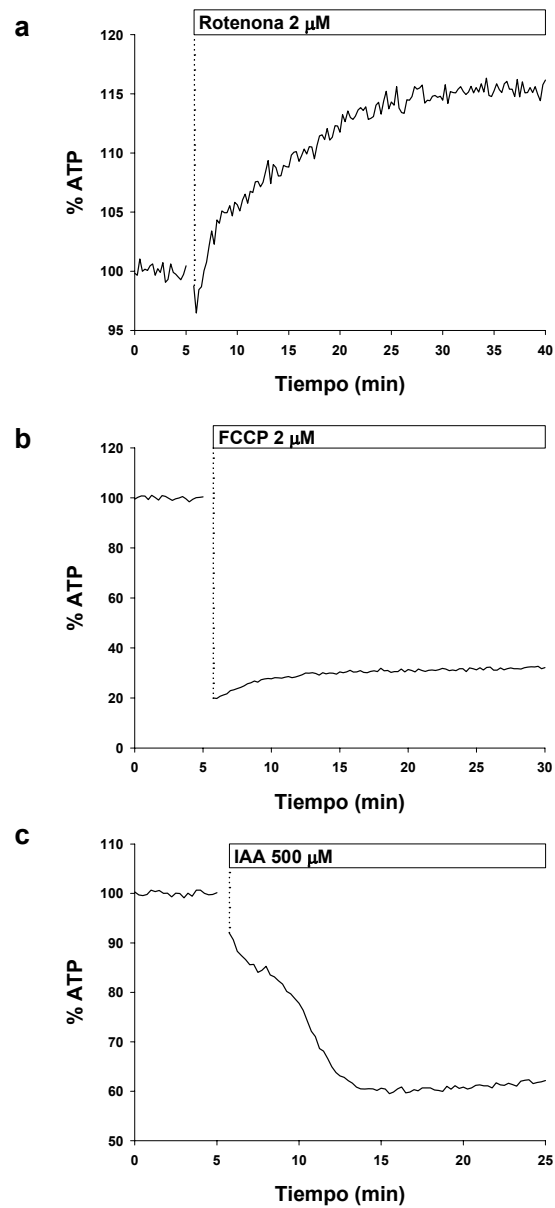


Figura A 1. Efecto de la rotenona (a), el FCCP (b) y el ácido iodoacético (c) sobre la señal del ATP. Cursos temporales de células que fueron sometidas a los distintos tratamientos. Las líneas punteadas indica la adición de los venenos metabólicos. $N = 3, 4$ y 4 , respectivamente.

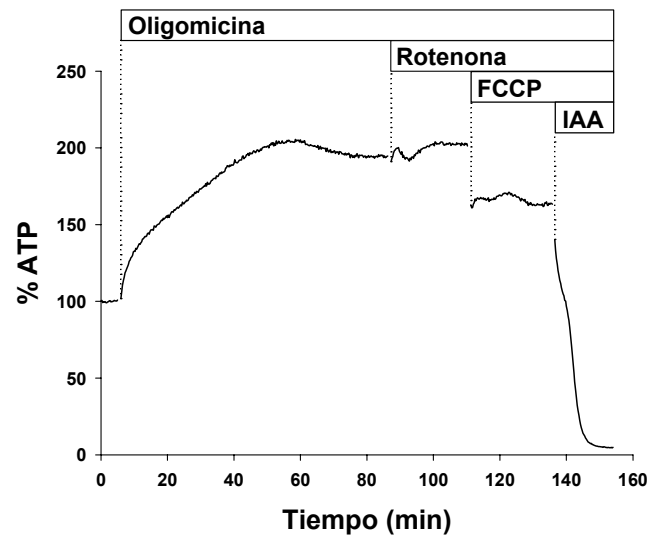


Figura A 2. Variaciones en la señal de ATP producidas en respuesta a los distintos venenos metabólicos. Curso temporal de células que fueron expuestas prolongadamente a una sumatoria de inhibidores de las distintas vías de producción de ATP. Las concentraciones utilizadas fueron 10 $\mu\text{g/ml}$, 2 μM , 2 μM y 500 μM en el orden que se indica en el gráfico. $N = 2$.

A. 2. Aproximaciones de las rutas de generación de ATP favorecidas por las células HeLa-Luc⁺

De los experimentos de las figuras A 1 y 2 se sostiene que las células pueden subsistir ante supresiones de una de las dos vías generadoras del ATP. La aseveración radica en que fue posible observar señales estables del nucleótido después de la aplicación de los distintos inhibidores. Cuando la fosforilación oxidativa fue abolida, tanto con la oligomicina como con la rotenona (figura A 1a y A 2), se pudieron observar fuertes incrementos en la luminiscencia, que fueron descartados como artefactos de pH en conjunto (figura 32a), y que reflejarían una activación inmediata de la glicólisis. De

esta manera, las células compensarían la pérdida del ATP producido por la mitocondria potenciando severamente la vía alternativa. Por el contrario, frente a la inhibición de la glicólisis, las células parecieran simplemente no recuperarse, ya que no fue factible advertir ningún incremento en la señal de ATP después del tratamiento (figura A 1c). Si bien la aplicación del IAA disminuyó considerablemente la luminiscencia, indicando que la ruta sería una fuente importante de energía, es posible que gran parte del efecto sea atribuible a la gran acidificación que produce el tratamiento (figura 36a). Estos experimentos en particular apoyan la postulación de que estas células utilizan preferentemente como bloque generador de energía a la fosforilación oxidativa y no a la glicólisis.

Ahora bien, ante situaciones de estrés, en este caso provocadas por influjos masivos de Na^+ , las células parecieran volcarse a la vía glicolítica. Dicha situación se desprende de los experimentos que se muestran en las figuras 31 y 35, en donde se puede observar que ante la inhibición de la fosforilación oxidativa se incrementa la producción de ATP glicolítico; efecto que no fue representativo cuando se bloqueó esta última ruta.

La interpretación de la respuesta causada por el FCCP (figura A 1b) se ve dificultada ya que los desacopladores no sólo inhabilitan la producción de ATP, sino que también, revierten a la ATP sintasa promoviendo el consumo (Soltoff, 2004). De esta manera, la caída en la señal pudiera ser producto de una acidificación celular (figura 34a) dada la naturaleza del compuesto (Buckler y Vaughan-Jones, 1998), como además, significar una demanda del nucleótido por la bomba de la mitocondria.

El efecto de la oligomicina sobre la señal de ATP fue notable (figura A 2) en

comparación con el suscitado por la rotenona (figura A 1a), y tal como se mencionó, la resolución estaría en parte dada por una activación inminente de la glicólisis. Se ha reportado que la oligomicina obstruye la unión del Na^+ a la Na^+/K^+ ATPasa, afectando la actividad de la proteína (Arato-Oshima *et al.*, 1996). Este suceso contribuiría a explicar que el alza en la señal podría deberse, asimismo, a la acumulación del ATP que no estaría siendo utilizado por la bomba de Na^+ ; fenómeno que no pudo ser visto en la figura 23 por el corto tiempo de registro del experimento.

ANEXO B

B.1. Procesamiento de datos.

Considerando los artefactos de pH descritos para la técnica, y una vez evaluados sus efectos con la sonda fluorescente BCECF en dos experimentos considerados como indispensables para este trabajo (figuras 16 y 32a), se decidió someter a análisis el intervalo de tiempo que comprende los primeros dos minutos postratamiento con la gramicidina, ya que durante este período, es cuando se observa la menor interferencia de pH, haciendo más fidedigna la interpretación de los resultados.

Comenzando por los registros crudos (figura B 1a), los datos de todos los gráficos de barras fueron analizados de la siguiente manera:

-para el caso de los experimentos realizados en el luminómetro (figuras 19a, 20, 23, 30 y 37), una vez normalizados (figura B 1b), se consideraron al menos 10 registros (tomados cada 15 segundos) equivalentes a 2 minutos 15 segundos como línea base (previa a cualquier tratamiento). Una vez aplicado el tratamiento, se escogieron los 9 primeros registros, equivalentes a 2 minutos de experimento (ver rectángulo de la figura B 1b y la línea achurada de la figura B 1c), y se procedió a obtener la razón de cambio en la luminiscencia (figura B 1c) simplemente sustrayendo sucesivamente los valores obtenidos de 2 registros consecutivos. A continuación, se promediaron los datos tanto pre como postratamiento, obteniéndose 2 cifras. Finalmente, el valor pretratamiento fue restado al valor postratamiento, teniendo como resultado un número que indica la razón de cambio neta cada 15 segundos. Para obtener la tasa de cambio por minuto, el valor fue multiplicado por cuatro.

-para el caso de los experimentos con la sonda fluorescente SBFI (figura 19b y 22b), se

consideraron los mismos intervalos de tiempo que en el caso anterior, ya que las tomas de fluorescencia también fueron llevadas a cabo cada 15 segundos.

-para el caso de los experimentos con la sonda fluorescente BCECF (figura 16d), se consideraron al menos 8 registros pretratamiento y 6 postratamiento, equivalentes a 4 y 2 minutos respectivamente. Las tomas de fluorescencia se efectuaron cada 20 segundos.

Con respecto al eje de las ordenadas de los gráficos de los experimentos de luminiscencia, es preciso destacar que el equipo entrega los datos en Unidades Relativas de Luz (U.R.L.), pero como una manera de facilitar la interpretación y lectura se decidió expresar la unidad en porcentaje de ATP.

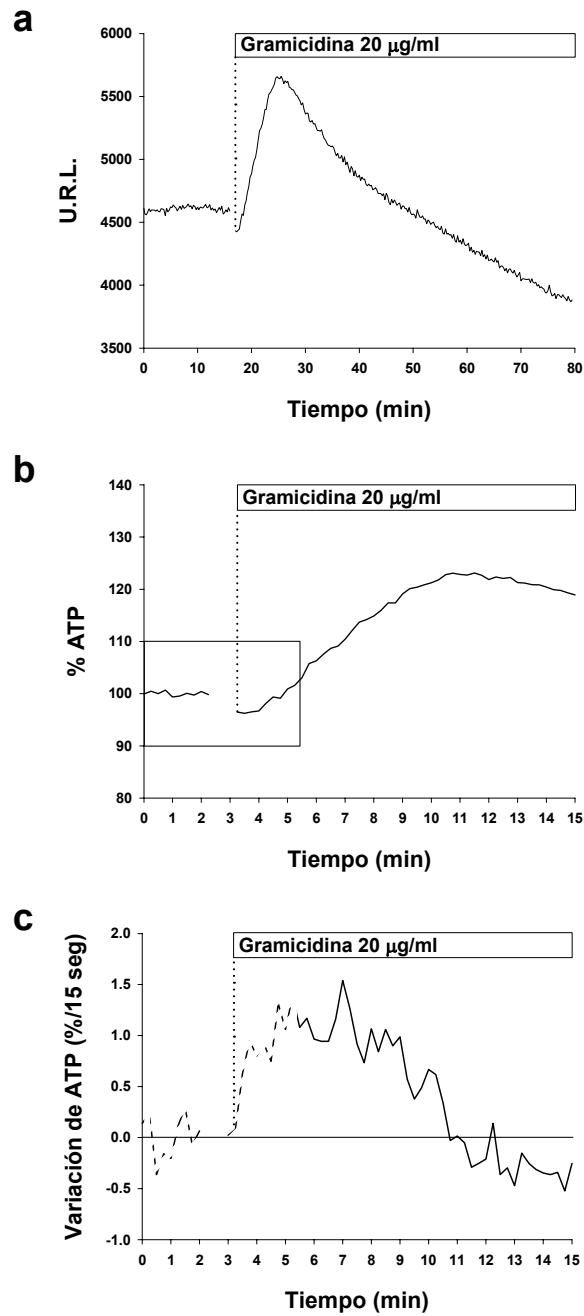


Figura B.1. Procesamiento de datos de un experimento tipo. A, datos crudos. **B,** datos normalizados. **C,** razón de cambio de la luminiscencia en %/15 seg. En líneas punteadas se muestran los tiempos analizados.

ANEXO C

C.1. Experimentos analizados en la figura 19.

Figura C 1. Cursos temporales de la gramicidina a distintas concentraciones realizados en el luminómetro. A, 20 $\mu\text{g/ml}$, b, 10 $\mu\text{g/ml}$, c, 5 $\mu\text{g/ml}$, d, 1 $\mu\text{g/ml}$, f, 0,75 $\mu\text{g/ml}$, g, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, h, 0,25 $\mu\text{g/ml}$ e i, 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Las líneas punteadas indican la adición del ionóforo. Se muestran los primeros 15 minutos de tratamiento.

Figura C 2. Cursos temporales de la gramicidina a distintas concentraciones, realizados con la sonda fluorescente SBFI. A, 20 $\mu\text{g/ml}$, b, 15 $\mu\text{g/ml}$, c, 10 $\mu\text{g/ml}$, d, 5 $\mu\text{g/ml}$, e, 1 $\mu\text{g/ml}$ f, 0,75 $\mu\text{g/ml}$, g, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, h, 0,25 $\mu\text{g/ml}$ e i, 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Las líneas punteadas indican la adición del ionóforo. Se muestran los promedios (sin los errores estándar por motivos de espacio) de los primeros 15 minutos de tratamiento. La caída de la señal al final de algunos experimentos es signo de la aplicación del control para la sonda realizado con KRH sin Na^+ .

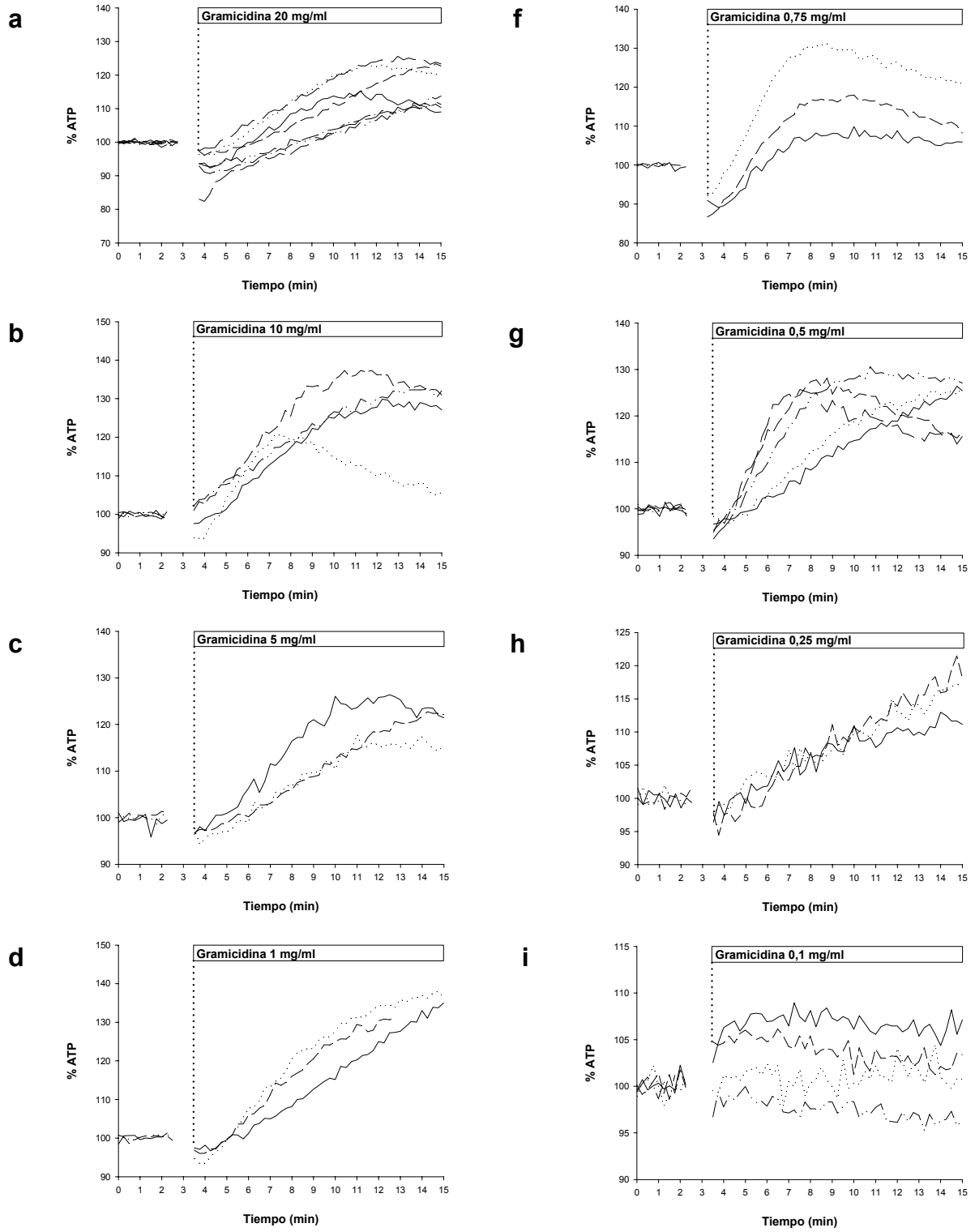


Figura C 1.

6. BIBLIOGRAFIA

Aflalo, C. (1991) Biologically localized firefly luciferase: a tool to study cellular processes. *Int. Rev. Cytol.*, 130: 269-323.

Aledort, L. M., Weed, R. I. and Troup, S. B. (1966) Ionic effects on firefly bioluminescence assay of red blood cell ATP. *Anal. Biochem.*, 17: 268-277.

Andersen, O. S., Koeppe II, R. E. and Roux, B. (2005) Gramicidin channels. *IEEE Trans. Nanobioscience*, 4: 10-20.

Arato-Oshima, T., Matsui, H., Wakizaka, A. and Homareda, H. (1996) Mechanism Responsible for Oligomycin-induced Occlusion of Na⁺ within Na/K-ATPase. *J. Biol. Chem.*, 271: 25604-25610.

Attwell, D. and Laughlin, S. B. (2001) An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 21: 1133-1145.

Baggetto, L. G. (1992) Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimie.*, 74: 959-74.

Balaban, R. S. and Bader, J. P. (1983) The efficiency of (Na⁺ + K⁺)-ATPase in tumorigenic cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 730: 271-275.

Balaban, R. S., Mandel, L. J., Soltoff, S. P. and Storey, J. M. (1980) Coupling of active ion transport and aerobic respiratory rate in isolated renal tubules. *Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 447-451.

Barros, L. F., Kanaseki, T., Sabirov, R., Morishima, S., Castro, J., Bittner, C., X., Maeno, E., Ando-Akatsuka, Y. and Okada, Y. (2003) Apoptotic and necrotic blebs in epithelial cells display similar neck diameters but different kinase dependency. *Cell. Death. Differ.*, 10: 687-97.

Ben-Tal, N., Sitkoff, D., Bransburg-Zabary, S., Nachliel, E. and Gutman, M. (2000) Theoretical calculations of the permeability of monensin-cation complexes in model biomembranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1466: 221-233.

Bevensee, M. O., Alper, S. L., Aronson, P. S. and Boron, W. F. (2000) Control of intracellular pH. In: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, edited by Seldin, D., W. and Giebisch, G. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams, & Wilkins, p. 391-442.

Boardman, L., Huett, M., Lamb, J. F., Newton, J. P. and Polson, J. M. (1974) Evidence for the genetic control of the sodium pump density in HeLa cells. *J. Physiol.*, 241: 771-794.

Buckler, K. J. and Vaughan-Jones, R. D. (1998) Effects of mitochondrial uncouplers on intracellular calcium, pH and membrane potential in rat carotid body type I cells.

Physiol., 513: 819-833.

DeLuca, M. and McElroy, W. D. (1984) Two kinetically distinguishable ATP sites in firefly luciferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123: 764-770.

Dennis, P. B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S. C. and Thomas, G. (2001) Mammalian TOR: A Homeostatic ATP Sensor. *Science*, 294: 1102-1105.

Donnelly, M. and Scheffler, I. E. (1976) Energy metabolism in respiration-deficient and wild type Chinese hamster fibroblasts in culture. *J. Cell. Physiol.*, 89: 39-51.

Feng, J. and Lingrel, J. B. (1994) Analysis of amino acid residues in the H5-H6 transmembrane and extracellular domains of Na,K-ATPase alpha subunit identifies threonine 797 as a determinant of ouabain sensitivity. *Biochemistry*, 33: 4218-4224.

Fraga, H., Esteves da Silva, J. C. and Fontes, R. (2003) pH opposite effects on synthesis of dinucleoside polyphosphates and on oxidation reactions catalyzed by firefly luciferase. *FEBS Lett.*, 543: 37-41.

Green, A. A. and McElroy, W. D. (1956) Crystalline firefly luciferase. *Biochim. Biophys. Acta*, 20: 170-176.

Gregg, C. T., Machinist, J. M. and Currie, W. D. (1968) Glycolytic and respiratory

properties of intact mammalian cells: inhibitor studies. *Arch. Biochem. Biophys.*, 127: 101-111.

Ikehara, T., Yamaguchi, H., Hosokawa, K., Sakai, T. and Miyamoto, H. (1984) Rb⁺ influx in response to changes in energy generation: effect of the regulation of the ATP content of HeLa cells. *J. Cell. Physiol.*, 119: 273-282.

Ikehara, T., Yamaguchi, H., Sakai, T. and Miyamoto, H. (1984) Kinetic parameters and mechanism of active cation transport in HeLa cells as studied by Rb⁺ influx. *Biochim. Biophys. Acta*, 775: 297-307.

Jorgensen, P. L., Hakansson, K. O. and Karlsh, S.J. (2003) Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.*, 65: 817-849.

Jouaville, L. S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G. A. and Rizzuto, R. (1999) Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 13807-13812.

Kalbacova, M., Vrbacky, M., Drahotka, Z. and Melkova, Z. (2003) Comparison of the effect of mitochondrial inhibitors on mitochondrial membrane potential in two different cell lines using flow cytometry and spectrofluorometry. *Cytometry A*, 52: 110-116.

Lyamzaev, K. G., Izyumov, D. S., Avestisyan, A. V., Yang, F., Pletjushkina, O. Y. and

Chernyak, B. V. (2004) Inhibition of mitochondrial bioenergetics: the effects on structure of mitochondria in the cell and on apoptosis. *Acta Biochim. Pol.*, 51: 553-562.

Mandel, L. J., Soltoff, S. P. and Storey, J. M. (1980) Coupling of active ion transport and aerobic respiratory rate in isolated renal tubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 447-451.

Manfredi, G., Yang, L., Gajewski, C. D. and Mattiazzi, M. (2002) Measurements of ATP in mammalian cells. *Methods*, 26: 317-326.

Marín-Hernández, A., Rodríguez-Enríquez, S., Vital-González, P. A., Flores-Rodríguez, F. L., Macías-Silva, M., Sosa-Garrocho, M. and Moreno-Sánchez, R. (2006) Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J.*, 273: 1975-1988.

Osthus, R. C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, A. L. and Dang, C. V. (2000) Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J. Biol. Chem.*, 275: 21797-21800.

Palasis, M., Kuntzweiler, T. A., Arguello, J. M. and Lingrel J. B. (1996) Ouabain interactions with the H5-H6 hairpin of the Na,K-ATPase reveal a possible inhibition mechanism via the cation binding domain. *J. Biol. Chem.*, 271: 14176-14182.

Piechota, J., Szczesny, R., Wolanin, K., Chlebowski, A. and Bartnik, E. (2006) Nuclear and mitochondrial genome responses in HeLa cells treated with inhibitors of mitochondrial DNA expression. *Acta Biochim. Pol.*, paper in press.

Pollack, L. R., Tate, E. H. and Cook, J. S. (1981a) Turnover and regulation of Na-K-ATPase in HeLa cells. *Am. J. Physiol.*, 241: 173-83.

Pollack, L. R., Tate, E. H. and Cook, J. S. (1981b) Na⁺, K⁺-ATPase in HeLa cells after prolonged growth in low K⁺ or ouabain. *J. Cell. Physiol.*, 106: 85-97.

Pressman, B. C. (1965) Induced active transport of ions in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 53: 1076-1083.

Pressman, B. C. (1976) Biological applications of ionophores. *Annu. Rev. Biochem.*, 45: 501-30.

Pu, H. X., Scanzano, R. and Blostein, R. (2002) Distinct regulatory effects of the Na,K-ATPase gamma subunit. *J. Biol. Chem.*, 277: 20270-20276.

Reitzer, L. J., Wice, B. M. and Kennell, D. (1979) Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, 254: 2669-2676.

Rosignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S. J. and Capaldi,

R. A. (2004) Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.*, 64: 985-993.

Rottenberg, H. and Koeppe II, R. E. (1989) Mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation by gramicidin. *Biochemistry*, 28: 4355-4360.

Rutter, G. A., DA Silva Xavier, G. and Leclerc, I. (2003) Roles of 5-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem. J.*, 375: 1-16.

Schoonen, W. G., Wanamarta, A. H., van der Klei-van Moorsel, J. M., Jakobs, C. and Joenje, H. (1990) Hyperoxia-induced clonogenic killing of HeLa cells associated with respiratory failure and selective inactivation of Krebs cycle enzymes. *Mutat. Res.*, 237: 173-181.

Seliger, H. H. and McElroy, W. D. (1960) Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence. *Arch. Biochem. Biophys.*, 88: 136-141.

Seliger, H. H. and McElroy, W. D. (1964) The colors of firefly bioluminescence: enzyme configuration and species specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 52: 75-81.

Shchepina, L. A., Popova, E. N., Pletjushkina, O. Y. and Chernyak, B. V. (2002) Respiration and mitochondrial membrane potential are not required for apoptosis and anti-apoptotic action of Bcl-2 in HeLa cells. *Biochemistry (Mosc)*, 67: 222-226.

Soltoff, S. P. (2004) Evidence that tyrophostins AG10 and AG18 are mitochondrial uncouplers that alter phosphorylation-dependent cell signaling. *J. Biol. Chem.*, 279: 10910-10918.

Soltoff, S. P. and Mandel, L. J. (1984) Active ion transport in the renal proximal tubule. III. The ATP dependence of the Na pump. *J. Gen. Physiol.*, 84: 643-662.

Steghens, J. P., Min, K. L. and Bernengo, J. C. (1998) Firefly luciferase has two nucleotide binding sites: effect of nucleoside monophosphate and CoA on the light-emission spectra. *Biochem. J.*, 336: 109-113.

Szewczyk, A. and Pikula, S. (1998) Adenosine 5'-triphosphate: an intracellular metabolic messenger. *Biochim. Biophys. Acta*, 1365: 333-353.

Therien, A. G. and Blostein R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol. Cel. Physiol.*, 279: C541-566.

Vaughan G. L. and Cook J. S. (1972) Regeneration of cation-transport capacity in HeLa cell membranes after specific blockade by ouabain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2627-31.

Viviani, V. R. (2002) The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 59: 1833-1850.

Vrbacky, M., Krijt, J., Drahotka, Z. and Melkova, Z. (2003) Inhibitory effects of Bcl-2 on mitochondrial respiration. *Physiol. Res.*, 52: 545-554.

White, E. H., Rapaport, E., Seliger, H. H. and Hopkins, T. A. (1971) The chemi- and bioluminescence of firefly luciferin: an efficient chemical production of electronically excited states. *Bioorg. Chem.*, 1: 92-122.

Wickson-Ginzburg, M. and Solomon, A. K. (1963) Electrolyte metabolism in HeLa cells. *J. Gen. Physiol.*, 46: 1303-1315.

Wu, R. (1959) Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. V. Limiting factors of glycolysis in HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, 234: 2806-2810.

Xie, Z. and Askari, A. (2002) Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer. *Eur. J. Biochem.*, 269: 2434-2439.

Xie, Z. and Cai, T. (2003) Na⁺-K⁺-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol. Interv.*, 3: 157-68.