



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

# **Homeostasis de ATP extracelular en eritrocitos: Interregulación y consecuencias funcionales.**

Tesista: Bioq. María Florencia Leal Denis

Director: Prof. Dr. Pablo Julio Schwarzbaum

Directora Adjunta: Dra. María Victoria Espelt

2014

INSTITUTO DE QUÍMICA Y FISICOQUÍMICA BIOLÓGICAS  
"Prof. Alejandro C. Paladini"

# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 ATP: de moneda energética a señal extracelular</b>	<b>2</b>
<b>1.2 ATP extracelular: vías de salida</b>	<b>3</b>
1.2.1 Exocitosis	4
1.2.2 Canales aniónicos	4
1.2.3 Transportadores ABC	5
1.2.4 Hemicanales de Conexinas	5
1.2.5 Panexinas	6
<b>1.3 Metabolismo extracelular de nucleótidos</b>	<b>8</b>
1.3.1 Ecto-nucleotidasas	8
1.3.1.1 E-NTPDasas	9
1.3.1.2 E-quinisas	10
1.3.1.3 Ecto-5' nucleotidasas	11
1.3.1.4 Ecto-deaminasas	11
1.3.2 Receptores Purinérgicos (receptores P)	12
1.3.2.1 Receptores P1	12
1.3.2.2 Receptores P2	14
1.3.2.2.1 Receptores P2X	14
1.3.2.2.2 Receptores P2Y	16
<b>1.4 El ATP extracelular y el volumen celular</b>	<b>19</b>

<b>1.5 Eritrocito: modelo in vitro para el estudio del ATP extracelular y la regulación de volumen por nucleótidos extracelulares</b>	<b>20</b>
1.5.1 El eritrocito y el ATP extracelular. Relevancia fisiológica	21
1.5.2 El eritrocito humano como modelo celular	25
1.5.2.1 El ATP extracelular de eritrocitos y el volumen celular	28
1.5.2.2 Eritrocitos de pacientes con esferocitosis hereditaria.	29
1.5.2.3 Otros modelos eritrocitarios.	30
1.5.2.3.1 Eritrocitos de ratón	30
1.5.2.3.2 Eritrocitos de perro	30
1.5.2.3.3 Eritrocitos de <i>Xenopus laevis</i>	30
<b>1.6 Objetivos</b>	<b>31</b>

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

<b>Introducción</b>	<b>32</b>
<b>2.1 Reactivos</b>	<b>32</b>
<b>2.2 Medios utilizados</b>	<b>33</b>
<b>2.3 Modelo celular</b>	<b>34</b>
<b>2.4 Aislamiento de eritrocitos</b>	<b>35</b>
2.4.1 Extracción de sangre	35
2.4.2 Purificación de eritrocitos	36
2.4.2.1 Separación por lavado con RBC-2 y centrifugación	36
2.4.2.2 Separación por gradiente discontinuo de Percoll	27
<b>2.5 Medición de ATP</b>	<b>30</b>
2.5.1 Mediciones de ATPe off-line con luciferasa soluble	41

2.5.2 <i>Cinéticas on-line de ATP</i>	42
2.5.2.1 <i>Mediciones de ATPe con luciferasa soluble</i>	42
2.5.2.2 <i>Medición de ATP intracelular</i>	45
2.5.3 <i>Medición de ATPe utilizando luciferasa unida a la membrana plasmática.</i>	45
2.5.3.1 <i>Producción y purificación de ProAluc</i>	47
2.5.3.2 <i>Identificación de antígenos eritrocitarios de superficie para unión de ProAluc.</i>	48
<b>2.6 <i>Medición del volumen celular</i></b>	
2.6.1 <i>Volumen corpuscular medio</i>	48
2.6.2 <i>Determinación de la variación de volumen por hematocrito</i>	49
2.6.3 <i>Determinación de la variación de volumen por microscopía de epifluorescencia</i>	50
<b>2.7 <i>Viabilidad celular y determinación del número de células</i></b>	<b>56</b>
2.7.1 <i>Viabilidad celular</i>	57
2.7.1.1 <i>Detección de hemoglobina mediante técnica enzimática</i>	57
2.7.1.2 <i>Cinética de viabilidad por microscopía de epifluorescencia</i>	59
2.7.2 <i>Determinación del número de células adheridas</i>	60
<b>2.8 <i>Medición de Ca<sup>2+</sup> intracelular</i></b>	<b>61</b>
<b>2.9 <i>Medición de AMPc intracelular</i></b>	<b>62</b>
<b>2.10 <i>Medición de sodio intracelular</i></b>	<b>62</b>
<b>2.11 <i>Actividad ecto-ATPasa</i></b>	<b>64</b>
2.11.1 <i>Actividad ecto-ATPasa por método radiactivo</i>	64

2.11.2	<i>Medición por luminiscencia on-line</i>	66
<b>2.12</b>	<b>Análisis estadístico de los datos</b>	<b>66</b>
<b>2.13</b>	<b>Modelado matemático de la cinética de ATPe de eritrocitos expuestos a MST7</b>	<b>67</b>
2.13.1	<i>Velocidad de consumo de ATPe (<math>J_v</math>)</i>	67
2.13.2	<i>Salida no lítica de ATP (<math>J_R</math>)</i>	68
2.13.3	<i>Un modelo de dos vías para la salida de ATP</i>	69
2.13.4	<i>Ajuste de distintos modelos a los datos experimentales</i>	72
2.13.5	<i>Evaluación de modelos más simples</i>	72
2.13.6	<i>Efectos del aumento del volumen celular sobre el gradiente químico de ATP</i>	74
2.13.8	<i>Ajuste de los parámetros del modelo</i>	75

## **RESULTADOS**

### **3. 3V, LOS TRES VALIENTES**

<i>Introducción</i>	76
<b>3.1 ATP intracelular</b>	<b>78</b>
<b>3.2 Cinética de ATPe de eritrocitos humanos estimulados con 3V</b>	<b>78</b>
<b>3.3 Efecto del volumen celular sobre la concentración de ATPe de eritrocitos humanos expuestos a 3V</b>	<b>80</b>
<b>3.4 Efecto de la adhesión celular sobre la concentración de ATPe de eritrocitos humanos expuestos a 3V</b>	<b>81</b>
<b>3.5 Señalización intracelular</b>	<b>82</b>
<b>3.6 Vías de salida de ATP en eritrocitos humanos y de ratón</b>	<b>83</b>

<b>3.7 Efecto de 3V en eritrocitos de <i>Xenopus</i> y de perro</b>	<b>84</b>
<b>3.8 Empleo de la sonda ProAluc para estudiar la cinética de ATP superficial de eritrocitos humanos estimulados con 3V</b>	<b>86</b>
<b>3.9 Actividad ecto-ATPasa de eritrocitos de humanos, <i>Xenopus</i>, perro y ratón</b>	<b>91</b>
<b>4. MASTOPARAN 7</b>	
<b>Introducción</b>	<b>93</b>
<b>4.1 ATP intracelular</b>	<b>95</b>
<b>4.2 Cinética de ATPe de eritrocitos humanos expuestos a MST7</b>	<b>95</b>
<b>4.3 Señalización intracelular</b>	<b>97</b>
<b>4.4 Vías de salida de ATP en eritrocitos humanos y de ratón expuestos a MST7</b>	<b>100</b>
<b>4.5 Actividad ecto-ATPasa de los eritrocitos humanos y de ratón</b>	<b>105</b>
<b>4.6 Otros moduladores de la cinética de liberación de ATPe de eritrocitos humanos expuestos a MST7</b>	<b>107</b>
<i>4.6.1 Efecto de la adhesión celular sobre la liberación de ATP inducida por MST7</i>	<i>108</i>
<i>4.6.2 Efecto del hematocrito sobre la liberación de ATP inducida por MST7</i>	<i>109</i>
<i>4.6.3 Efecto del 3V en la liberación de ATP inducida por MST7 en eritrocitos humanos no adheridos</i>	<i>112</i>
<i>4.6.4 Otros modelos celulares</i>	<i>114</i>

4.6.5 Efecto del volumen celular sobre la cinética de ATPe de eritrocitos humanos expuestos a MST7	115
<b>4.7 Modelado de la cinética de ATPe de eritrocitos expuestos a MST7</b>	<b>118</b>
4.7.1 Flujos que median la salida de ATP	118
4.7.2 Actividad ecto-ATPasa	120
4.7.3. Volumen celular	122
<b>4.8 Papel de los receptores P en la cinética de ATPe</b>	<b>123</b>
4.8.1 Receptor P2Y <sub>13</sub>	124
4.8.2 Receptor P2X	124
<b>4.9 Interacción dinámica entre volumen celular y ATPe</b>	<b>126</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>133</b>
<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>156</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>157</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>162</b>

## ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
AM	acetilmetoxi éster
ATPe	ATP extracelular
ATPi	ATP intracelular
BCECF	2',7'-Bis-(2-Carboxietil)-5-(y 6)-Carboxifluoresceína
BSA	Bovine Serum Albumin (albúmina de suero bovino)
Ca <sup>2+</sup> <sub>i</sub>	Calcio libre citosólico
CBX	Carbenoxolona
DIDS	ácido 4,4' - Diisotiocianatoestilbeno - 2,2' - disulfónico
KO	knockout
MST7	Mastoparín 7
Na <sup>+</sup> <sub>i</sub>	Sodio intracelular
NPPB	Ácido 5-nitro-2-[(3-fenilpropil)amino] benzoico
PBC	Probenecid
PTX	Toxina <i>pertussis</i>
Receptor P	receptor purinérgico
V <sub>r</sub>	Volumen relativo
v <sub>i</sub>	Velocidad inicial de la actividad ecto-ATPasa
WT	Wyldtype
3V	cocktail formado con forkolina (30 μM), isoproterenol (10 μM) y paperina (100 μM)

# Introducción

## **INTRODUCCIÓN**

Las complejas relaciones químicas que ocurren en los organismos vivos requieren condiciones estables y restrictas dentro de ciertos límites compatibles con la vida. Las células están en constante comunicación para coordinar sus funciones de forma tal de mantener las condiciones fisicoquímicas internas adecuadas para la vida frente a determinados cambios.

Clásicamente las principales moléculas modelo de señalización extracelular han sido las hormonas y los neurotransmisores, sin embargo en los últimos años, la señalización por nucleótidos extracelulares ha cobrado gran importancia y es objeto de intenso estudio.

La presente tesis aborda el estudio de las vías de señalización extracelulares mediadas por nucleótidos, principalmente el ATP, en eritrocitos expuestos a diferentes estímulos que activan esta vía de señalización.

## **1.1 ATP: de moneda energética a señal extracelular.**

Transcurrieron setenta años desde que Fritz Lipmann y Herman Kalckar [1-2] establecieron que el ATP es la principal molécula de transferencia de energía metabólica en la célula. El concepto ha sido verificado hasta el presente por incontables trabajos de fisiólogos y bioquímicos.

Dado que tanto el ATP como los demás nucleótidos no atraviesan libremente la membrana plasmática, se supuso durante mucho tiempo que estas moléculas sólo podrían existir en el interior de la célula. Además, la célula posee complejos mecanismos de síntesis y reserva de nucleótidos, por lo que era esperable que también poseyera mecanismos que evitaran la salida de estos componentes.

La primera evidencia de que los nucleótidos podían tener funciones fisiológicas a nivel extracelular fue descrita por Drury y Szent-Gyorgyi en 1929 [3], sin embargo, pasaron más de 40 años antes de que los nucleótidos re-emergieran como factores de señalización extracelular. En 1970 Geoffrey Burnstock, pionero en el estudio de la señalización por nucleótidos, postuló que el ATP podría actuar como transmisor en el espacio sináptico [4-5] acuñando el término “purinérgico” para hacer referencia a los nervios que utilizan ATP como su principal neurotransmisor. Deberían transcurrir otros veinte años hasta que se aceptara definitivamente la idea de que los nucleótidos actúan como factores de señalización extracelular.

Actualmente, el nucleósido adenosina, los nucleótidos ATP, ADP, UTP, y UDP, y ciertos nucleótidos-azúcares (UDP-glucosa, UDP-galactosa) son reconocidos como potentes y selectivos mensajeros extracelulares que controlan, entre otras funciones, el impulso nervioso, la respuesta inflamatoria, la secreción de insulina, la agregación plaquetaria, la hidratación y protección de las mucosas respiratorias, la regulación del tono vascular y la percepción del dolor.

El término “*purinérgico*” ha sido ampliado a las señales impartidas por nucleótidos y nucleósidos extracelulares en todo tipo de células.

## **1.2 Vías de salida de ATP.**

Dado que la principal fuente de ATP extracelular es el interior de las células, todas las células constituyen potenciales fuentes del nucleótido, aunque también se ha reportado su síntesis extracelular [6]. La salida de ATP (y otros nucleótidos) de diversos tipos celulares puede ser inducida por una gran variedad de estímulos fisiológicos y farmacológicos, incluyendo hipoxia [7-9], acidosis [10-11], deformación mecánica de la membrana celular [12], shock hiposmótico [13-14], estimulación de receptores de membrana por diversos ligandos [15] y despolarización eléctrica de la membrana plasmática [16-17].

Si se considera que: 1) en estado estacionario la concentración de ATP extracelular es nanomolar y la concentración de ATP intracelular es milimolar; 2) a pH fisiológico la mayoría de las moléculas de ATP se encuentran en forma aniónica [18] y 3) el potencial eléctrico intracelular es inferior al extracelular, el gradiente electroquímico de ATP es altamente favorable para la salida del nucleótido. Sin embargo, hay que destacar que en varios tipos celulares (pero no todos), sólo una pequeña proporción del ATP intracelular es liberado para activar mecanismos purinérgicos de señalización extracelular. Es decir que, en general, la señalización por ATP extracelular puede ocurrir sin comprometer el metabolismo energético, por lo que su liberación al medio extracelular se encuentra altamente regulada.

El ATP intracelular puede ser liberado por lisis (muerte celular) o por mecanismos no líticos (mecanismos de liberación controlada). Se ha postulado que la salida no lítica de ATP puede ser mediada por exocitosis, canales aniónicos, transportadores ABC, hemicanales de Conexinas y canales de Panexinas.

Adicionalmente, en algunos tipos celulares el ATP puede ser sintetizado en el medio extracelular mediante una ATP sintasa ubicada en la membrana plasmática, que exhibe su sitio activo al exterior celular[6,19-21].

A continuación se hace una breve reseña de cada uno de los mecanismos de salida de ATP mencionados.

### *1.2.1 Exocitosis.*

Esta es una de las principales vías de salida de ATP de células secretoras y neuronas[22-24]. Actualmente, se sabe que células sin función secretora pueden liberar ATP por exocitosis, como por ejemplo astrocitos, células de Schwann y hepatoma humano[14,25-26-14].

Los inhibidores más utilizados para bloquear la vía exocítica son la brefeldina A y la bafilomicina[27]).

### *1.2.2 Canales aniónicos*

Como se mencionó anteriormente, el gradiente electroquímico del ATP es ampliamente favorable para promover la salida del nucleótido de la célula. De ahí que sea posible que el ATP pueda ser transportado al exterior celular por canales aniónicos.

Entre los potenciales canales que transportarían ATP se hallan el VDAC-1 (del inglés *Voltage-Dependent-Anion-selectiveChannel*) en el epitelio de las vías respiratorias [28-29], el VSOR (o VRAC, del inglés *Volume-SensitiveOutwardlyRectifying*) en células endoteliales de aorta [30], el CALHM1, un canal activado por voltaje presente en células de las papilas gustativas [31] y el MAC (del inglés *Maxi-AnionChannel*) [32] aunque en este caso algunos autores postulan que MAC y VDAC son la misma entidad[33].

Estos canales pueden ser inhibidos por una gran variedad de compuestos con distinto grado de selectividad. Los inhibidores más comúnmente utilizados son NPPB (VSOR, MAC), DIDS (VSOR, MAC), glibenclamida (VSOR, mdr), TRO (VDAC), bcL-xI (VDAC), SITS (MAC), DPC (MAC) y los lantánidos, como el  $\text{La}^{3+}$  y el  $\text{Gd}^{3+}$  (MAC). [15].

### 1.2.3 Transportadores ABC.

Estas proteínas representan la mayor y más diversa superfamilia de moléculas con actividad ATPasa intracelular [34], donde se incluyen el CFTR (del inglés *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), la proteína de resistencia a multidroga (mdr, del inglés *multidrug resistant*) y el receptor de sulfonil urea (SUR).

Inicialmente se postuló que el ATP podía ser transportado por alguna de estas moléculas, dado que la sobreexpresión de estos transportadores aumentaba la liberación de ATP al medio extracelular, de la misma forma que su inhibición la disminuía [35-39]. Sin embargo, si bien no se descarta una acción moduladora de alguna de las proteínas ABC en la liberación de ATP, el transporte transmembrana de ATP por estas proteínas no pudo ser comprobado experimentalmente. [40-43].

Los inhibidores más utilizados en estos transportadores son la glibenclamida y el probenecid (44).

### 1.2.4 Hemicanales de conexinas.

Las conexinas son proteínas de las uniones estrechas (gap junctions) en vertebrados. Forman hexámeros (conexones) que se insertan en la membrana plasmática y, al entrar en contacto con un conexón expresado en una célula adyacente, las dos proteínas unen sus dominios extracelulares en forma no covalente, formando así uniones estrechas. Éstas conectan el citosol de ambas células y permiten el pasaje de moléculas menores a 1kDa, así como también la

propagación del potencial de membrana [45-47]. Sin embargo, se han reportado que un conexón de una célula, desacoplado de otro conexón de una célula adyacente podría formar un hemicanal en varios tipos celulares, incluyendo astrocitos y células gliales en el sistema nervioso central [48-50], leucocitos [51-52], células del endotelio vascular [53-54] y células del músculo liso vascular [55]. Se ha propuesto que estos hemicanales pueden funcionar como canales no selectivos para la liberación de moléculas de bajo peso molecular, incluyendo al ATP [56-57].

El inhibidor más utilizado para estos canales es la carbenoxolona (CBX)[58].

### *1.2.5 Panexinas.*

En el año 2000 se identificó una nueva familia de proteínas denominadas panexinas [59]. Estas son ortólogos de las proteínas de las uniones estrechas en invertebrados (las inexas), y se ha sugerido que, si bien no exhiben homología de secuencia con las conexinas, podrían adoptar una topología similar al insertarse en la membrana plasmática. Hasta el momento se han identificado tres isoformas (panexinas 1, 2 y 3) y la distribución de cada una sigue siendo tema de estudio. Al igual que las conexinas, las panexinas forman hexámeros, heptámeros u octámeros (panexones; [60-61]) pero, a diferencia de las conexinas, las panexinas poseen un loop extracelular altamente glicosilado (principalmente las panexinas 1 y 3) que impide el acoplamiento entre panexones de células adyacentes; en consecuencia no forman uniones estrechas y consecuentemente podrían actuar como canales. Más aun, se ha postulado que las panexinas, en particular panexina 1, funcionarían como un canal no selectivo de moléculas de peso molecular menor a 1 kDa.

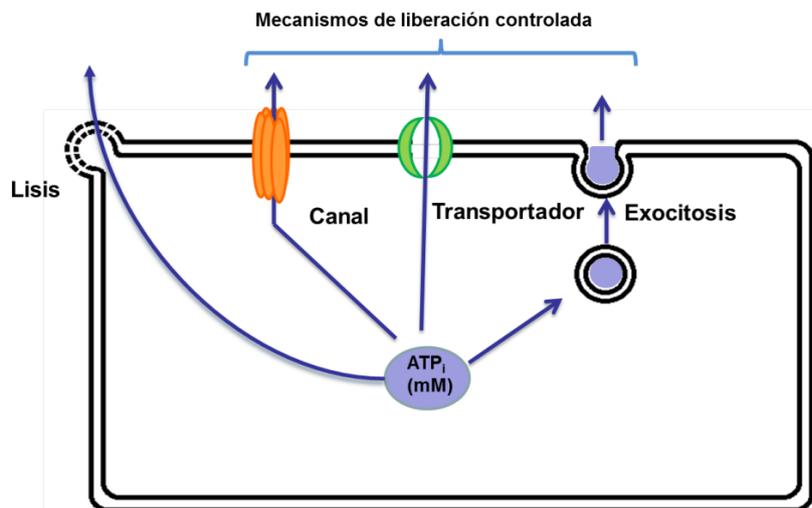
Más recientemente se reportó que panexina 1 está involucrada en la liberación de ATP de un gran número de tipos celulares, incluyendo astrocitos y células gliales del sistema nervioso central [62-64], linfocitos [65], epitelios de la vía respiratoria [66-

67]y células endoteliales y musculares de la vasculatura [68]. Por otro lado, se ha sugerido que el ATP extracelular podría tener un efecto alostérico negativo sobre el transporte de ATP mediado por panexina 1 [69].

Entre los estímulos que inducen salida de ATP mediada por panexina 1 se encuentran la despolarización [70], la hipoxia [71] y el estiramiento de la membrana [72].

Los inhibidores más utilizados para estos canales son la carbenoxolona (CBX), el probenecid (PBC) y los inhibidores de canales aniónicos (NPPB, DIDS, SITS y glibenclamida)[73-74]

En la **Fig. 1** se resumen los mecanismos postulados de liberación de ATP



**Figura 1.** Posibles mecanismos responsables de la liberación de ATP al medio extracelular. Las flechas indican los flujos netos de ATP.

En general, la activación de una o varias vías de salida de ATP parece depender del tipo celular y de la naturaleza del estímulo.

No se sabe con certeza si estos canales y transportadores de ATP actúan como entidades aisladas o en asociación física con otras proteínas, como por ejemplo, componentes del citoesqueleto y receptores específicos en la membrana plasmática.

Por ejemplo en neuronas, la panexina 1 se asocia a un complejo multiproteico llamado inflamasoma, que incluye receptores P (P2X7) y caspasa 1 [73].

### **1.3 Metabolismo extracelular de nucleótidos.**

Una vez en el espacio extracelular, el ATP y otros nucleótidos pueden acumularse en concentraciones nano a micromolares, e influenciar en forma parácrina o autócrina varios procesos biológicos como la agregación plaquetaria, el control del tono vascular, la transmisión nerviosa, la respuesta inmune, la secreción de hormonas y la contracción muscular [31,75-77]. Todos estos procesos se llevan a cabo mediante la interacción de los nucleótidos con dos grandes grupos de proteínas localizadas en la membrana plasmática: las ecto-nucleotidasas [78] y los receptores purinérgicos (receptores P, [79]).

#### *1.3.1 Ecto-nucleotidasas.*

Son enzimas que promueven la degradación de ATP y otros nucleótidos/nucleósidos extracelulares. Pueden clasificarse en tres grandes grupos de acuerdo a su función:

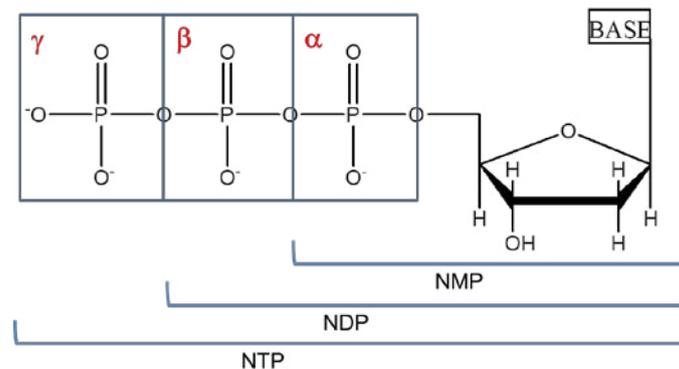
- 1) Ecto-enzimas con actividad ATPasa, dentro de las que se encuentran:
  - E-NTPDasas (ecto nucleósido trifosfato difosfo hidrolasas)
  - E-PA (ecto fosfatasas)
  - Ecto-quinasas, dentro de las que se encuentran:
    - E-AKasa (ecto adenilato quinasa)
    - E-NDPKasas (ecto nucleósido difosfato quinasas)
- 2) Ecto-5' nucleotidasas.
- 3) Ecto-deaminasa.

Se trata de enzimas que están unidas a la membrana plasmática, ya sea mediante regiones proteicas transmembrana o mediante uniones de tipo glicosilfosfatidilinositol (GPI; por ej. la E-5' nucleotidasa). La denominación “Ecto” o “E” refiere a que, salvo las isoformas 4 y 7 de E-NTPDasas (ver más abajo), todas presentan su sitio activo en el medio extracelular. Algunas de estas enzimas pueden también encontrarse de manera soluble en el medio extracelular, en cuyo caso se las denomina “exo” enzimas.

A continuación se detallan las funciones de las enzimas más importantes.

### 1.3.1.1 E-NTPDasas.

De entre todas las ecto-enzimas, las E-NTPDasas son responsables de gran parte de la hidrólisis de nucleótidos tri- y difosfato extracelulares en una gran variedad de tipos celulares [78].



**Figura 2.** Estructura general de nucleótidos, donde se distinguen nucleósido monofosfato (NMP), difosfato (NDP) y trifosfato (NTP). Se indican las posiciones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de los grupos fosfato. Base refiere a las bases nitrogenadas: adenina, guanina, citosina y uracilo.

Promueven la hidrólisis de nucleótidos tri- y difosfato de manera secuencial, es decir que primero se hidroliza el fosfato  $\gamma$  del nucleosido trifosfato y luego el fosfato  $\beta$  del nucleósido difosfato (**Fig. 2**); quedando como producto final nucleósidosmonofosfato.

Las E-NTPDasas son proteínas glicosiladas, dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ , que generalmente poseen uno o dos pasos transmembrana. Se han identificado ocho parálogos en mamíferos (NTPDasas 1-8) y uno o más subtipos se expresan en casi todos los tejidos [80-81]. Los subtipos 1, 2, 3 y 8 se localizan en la membrana plasmática, mientras que los subtipos 4 a 7 se localizan en organelas intracelulares, aunque se han reportado formas solubles en el medio extracelular de subtipos 5 y 6 [82-83].

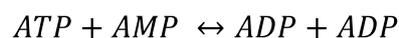
Los subtipos 1, 2, 3 y 8 hidrolizan tanto nucleósidos di- y trifosfatos a pH fisiológico, exhibiendo un amplio rango de especificidad por nucleótidos purínicos o pirimidínicos. En humanos, los subtipos 1 y 2 hidrolizan preferentemente nucleótidos de adenina por sobre los de uracilo. Además, los subtipos 1 y 3 hidrolizan ATP y ADP a velocidades similares [82-84], mientras que el subtipo 2 tiene mayor preferencia por ATP [85].

Estas enzimas pueden ser inhibidas en forma inespecífica por  $\text{Ce}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ , suramina, cibacrón blue [86-87], análogos de ATP (ARL67156; 8-BuS-ATP;  $\alpha,\beta$ -metilén ATP;  $\beta,\gamma$ -metilén ATP) y PSB 069 [88-91]. También se desarrollaron algunos inhibidores selectivos como PSB 06126 y POM 1 [91-92].

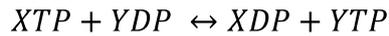
#### 1.3.1.2 E-quinisas.

Son enzimas que catalizan la interconversión de nucleótidos extracelulares [12-93].

La E-AKasa (ecto adenilato quinasa) cataliza en forma reversible la siguiente reacción:



Por otro lado las E-NDPKasas (ecto nucleósido difosfato quinisas) transfieren el fosfato  $\gamma$  de nucleósidos trifosfato a nucleósidos difosfato que pueden tener diferentes bases nitrogenadas:



Donde X e Y corresponden a los nucleósidos adenosina, citidina, uridina o guanosina.

Por lo tanto, las E-quinisas pueden generar cambios en las concentraciones de nucleótidos cercanos a la superficie externa de la membrana plasmática.

#### *1.3.1.3 Ecto-5' nucleotidasas.*

Los nucleósidos monofosfato se acumulan en el medio extracelular como resultado del metabolismo de los nucleósidos tri- y difosfatos y son sustrato de enzimas denominadas Ecto-5' nucleotidasas. Estas enzimas catalizan la hidrólisis del fosfato (ver **Fig. 2**) de las ribosas y desoxirribosas.

En el espacio extracelular, las Ecto-5' nucleotidasas se encuentran tanto de forma soluble como unida a la membrana a través de una unión GPI y, por lo general, forman dímeros unidos por puentes di-sulfuro cuya conformación es fundamental para su actividad [94]. Estas enzimas se encuentran en la mayoría de las células [95-96]; ATP y el ADP (y análogos) extracelulares actúan como inhibidores competitivos de estas enzimas, mientras que la concavalina A y las teofilinas actúan como inhibidores no competitivos.

#### *1.3.1.4 Ecto-deaminasas.*

En varios tipos celulares, la acción secuencial de E-NTPDasas (que hidrolizan ATP y ADP) y la E-5' nucleotidasa (que hidroliza AMP) es capaz de desfosforilar el ATP extracelular a adenosina [97-100].

La adenosina puede ser luego incorporada a las células por transportadores específicos y/o unirse a receptores purinérgicos específicos sobre la superficie de las células y/o ser deaminada en forma irreversible a inosina por una E-deaminasa.

Las ecto-deaminasas pueden ser inhibidas por 1-Deazaadenosina, EHNA, Pentostatina y,  $Zn^{2+}$ [101-103].

### *1.3.2 Receptores purinérgicos (receptores P).*

La relevancia de los nucleótidos como señales intercelulares se evidenció mediante la identificación a nivel genético y molecular de 19 tipos de receptores de superficie que transducen la presencia extracelular de nucleótidos y nucleósidos en una respuesta celular. A pesar de la denominación “purinérgicos”, varios de estos receptores pueden ser activados por pirimidinas (UTP, UDP, UDP-glucosa).

Existen dos familias de receptores P denominados P1 y P2. Los receptores P1 tienen alta afinidad por adenosina, mientras que los receptores P2 tienen alta afinidad por nucleósidos di- y trifosfato.

En las secciones siguientes se describen en detalle los receptores P.

#### *1.3.2.1 Receptores P1.*

En base a una caracterización molecular, farmacología y bioquímica los receptores P1 se dividen en los subtipos  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ . Todos ellos se encuentran acoplados a proteína G heterotrimérica[104-105] y su activación induce cambios en la concentración intracelular de AMPc y/o de inositol fosfato.

Los efectos de la adenosina (ADO) sobre estos receptores pueden ser antagonizados por metilxantinas, teofilinas y ATP. En particular, la 8-fenilteofilina y la 8-(p-sulfofenil) teofilina (8-SPT) son potentes antagonistas no selectivos de receptores P1 [106]. Asimismo, existen agonistas y antagonistas de mayor especificidad por subtipo. En la Tabla 1 se resumen los receptores P1 y se indican agonistas, antagonistas y los mecanismos de señalización.

**Tabla 1.** Receptores P1

Receptor	Agonista natural (K <sub>0,5</sub> μM)	Otros Agonistas	Antagonista	Mecanismo de transducción
A <sub>1</sub>	ADO (0,073)	CCPA > R-PIA= S-ENBA; CVT-510; GR79236 20-MeCCPA, SDZ WAG 994	8-SPT, DPCPX, N-0840, MRS1754, WRC-0571, PSB36, SLV320, CGS 16943	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub>
A <sub>2A</sub>	ADO (0,159)	HENECA >GCS21680 =CVT-3146 >NECA	8-SPT, KF17837, SCH58261, ZM241385, KW6002	G <sub>s</sub>
A <sub>2B</sub>	ADO (5,1)	Bay60-583 >NECA	MRE2029	G <sub>s</sub>
A <sub>3</sub>	ADO (6,5)	IB-MECA ≥ NECA > MRS5151 > MRS5168 > 2-CI-IB-MECA; DBXRM; VT160; HEMADO	MRS1220, L-268605, MRS1191, VUF8504, VUF5574, MRS1334, PSB10	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> , G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>

>, mayor potencia; ≥, mayor o igual potencia; =, igual potencia

Datos tomados de [79,106-108]

Los receptores P1 se detectaron en la mayoría de los tipos celulares animales. Dado que una misma célula puede expresar varios subtipos de receptores P1 [109] y que, el tipo de respuesta observada depende de la concentración de adenosina extracelular en condiciones fisiológicas y patológicas [110], un mismo agonista puede activar diferentes vías de transducción de señales. Por ejemplo, en humanos la respuesta inflamatoria por neutrófilos mediante activación de receptores A<sub>1</sub> puede ser inhibida por la activación de un tipo de receptor A<sub>2</sub>[111].

La exposición prolongada de los receptores a sus agonistas induce la atenuación de la respuesta observada inicialmente [110-112]. Esta desensibilización de los receptores causaría una disminución o finalización de la respuesta, aun cuando las concentraciones extracelulares de los agonistas continúen elevadas.

### *1.3.2.2 Receptores P2.*

Los receptores de nucleósidos di- y trifosfato pertenecen a dos subfamilias: receptores ionotrópicos P2X, donde la misma estructura proteica actúa como receptor y canal iónico, y receptores metabotrópicos P2Y, acoplados a proteína G [105,113].

#### *1.2.2.2.1 Receptores P2X.*

Los receptores P2X son complejos triméricos compuestos por siete subunidades distintas (P2X1-7) que se asocian para formar complejos homo- o heteroméricos y forman canales catiónicos con conductancias para Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> [114].

El ligando natural es el ATP, para el cual los diferentes subtipos de receptores presentan distinta afinidad. Compuestos como el CTP, 2-metil ATP (2-MeSATP),  $\alpha,\beta$ -metil ATP (AMP-CPP) y el  $\beta,\gamma$ -metil ATP (AMP-PCP), entre otros, también pueden activar distintos subtipos de receptores, aunque ninguno puede ser activado por ADP, UTP o UDP [105,115]. En los últimos años se han desarrollado antagonistas específicos para los diferentes subtipos [107,116]. En la Tabla 2 se resumen los agonistas, antagonistas y los mecanismos de señalización de los receptores P2X.

**Tabla 2.** Receptores P2X

Receptor	Agonista natural (K <sub>0,5</sub> μM)	Otros Agonistas	Antagonista	Mecanismo de transducción
P2X <sub>1</sub>	ATP (0,06)	BzATP > ATP = 2-MeSATP ≥ AMP-CPP = AMP-PCP; PAPET-ATP	NNF449 > IP5I > TNP-ATP > RO0437626 > NF279, NF110, NF023, MRS2159; Suramina; PPADS,	Canal catiónico
P2X <sub>2</sub>	ATP (1,0)	ATP ≥ ATP <sub>γ</sub> S 2-MeSATP >> AMP CPP; β,γ-CF <sub>2</sub> ATP	PSB-1011 > RB2, isoPPADS > PPADS > Suramina, NF770, NF110 NF778, aminoglycoside	Canal catiónico
P2X <sub>3</sub>	ATP (0,4)	2-MeSATP ≥ ATP ≥ Ap <sub>4</sub> A ≥ AMP-CPP; PAPET-ATP; BzATP	TNP-ATP, isoPPADS > A317491 > NF110 > PPADS, Ip5I, rojofenol, RN-1838, Espinorfina, AF353	Canal catiónico
P2X <sub>4</sub>	ATP (0,5)	ATP >> AMP-CPP >> CTP, 2-MeSATP	5-BDBD >> TNP-ATP, PPADS > BBG, Paroxetina, fenoltaleína; Suramina	Canal catiónico
P2X <sub>5</sub>	ATP (1)	ATP = 2-MeSATP = ATP <sub>γ</sub> S >> AMP-CPP > AP <sub>4</sub> A	BBG > PPADS, Suramina	Canal catiónico
P2X <sub>6</sub>	-	Solo comoheteromultímero		Canal catiónico
P2X <sub>7</sub>	ATP (>100-300)	BzATP > ATP ≥ 2-MeSATP >> AMP-CPP	KN62, BBG, KN04, MRS2427, O-ATP, A740003, A-438079, A-804598, GSK-1370319,, AZD-9056, CE-224535; Suramina; PPADS	Canal catiónico

>, mayor potencia; ≥, mayor o igual potencia; =, igual potencia

Datos tomados de [105,107,115-117]

Los receptores P2X se expresan en todo el cuerpo humano, incluyendo los sistemas nervioso, cardiovascular, inmune y digestivo, y están implicados en una amplia gama

de procesos fisiológicos que incluyen la transmisión sináptica, la contracción del músculo liso, el gusto, la nocicepción y la inflamación [119-120].

#### 1.3.2.2.2 Receptores P2Y.

Los receptores P2Y son receptores metabotrópicos con siete segmentos transmembrana que se encuentran acoplados a proteína G heterotrimérica. Agonistas de estos receptores inducen cambios en la concentración intracelular de AMPc y/o de inositol fosfato.

Hasta la actualidad se han descrito ocho subtipos en mamíferos, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> and P2Y<sub>14</sub> [121]. Los subtipos faltantes en la clasificación representan receptores ortólogos en organismos no mamíferos o con homología de secuencia con receptores P2Y ya clasificados, pero cuyos agonistas no son nucleótidos [105,122].

Los agonistas naturales de estos receptores son el ATP, UTP, ADP, UDP y UDP-glucosa; también pueden ser activados por ATP<sub>γ</sub>S, UTP<sub>γ</sub>S, ADP<sub>β</sub>S, UDP<sub>β</sub>S, 2-MeSADP Y 2-MeSAMP. Existen agonistas generales para estos receptores [105,115] y en los últimos años se han desarrollado antagonistas específicos para los diferentes subtipos [107,123]. En la Tabla 3 se resumen agonistas, antagonistas y mecanismos de señalización.

Al igual que los receptores P2X, los receptores P2Y se expresan en todo tipo de tejidos y órganos humanos y están implicados en una amplia gama de procesos fisiológicos que incluyen migración celular, fagocitosis, desarrollo embrionario del riñón y proliferación de tumores, entre otros [124-126].

**Tabla 3.** Receptores P2Y

Receptor	Agonista natural (K <sub>0,5</sub> μM)	Otros Agonistas	Antagonista	Mecanismo de transducción
P2Y <sub>1</sub>	ADP (8,10)	MRS2365 > ADP > 2-MeSADP = Ap <sub>5</sub> (γB) >> ADPβS > ATP >2-MeSATP	MRS2500 > MRS2279 > MRS2179, PIT, A3P5P, Suramina	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>
P2Y <sub>2</sub>	UTP(0,008), ATP (0,08)	2-S-UTP > UTP, MRS2698 ≥ ATP, INS 365> INS 37217, UTPγS > Ap4A > MRS 2768,	AR-C126313 >Suramina> RB2, PSB-716, MRS2576, BBG	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> (G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> ) <sup>1</sup>
P2Y <sub>4</sub>	UTP (2,50)	20-Azido-dUTP> UTPγS, UTP ≥ ATP ≥ Ap <sub>4</sub> A Up <sub>4</sub> U	ATP > RB2 >Suramina, MRS2577, PPADS	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> (G <sub>i</sub> ) <sup>1</sup>
P2Y <sub>6</sub>	UDP (0,30)	MRS2693 > UDPβS, PBS0474> INS48823, Up <sub>3</sub> U, UDP > UTP >> ATP, α,β-Me UDP	MRS2578 > RB2, PPADS, MRS2567, MRS2575	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>
P2Y <sub>11</sub>	ATP (17)	ATPγS > AR-C67085MX > BzATP ≥ATP, NF546, NAD <sup>+</sup> ,	NF157 >Suramina> RB2, 50-AMPS, NF340, AMP-a-5	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> G <sub>s</sub>
P2Y <sub>12</sub>	ADP (0,06)	2-MeSADP ≥ ADP > ATP, ADPβS	AR-C69931MX> AZD6140, INS50589 > RB2 > 2-MeSAMP AR-C66096, CT50547, PSB-0413,MRS2395, AR-C67085, Cangrelor	Gα <sub>i</sub>
P2Y <sub>13</sub>	ADP (0,01)	ADP = 2-MeSADP > 2-MeSATP, ATP	AR-C69931MX > AR-C67085 > MRS2211, 2-MeSAM	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub>
P2Y <sub>14</sub>	UDP-glucosa (0,35), UDP (0,16)	MRS2690 > UDP > UDP-glucose ≥UDP-galactosa, UDP-	No se reportaron antagonistasnucleotídicos	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>

>, mayor potencia;  $\geq$ , mayor o igual potencia; =, igual potencia

<sup>1</sup> Se postula que también esa vía de señalización.

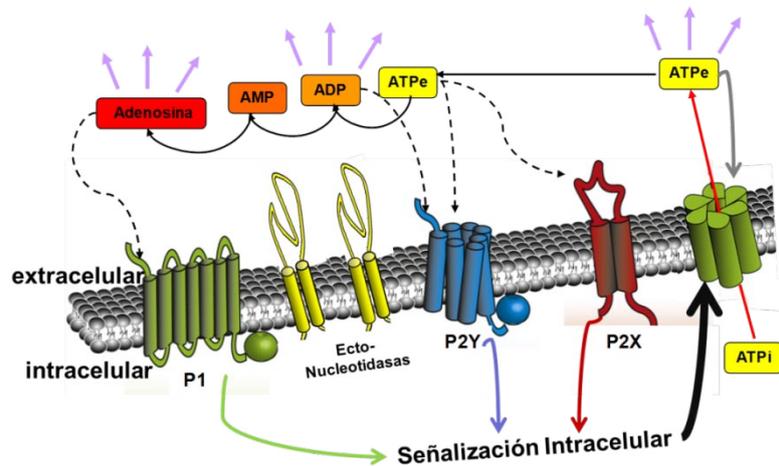
Datos tomados de [107,123]

Al igual que ocurre con los receptores P1, la exposición prolongada de los receptores P2 a sus agonistas induce la atenuación de la respuesta observada inicialmente [110,112]. Los receptores P2X de subtipos 1 y 3 presentan una rápida desensibilización (100-300 msec) mientras que en los subtipos 2, 4, 5, 6 y 7 el fenómeno es más lento. Por otra parte, casi todos los receptores P2Y exhiben algún grado de desensibilización [121,127-129].

En la **Figura 3** se resumen los factores que modulan la concentración del ATP extracelular, y de otros nucleótidos purínicos y pirimidínicos.

Una vez que el ATP es liberado al medio extracelular, puede actuar sobre receptores P en forma autócrina y parácrina, y activar mecanismos de señalización que pueden activar o inhibir la salida del nucleótido. Por acción de las ecto-nucleotidasas de la misma célula o de células adyacentes el ATP puede ser metabolizado a ADP, AMP y adenosina, generando nuevos ligandos de receptores P. Alternativamente, el ATP extracelular puede inhibir directamente la vía de salida de ATP intracelular.

De esta forma, en función de las ecto-nucleotidasas y receptores P que se expresen en la superficie de una célula, se desencadenarán distintos mecanismos de señalización intracelular, a la vez que se generarán mecanismos de retroalimentación positivos o negativos sobre la liberación de ATP.



**Figura 3.**Regulación de ATP extracelular.

El ATP que sale de la célula (por canales, transportadores, exocitosis o lisis) puede ser metabolizado por ecto-nucleotidasas, unirse a receptores P o difundir en el medio extracelular. La unión del ATP extracelular y sus metabolitos a receptores P desencadena vías de retroalimentación que pueden potenciar o inhibir la salida del ATP. ATPi, ATP intracelular; ATPe, ATP extracelular.

#### 1.4 El ATP extracelular y el volumen celular

El volumen celular es determinado principalmente por flujos de agua y osmolitos que atraviesan la membrana plasmática.

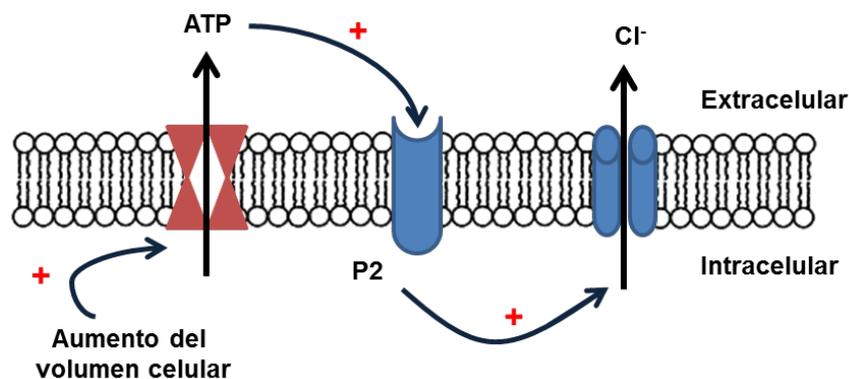
*In vivo* la mayoría de las células están sujetas a cambios de volumen provocados por desbalances osmóticos entre las células y el medio extracelular, que pueden ocurrir como consecuencia de la captación de solutos y de cambios metabólicos.

Las células animales pueden contrarrestar los cambios de volumen mediante sistemas regulatorios altamente conservados [130]. Por lo general, un aumento del volumen celular inducido por exposición de las células a un medio hiposmótico, produce la expulsión de osmolitos y agua al exterior celular, con la consecuente disminución del volumen celular. Esta respuesta regulatoria se conoce como RVD (del inglés, *Regulatory Volume Decrease*). Se sabe que el RVD es acompañado por liberación de ATP y otros nucleótidos al medio extracelular, lo que lleva a pensar que los nucleótidos extracelulares podrían estar involucrados en la respuesta regulatoria

de volumen[131]. Si bien existe abundante información sobre los mecanismos intracelulares que median el RVD, poco se sabe sobre los eventos de señalización extracelular.

En los últimos años se ha avanzado en la caracterización de la modulación del RVD por nucleótidos extracelulares [14,100,132].

El modelo canónico para la modulación del RVD por nucleótidos extracelulares, propuesto por Roman y col. [131] postula que el aumento de volumen celular gatilla la salida de ATP al espacio extracelular. Seguidamente, la estimulación de receptores P2 por el ATP extracelular podría activar el flujo de salida de osmolitos, promoviendo la salida osmótica de agua y la recuperación del volumen celular mediante el RVD. En la **Fig.4** se ilustra el modelo propuesto.



**Figura 4.** Modelo propuesto para explicar la respuesta reguladora de volumen mediada por receptores P en células de hepatoma[131]. La salida de Cl<sup>-</sup> es acompañada por salida de agua, induciendo RVD.

De manera consistente con este modelo, se demostró que en células epiteliales humanas, bovinas y murinas, el aumento de volumen inducido por exposición a medios hiposmóticos lleva a la liberación de ATP [133]. Por otro lado, en varios tipos celulares la remoción del ATP extracelular o el bloqueo de los receptores P2 previene la salida de osmolitos implicados en el RVD [14,134].

Si bien la literatura es heterogénea en lo que respecta al mecanismo involucrado en la liberación de ATP en respuesta al estímulo hiposmótico[70-135], se sugiere que el aumento del volumen celular lleva al estiramiento de la membrana plasmática y a la activación de canales activables por estiramiento. Muchos tipos celulares presentan canales sensibles a estiramiento, algunos de los cuales han sido postulados como vías de salida de ATP (ver sección 1.2.2). Alternativamente, la variación de volumen provocaría cambios en la concentración de uno o varios factores citosólicos que activarían movimientos netos de osmolitos a través de la membrana plasmática [136].

Durante la última década se complementó y profundizó el modelo de RVD, generándose nueva información y abriéndose nuevos interrogantes.

Como mencionamos en 1.3.1, en varios sistemas la actividad de ecto-nucleotidasas es suficientemente elevada como para actuar en forma acoplada con otras enzimas para desfosforilar totalmente el ATP extracelular en condiciones fisiológicas [96,137]. Estas enzimas son capaces de imponer un límite temporal a la función reguladora de los nucleótidos sobre el volumen celular. Por lo tanto la actividad de las ecto-nucleotidasas generaría acumulación transitoria de agonistas naturales de receptores P como ATP, ADP, adenosina, UTP y UDP, en el rango de concentraciones de los valores de  $K_{0,5}$  para la interacción ligando-receptor [14,79,134,138-139].

## **1.5 Eritrocito: modelo *in vitro* para el estudio del ATP extracelular y la regulación de volumen por nucleótidos extracelulares.**

### *1.5.1 El eritrocito y el ATP extracelular. Relevancia fisiológica*

En situaciones de alta demanda energética, como por ejemplo en el músculo esquelético en ejercicio, el sistema circulatorio es modulado para aumentar el flujo sanguíneo en aquellas zonas donde se requiere una mayor provisión de oxígeno. En 1929 August Krogh [140] propuso que debería existir una coordinación dinámica muy fina entre la demanda de oxígeno (por ejemplo, el músculo en ejercicio), y su oferta (el flujo de sangre conteniendo eritrocitos). Varias líneas de investigación demostraron la existencia de numerosos factores que a nivel celular, tisular y sistémico promueven el sensado de este requerimiento energético, y consecuentemente la activación de mecanismos que modulan el calibre de los vasos [141]. Se trata de una coordinación compleja, que requiere estudiar el intercambio de gases a nivel tisular, el metabolismo energético muscular, y la función del endotelio y el músculo liso de los vasos sanguíneos [142].

Una parte de esta investigación se enfocó en identificar compuestos liberados en la circulación por las células sanguíneas, entre ellos el ATP liberado por los eritrocitos. El primer indicio que vincula la regulación del calibre de los vasos sanguíneos y el ATP intravascular liberado por los eritrocitos humanos aparece en los trabajos de Bergfeld y Forrester en 1992 [7]. Estos autores reportaron que los eritrocitos humanos *in vitro* eran capaces de liberar ATP en respuesta a la hipoxia/hipercapnia. Se propuso entonces que, en esta condición el ATP intravascular proveniente de los eritrocitos sería capaz de inducir la síntesis de vasodilatadores por el endotelio vascular.

De esta forma se estaba postulando que el eritrocito no sólo era el transportador de O<sub>2</sub>, sino que también, de alguna manera, era capaz de sensar el requerimiento energético, y consecuentemente gatillar una serie de eventos que conducen a la vasodilatación.

Años más tarde se caracterizó experimentalmente el rol del ATP extracelular liberado por los eritrocitos en este proceso. Estudios *in vitro* con eritrocitos de ratón, rata, conejo y humano mostraron que, en condiciones que simulan alta demanda energética, los eritrocitos eran capaces de liberar ATP en ausencia de hemólisis. Por otro lado, se utilizaron modelos animales para demostrar que el ATP extracelular proveniente de los eritrocitos era capaz de inducir la dilatación de pequeños vasos (arteriolas y capilares) [143-144].

En paralelo con estos estudios se observó que el endotelio vascular presentaba receptores purinérgicos funcionales y que varios subtipos de estos receptores, al ser activados por ATP y otros nucleótidos, eran capaces de activar la síntesis de vasodilatadores como óxido nítrico y prostaglandinas [145]. Estos compuestos promovían, a nivel ab-luminal la relajación del músculo liso, con el consiguiente aumento del calibre de los vasos [146].

Además, la activación de receptores P específicos sobre la superficie del eritrocito lleva a la liberación de eicosanoides que también contribuyen a la vasodilatación. [147].

Posteriormente se comenzaron a estudiar más en detalle aquellos estímulos fisiológicos a los cuales los eritrocitos se ven expuestos en la vasculatura, como por ejemplo al pasar por los capilares de la microcirculación [141].

Se observó en estas células liberación de ATP frente a medios hiposmóticos [135], agonistas  $\beta$ -adrenérgicos [148], deformación mecánica [149], hipoxia y acidosis.

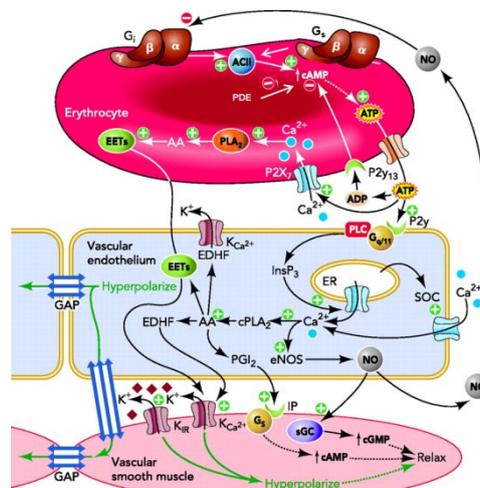
En general la liberación de ATP de eritrocitos involucra la activación en estas células de proteínas  $G_s$  y  $G_q$ , ligadas al aumento intracelular de AMPc y la consecuente activación de la proteína quinasa A (PKA, la vía clásica) [150] o de la proteína quinasa C (PKC) [151]. Además se sabe que proteínas G del tipo  $G_i$  de eritrocitos

transducen el estrés mecánico en liberación de ATP [149]. La cadena de eventos que asocia la activación de  $G_i$  con el eflujo de ATP involucra la disociación de la proteína trimérica  $G_{i\alpha\beta\gamma}$ , permitiendo que dímeros de las subunidades  $\beta\gamma$  estimulen las isoformas II, IV y VII de adenilato ciclasas [152], lo que lleva a un aumento en la síntesis de AMPc, activación de PKA y liberación de ATP [153-154].

En la **Fig. 5** se resume el mecanismo propuesto para la regulación de la microcirculación mediada por eritrocitos.

De manera general, la activación de las proteínas  $G_i$  y  $G_s$  del eritrocito lleva a la liberación de ATP. Una vez en el medio extracelular, el ATP puede:

1) activar en forma parácrina receptores P2Y en la superficie de las células endoteliales y, mediante el aumento en la concentración de calcio intracelular, inducir la síntesis de óxido nítrico y prostaglandina ( $NO$  y  $PGI_2$ ).



**Figura 5.** Mecanismo propuesto para la vasodilatación mediada por ATP extracelular de eritrocitos.

Ver texto para la explicación de la figura.

AA, ácido araquidónico; ACII, adenilato ciclasa II; PDE, fosfodiesterasa; EDHF, factor hiperpolarizante derivado del endotelio; EETs, ácidos epoxieicosanotrienoicos; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; ER, retículo endoplasmático; IP, receptor de prostacolina;  $K_{Ca^{2+}}$ , canales de potasio activados por calcio; KIR, canales de potasio rectificadores hacia adentro; NO, óxido nítrico; P2X, receptor P ionotrópico; P2Y, receptor P metabotrópico;  $PGI_2$ , prostaciclina; cPLA2, fosfolipasa A2 citosólica; PLC, fosfolipasa C; sGC, gualinato ciclasa citosólica; SOC, canales de calcio operados por almacenamiento; GAP, uniones estrechas.

Adaptado de [155].

Tanto NO como PGI<sub>2</sub> difunden a través de la membrana plasmática del endotelio e inducen la relajación del músculo liso que recubre los vasos.

2) Alternativamente, el ATP liberado por eritrocitos puede activar receptores P2X en forma autócrina, e inducir la síntesis de eicosanoides (EETs). Estos compuestos difunden hacia el músculo liso e inducen la relajación del mismo por hiperpolarización de la membrana.

Ambos mecanismos llevan a la vasodilatación en la microcirculación.

Tanto las células endoteliales como las musculares pueden transmitir a células adyacentes la hiperpolarización a través de uniones estrechas, lo que lleva a la propagación de la señal de relajación en forma retrógrada y anterógrada.

Se han descrito dos bucles de retroalimentación negativa que inhibirían la liberación de ATP del eritrocito:

1) la inhibición de la proteína G<sub>i</sub> del eritrocito por NO. El NO producido por las células endoteliales, no solo difunde a nivel ab-luminal para interactuar con células de la musculatura lisa vascular, sino que también puede liberarse al lumen vascular y afectar al eritrocito. *In vitro* el agregado de NO al medio extracelular reduce la liberación de ATP de eritrocitos inducida por varios estímulos fisiológicos[153,156].

2) el ADP extracelular, obtenido a partir de la hidrólisis del ATP por acción de ectonucleotidasas, puede activar receptores P2Y (acoplados a proteína G<sub>i</sub>) en la superficie del eritrocito e inhibir la síntesis de AMPc [157].

### *1.5.2 El eritrocito humano como modelo celular*

Más arriba se ha descrito la importancia del estudio de la regulación del ATP extracelular de eritrocitos humanos a nivel celular y sistémico. Además, el eritrocito humano representa un modelo celular sencillo para estudiar la regulación del ATP

extracelular, y su interrelación con el volumen celular, ya que, en comparación con otros tipos celulares:

1) *Posee una salida de ATP no lítica más simple.*

Como carece de compartimientos intracelulares y de vesículas secretorias, no presenta salida de ATP por exocitosis, mientras que en la mayoría de los tipos celulares el ATP se libera por mecanismos conductivos (poros y transportadores) y exocitóticos[15]. Además, se trata de células aisladas que no forman uniones estrechas y no expresarían conexinas [158] que, como se indicó en la sección 1.2.4, podrían mediar la salida de ATP. Por otro lado, se ha avanzado en la caracterización funcional de la panexina 1, que podría transportar ATP en el eritrocito humano [69], aunque la evidencia es incompleta. También se ha reportado que mdr1 y CFTR podrían estar involucrados en la salida de ATP [159].

2) *Posee una única vía de síntesis de ATP.*

La salida de ATP depende en gran medida de la concentración de ATP intracelular. En la mayoría de los tipos celulares, el ATP se sintetiza por glucólisis y fosforilación oxidativa. En el caso del eritrocito, la glucólisis es el único proceso de síntesis de ATP. Se conoce en detalle la regulación de la glucólisis del eritrocito, en especial, cómo el flujo glucolítico (proporcional a la velocidad de producción de ATP) es modulado por la interacción de enzimas glucolíticas con proteínas integrales de membrana [160].

3) *Posee un sistema de señalización P relativamente simple.*

De entre los siete receptores P2X, ocho receptores P2Y y cuatro receptores P1, la mayoría de las células muestra un gran repertorio de receptores P funcionales [107].

En cambio, en el eritrocito humano maduro se expresan pocos subtipos de receptores P.

Si bien estas células carecen de organelas intracelulares y de la maquinaria para la síntesis de proteínas, contienen trazas de ARNm que pueden ser detectadas por RT-PCR. De los receptores P2Y, se detectaron bajos niveles de P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>2</sub> y altos niveles de P2Y<sub>13</sub>. Este último subtipo, con alta afinidad por ADP, también fue identificado por Western Blot utilizando anticuerpos específicos, y fue además caracterizado farmacológicamente utilizando agonistas y antagonistas selectivos [157]. Por otro lado, estudios farmacológicos y de inmunocitoquímica han demostrado la presencia de receptores P2X<sub>2</sub> y P2X<sub>7</sub>[161-162] y receptores A<sub>2</sub>B (receptor P1 [137]).

En la Tabla 4 se resumen los receptores P expresados en eritrocitos humanos y se indican algunos agonistas y antagonistas.

**Tabla 4.** Receptores P presentes en eritrocitos humanos

Receptor	Agonista natural K <sub>0,5</sub> (μM)	Otros Agonistas	Antagonista	Mecanismo de transducción
A <sub>2</sub> B	ADO (5,1)	NECA	MRE2029	G <sub>s</sub>
P2X <sub>2</sub>	FALTA	ATP ≥ ATP <sub>γ</sub> S, 2-MeSATP >> AMP CPP; β,γ- CF <sub>2</sub> ATP	PPADS >Suramina, NF110	Canal catiónico
P2X <sub>7</sub>	ATP (>100- 300)	BzATP > ATP ≥2-MeSATP >>AMP-CPP	O-ATP, CE-224535; Suramina; PPADS	Canal catiónico
P2Y <sub>13</sub>	ADP (7.94)	ADP = 2- MeSADP > 2- MeSATP, ATP	AR-C67085 > MRS2211, 2- MeSAMP	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub>

Datos tomados de [107,157,161-161]

Adicionalmente, nuestro grupo de trabajo ha reportado que el eritrocito humano es capaz de desfosforilar completamente el ATP extracelular a adenosina [137], pero

hasta el momento no se han identificado las ecto-nucleotidasas responsables de la hidrólisis.

#### *1.5.2.1 El ATP extracelular de eritrocitos y el volumen celular.*

Como se mencionó en la sección 1.4, la mayoría de las células eucariotas liberan ATP ante estímulos que inducen un aumento del volumen celular [133]. Por ende, en el contexto de esta tesis, resultó interesante considerar si alguno de los estímulos utilizados para inducir la salida de ATP era capaz de producir cambios volumétricos.

En 1950 se postuló que los eritrocitos humanos no eran capaces de regular su volumen, es decir, se comportaban como un osmómetro ideal cuyo volumen estaba determinado por la distribución de agua en equilibrio a través de los compartimientos intra- y extracelulares [163]. Esto significa que, en principio, en medios hiposmóticos un eritrocito incrementa su volumen celular hasta alcanzar su nivel de equilibrio osmótico.

Sin embargo, nuestro grupo de trabajo ha observado que estímulos hiposmóticos promueven la salida de ATP de estas células, y que la desfosforilación completa de ATP induce la acumulación de adenosina extracelular. Seguidamente, la activación de receptores P<sub>1</sub> (A<sub>2</sub>B) por adenosina es capaz de inducir una pequeña, pero significativa disminución de volumen [137].

La capacidad de los eritrocitos humanos de liberar ATP frente aumentos del volumen, y de desfosforilar el ATP extracelular resultante implica que los productos metabólicos ADP, AMP y adenosina son capaces de acumularse en el medio extracelular. Esto sugiere que en eritrocitos humanos, además de la activación del receptor de adenosina A<sub>2</sub>B, podrían activarse otros receptores P como los detallados

en la Tabla 4. Se sabe que en células de hepatoma, astrocitos y linfocitos, la activación de receptores P específicos es capaz de afectar los mecanismos que llevan a la liberación de ATP extracelular [14,164-165]. Es decir que se podría establecer un vínculo mecánico entre volumen celular, receptores purinérgicos y salida de ATP.

#### *1.5.2.2 Eritrocitos de pacientes con esferocitosis hereditaria.*

Gran parte de las propiedades mecánicas y elásticas del eritrocito humano se deben al citoesqueleto. En el eritrocito humano, las principales proteínas del citoesqueleto lo constituyen  $\alpha$ - y  $\beta$ -espectrina, F actina, anquirina R, proteínas 4.1R, aducina, dematina, tropomiosina, tropomodulina, proteína 4.2 y pp55, mientras que las principales proteínas transmembrana la constituyen la banda 3, glicoforina A y C, proteínas Rh, Cd47, Lw, Duffy, XK y Kell.

Estudios recientes muestran que estas proteínas se asocian en grandes complejos multiproteicos involucrados en funciones metabólicas y de transporte [166]

En eritrocitos de pacientes con esferocitosis hereditaria se observa principalmente una disminución significativa en la expresión de anquirina y/o espectrina. Por lo tanto, estas células constituyen un buen modelo para estudiar la interrelación entre el volumen celular, el citoesqueleto y los mecanismos de transporte de ATP. Sobre todo teniendo en cuenta estudios recientes que sugieren que el correcto arreglo de las proteínas del citoesqueleto define la forma bicóncava de los eritrocitos y su capacidad de deformarse al atravesar los capilares de la microcirculación. Se observó que compuestos que se unen a espectrina reducen la deformabilidad del eritrocito, y llevan a una reducción de la salida de ATP inducida por hipoxia [71]. Por otro lado la expresión funcional de panexina 1, una proteína que mediaría la salida de ATP, requiere de su interacción con proteínas del citoesqueleto [167].

### 1.5.2.3 Otros modelos eritrocitarios.

#### 1.5.2.3.1 Eritrocitos de ratón.

Clásicamente el ratón ha sido utilizado como modelo de enfermedades humanas, debido a que muchos procesos bioquímicos son similares al hombre [168].

Los eritrocitos de ratón son capaces de liberar ATP al medio extracelular en respuesta a varios estímulos de manera similar que el eritrocito humano [169]; también presentan una respuesta osmométrica de volumen similar. Se ha reportado que frente a un medio hiposmótico los eritrocitos de ratón liberan ATP al medio extracelular por un mecanismo dependiente de panexina 1 [170].

Además, por ser una de las especies más estudiadas a nivel genético [171], ofrece la posibilidad de trabajar con animales knockout (KO) para proteínas involucradas en la vía señalización por nucleótidos extracelulares, como el CFTR y, panexina 1, entre otras [172-173].

#### 1.5.2.3.2 Eritrocitos de perro.

Se ha demostrado que los eritrocitos de perro son capaces de liberar ATP al medio extracelular en forma independiente del AMPc [174-175]. Por eso estas células representan un modelo adecuado para evaluar: 1- efectos inespecíficos de estímulos que inducen la salida de ATP mediada por AMPc, 2- inductores de la salida de ATP no dependientes de AMPc.

#### 1.5.2.3.3 Eritrocitos de *Xenopus laevis*.

Los eritrocitos de *Xenopus laevis* son células nucleadas, que presentan un metabolismo más complejo que los eritrocitos de mamíferos. Se ha reportado que, en estas células la salida de ATP inducida por estímulos osmóticos podría estar mediada por panexina 1 [73]. El modelo de eritrocito de *Xenopus*, comparado con

*los de ratón y humanos, permite una comparación más amplia de la regulación del ATP extracelular en eritrocitos de vertebrados, con la posibilidad de generalizar los resultados obtenidos en humanos.*

## **1.6 Objetivos**

### *1.6.1 Objetivo General.*

Estudiar a los nucleótidos como señales extracelulares involucradas en respuestas autócrinas y parácrinas en eritrocitos.

### *1.6.2 Objetivos específicos.*

Para comprender los mecanismos que controlan el perfil temporal de acumulación de ATPe (cinética de ATPe) de eritrocitos humanos se inducirá la liberación de ATP mediante diferentes estímulos. En estas condiciones se estudiarán:

- I. Los mecanismos de salida de ATP intracelular (ATPi).
- II. Los receptores P y actividad ecto-ATPasa involucradas en la respuesta.
- III. Los mecanismos intracelulares involucrados en la vía de señalización.
- IV. Potenciales moduladores de la cinética de ATPe: adhesión celular, volumen celular
- V. Un modelo matemático que, mediante el ajuste a los datos experimentales, permitacuantificar el peso relativo de los distintos procesos que contribuyen a la cinética de ATPe y predecir distintos escenarios de interés fisiológico y patológico.

# Materiales y Métodos

## **Introducción.**

Para reproducir una metodología experimental se debe contar con buenos registros de las tareas desarrolladas. Por esa razón, este capítulo describe en detalle las principales técnicas empleadas en las labores experimentales empleadas en estesis. Así también se incorpora una descripción de los materiales necesarios para poder llevarlas a cabo.

### **2.1 Reactivos.**

Los siguientes reactivos fueron provistos por Sigma Aldrich de Argentina: poli-D-lisina, lisina, seroalbúmnina bovina libre de ácidos grasos (BSA), mastoparan 7, mastoparan 17, ácido (3 $\beta$ )-3-[(3-carboxipropanoil)oxi]-11-oxoolean-12-en-30-oico (carbenoxolona, CBX), Ácido 4-(dipropilsulfamoil) benzoico (probenecid, PBC), luciferasa de luciérnaga (EC 1.13.12.7), forskolina, isoproterenol, papaverina, H-89, laminina, colágeno, 8-sulfofenil teofilina, 2-metil tio-adenosina difosfato (2-MeSADP), 6-(2'-cloro-5'-nitro-azofenil)-piridoxal-5 $\alpha$ -fosfato (MRS2211), CoA-SH, ionomicina, PMSF, cloruro de colina,  $\beta$ -D-tio-galactósido (IPTG), amiloride, NF110, digitonina, Imidazol y ácido. Alfa – Hidroxiisobutírico (HIBA).

La luciferina y los acetoximetil ésteres de Fluo-4 (Fluo-4AM) y 2',7'-Bis-(2-Carboxietil)-5-(y 6)-Carboxifluoresceina (BCECF-AM) fueron provistos por Invitrogen/Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, EEUU). El [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (10 Ci/mmol) fue provisto por Perkin Elmer LifeSciences (Santa Clara, California, EEUU). La Adenosina 5'-Trifosfato (ATP) para realizar las curvas de calibración por luminometría fue comprada a GE Healthcare LifeSciences.

El anticuerpo específico para AMPc fue provisto por National Institutes of Health (NIH. Dr. A. F. Parlow, National Hormone and Peptide Program, NIDDK, National Institutes of Health).

Los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

El capilar de sílice fundida utilizado para electroforesis capilar fue provisto por Polymicro Technologies (actualmente perteneciente a Molex, Lisle, IL, EEUU).

## **2.2 Medios utilizados.**

RBC-2 (en mM): 137 NaCl, 2,7 KCl, 2,50 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,50 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,32 CaCl<sub>2</sub>, 1,01 MgSO<sub>4</sub>, 5 glucosa, pH 7,4 a 20 °C, osmolaridad 300 mosM.

RBC-4 (en mM): 2,7 KCl, 4,72 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,50 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,32 CaCl<sub>2</sub>, 1,01 MgSO<sub>4</sub>, 5 glucosa, pH 7,4 a 20 °C, osmolaridad 45 mosM.

RBC libre de Ca<sup>2+</sup> (en mM): 137 NaCl, 2,7 KCl, 2,50 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,50 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,01 MgSO<sub>4</sub>, 5 glucosa, pH 7,4 a 20 °C, osmolaridad 300 mosM.

HIPO RBC: se prepararon medios hiposmóticos mediante la mezcla de RBC-2 y RBC-4 en diferentes proporciones.

HIPO tratamiento, 270 mosM (88:21, RBC-2:RBC-4)

Soluciones de calibración en experimentos de microscopía:

HIPO 1, 285-280 mosM (94:6, RBC-2:RBC-4)

HIPO 2, 265-260 mosM (85:15, RBC-2:RBC-4)

HIPO 3, 245-240 mosM (79:21, RBC-2:RBC-4)

HIPER RBC: se construyeron medios hiperosmóticos mediante el agregado de sacarosa al medio RBC-2 de la siguiente manera:

HIPER tratamiento, 345 mosM (RBC-2 con sacarosa 45 mM)

Soluciones para calibración para experimentos de microscopía:

HIPER 1, 310 mosM (78:22, RBC-2:HIPER 1)

HIPER 2, 320 mosM (56:44, RBC-2:HIPER 1)

HIPER 3, 340 mosM (11:89, RBC-2:HIPER 1)

RBC-Colina, sin Na<sup>+</sup> (en mM): 136 Cloruro de colina, 2,7 KCl, 2,50 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,50 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,01 MgSO<sub>4</sub>, 1,32 CaCl<sub>2</sub>, 5 glucosa, pH 7,4 a 20 °C, osmolaridad 300 mosM.

Buffer HEPES-IMIDIZOL-SACAROSA (en mM): 20 Hepes, Imizadolcsp pH 7,40, 240 sacarosa; pH 7,4 a 20 °C, osmolaridad 300 mosM.

En todos los casos el pH de los medios fue de 7,40 y se midió con un pHmetro Orion 720A (Termo Fisher Sci., MA, EE.UU) y la osmolaridad fue determinada con un osmómetro de presión de vapor Wescor 5100 B (Wescor Inc., Logan, EE.UU).

### **2.3 Modelo celular.**

Se utilizaron eritrocitos humanos provenientes de voluntarios sanos; eritrocitos humanos de pacientes con esferocitosis hereditaria (provistos por la Dra. Crisp, Sección Hematología Hospital Posadas); eritrocitos caninos provistos por la Dra. Maria Marta Rivero (Centro Hemolab Srl. Banco de Sangre Canino. Av. Alsina 1146. Bánfield, Lomas De Zamora, Prov. de Buenos Aires); eritrocitos de *Xenopus laevis*, gentileza del laboratorio de Biomembranas de la Cátedra de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires y del laboratorio del Dr. Daniel J. Calvo, Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI), CONICET. Se utilizaron además eritrocitos de ratón C57BL/6 wild type y knockout de panexina 1 (gentileza del Dr. Eduardo Lazarowski, Centro de Investigación y

Tratamiento de Fibrosis Quística Pulmonar, Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill, EE.UU).

Todos los experimentos con eritrocitos obtenidos de sangre de pacientes con esferocitosis hereditaria fueron incluidos en un protocolo de investigación clínica aprobado por el comité de bioética del Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas, Haedo, Provincia de Buenos Aires (22 de febrero de 2013).

Todos los experimentos realizados con animales fueron evaluados por el comité de ética de facultad de Farmacia y Bioquímica (CICUAL-FFYB) de la Universidad de Buenos Aires.

## **2.4 Aislamiento de eritrocitos.**

### *2.4.1 Extracción de sangre.*

En humanos: se extrajo entre 5-10 mL de sangre por punción venosa de la vena cefálica o de la vena basilica mediana de voluntarios sanos. Se utilizó EGTA 200 mM como anticoagulante (20  $\mu$ L /mL de sangre). En las muestras correspondientes a pacientes con esferocitosis hereditaria, se trabajó con 100-150  $\mu$ L sangre. Para evitar la contaminación con eritrocitos provenientes de la sangre transfundida, los pacientes no fueron transfundidos por al menos 90 días previos a la toma de muestra.

En perros: se extrajo entre 2-5 mL de sangre por punción venosa de la vena cefálica o de la vena safena. Se utilizó Heparina como anticoagulante (5-10 UI/mL de sangre).

En *Xenopus laevis*: se extrajo entre 1-2 mL de sangre por punción cardíaca de ranas anestesiadas. Se utilizó EGTA 200 mM como anticoagulante (20  $\mu$ L /mL de sangre). Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical.

En ratones: se extrajo entre 0,100-0,150 mL de sangre por punción venosa del seno orbital de ratones knock-out y wild type para panexina 1. Se utilizó Heparina como anticoagulante (5-10 UI/mL de sangre).

#### *2.4.2 Purificación de eritrocitos.*

##### *2.4.2.1 Separación por lavado con RBC-2 y centrifugación.*

Inicialmente, las plaquetas y los leucocitos fueron separados de los eritrocitos mediante centrifugación de la muestra de sangre a 900 g durante 3 min a temperatura ambiente. El plasma se separó por aspiración manual y se descartó, junto con la capa superior del pellet (que contiene mayoritariamente leucocitos). El pellet enriquecido en eritrocitos fue lavado 3 veces con RBC-2, repitiéndose el procedimiento de centrifugación y eliminación del sobrenadante. Finalmente, se obtuvo una suspensión de eritrocitos en RBC-2 a la que se agregó 0,5 % de BSA.

Mediante este procedimiento se obtuvieron eritrocitos de todas las edades biológicas.

Tanto las plaquetas como los leucocitos pueden responder en forma más robusta que los eritrocitos a los estímulos inductores de la salida de ATP; es por eso que la eliminación de ambos tipos celulares es muy importante durante la obtención de las muestras de eritrocitos. Para evaluar la pureza de las suspensiones de eritrocitos aislados por la técnica de lavado y centrifugación con RBC-2, las muestras fueron teñidas con Hoechst (colorante que se inserta en ADN) y analizadas en el microscopio de fluorescencia en busca de células nucleadas. Los resultados de

estos experimentos mostraron sólo 0,05 % de contaminación con células nucleadas (10 células nucleadas cada 20000 células totales).

#### *2.4.2.2 Separación por gradiente discontinuo de Percoll.*

Se sabe que los eritrocitos aumentan su densidad a medida que envejecen. La centrifugación en gradientes de densidad es la técnica más utilizada para separar subpoblaciones de eritrocitos según su edad.

Por ende, se utilizaron gradientes discontinuos de Percoll para separar eritrocitos senescentes, maduros y jóvenes. Estos últimos incluyen reticulocitos, es decir, glóbulos rojos inmaduros que contienen RNA y son liberados prematuramente al sistema circulatorio [176].

Se prepararon las siguientes soluciones:

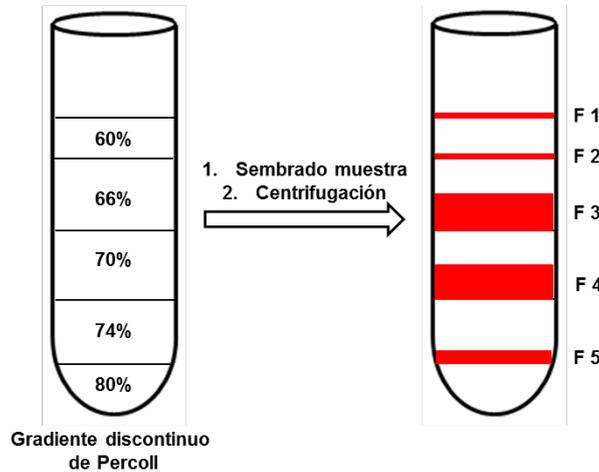
- RBC 20X (en M): 2,74 NaCl, 0,054 KCl, 0,05 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,03 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH= 7,40 a 20 °C.

- Solución A: 19 volúmenes de 5,25 % BSA en agua:1 volumen de RBC 20 X.

- Solución B: 19 volúmenes de 5,25 % BSA en Percoll:1 volumen de RBC 20 X.

Las soluciones A y B fueron mezcladas para obtener 5 soluciones de Percoll de concentración final de 60 %, 66 %, 70 %, 74 % y 80 %. Luego se construyó un gradiente discontinuo de Percoll mediante el agregado manual de 1 mL de solución 80 %, seguido de 3 mL de 74 %, 3 mL de 70 %, 3 mL de 66 % y 1,5 mL de 60 %. Finalmente se sembraron 1,5 mL de la muestra de sangre sobre el gradiente discontinuo formado.

El gradiente fue centrifugado a 4000 g durante 15 min a temperatura ambiente en un rotor de ángulo fijo (SS34 en centrífuga Sorvall RC5B o RB5C, Thermo Fisher, MA, EE.UU). En la **Fig. 6** se ilustra el procedimiento.



**Figura 6. Gradiente discontinuo de Percoll para la separación de glóbulos rojos.** La muestra se siembra sobre el gradiente y luego se centrifuga, obteniéndose de esta forma 5 fracciones de glóbulos rojos. En las fracciones F 1 y F2 se encuentran los reticulocitos, en las fracciones F 3 y F4 se encuentran los eritrocitos de edad biológica media y en la fracción F 5 se encuentran los eritrocitos de mayor edad biológica.

Las fracciones superiores del gradiente (F1 y F2) contienen las células más jóvenes y los reticulocitos, mientras que las células de mayores edades biológicas y senescentes se encuentran en la parte inferior (F5). Las células presentes en las fracciones 3 y 4 representan la mayor parte de los eritrocitos totales y contienen a los eritrocitos de edad biológica intermedia.

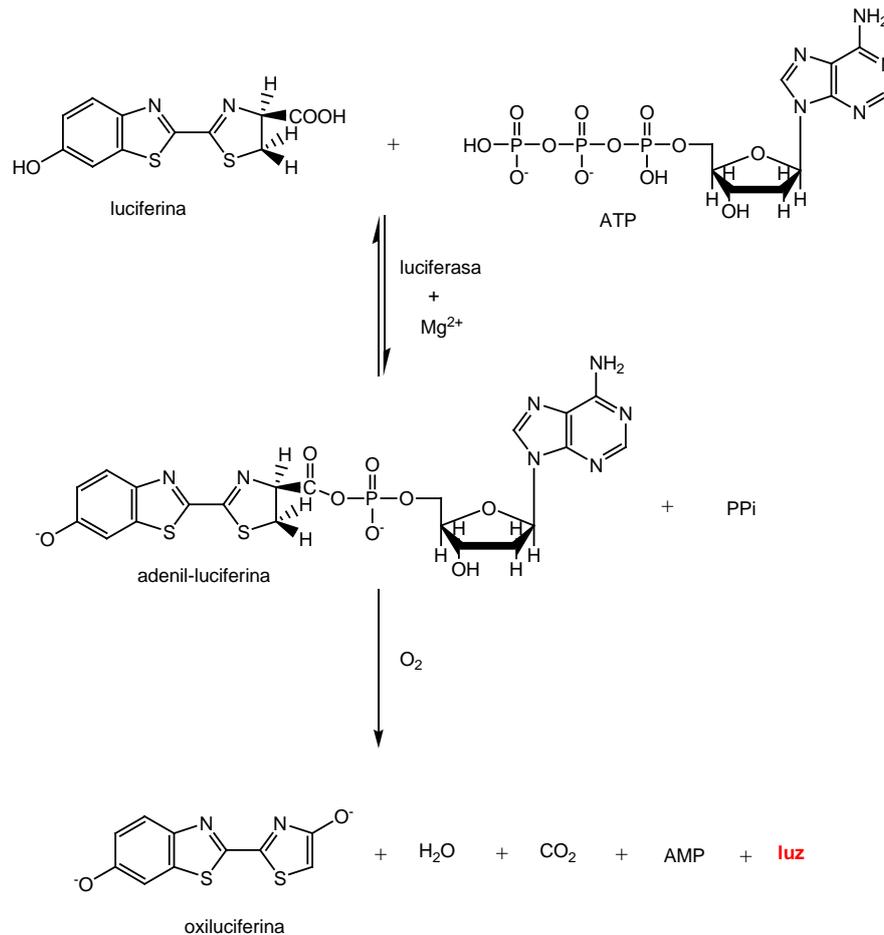
Las fracciones 3 y 4 fueron separadas del gradiente, lavadas con RBC-2 y centrifugadas durante 3 min a 900 g a temperatura ambiente. El sobrenadante fue removido y el pellet resuspendido en RBC-2 con 0,5 % seroalbúmina bovina (BSA). Este procedimiento fue repetido 3 veces con el fin de eliminar completamente el Percoll.

La ausencia de células nucleadas en la suspensión celular final fue corroborada mediante tinción con Hoechst y posterior visualización de las muestras en microscopio de fluorescencia.

Los resultados obtenidos utilizando una u otra técnica de separación no presentaron diferencias significativas (ver Resultados capítulo 3, sección 3.2, **Fig. 2**). Por lo tanto, con excepción de los resultados que se muestran en la figura mencionada, todos los experimentos fueron realizados aislando los eritrocitos por la técnica de lavado y centrifugación con RBC-2.

## **2.5 Medición de ATP.**

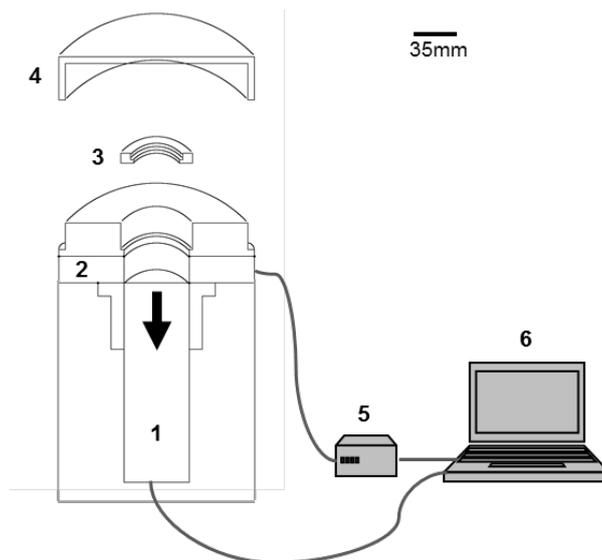
Se utilizó la reacción de luciferina-luciferasa. La luciferasa de luciérnaga (*Photinuspyralis*) cataliza la oxidación de luciferina en presencia de ATP y libera energía en forma de luz. La intensidad de la luz emitida es directamente proporcional a la concentración de ATP presente en el medio de reacción [177-178]. En la **Fig. 7** se muestra el esquema de reacción de la luciferina-luciferasa y sus productos de reacción. A bajas concentraciones de ATP ( $< \mu\text{M}$ ), la producción de luz es constante, mientras que a concentraciones mayores ( $> \mu\text{M}$ ) la producción de luz presenta un máximo que luego decae. La caída se debe a una lenta liberación de oxiluciferina del sitio de reacción que determina una disminución de la velocidad global de la reacción. Para lograr una producción constante de luz en el rango de concentraciones de ATP ensayadas (nM- $\mu\text{M}$ ), se adicionó coenzima A (CoA) al medio de reacción, ya que este factor estimula la liberación de oxiluciferina mediante un mecanismo aún no conocido. Adicionalmente se agregó BSA 1%, al medio de reacción para disminuir la tensión superficial de la solución y así generar una superficie homogénea en toda el área de medición.



**Figura7. Reacción de la luciferasa utilizada para la detección de ATP.** La luciferina es transformada en oxiluciferina mediante la enzima luciferasa, en una reacción que consume ATP y O<sub>2</sub> y libera energía en forma de luz. La intensidad de la luz es proporcional a la concentración de ATP en el medio de reacción.

Dado que la actividad de la luciferasa a 37 °C es sólo un 10% de la observada a 20 °C (Gorman 2003), las mediciones de ATP se llevaron a cabo en un ambiente climatizado a 20 °C.

Para medir la concentración de ATPe se utilizó un sistema de detección de luminiscencia de alta sensibilidad (**Fig. 8**).Las células son depositadas sobre un cubreobjetos de 2,5 cm de diámetro, que luego se asienta sobre una cámara de medición especialmente desarrollada para los luminómetros diseñados y construidos por nuestro grupo de trabajo.



**Figura 8. Esquema del sistema sensor de luminiscencia.** 1. fotomultiplicador. 2. Obturador electrónico. 3. Cámara de medición. 4. Tapa hermética a la luz. 5. Controlador del obturador. 6. Computadora con interfases a fotomultiplicador y controlador del obturador electrónico. La flecha indica la dirección en que la luz es registrada por el sistema.

La señal se registra de manera continua en la dirección que indica la flecha de la

**Fig. 3.** El sistema incluye un fotomultiplicador (sensor de luz, P30232-02; ElectronTubesLtd, Coventry, Reino Unido), dos gabinetes impermeables a la luz (uno que contiene a la muestra y el otro contiene al fotomultiplicador), un obturador electrónico que regula el paso de luz entre la muestra y el fotomultiplicador y una PC. La información se recoge digitalmente con una frecuencia de adquisición de 1  $\text{seg}^{-1}$  utilizando el programa de adquisición Sobral v1.01 (Buenos Aires, Argentina).

### 2.5.1 Mediciones de ATPe off-line con luciferasa soluble.

Para las determinaciones off-line, se incubaron suspensiones de eritrocitos en presencia o ausencia de MST7. Posteriormente, las suspensiones fueron centrifugadas durante 2 min a 1000 x g a temperatura ambiente. Las mediciones de ATPe fueron realizadas en 45  $\mu\text{L}$  del sobrenadante obtenido, mediante el agregado de luciferina, luciferasa, CoA y BSA. La luz emitida fue transformada en concentración de ATPe mediante una curva de calibración realizada al final de cada

experimento. Los resultados se indican como  $\Delta\text{ATP}_{10}$ , que resulta de la diferencia de la concentración de ATPe basal y la concentración de ATPe a los 10 min después del estímulo.

## 2.5.2 Cinéticas on-line de ATP.

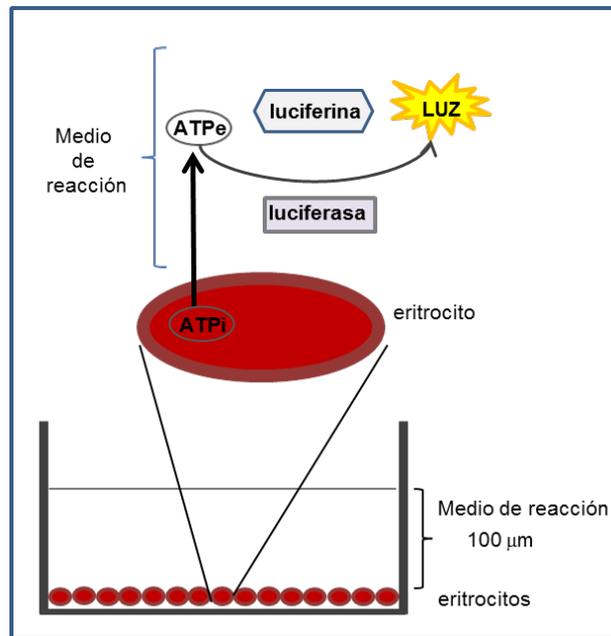
### 2.5.2.1 Mediciones de ATPe con luciferasa soluble.

Las mediciones on-line se realizaron con  $3 \times 10^6$  células depositadas sobre cubreobjetos recubiertos con poli-D-lisina 0,001% (células adheridas) o sin pre-tratamiento (células no adheridas). A esta baja concentración de poli-D-lisina, los eritrocitos cargados negativamente se adhieren al cubreobjeto y mantienen su forma discoidal [179]. La poli-lisina es el compuesto más utilizado para adherir las células *in vitro*. Alternativamente, para realizar experimentos con células adheridas, los cubreobjetos fueron recubiertos con 5  $\mu\text{g}$  de laminina o 0,5-50  $\mu\text{g}$  de colágeno.

Para realizar los experimentos con eritrocitos adheridos, se sembraron 400  $\mu\text{L}$  de una suspensión celular de hematocrito 0,075% sobre cubreobjetos pre-tratados con poli-D-lisina 0,001% y se permitió la adhesión durante 1 hora. Posteriormente se retiró el sobrenadante, se lavó y se reemplazó por 40  $\mu\text{L}$  de RBC-2 fresco. Los cubreobjetos fueron luego montados sobre las cámaras de los luminómetros para registrar la emisión de luz de fondo (sin luciferina y luciferasa), luego se reemplazaron los 40  $\mu\text{L}$  de RBC-2 por 40  $\mu\text{L}$  de medio de reacción conteniendo luciferina y luciferasa. Posteriormente se agregó 1  $\mu\text{L}$  del estímulo y/o el tratamiento a ensayar, dejando al mismo difundir en el volumen de reacción.

En estas condiciones de ensayo la altura comprendida entre la base de la cámara (donde se asientan las células) y la superficie del líquido es de 100  $\mu\text{m}$ . Es decir que

la luciferasa soluble se distribuye entre 0 y 100  $\mu\text{m}$  de la superficie celular. En la **Fig. 9** se ilustra el principio de la técnica.



**Figura 9. Principio de detección de ATP extracelular con luciferasa soluble.** Las células se depositan sobre la superficie de un cubreobjeto y se agrega el medio de reacción con luciferasa soluble y luciferina. El medio de ensayo tiene una altura de 100  $\mu\text{m}$ .

Para realizar los experimentos con eritrocitos no adheridos, se sembraron 10  $\mu\text{L}$  de una suspensión celular de hematocrito 3% sobre cubreobjetos sin adherentes y se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de medio de reacción conteniendo luciferina y luciferasa. Es decir, el volumen de reacción fue de 60  $\mu\text{L}$ .

El hematocrito es una medida del volumen relativo que ocupan los eritrocitos en la sangre y, por extensión, en un medio de ensayo *in vitro*. Si bien en un medio de ensayo *in vitro*, el término correcto sería citocrito (volumen relativo que ocupan las células en un medio de ensayo), no se hace distinción entre ambos términos en esta tesis.

Si se considera que el volumen corpuscular medio (VCM, volumen promedio de un eritrocito) de un eritrocito humano es de alrededor de 90 fl, cuando se siembran 400

$\mu\text{L}$  de una suspensión celular de hematocrito 0,075% se están sembrando aproximadamente  $3 \times 10^6$  células. Cuando los 400  $\mu\text{L}$  de medio son reemplazados por 40  $\mu\text{L}$  de medio de reacción, el hematocrito pasa a ser diez veces mayor al sembrado originalmente, es decir, 0,75%. Del mismo modo, al sembrar 9  $\mu\text{L}$  de una suspensión celular de hematocrito 3%, se están sembrando aproximadamente  $3 \times 10^6$  células. Al agregar 50  $\mu\text{L}$  de medio de reacción, el hematocrito original se reduce a 0,45%.

Los volúmenes de sembrado fueron ajustados cuando se trabajó con eritrocitos provenientes de otras especies (o provenientes de pacientes con patologías eritrocitarias), en función del VCM de las células en estudio.

En todos los experimentos, la intensidad de la luz emitida fue transformada en concentración de ATPe mediante una curva de calibración realizada al finalizar cada experimento, agregando concentraciones crecientes de ATP (de soluciones stock) al medio de reacción.

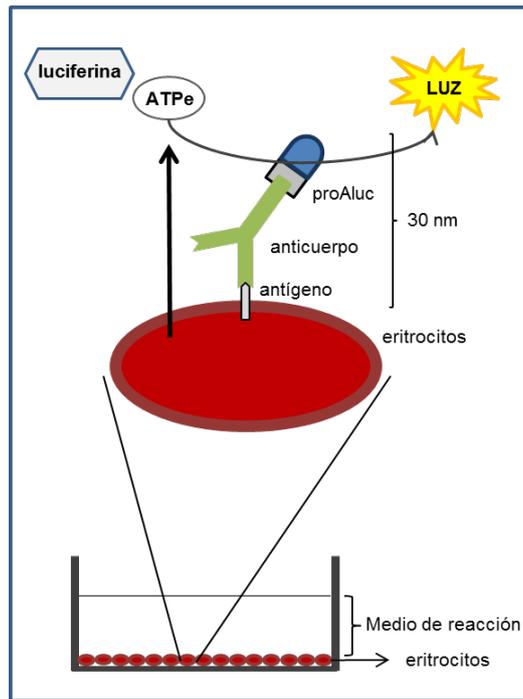
Los resultados fueron expresados como concentración de ATPe para cada tiempo, obteniéndose una cinética de ATPe. La concentración de ATPe fue expresada en pmoles/ $10^6$  células o nM/( $3 \times 10^6$  células)/40  $\mu\text{L}$ . Alternativamente, los incrementos en la concentración de ATPe fueron analizados como la diferencia entre la concentración de ATPe a un tiempo fijo luego del estímulo y el valor basal de la concentración de ATPe previo al estímulo, y se indicaron como  $\Delta\text{ATP}_{20}$  (20 min luego del estímulo, para eritrocitos humanos) o  $\Delta\text{ATP}_5$  (5 min luego del estímulo, para eritrocitos de ratón).

#### 2.5.2.2 Medición de ATP intracelular.

El contenido total de ATP intracelular (ATPi) fue estimado por luminometría on-line, utilizando eritrocitos adheridos ( $3 \times 10^6$  células). Los eritrocitos se permeabilizaron mediante el agregado de digitonina (50 mg/mL) y la liberación del ATP citosólico fue determinado como se indicó en 2.5.2.1. Luego de considerar el volumen total ocupado por todas las células presentes en la cámara y el volumen relativo de agua libre del eritrocito [180], los valores de ATP obtenidos fueron expresados como la concentración de ATPi. Se tuvieron en cuenta los cambios de volumen inducidos por el MST7.

#### 2.5.3 Medición de ATPe utilizando luciferasa unida a la membrana plasmática.

La técnica se basa en la unión de una proteína quimérica denominada *ProAluca* antígenos de la superficie celular (**Fig. 10**). La proteína *ProAluc* contiene la secuencia completa de la enzima luciferasa y una porción de la proteína A. La proteína A proviene de *Staphylococcus Aureus* y contiene sitios de unión a la porción Fc de los anticuerpos. La metodología requiere de un anticuerpo cuyo segmento Fc una a la *proAluc* con alta afinidad y que su porción Fab se una a un antígeno de superficie de la célula en estudio. El método tiene muy alta resolución espacial, dado que la porción luciferasa de la sonda se encuentra a 30 nm de la superficie celular.



**Figura 10. Principio de detección de ATP extracelular con proAluc.** Detección por proAluc. Las células se adhieren sobre cubreobjetos y son incubadas durante 1 h en forma secuencial, con el anticuerpo y la sonda. Luego se agrega el medio de reacción conteniendo luciferina.

Para poder realizar esta técnica fue necesario expresar y purificar la enzima *ProAluc*, así como también identificar un antígeno en la superficie de los eritrocitos que pudiera ser utilizado como blanco para unir a la sonda (ver más adelante). Esta unión no debía inducir *per se* la liberación de ATP de las células.

Las mediciones se realizaron por luminometría on-line. Se depositaron  $3 \times 10^6$  células sobre cubreobjetos recubiertos con poli-D-lisina 0,001% y se incubó durante 1h con el anticuerpo primario. Luego de la incubación, se realizaron tres lavados con medio RBC-2, para eliminar el anticuerpo no unido, y se incubó 1 h con *ProAluc*. Posteriormente se realizaron otros tres lavados con medio RBC-2, para eliminar la proAluc no unida, y se dejaron reposar las células durante 30 minutos. Luego se agregaron 40  $\mu\text{L}$  de medio de reacción conteniendo luciferina y se midió la emisión de luz antes y después del agregado del estímulo. En todos los

experimentos, la luz emitida fue transformada en concentración de ATPe mediante una curva de calibración realizada al finalizar cada experimento, agregando concentraciones crecientes de ATP (de soluciones stock) al medio de reacción.

En experimentos preliminares, se ajustaron las concentraciones de anticuerpo y *ProAluca* utilizar.

#### *2.5.3.1 Producción y purificación de ProAluc.*

El plásmido PMALU7 codificante para proAluc fue gentilmente donado por el Dr. Kobatake (Tokyo Institute of Technology, Japón). Se transformaron *E. coli* JM109 con este plásmido. Posteriormente se expresó y purificó la proteína de fusión resultante según métodos descritos [181]. Brevemente, *E. coli* JM109 transformadas fueron cultivadas en medio LB con ampicilina 1 mM a 37 °C hasta la mitad de la máxima densidad, luego de lo cual fueron inducidas con IPTG 1 Mm e incubadas overnight a 30 °C para que expresen la proteína.

Luego, las bacterias fueron concentradas por centrifugación a 4000 g a 4 °C durante 4 minutos, lavadas dos veces con PBS y finalmente resuspendidas en PBS con PMSF 1 Mm (inhibidor de proteasas).

Posteriormente las bacterias fueron lisadas por sonicación en frío (0-4 °C, 3 ciclos de 10 segundos). El lisado bacteriano se centrifugó a 7000g a 4 °C durante 20 minutos y luego se sembró en una columna de IgG-sefarosa (1 MI) a 4 °C durante 1 hora. Posteriormente la proteína se eluyó con un buffer Hac/NaAc 0,5 M Ph: 3,4 y las fracciones fueron recogidas en buffer de neutralización Tris-HCl 1 M Ph: 8,00. Las fracciones eluidas fueron luego desaladas y concentradas en un solo paso mediante ultracentrifugación en tubos Centriprep YM-50 (50 kDa NMWL, EMD Millipore). El contenido de proteína fue determinado mediante el micrométodo de Bradford [182].

### 2.5.3.2 Identificación de antígenos eritrocitarios de superficie para unión de ProAluc.

Se realizaron ensayos de aglutinación para los siguientes antígenos eritrocitarios:

- Sistema ABO. Para realizar el ensayo se utilizó una mezcla de IgM monoclonal Anti-A y Anti-B murinos (Seraclone Anti-A,B (AB03).BioRad).
- D (perteneciente al sistema antigénico Rh). Para realizar el ensayo se utilizó una mezcla de IgG/IgM anti-D monoclonal humano (Seraclone Anti-D (RH1) Blend. BioRad)
- Fy<sup>a</sup> (perteneciente al sistema antigénico Duffy). Para el ensayo se utilizó IgG monoclonal humano (Seraclone Anti-Fy<sup>a</sup> (FY1).BioRad).
- M (perteneciente al sistema antigénico MNS). Para el ensayo se utilizó IgM monoclonal murino (Seraclone Anti-M (MNS1).BioRad)

También se utilizó un anticuerpo anti Glicoforina A (IgG monoclonal humano. Abcam, Cambridge, MA) para la adhesión de la ProAluc a la superficie de los eritrocitos. La glicoforina A es la principal glicoproteína de la membrana eritrocitaria, ya que conforma la estructura basal del Sistema antigénico MNS y es abundante en la banda 3, aunque no es crítica para la integridad de los eritrocitos.

## 2.6 Medición del volumen celular.

### 2.6.1 Volumen corpuscular medio

La determinación del volumen corpuscular medio (VCM) de un eritrocito se puede estimar mediante recuento en cámara de Neubauer y determinación del hematocrito. Se determinó el número de eritrocitos contenidos en 1  $\mu$ l de una suspensión de hematocrito conocido.

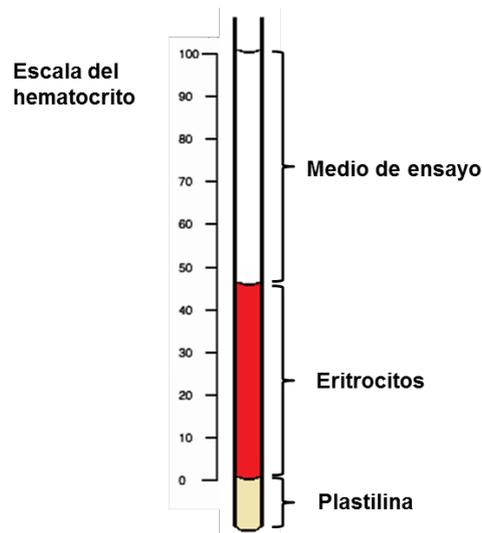
El VCM estimado de un eritrocito humano fue de 90 fl, valor similar al reportado en literatura [183].

De forma similar, se obtuvieron los VCM de los eritrocitos de ratón (48 fl), de *Xenopus* (170 fl), de perro (66 fl) y de donantes con esferocitosis hereditaria (80-85 fl)

### 2.6.2 Determinación de la variación de volumen por hematocrito.

Como se mencionó anteriormente, el hematocrito es una medida del volumen relativo que ocupan los eritrocitos en la sangre. Por lo tanto, en una suspensión de eritrocitos, cambios en el hematocrito indican cambios en el volumen de estas células.

Para determinar el hematocrito, las células fueron centrifugadas en capilares de 80  $\mu\text{L}$  a 5000 g durante 3 min. Dado que los capilares poseen una sección interna constante, el volumen de células y el volumen de medio extracelular pueden ser estimados mediante la medición de la longitud que ocupan dentro del capilar (**Fig. 11**).



**Figura 11. Determinación del hematocrito.**

La suspensión celular se centrifuga en capilares de 80  $\mu\text{L}$  y el volumen de células y el volumen de medio extracelular se estiman mediante la longitud que ocupan dentro del capilar.

Para la determinación de la variación del volumen celular se prepararon suspensiones de eritrocitos humanos en medio RBC-2 + BSA 0,5% y hematocrito aproximado de 20%. Las células fueron expuestas durante 2 minutos a un medio RBC-2 (control) o MST7 10  $\mu$ M), en presencia o ausencia de inhibidores. Luego se determinó el hematocrito por centrifugación en capilares de 80  $\mu$ L.

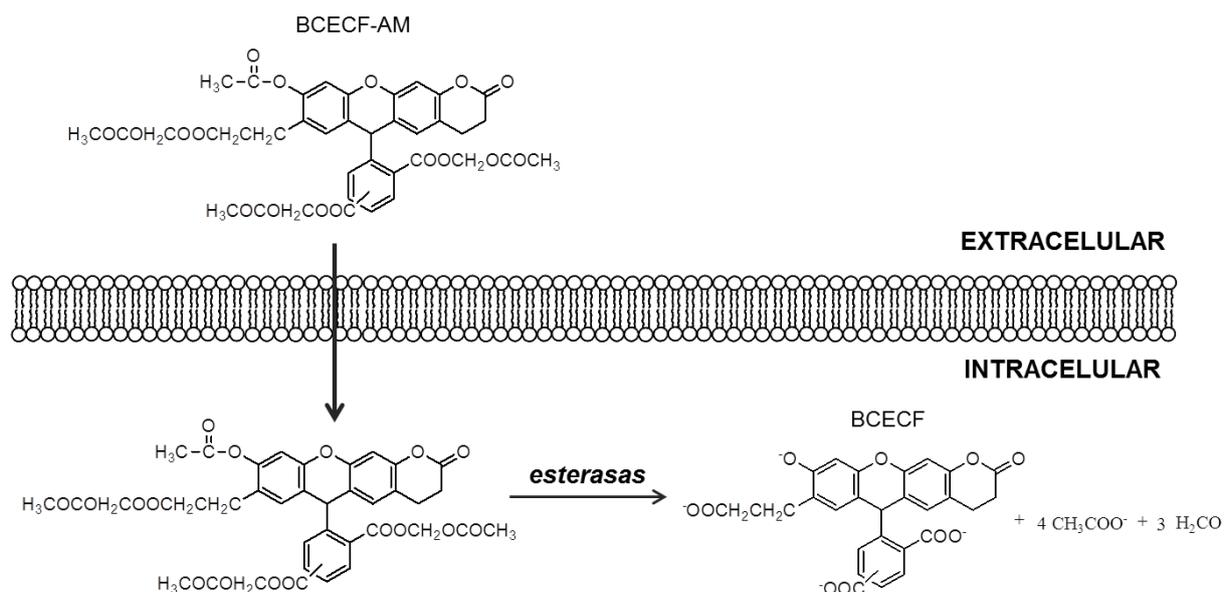
El volumen relativo ( $V_r$ ) fue calculado como

$$V_r = \frac{Hct_t}{Hct_c}$$

Donde  $Hct_t$  y  $Hct_c$  son los hematocritos de células tratadas y control respectivamente.

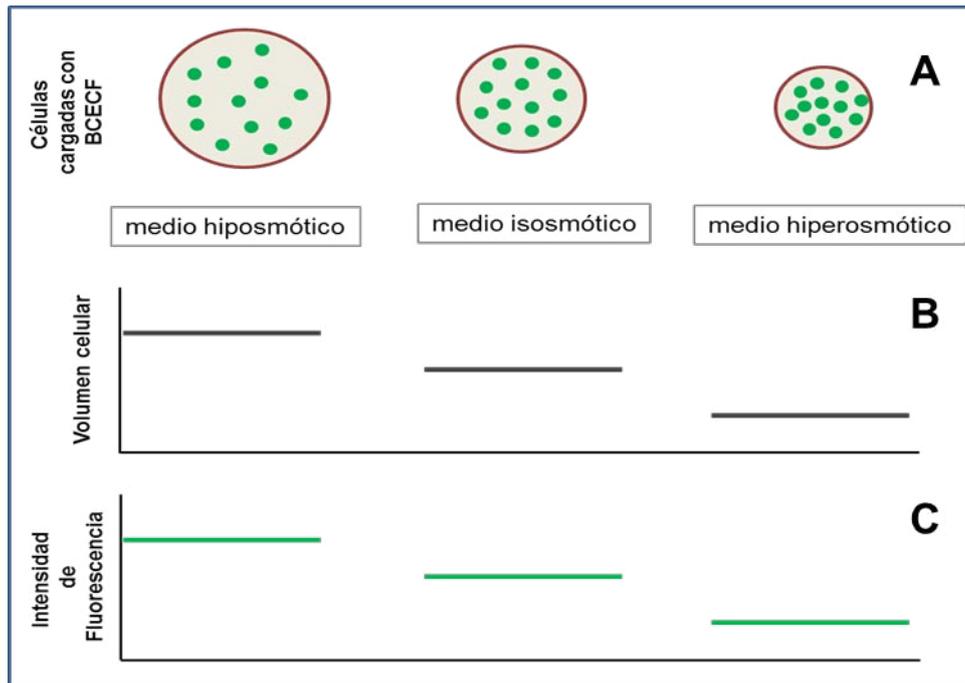
### *2.6.3 Determinación de la variación de volumen por microscopía de epifluorescencia.*

Para medir el volumen celular se utilizó el fluoróforo BCECF, derivado de la fluoresceína. La membrana plasmática es impermeable a la mayoría de fluoróforos conteniendo grupos carboxilos que en las condiciones de ensayo exhiben carga neta negativa. Sin embargo, los acetoximetil ésteres (AM) de estos compuestos son altamente permeables a las células. En esta técnica el BCECF-AM atraviesa la membrana celular y una vez dentro de la célula el grupo acetometil es desesterificado por esterasas intracelulares (**Fig. 12**), quedando el fluoróforo libre atrapado en el interior de la célula, ya que a pH 7-8 la molécula desesterificada tiene 4-5 cargas negativas.



**Figura12. Mecanismo de captación de BCECF.** El compuesto esterificado (AM) puede atravesar libremente la membrana plasmática, siendo hidrolizado en el medio intracelular por esterases. De esta forma el fluoróforo libre posee carga neta negativa y queda retenido en el interior de la célula.

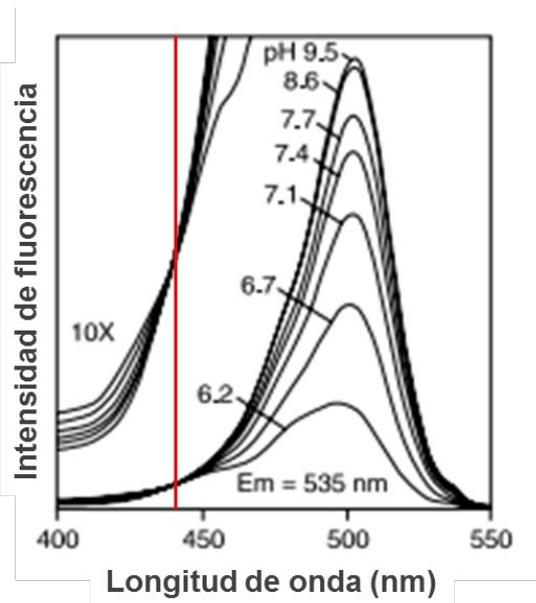
En ciertos protocolos experimentales, la intensidad de fluorescencia de las células cargadas con algunos fluoróforos disminuye con el aumento de la concentración de dicho fluoróforo. Este efecto, denominado extinción de la fluorescencia o quenching, puede ser utilizado para medir cambios en el volumen de agua de varios tipos celulares por microscopía de fluorescencia [184]. Como se esquematiza en la **Fig. 13**, cuando células cargadas con BCECF son expuestas a medios de distinta osmolaridad, la magnitud del volumen celulares inversamente proporcional a la concentración del fluoróforo. Sin embargo, el aumento del volumen celular es directamente proporcional a la intensidad de fluorescencia, por el efecto quenching.



**Figura13. Medición del volumen celular con BCECF intracelular.** El número de moléculas de fluoróforo se mantiene constante en las diferentes condiciones de ensayo, pero su concentración varía en la variación del volumen celular (A). Los gráficos inferiores esquematizan el sentido de la variación del volumen celular (B) y la intensidad de fluorescencia (C) frente a cambios en la osmolaridad del medio extracelular.

Cuando la célula aumenta su volumen frente a un medio hiposmótico, la intensidad de fluorescencia aumenta de con la disminución de la concentración del BCECF ya que disminuye el quenching; el efecto opuesto se observa frente a un medio hiperosmótico.

Si bien este fluoróforo se utiliza para medir cambios en el pH intracelular, cuando el fluoróforo es excitado en la longitud de onda correspondiente al punto isobéptico (**Fig. 14**) la intensidad de fluorescencia emitida es independiente de los cambios de pH. Como consecuencia, al excitar a la muestra en la longitud de onda isobéptica, el BCECF puede utilizarse para la medición temporal del volumen celular relativo. Esta técnica ya fue empleada por nuestro grupo para evaluar la regulación del volumen celular de eritrocitos humanos [137].



**Figura14. Espectro de excitación de BCECF en función del pH.** La ampliación 10X corresponde a la región por debajo de los 470 nm. La línea roja marca el punto isobéptico a ~445 nm. Tomado de Invitrogen, Life Technologies.

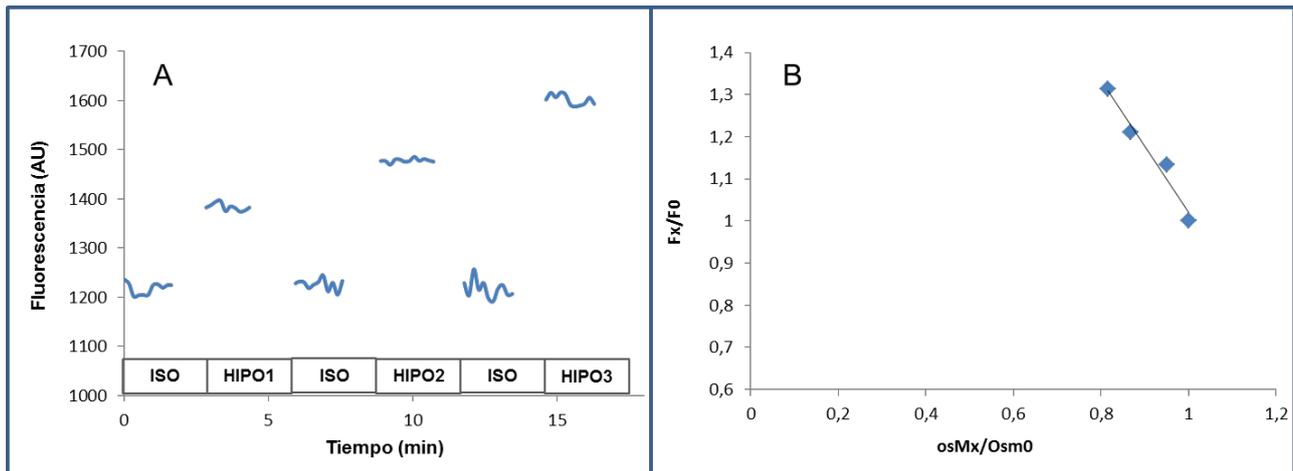
Para estudiar la cinética de volumen de eritrocitos humanos, se adhirieron  $3 \times 10^6$  células sobre cubreobjetos pre-tratados con poli-D-lisina 0,001% y fueron incubados en un medio RBC-2 con  $5 \mu\text{M}$  BCECF-AM durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente las células fueron lavadas 3 veces con RBC-2 para eliminar la sonda no incorporada a las células y los cubreobjetos fueron luego montados sobre la cámara de medición del microscopio invertido de epifluorescencia Nikon TE-200. La adquisición de la señal fluorescente se realizó por medio de una cámara CCD (del inglés *chargedcoupleddivice*, Hamamatsu C4742-95, Japón), utilizando el programa Metafluor 5.3 (Universal Imaging, PA, EE.UU); este programa permite elegir la frecuencia de adquisición de imágenes y calcular la intensidad de fluorescencia de regiones específicas de las células, denominadas pinholes digitales.

Los cambios en el volumen de agua de la célula se infieren de la lectura de la intensidad de fluorescencia a  $\lambda_{\text{exc}}$ : 445 nm y  $\lambda_{\text{em}}$ : 510 nm, adquiriendo imágenes a

intervalos de 30 seg (lecturas previas a los estímulos) o de 1 seg (lecturas post-estímulos).

Los valores de volumen celular se obtuvieron a partir de la relación de intensidades de fluorescencia  $F_t/F_0$ . Donde  $F_0$  representa la señal obtenida a partir de una pequeña región circular situada en el plano de la imagen de cada célula cargada con BCECFequilibrada en medio isosmótico, mientras que  $F_t$  indica la fluorescencia del mismo pinhole a tiempo  $t$ . Por lo tanto, esta medida representa un volumen fraccional en el que el valor de volumen celular isosmótico inicial es 1 y los cambios de volumen se expresan en relación al mismo, es decir como volumen relativo ( $V_r$ ). Entonces esta técnica nos permite obtener mediciones de  $V_r$  de forma continua en el tiempo.

La conversión de la intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias) a  $V_r$  se realizó mediante una calibración, en la cual se expusieron las células a medios de distintas osmolaridades (hipo o hiperosmóticos) al final de cada experimento. Como se ilustra en la **Fig. 15A**, las células equilibradas en medio isosmótico (ISO) son expuestas a un medio hiposmótico 1 (HIPO 1), para luego ser nuevamente equilibradas en medio isosmótico. Este procedimiento se repite en forma secuencial con otros dos medios hiposmóticos (HIPO 2 e HIPO 3).



**Figura15. Experimentos de calibración.**

**A:** Intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (AU) en función del tiempo. Las células son expuestas a un medio isosmótico (ISO) y medios hiposmóticos (HIPO1, HIPO2, HIPO3) en forma secuencial.

**B:**  $F_x/F_0$  en función de  $osM_x/osM_0$ , obtenido de los promedios de los valores de A. La línea continua corresponde al ajuste de una recta a los datos experimentales.

$F_x$  y  $F_0$ , son los valores de intensidad de fluorescencia al exponer las células a medios hiposmóticos e isosmótico, respectivamente.  $osM_x$  y  $osM_0$  son las osmolaridades de las solución hiposmóticas e isosmótica, respectivamente.

En estas condiciones las células cambiaron su intensidad de fluorescencia, alcanzando un valor estacionario específico para cada uno de los medios. Luego se procedió a realizar la curva de calibración a partir del curso temporal de fluorescencia de cada célula individual. Para ello se realizaron los siguientes cálculos:

- 1)  $F_x/F_0$ , donde  $F_x$  es la intensidad de fluorescencia estacionaria medida al exponer las células a medios hiposmóticos, mientras que  $F_0$  es el valor de intensidad estacionaria de fluorescencia medida en medio isosmótico.
- 2)  $osM_x/osM_0$ , donde  $osM_x$  es la osmolaridad del medio hiposmótico, mientras que  $osM_0$  es la osmolaridad de la solución isosmótica.

A partir de estos valores se graficó  $F_x/F_0$  en función de  $osM_x/osM_0$  y se aplicó regresión lineal a los datos (**Fig. 15B**). Luego, los valores de  $V_r$  para cada célula se calcularon de la siguiente manera:

$$Vr = \frac{(F_0/F_t) - b}{a}$$

Donde  $F_0$  representa la intensidad de fluorescencia promedio en medio isosmótico y  $F_t$  la intensidad de fluorescencia a tiempo  $t$  ya y  $b$  son los parámetros de la regresión lineal.

Alternativamente, cuando los tratamientos indujeron una disminución del volumen celular las calibraciones al final de cada experimento se hicieron con soluciones hiperosmóticas. En el *punto 2.1* se indican las osmolaridades de las soluciones de calibración. Durante los cambios de medio las posiciones X, Y y Z del campo del microscopio se mantuvieron sin cambios.

## **2.7 Viabilidad celular y determinación del número de células.**

Debido a que la principal fuente de ATP extracelular (ATPe) es el ATP intracelular (ATPi), la lisis celular es uno de los mecanismos por los que el ATPi es liberado al medio. Por ende, dado que en esta tesis se estudiaron los mecanismos no líticos de salida de ATP, fue necesario corroborar la ausencia de muerte celular en los ensayos.

Por otro lado, uno de los estímulos empleado para inducir la salida de ATP requiere que las células se encuentren adheridas durante el ensayo. Si bien en todos los ensayos se sembró el mismo número de células, fue necesario determinar el número de células adheridas al finalizar el experimento y así obtener el número real de células que respondieron al tratamiento.

Dado que el eritrocito tiene una alta concentración de hemoglobina ( $\cong 5$  mM), la presencia de esta proteína en el medio de ensayo es un indicador de muerte celular.

Por otro lado, la concentración de hemoglobina presente en las células permite estimar el número de células en un ensayo.

De acuerdo a esta idea, al finalizar cada experimento de luminiscencia on-line, se separó el sobrenadante para la determinación de hemoglobina libre (y evaluar así la lisis celular), mientras que las células adheridas al cubreobjeto fueron lisadas mediante el agregado de 50  $\mu$ L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25 mM, utilizándose el sobrenadante obtenido para medir hemoglobina y determinar el número de células adheridas.

### *2.7.1 Viabilidad celular.*

La concentración de ATPi es mM, mientras que la concentración de ATPe en los ensayos es nM. Por eso, incluso un pequeño grado de muerte celular durante los experimentos podría generar aumentos importantes en la concentración de ATPe. Esto indica que se requieren de técnicas de alta sensibilidad para detectar la muerte celular. En este trabajo de tesis se utilizaron dos técnicas independientes, una técnica enzimática de detección de hemoglobina altamente sensible y microscopía de epifluorescencia.

#### *2.7.1.1 Detección de hemoglobina mediante técnica enzimática.*

Casi todas las hemoproteínas y las heminas presentan actividad peroxidasa. Por lo tanto, la hemoglobina (Hb) y algunos de sus productos de degradación poseen actividad enzimática comparable a las peroxidasas. En base a este principio se utilizó el método de Vázquez y col. (1991) [185] que detecta microcantidades de Hb. La técnica se basa en la determinación de la velocidad inicial ( $v_i$ ) de formación de un producto coloreado ( $\text{CPZ}^+$ ) que se genera durante la oxidación de la clorpromazina (CPZ, sustrato) mediada por la Hb. Brevemente, se midieron por

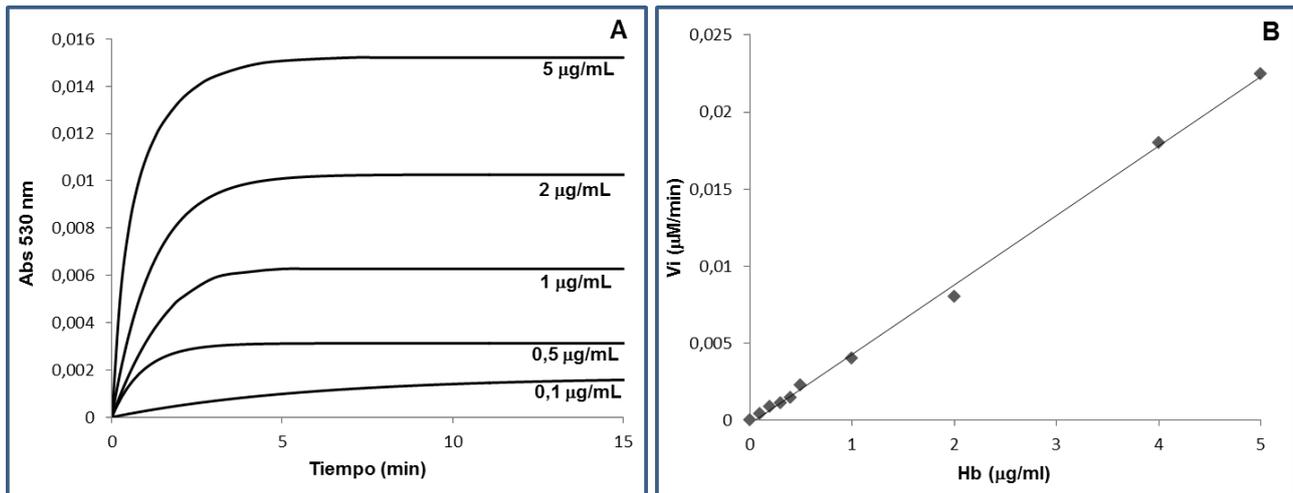
espectrofotométricas cinéticas de acumulación de CPZ<sup>+</sup> en medios conteniendo concentraciones variables de Hb (**Fig. 16 A**). Luego se ajustó la ecuación

$$Y = Y_0 + A \times (1 - \exp^{-k \times t})$$

a cada una de las curvas; donde  $Y$  e  $Y_0$  son los valores de CPZ<sup>+</sup> a tiempo  $t$  y a  $t=0$ , respectivamente;  $A$  representa el máximo valor alcanzado por  $Y$  en el tiempo y  $k$  es un coeficiente de velocidad. Los parámetros de mejor ajuste a la regresión fueron usados para calcular la velocidad inicial ( $v_i$ ) como  $k \times A$ . Posteriormente se graficó  $v_i$  en función de la concentración de Hb, obteniéndose así la curva de calibración (**Fig. 16 B**).

Para determinar la concentración de Hb en la muestra, se realizó la cinética de CPZ<sup>+</sup> y se calculó su  $v_i$ . Luego se calculó la concentración de Hb utilizando los parámetros de la curva de calibración. El límite de cuantificación de esta técnica es de 0,073  $\mu\text{g/ml}$  de Hb, que representa un 0,003% de lisis en los experimentos realizados.

Como se indicó previamente, una vez finalizados los experimentos de luminiscencia on-line se recogió el sobrenadante (entre 40 y 50  $\mu\text{L}$ ) y se centrifugó a 3000 g durante 3 min. Luego se tomaron 10  $\mu\text{L}$  del sobrenadante, se mezclaron con el medio de reacción y se realizó la cinética de acumulación de CPZ<sup>+</sup>; posteriormente se calculó la concentración de Hb utilizando los parámetros de la curva de calibración realizada en el día.



**Figura16. Determinación enzimática de Hb.**

**A:** Absorbancia en función del tiempo a diferentes concentraciones de Hb. Se mide la acumulación (a 530 nm) del producto de oxidación de la clorpromazina en función del tiempo.

**B:** Velocidad inicial (vi) en función de la concentración de Hb. La línea continua corresponde a la regresión lineal ajustada a los datos experimentales para tener una curva de calibración lineal.

### 2.7.1.2 Cinética de viabilidad por microscopía de epifluorescencia.

Células cargadas con BCECF fueron monitoreadas antes y después del agregado de agentes farmacológicos, durante el mismo periodo y en condiciones similares que los experimentos de luminiscencia descritos en 2.5.2.1. Mediante esta técnica se puede observar que cuando una célula muere, presenta un aumento agudo de la intensidad de fluorescencia seguido de una caída abrupta de la señal por dilución del fluóroforo en el medio de ensayo, observándose de esta forma la desaparición de la célula en la imagen registrada (186). Teniendo en cuenta que con una magnificación de 40X, se observan alrededor de 600 células en el campo, esta técnica permite detectar un 0,002% de mortalidad celular, con la ventaja de saber el momento preciso en que una célula en el campo muere.

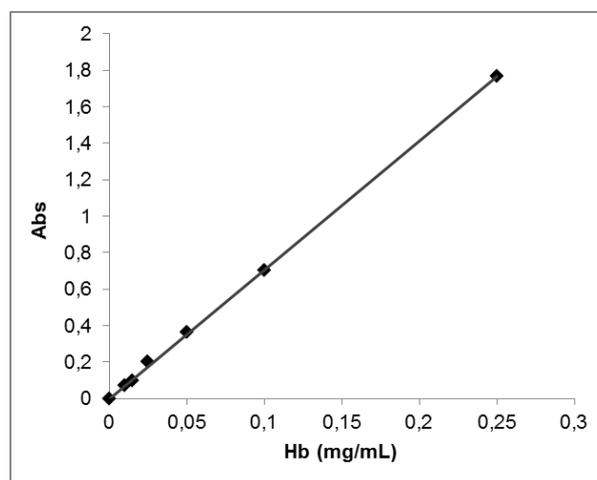
Los experimentos en que se detectó muerte celular (menos del 1% de los experimentos) fueron descartados.

### 2.7.2 Determinación del número de células adheridas.

La hemoglobina es una de las proteínas más abundantes en el eritrocito y su concentración puede ser determinada espectrofotométricamente midiendo su absorbancia a 405 nm, longitud de onda en la que absorbe tanto la hemoglobina oxigenada como carboxigenada. Conociendo el contenido de hemoglobina corpuscular media (CHCM, contenido promedio de hemoglobina por eritrocito) y el volumen corpuscular medio (VCM), al medir concentración de hemoglobina de un lisado celular se puede determinar el número de células.

Como se indicó previamente, una vez finalizados los experimentos de luminiscencia on-line se separó el sobrenadante y las células adheridas al cubreobjeto fueron lisadas por agregado de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25 mM. El lisado fue vortexeado 5 segundos y luego centrifugado a 1000g durante 1 minuto. Luego se tomaron 5  $\mu\text{L}$  del sobrenadante, se mezclaron con 195  $\mu\text{L}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25 mM y se midió la absorbancia de la muestra a 405 nm.

El contenido de hemoglobina fue transformado en número de células mediante curvas de calibración (**Fig. 17**), considerando CHCM y VCM como, 5,3 mM y 90 fl respectivamente.



**Figura 17. Curva de calibración de hemoglobina.** Absorbancia a 405 nm en función la concentración de hemoglobina

## 2.8 Medición de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular.

La determinación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en respuesta al MST7 se realizó por microscopía de epifluorescencia, utilizando Fluo4-AM.

Los eritrocitos ( $3 \times 10^6$  células) fueron adheridos a cubreobjetos pre-tratados con poli-D-lisina 0,001%. Luego fueron incubados con  $5 \mu\text{M}$  Fluo4-AM en medio RBC-2 durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con RBC-2 a temperatura ambiente para eliminar la sonda no incorporada a las células. Los cubreobjetos fueron montados en la cámara de medición del microscopio invertido de epifluorescencia. Se determinó la intensidad de fluorescencia en intervalos de 30 seg a  $\lambda_{\text{excitación}}$ : 495 nm y  $\lambda_{\text{emisión}}$ : 510 nm.

Todas las mediciones fueron realizadas a  $20^\circ\text{C}$ .

La conversión de la intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias) a concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se realizó mediante una calibración al final de cada experimento. Dado que los eritrocitos carecen de membranas internas, todo aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular registrado corresponde a la entrada de calcio desde el medio extracelular, por lo tanto la calibración se realizó en presencia de un ionóforo de calcio. Para la calibración se midió la intensidad de fluorescencia mínima ( $F_{\text{min}}$ ), mediante el agregado de 0,5 mM EGTA en un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$ , y la intensidad de fluorescencia máxima ( $F_{\text{máx}}$ ) por adición de 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , ambas determinaciones en presencia de ionomicina (ionóforo de calcio). Los resultados fueron transformados en concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular utilizando la siguiente ecuación:

$$[\text{Ca}_i^{2+}] = \frac{K_d \times (F - F_{\text{min}})}{(F_{\text{máx}} - F)}$$

Con una constante de disociación  $K_d = 345 \text{ nM}$  [187]. F representa la intensidad de fluorescencia a cada tiempo. Las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}_i$  obtenidas fueron corregidas considerando el cambio de volumen celular inducido por el MST7.

## **2.9 Medición de AMPc intracelular.**

La determinación de AMPc se hizo por RIA utilizando el método descrito por Stainer y col. [188] con modificaciones [189-190]. El método se basa en la competición entre AMPc presente en la muestra y una cantidad fija de [ $^{125}\text{I}$ ]AMPc por la unión a un anticuerpo. El TME-cAMP fue radiomarcado con  $\text{Na}[^{125}\text{I}]$  por el método de la cloramina T (actividad específica 600 Ci/mmol) [191].

Eritrocitos humanos o caninos, en un hematocrito de 50%, fueron incubados con 10  $\mu\text{M}$  MST7 o RBC-2 (control) durante 10 min a temperatura ambiente. La reacción fue luego detenida por el agregado de 4 mL de etanol frío con 1 mM HCl. La mezcla resultante se centrifugó 4 min a 14000 x g a 4 °C. El sobrenadante fue incubado overnight a -20 °C para precipitar las proteínas remanentes.

Las muestras fueron luego centrifugadas durante 10 min a 3700 g a 4 °C. El sobrenadante fue luego secado por centrifugación al vacío (Savant™ SPD131DDA SpeedVac™ Concentrador) y el residuo se resuspendió en buffer acetato de sodio 50 mM (pH 6,00). Las muestras y los estándares de calibración fueron acetiladas y medidas en un contador Beckman Gamma 4000. Los coeficientes de variación inter ensayo fueron menores al 10 %.

## **2.10 Medición de sodio intracelular.**

La determinación del contenido de sodio intracelular se hizo por electroforesis capilar, en un equipo P/ACE MDQ (BeckmanCoulter, Brea, CA, U.S.A.), equipado con un detector de arreglo de diodos UV – visible.

Para ello, los eritrocitos ( $3 \times 10^6$  células) fueron adheridos a cubreobjetos pre-tratados con poli-D-lisina 0,001% y expuestos a RBC-2 (control) o MST7  $10 \mu\text{M}$  durante 2 o 5 minutos. Inmediatamente se retiró el sobrenadante y se lavaron las células 3 veces con buffer HEPES-Imidazol-Sacarosa para eliminar todo el sodio extracelular. Se agregaron  $2 \mu\text{L}$  de  $\text{LiCO}_3$  4 mM (estándar interno) y luego se lisaron las células mediante la exposición a TCA (20% final) a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. El lisado se recogió y se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 minutos a 14000 rpm. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se secó durante 2 horas en un concentrador SpeedVac™. Las muestras secas fueron conservadas a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  en heladera. Dado el alto contenido de sacarosa en la muestra, las muestras “secas” presentaron una consistencia de gel, no pudiéndose eliminar el agua completamente. Finalmente, las muestras se reconstituyeron con  $5 \mu\text{L}$  de agua milli Q al momento de su análisis, quedando un volumen final de  $20 \mu\text{L}$ .

Las condiciones de corrida fueron las siguientes:

- Capilar,  $75 \mu\text{m}$  d.i x 60 cm de largo total, 50 cm hasta el detector
- BGE (solución de corrida), compuesto por Imidazol 5,0 mM, ácido alfa-hidroxiisobutírico 6,5 mM, pH 3,0.
- Inyección, 10 seg a 1 kV.
- Volumen de inyección,  $10 \mu\text{L}$
- Voltaje, 20 kV, polaridad normal.
- Detección, indirecta a 254 nm.

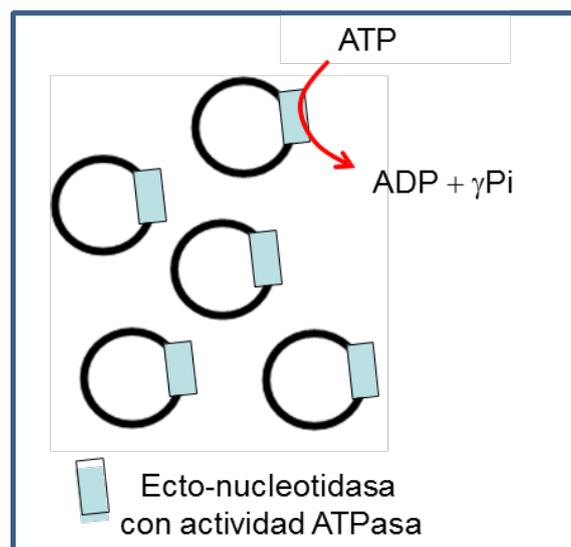
Los resultados fueron expresados en forma relativa al control, en el que el valor basal (control) del contenido de sodio es 1 y los cambios observados con el tratamiento se expresan en relación el mismo ( $\text{Na}^+_r$ ).

## 2.11 Actividad ecto-ATPasa.

Uno de los mecanismos involucrados en el metabolismo del ATPe es la hidrólisis del nucleótido en el medio extracelular. Esta hidrólisis es facilitada por enzimas de membrana denominadas ectonucleotidasas. Se determinó la actividad ecto-ATPasa de ecto-nucleotidasas presentes en los eritrocitos humanos y de ratón, mediante un método radioactivo y un método luminiscente, que se describen a continuación.

### 2.11.1 Actividad ecto-ATPasa por método radiactivo.

Dado que el ATP extracelular no puede ser captado por células enteras [96], cuando se agrega ATP exógeno a una suspensión celular, la velocidad de hidrólisis de ATP a ADP +  $\gamma$ Pi que se observa puede ser definida en estas condiciones como actividad ecto-ATPasa (**Fig. 18**).



**Figura18.** Suspensión celular con agregado de ATP exógeno. Como el ATPe es impermeable a las células, la velocidad de hidrólisis del ATP a ADP + Pi que se observa corresponde a la actividad ecto-ATPasa de una o más ecto-nucleotidasas. Estas enzimas de membrana exhiben sus sitio activo expuesto al medio extracelular.

La técnica se basa en determinar la velocidad inicial ( $v_i$ ) de formación del  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{Pi}$  liberado a partir de  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  agregado a una suspensión celular [105,192]. La  $v_i$  de la curva de  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{Pi}$  en función del tiempo permite estimar la actividad ecto-ATPasa.

Se evaluó la actividad ecto-ATPasa en condiciones parecidas a las fisiológicas, ya que se utilizaron concentraciones nM de ATP, similares a las esperables in vivo, y el ensayo se realizó con células enteras. Se evaluó así la capacidad de las células de hidrolizar ATP mediante una o varias ectonucleotidasas.

Brevemente, la actividad ecto-ATPasa fue determinada a 20 °C en suspensiones celulares con un hematocrito final de 20% en RBC-2. La reacción fue iniciada con el agregado de  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  (0.27 Ci/mmol) disueltos en RBC-2. Inmediatamente, y a intervalos de tiempo definidos, se tomaron alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular, se centrifugaron a 900 g durante 30 segundos y 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante se mezclaron con 750  $\mu\text{l}$  de solución de frenado fría (conteniendo 4,05 mM  $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6$  y 0,83 mM  $\text{HClO}_4$ ). Luego se agregaron 600  $\mu\text{l}$  de isobutanol y se agitó durante 40 segundos. Como consecuencia de este tratamiento, el molibdato de la solución de frenado forma un complejo con el fosfato gamma presente en el medio de reacción para dar un complejo fosfomolibdico extraíble con isobutanol. Posteriormente las fases fueron separadas por centrifugación a 1000g durante 3 minutos, se extrajeron 200  $\mu\text{l}$  de la fase isobutanólica y se mezclaron con 2 ml de NaOH 0,5 M. En estas condiciones, el NaOH destruye el complejo fosfomolibdico y libera el ortofosfato. La radiactividad de las muestras fue medida mediante efecto Cerenkov en un contador de centelleo líquido Wallac 1214 Rackbeta.

La producción de  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{Pi}$  fue determinada a los 0, 5, 10, 20, 40 y 60 minutos. El mismo procedimiento se realizó manteniendo constante el  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  y variando las concentraciones de ATP frío (de 150 a 900 nM) en presencia o ausencia de MST7.

Para calcular la actividad ecto-ATPasa se graficó la concentración de  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{Pi}$  en función del tiempo para cada una de las concentraciones de ATP frío ensayadas y se ajustó la siguiente ecuación

$$Y = Y_0 + A \times (1 - \exp^{-k \times t})$$

a cada una de las curvas; donde  $Y$  e  $Y_0$  son los valores de  $[\gamma^{32}\text{Pi}]$  a tiempo  $t$  y a  $t=0$ , respectivamente;  $A$  representa el máximo valor alcanzado por  $Y$  en el tiempo y  $k$  es un coeficiente de velocidad. Los parámetros de mejor ajuste a la regresión fueron usados para calcular  $v_i$  como  $k \times A$ . Posteriormente se graficó  $v_i$  en función de la concentración de ATP, obteniéndose así una curva de sustrato.

### *2.11.2 Medición por luminiscencia on-line.*

La  $v_i$  de hidrólisis de ATP a ADP +  $\gamma\text{Pi}$  fue estimada a partir del curso temporal de la desaparición de ATPe, utilizando la técnica de luminiscencia on-line descrita en 2.5.2.1.

Brevemente, se montaron cubreobjetos con suspensiones de  $3 \times 10^6$  ó  $30 \times 10^6$  células en la cámara de medición del luminómetro y se agregó mezcla de reacción. Se midió la intensidad de luz basal durante 20 minutos, se agregó ATP exógeno en concentraciones finales de 103, 206 and 326 o 863 nM (en experimentos separados) y se continuó midiendo la intensidad de luz durante 20 minutos más. Utilizando curvas de calibración se transformaron los datos de luz emitida en concentración de ATP para cada tiempo. A partir de la disminución de ATPe en el tiempo fue posible estimar  $v_i$ .

### **2.12 Análisis estadístico de los datos.**

El efecto de los tratamientos fue evaluado mediante ANOVA de una vía seguido se un test a *posteriori* de Tukey-Kramer. Los valores de  $p \leq 0,05$  fueron considerados significativos. En todos los casos los resultados se muestran como valores promedio.

## 2.13 Modelado matemático de la cinética de ATPe de eritrocitos expuestos a MST7.

Se desarrolló un modelo matemático para explicar los resultados experimentales observados en las cinéticas de ATPe cuando los eritrocitos humanos son expuestos a MST7 10  $\mu$ M.

En el modelo, la concentración de ATPe es controlada por la velocidad de liberación de ATP ( $J_R$ ), que incluye uno o más mecanismos de salida no lítica de ATP, y la velocidad de consumo de ATPe por la actividad ecto-ATPasa ( $J_V$ ).

Los cambios en el tiempo en la concentración de ATPe están dados por:

$$\frac{d[ATPe]}{dt} = J_R - J_V \quad \text{Ec. 1}$$

donde  $J_R$  y  $J_V$  son los flujos de salida de ATP y de hidrólisis de ATPe, respectivamente.

### 2.13.1 Velocidad de consumo de ATPe ( $J_V$ ).

Luego de analizar los resultados experimentales de actividad ecto-ATPasa en eritrocitos intactos en suspensión, para un amplio rango de concentraciones de ATPe (100-900 nM, ver **Fig. 39 C**, sección 4.5, capítulo 4), se obtuvo una expresión lineal que describe la dependencia del  $J_V$  con la concentración de ATPe:

$$J_V = k_{ATP} \cdot [ATPe] \quad \text{Ec. 2}$$

Dado que el MST7 no afecta la actividad ecto-ATPasa (**Fig. 39 A**, sección 4.5, capítulo 4), se asumió que  $k_{ATP}$  es constante a lo largo del experimento, tanto en ausencia como en presencia de MST7.

### 2.13.2 Salida no lítica de ATP ( $J_R$ ).

En eritrocitos humanos expuestos a MST7, la liberación de ATP ocurre en ausencia de lisis y puede ser explicada por uno o más mecanismos de transporte. Se asume que el eflujo de ATP es mediado por un mecanismo de difusión facilitada no saturable como:

$$J_R = P([ATP_i] - [ATP_e]) \quad \text{Ec. 3}$$

Donde P es la permeabilidad del ATP (cuyas propiedades se explican más abajo), y  $[ATP_i]$  y  $[ATP_e]$  son las concentraciones intracelular y extracelular de ATP, respectivamente. La diferencia entre ambas concentraciones representa el gradiente químico de ATP a través de la membrana plasmática del eritrocito.

Según la ecuación 3,  $J_R$  depende de "P" multiplicado por el gradiente químico del ATP. El gradiente eléctrico del ATP, por otro lado, pudo ser calculado como " $z \times F \times V_m$ " (donde z representa la carga eléctrica del ATP, F es la constante de Faraday y  $V_m$  es el potencial eléctrico de membrana). Sin embargo, aun considerando que a pH intracelular (pH=7) la carga eléctrica del ATP (un promedio ponderado de todas las especies aniónicas de ATP, ver [18]) es aproximadamente -2,4, debido al bajo potencial de membrana de los eritrocitos humanos (alrededor de -10 Mv [193]), el gradiente eléctrico del ATP representa alrededor del 1% del total del gradiente electroquímico del ATP y por lo tanto no fue considerado en la Ec.3.

Dado que los cambios en la concentración de  $ATP_e$  ocurren en el rango nanomolar mientras que la concentración de  $ATP_i$  es milimolar (ver Resultados 3V - MST7) el gradiente químico es aproximadamente igual a la concentración de  $ATP_i$  y por lo tanto  $J_R$  pudo ser modelada como:

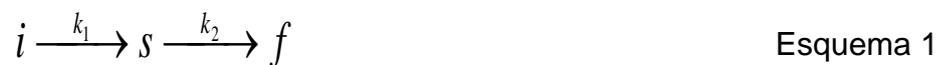
$$J_R = P \cdot [ATP_i] \quad \text{Ec. 4}$$

### 2.13.3 Un modelo de dos vías para la salida de ATP.

En eritrocitos expuestos a MST7, la cinética de la concentración de ATPe observada (**Fig. 32 A**, sección 4.2, capítulo 4) se puede interpretar suponiendo cambios dependientes del tiempo en el flujo de liberación de ATP ( $J_R$ ). El modelo asume que los cambios en  $J_R$  son debido a diferentes grados de activación de las vías responsables del flujo de salida de ATP.

Por consiguiente, en la condición pre-estimulo (en ausencia de MST7), hay un estado basal de flujo estacionario e isosmótico (i). La exposición a MST7 induce una transición irreversible instantánea a un estado (s) estimulado, seguido por un decaimiento irreversible posterior a un estado final (f).

Para cada una de las vías de salida de ATP, esta transición se formula como un proceso de dos pasos irreversibles:



donde  $k_1$  y  $k_2$  son constantes de velocidad de primer orden que gobiernan la cinética de esta transición. Como se explica más abajo, la primera transición (i->s) fue considerada un paso instantáneo luego de la adición de MST7.

Para una vía de salida determinada, la fracción de vías en estado inicial, estimulado y final son denominadas  $x_i$ ,  $x_s$  y  $x_f$ , respectivamente y varían con el tiempo de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

antes del agregado de MST7

$$x_i = 1, x_s = x_f = 0 \quad \text{Ec. 5}$$

luego de la exposición a MST7

$$x_i = 0 \quad \text{Ec. 6}$$

$$x_s = e^{-k_2 \cdot (t-t_s)} \quad \text{Ec. 7}$$

$$x_f = 1 - e^{-k_2 \cdot (t-t_s)} \quad \text{Ec. 8}$$

Donde  $t_s$  indica el tiempo al que se añadió MST7, de tal manera que en cualquier momento los valores de  $x$  varían de 0 a 1 y están relacionados por:

$$x_i + x_s + x_f = 0 \quad \text{Ec.9}$$

Para un modelo de una vía de salida, la permeabilidad  $P$  en las Ec. 3 y 4 está dada por:

$$P = x_i \cdot p_i + x_s \cdot p_s + x_f \cdot p_f \quad \text{Ec. 10}$$

por lo que  $J_R$  se puede expresar como:

$$J_R = (x_i \cdot p_i + x_s \cdot p_s + x_f \cdot p_f) \cdot ([ATP_i] - [ATP_e]) \quad \text{Ec. 11}$$

donde  $p_i$ ,  $p_s$  y  $p_f$  son los parámetros de permeabilidad de los estados inicial, estimulado y final de la vía de salida, respectivamente. Dado que los valores de estos parámetros no cambian con el tiempo, y el gradiente químico sólo varía ligeramente durante la inducción con MST7 (ver más adelante), el curso temporal de  $J_R$  es controlado principalmente por la dependencia temporal de  $x_i$ ,  $x_s$  y  $x_f$ .

En el caso de dos vías de salida sometidos a una transición de dos pasos similar (es decir,  $i \rightarrow s \rightarrow F$ , como en el Esquema 1), con cada flujo siendo impulsado por el mismo gradiente químico (es decir,  $[ATP_i] - [ATP_e]$ ),  $J_R$  se puede expresar como la suma de dos flujos, con cada flujo teniendo sus parámetros de permeabilidad correspondientes, donde tanto  $P_1$  como  $P_2$  se describen por:

$$J_R = J_{R1} + J_{R2} = (P_1 + P_2) \cdot ([ATP_i] - [ATP_e]) \quad \text{Ec. 12}$$

$$P_1 = x_{i1} \cdot p_{i1} + x_{s1} \cdot p_{s1} + x_{f1} \cdot p_{f1} \quad \text{Ec. 13}$$

$$P_2 = x_{i2} \cdot p_{i2} + x_{s2} \cdot p_{s2} + x_{f2} \cdot p_{f2} \quad \text{Ec. 14}$$

por lo tanto, antes de la adición de MST7,

$$P = p_{i1} + p_{i2} \quad \text{Ec. 15}$$

luego de aplicar el estímulo,

$$P_1 = e^{-k_{21} \cdot (t-t_s)} \cdot p_{s1} + (1 - e^{-k_{21} \cdot (t-t_s)}) \cdot p_{f1} = p_{f1} + e^{-k_{21} \cdot (t-t_s)} \cdot (p_{s1} - p_{f1}) \quad \text{Ec. 16}$$

$$P_2 = e^{-k_{22} \cdot (t-t_s)} \cdot p_{s2} + (1 - e^{-k_{22} \cdot (t-t_s)}) \cdot p_{f2} = p_{f2} + e^{-k_{22} \cdot (t-t_s)} \cdot (p_{s2} - p_{f2}) \quad \text{Ec. 17}$$

donde  $k_{21}$  y  $k_{22}$  son las constantes de velocidad de primer orden para la segunda transición (**s** → **f**) de las vías de salida 1 y 2, respectivamente.

Suponiendo que la concentración de ATP intracelular permanece constante en el tiempo (ver resultados), el modelo predice que, tras la activación instantánea del flujo de  $[\text{ATPi}] \cdot (p_{i1} + p_{i2})$  a  $[\text{ATPi}] \cdot (p_{s1} + p_{s2})$ ,  $J_R$  se describe por una función decreciente biexponencial de tiempo, con lo que  $J_R$  decrece de  $[\text{ATPi}] \cdot (p_{s1} + p_{s2})$  a  $[\text{ATPi}] \cdot (p_{f1} + p_{f2})$ .

De esta manera  $J_R$  (considerado como el flujo total de ATP) fue capaz de describir la cinética de ATPe en ausencia de carbenoxolona (CBX), siendo la contribución de la actividad ecto-ATPasano significativa.

Sobre la base de las características anteriores del modelo, la cinética de la concentración de ATPe viene dada por:

$$[\text{ATPe}] = [\text{ATPe}]_{\text{basal}} e^{-k_{\text{ATP}}(t-t_s)} + [\text{ATPi}] \left[ \left( \frac{p_{f1} + p_{f2}}{k_{\text{ATP}}} - \frac{p_{s1} - p_{f2}}{k_{21} - k_{\text{ATP}}} - \frac{p_{s2} - p_{f2}}{k_{22} - k_{\text{ATP}}} \right) (1 - e^{-k_{\text{ATP}}(t-t_s)}) + \frac{p_{s1} - p_{f1}}{k_{21} - k_{\text{ATP}}} (1 - e^{-k_{21}(t-t_s)}) + \frac{p_{s2} - p_{f2}}{k_{22} - k_{\text{ATP}}} (1 - e^{-k_{22}(t-t_s)}) \right] \quad \text{Ec. 18}$$

En el modelo, se asumió que  $J_{R1}$  era totalmente bloqueado por CBX. Esto significa que, en presencia de CBX,  $J_R$  será una función monoexponencial decreciente de tiempo y la cinética de la  $[\text{ATPe}]$  será dada por:

$$[\text{ATPe}] = [\text{ATPe}]_{\text{basal}} e^{-k_{\text{ATP}}(t-t_s)} + [\text{ATPi}] \left[ \left( \frac{p_{f2}}{k_{\text{ATP}}} - \frac{p_{s2} - p_{f2}}{k_{22} - k_{\text{ATP}}} \right) (1 - e^{-k_{\text{ATP}}(t-t_s)}) + \frac{p_{s2} - p_{f2}}{k_{22} - k_{\text{ATP}}} (1 - e^{-k_{22}(t-t_s)}) \right] \quad \text{Ec. 19}$$

En la Tabla 5 se muestran los parámetros del modelo.

**Tabla 5: Parámetros del modelo.**

	Iso	Iso + CBX	Hiper
$k_{21} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$6.1 \pm 0.2$	*	$3.5 \pm 0.1$
$k_{22} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$0.32 \pm 0.02$	$1.13 \pm 0.01$	$0.33 \pm 0.02$
$p_{f \text{ total}} \text{ (10}^{-8} \text{ min}^{-1}\text{)}$	$110 \pm 3$	*	$50 \pm 2$
$p_{f2} \text{ (10}^{-8} \text{ min}^{-1}\text{)}$	$50 \pm 2$	*	**
$p_{s1} \text{ (10}^{-5} \text{ min}^{-1}\text{)}$	$35.5 \pm 0.9$	*	$10.9 \pm 0.2$
$p_{s2} \text{ (10}^{-5} \text{ min}^{-1}\text{)}$	$0.83 \pm 0.04$	$6.35 \pm 0.07$	$0.47 \pm 0.03$
$p_i \text{ (10}^{-8} \text{ min}^{-1}\text{)}$	$2.24 \pm 0.01$	$2.76 \pm 0.01$	$2.166 \pm 0.005$

Los resultados son los valores del mejor ajuste obtenido al ajustar el modelo a los datos experimentales.

(\*) Los mejores valores ajustados de estos parámetros son iguales en presencia o en ausencia de CBX, como se demuestra por ajuste simultáneo a los datos experimentales.

(\*\*) Mejor valor ajustado proporcionado por ajuste a los datos obtenidos en medio isotónico (Iso).

#### 2.13.4 Ajuste de distintos modelos a los datos experimentales.

Se aplicaron ajustes modelo dependiente los datos experimentales de la cinética de ATPe, con la restricción de que los modelos ajustados debían ajustar simultáneamente los perfiles de acumulación de ATPe en presencia y ausencia de CBX.

Consideramos un modelo de dos vías que explicara  $J_{R1}$  y  $J_{R2}$  de la Ec. 12.

#### 2.13.5 Evaluación de modelos más simples.

Durante la construcción del modelo, probamos modelos alternativos más simples que no proporcionaron un ajuste aceptable a los datos experimentales de la **Fig.32 A**, sección 4.2, capítulo 4. En todos los casos se aplicó el criterio de Akaike[194], que no sólo premia la bondad de ajuste, sino que también incluye una penalidad, que es una función creciente del número de parámetros estimados. Esta sanción desalienta el aumento innecesario del número de parámetros.

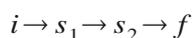
1- Un modelo de dos pasos, en el cual hay solo una transición de un estado inicial a un estado final ( $i \rightarrow f$ ). Este modelo define el flujo de ATP por una función de

tiempo monoexponencial creciente, en la cual  $J_R$  debe aumentar en un paso repentino y permanecer estable de ahí en adelante. En este caso, la cinética de ATP predicha no fue capaz de ajustar a los datos experimentales, a menos que se fijaran valores de actividad ecto-ATPasa muy elevados (no compatible con los resultados de la **Fig.39**, sección 4.5, capítulo 4).

2- Un modelo de tres pasos ( $i \rightarrow s \rightarrow f$ ), similar al modelo usado para las simulaciones (Esquema 1), excepto que el flujo en el estado final fue fijado para ser igual al flujo en el estado inicial. Este modelo predice que la concentración de ATPe final debe ser igual a la concentración de ATPe inicial, lo cual no coincide con la cinética de ATPe observada.

En esencia, para describir la cinética de ATPe fue necesario suponer un flujo de ATP compuesto por una función de tiempo biexponencial.

Esto significa que en lugar de nuestro modelo actual donde  $J_R$  está compuesto por  $J_{R1}$  y  $J_{R2}$ , con cada uno de estos subflujos experimentando una transición de dos pasos irreversibles (es decir,  $i \rightarrow s \rightarrow f$ ), los resultados fueron también compatibles con una liberación de ATP mediada por una sola vía de salida (tal vez un complejo supramolecular) sufriendo una transición irreversible de tres pasos.



Es decir, para explicar los resultados experimentales, dos transiciones irreversibles (2 subflujos) compuestas por dos pasos, puede ser reemplazada por una única transición irreversible (un flujo único) compuesta por tres pasos. En este caso se cumple el requisito de tener al menos 2 funciones exponenciales de tiempo para definir el flujo de ATP y la bondad del ajuste es tan buena como en el modelo propuesto. La gran dificultad de un modelo de 1 vía radica en modelar el efecto del

CBX. Es decir, no es posible asignar de manera unívoca que parámetros de dicho modelo se verían afectados y en qué medida por este bloqueante.

Estudios futuros podrían permitir identificar cómo y cuándo diferentes vías de salida de ATP (panexina 1, VDAC, CALHM1, etc) actúan como entidades separadas o en asociación.

### *2.13.6 Efectos del aumento del volumen celular sobre el gradiente químico de ATP.*

Para explicar los cambios en el volumen celular inducido por MST7, la concentración de ATPi puede ser descompuesta como:

$$[ATPi] = \frac{mATPi}{V_t} \quad \text{Ec. 20}$$

Donde mATPi es el contenido intracelular de ATP en moles y Vt es el volumen celular promedio de los eritrocitos a diferentes valores de tiempo durante el experimento. Dado que la exposición de los eritrocitos a MST7 no altera mATPi, esta magnitud fue considerada constante.

La técnica fluorométrica utilizada para los experimentos volumétricos cuantifica los cambios de volumen relativo en función del tiempo (Vr, **Fig. 47 B**, sección 4.6.5, capítulo 4).

$$V_r = \frac{V_t}{V_0} \quad \text{Ec. 21}$$

donde el volumen a tiempo 0 es uno (V0) y los cambios de volumen en el tiempo (Vt) son relativos a este valor.

Considerando las Ec. 3,20 y 21, JR puede ser expresado como:

$$J_R = P \cdot \left( \frac{mATPi}{V_0 \cdot V_r} - [ATPe] \right) \quad \text{Ec. 22}$$

En esta ecuación, los valores de  $V_r$  para cada tiempo fueron obtenidos por el ajuste de una función biexponencial a los datos experimentales (**Fig. 47 B**, sección 4.6.5, capítulo 4).

#### *2.13.7 Predicciones del modelo para evaluar la importancia de la actividad ecto-ATPasa.*

Luego del ajuste del modelo a los datos experimentales, y de la consiguiente obtención de los valores de mejor ajuste de los parámetros, se procedió a utilizar el modelo para predecir la importancia relativa de la actividad ecto-ATPasa en la cinética de ATPe. Las predicciones fueron hechas asumiendo que  $k_{ATP} = 0$  (es decir, bloqueo de la actividad ecto-ATPasa) o  $k_{ATP} = 0,051 \text{ min}^{-1}$  (alrededor de 43 veces la  $k_{ATP}$  derivada de la **Fig.39**, sección 4.5, capítulo 4).

#### *2.13.8 Ajuste de los parámetros del modelo*

Los mejores valores de ajuste de los parámetros, sus errores estándar asociados y todas las simulaciones mostradas en resultados se obtuvieron numéricamente con el software Copasi, versión 4.7 [195].

# Resultados



# 3V, LOS TRES VALIENTES

## Introducción.

Cuando los eritrocitos son expuestos a agentes farmacológicos capaces de inducir un aumento en la concentración de AMPc, la respuesta se traduce en un aumento de la liberación de ATP al medio extracelular.

El aumento de la concentración de AMPc lleva a la activación de la PKA y, por mecanismos no del todo conocidos, se produce la salida de ATP. Esta vía de señalización involucra también a las fosfodiesterasas, enzimas que degradan al AMPc para finalizar la señal (ver **Fig. 5** de la Introducción).

Nuestro grupo de trabajo optimizó la formulación de un cocktail que induce, en eritrocitos humanos, un aumento agudo y robusto de la concentración de AMPc [196]. El cocktail, llamado 3 Valientes (3V), está compuesto por isoproterenol 10  $\mu$ M, forskolina 30  $\mu$ M y papaverina 100  $\mu$ M. El isoproterenol es un agonista beta adrenérgico que incrementa los niveles de AMPc vía activación de la proteína trimérica Gs; la forskolina es un activador de adenilato ciclasas (AC) y la papaverina es un inhibidor de fosfodiesterasas. Utilizados en combinación, en concentraciones optimizadas, los tres compuestos potencian el aumento de la concentración de AMPc inducida por activación  $\beta$ -adrenérgica.

En este capítulo se describen resultados de la cinética de acumulación de ATP extracelular (denominada "cinética de ATPe"), obtenida al exponer a los eritrocitos humanos al cocktail 3V.

La cinética de ATPe depende de la velocidad de liberación de ATP (que induce aumento de la concentración de ATPe) y de la hidrólisis extracelular de ATP (que induce disminución de la concentración de ATPe).

Esta cinética fue estudiada en varias condiciones y/o tratamientos:

- 1) Utilizando diferentes poblaciones eritrocitarias
- 2) Evaluando la participación de potenciales moduladores:
  - Variación del volumen celular
  - Adhesión celular a un sustrato
- 3) En presencia de bloqueantes de la salida de ATP
- 4) Utilizando distintas sondas para sensar ATPe.

Además se estudiaron:

- 5) La señalización intracelular por AMPc
- 6) La actividad ecto-ATPasa

Se muestra también estudios comparativos de las cinéticas de ATPe y la actividad ecto-ATPasa de otros modelos eritrocitarios (eritrocitos de perro, ratón y *Xenopus laevis*).

En todos los experimentos realizados, la acumulación de ATPe corresponde a la salida no lítica de ATP, ya que los experimentos en los que se detectó hemoglobina libre en el sobrenadante (menos del 1% de los experimentos) fueron descartados (ver sección 2.7.1, Materiales y Métodos).

### **3.1 ATP intracelular.**

En eritrocitos humanos la principal fuerza impulsora de la salida de ATP es el gradiente químico transmembrana del nucleótido. Sin embargo, dado a que la concentración de ATP intracelular (ATPi) es al menos tres órdenes de magnitud superior a la concentración de ATP extracelular (ATPe), el ATPi constituye el principal componente del gradiente químico que impulsa la salida de ATP.

Las determinaciones del contenido total de ATPi y del volumen celular (sección 2.8.1, Materiales y Métodos), permitieron calcular la concentración de ATPi, tanto en ausencia como en presencia de estímulos inductores de la salida de ATP.

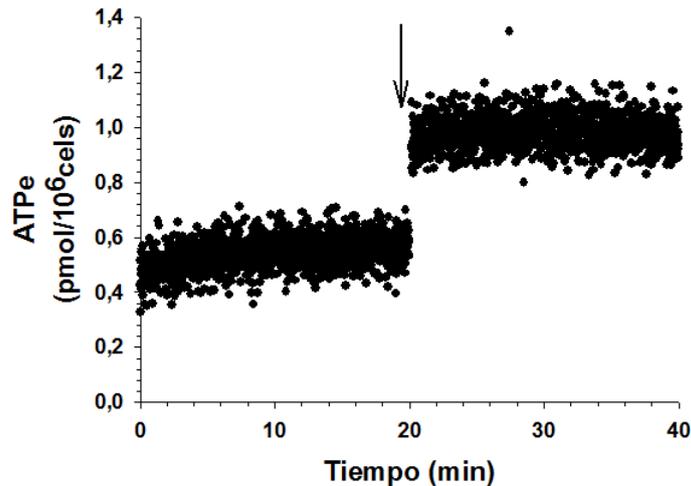
El volumen celular fue de  $90 \pm 7$  fl, y el contenido de ATPi de  $147,7 \pm 19,2$  pmoles/ $10^6$  células, resultando una concentración de  $2,05 \pm 0,27$  mM. No se observaron diferencias significativas en el valor de estos parámetros en ausencia o en presencia de 3V.

### **3.2 Cinética de ATPe de eritrocitos humanos estimulados con 3V.**

En la **Fig. 19** se muestra la cinética de ATPe de eritrocitos humanos expuestos a 3V.

Se utilizaron  $3 \times 10^6$  células en 60  $\mu$ l de medio de ensayo.

Se puede observar que, durante los primeros 20 minutos, la concentración basal de ATPe permanece estable en  $0,50 \pm 0,11$  pmoles/ $10^6$  células. La posterior estimulación con 3V promueve un incremento agudo de la concentración de ATPe hasta alcanzar un valor máximo a  $0,98 \pm 0,23$  pmoles/ $10^6$  células.



**Figura 19. Efecto del 3V sobre eritrocitos humanos.**

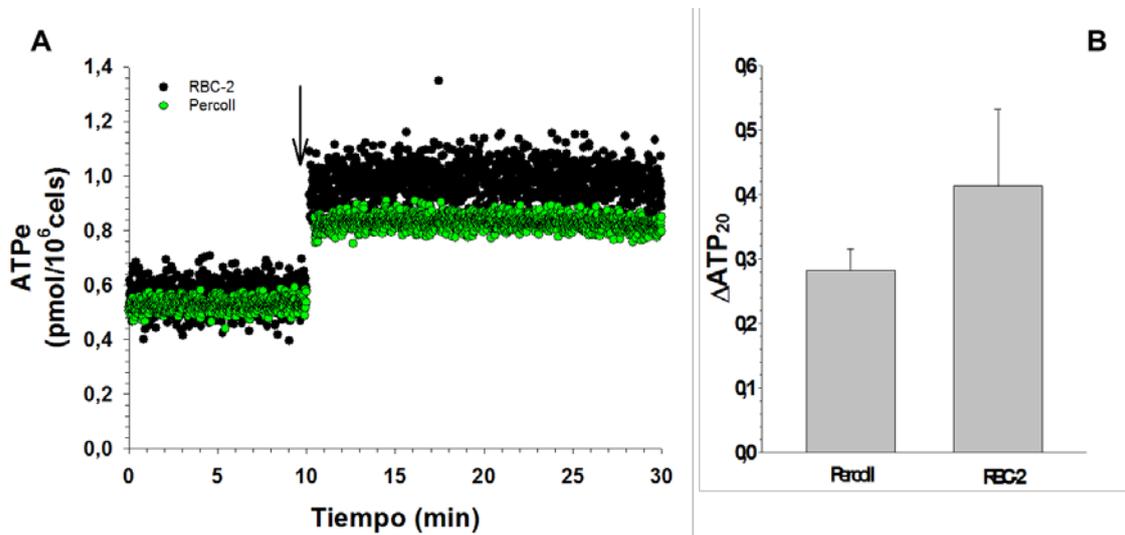
*Cinética de ATPe de eritrocitos expuestos a 3V.* Una suspensión de eritrocitos, conteniendo  $3 \times 10^6$  células, fue depositada sobre un cubreobjetos y luego de 20 minutos las células fueron expuestas a 3V (N=5, n=7). La flecha indica exposición al estímulo. Se indica en número de determinaciones (n) de preparaciones independientes (N).

Como se mencionó en la sección 2.4.1.2 de Materiales y Métodos, mediante el aislamiento de eritrocitos por lavado y centrifugación con RBC-2 se obtienen muestras con eritrocitos de todas las edades biológicas, es decir, toda la población eritrocitaria. Las células podrían responder en forma diferencial de acuerdo a su edad, aumentando de esta forma la variabilidad en la determinación de la cinética de ATPe.

Para evaluar esta idea, se realizaron experimentos de exposición a 3V utilizando una subpoblación de eritrocitos obtenida mediante purificación por gradiente de discontinuo de Percoll (sección 2.4.2.2, Materiales y Métodos). Mediante esta técnica se aislaron eritrocitos de edad biológica intermedia, que representan la mayor población de eritrocitos en sangre.

Los resultados obtenidos utilizando la separación por gradiente de Percoll (subpoblación de eritrocitos) o por lavado y centrifugación con RBC-2 (población total de eritrocitos) no presentaron diferencias significativas (de  $0,53 \pm 0,04$  a  $0,81 \pm$

0,04 pmoles/ $10^6$  células y de  $0,57 \pm 0,23$  a  $0,97 \pm 0,33$  pmoles/ $10^6$  células, respectivamente; Fig. 20A y B).



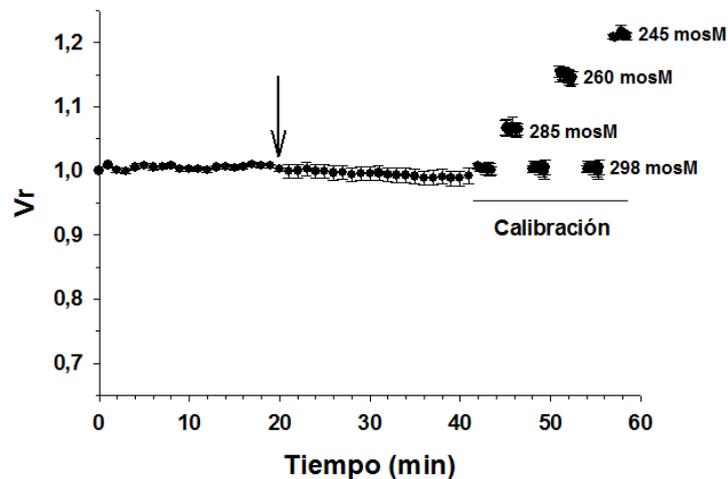
**Figura 20. Efecto del 3V sobre eritrocitos de diferentes edades biológicas.**

**A:** *Cinéticas de ATPe.* Eritrocitos humanos fueron purificados por lavado y centrifugación con RBC-2 (●; N= 5, n=7), obteniendo muestras de eritrocitos de todas las edades biológicas, o purificados por un gradiente de discontinuo de Percoll (●; N=2, n=4), obteniéndose muestras sólo de eritrocitos maduros. Cada muestra conteniendo  $3 \times 10^6$  células fue depositada sobre un cubreobjeto y, luego de 10 minutos, expuesta a 3V durante 20 minutos. La flecha indica la exposición al estímulo.

**B:** *Aumento de la concentración de ATPe dependiente de 3V, calculado de los datos de A.* Los valores están expresados como  $\Delta\text{ATP}_{20}$ , es decir, la diferencia entre la concentración de ATPe a los 20 min luego del estímulo y la concentración de ATPe basal. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES. Se indica el número de determinaciones (n) de preparaciones independientes (N).

### 3.3 Efecto del volumen celular sobre la concentración de ATPe de eritrocitos humanos expuestos a 3V.

Cambios en el volumen de los eritrocitos pueden alterar de manera directa o indirecta la liberación de ATP, con cambios concomitantes en la cinética de ATPe. Por lo tanto se investigó la posibilidad de que el volumen celular pudiera ser afectado por la exposición a 3V. Los resultados muestran que la exposición a 3V no altera el volumen celular (**Fig. 21**)



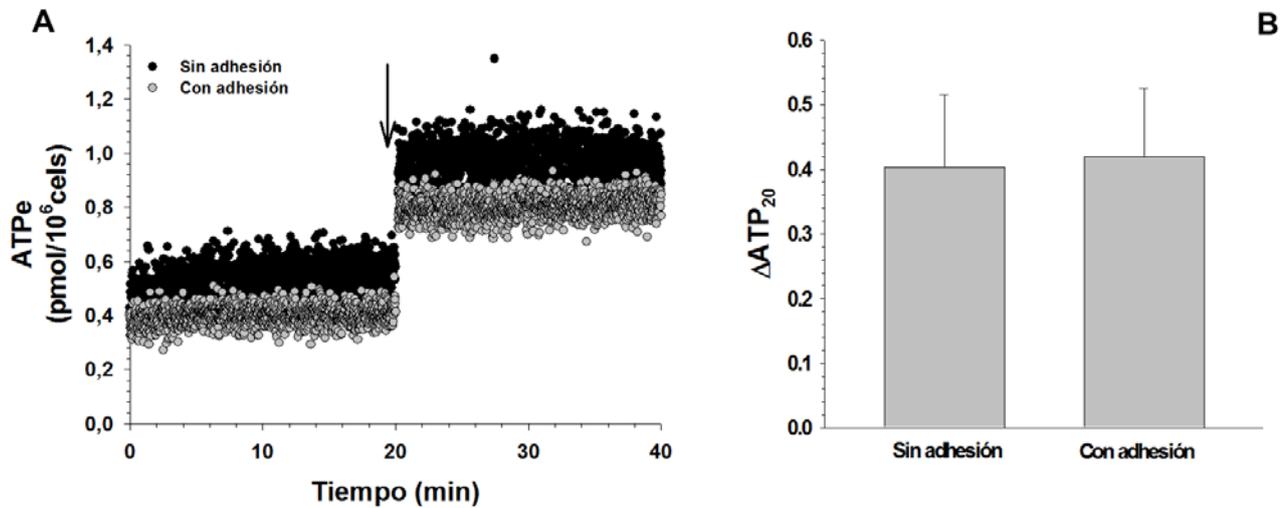
**Figura 21. Efecto de 3V sobre la cinética del volumen celular (Vr).**

Las células fueron cargadas con BCECF durante 1 h a temperatura ambiente y luego lavadas 3 veces con medio isosmótico (RBC-2, 298 mosM). Luego fueron adheridas a cubreobjetos tratados con poli-D-lisina 0,001% durante 1 h. Al inicio de la medición, las células fueron incubadas 20 min en medio isosmótico (298 mosM) y luego expuestas a 3V. Las calibraciones se realizaron al final de cada experimento exponiendo secuencialmente a las células a medios de ensayo con las siguientes osmolaridades (en mosM) 298, 286, 260 y 245. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES de 20–30 células (N=3, n=4). La flecha indica exposición al estímulo. Se indica en número de determinaciones (n) de preparaciones independientes (N).

### 3.4 Efecto de la adhesión celular sobre la concentración de ATPe de eritrocitos humanos expuestos a 3V.

La metodología empleada para la determinación de la variación del Vr requirió de la adhesión de las células a la superficie del cubreobjeto, mediante la utilización de un adherente. En consecuencia, fue necesario investigar si la adhesión celular afectaba la cinética de ATPe inducida por 3V.

Por lo tanto, los experimentos de cinética de ATPe se repitieron adhiriendo las células a cubreobjetos pre-tratados con poli-D-lisina 0,001% (**Fig. 22 A**). Los resultados obtenidos con células adheridas o no adheridas no presentaron diferencias significativas (de  $0,57 \pm 0,23$  a  $0,97 \pm 0,33$  pmoles/ $10^6$  células y de  $0,41 \pm 0,14$  a  $0,82 \pm 0,25$  pmol/ $10^6$  células, respectivamente; Fig. 4 B).



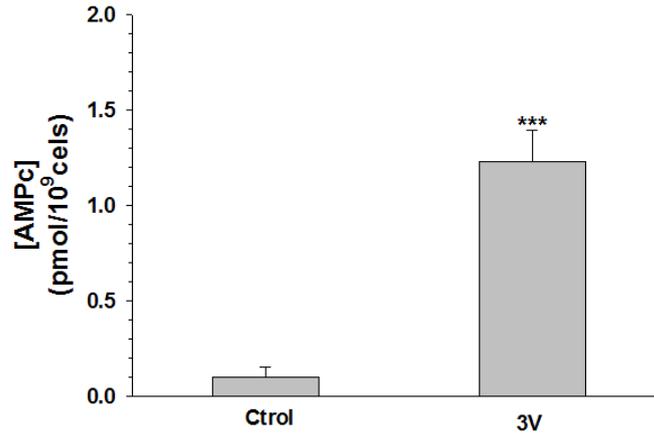
**Figura 22. Efecto de la adhesión celular sobre la cinética de ATPe de eritrocitos humanos.**

**A:** Cinética de ATPe de eritrocitos adheridos y sin adherir expuestos a 3V. Las células fueron adheridas a cubreobjetos tratados con poli-D-lisina 0,001% (●, Con adhesión; N=3, n=4) o depositados sobre cubreobjetos sin ningún adherente (●, Sin adhesión; N=5, n=7) y luego expuestos a 3V. La flecha indica la exposición al estímulo.

**B:** Aumento de la concentración de ATPe dependiente de 3V, calculado de los datos de A. Los valores están expresados como  $\Delta\text{ATP}_{20}$ , es decir, la diferencia entre la concentración de ATPe a los 20 min luego del estímulo y la concentración de ATPe basal. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES. Se indica el número de determinaciones (n) de preparaciones independientes (N).

### 3.5 Señalización intracelular.

A continuación, se chequeó si los cambios observados en la concentración de ATPe se correlacionaban con los cambios en la concentración de AMPc. La incubación de los eritrocitos con 3V indujo un aumento en la concentración de AMPc a los 10 min del estímulo, de  $0,10 \pm 0,01$  a  $1,23 \pm 0,16$  pmoles/10<sup>9</sup> células (**Fig. 23**).



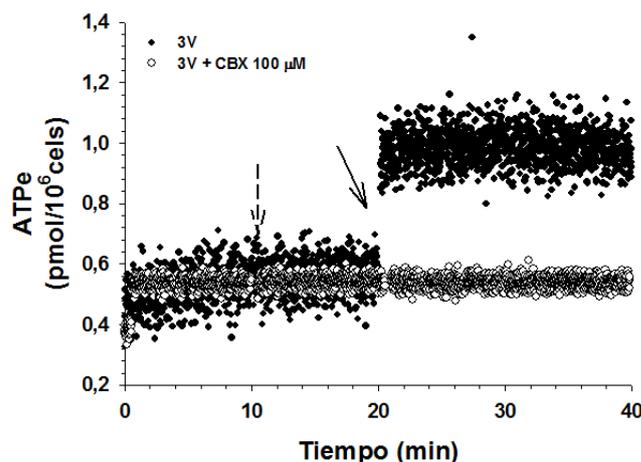
**Figura 23. Niveles de AMPc de eritrocitos humanos expuestos a 3V.**

Las células fueron incubadas por 10 min a temperatura ambiente en condiciones control o en presencia de 3V. La concentración de AMPc se determinó por radioinmunoensayo (N=4, n=15). Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES. (\*\*\*,  $p < 0.001$  respecto al control). Se indican el número de determinaciones (n) de preparaciones independientes (N).

### 3.6 Vías de salida de ATP en eritrocitos humanos y de ratón.

La panexina 1 fue sugerida como una de las vías de salida de ATP en eritrocitos humanos [71,197], por lo tanto investigamos la cinética de ATPe dependiente de 3V en presencia de carbenoxolona (CBX) un inhibidor de panexinas y conexinas.

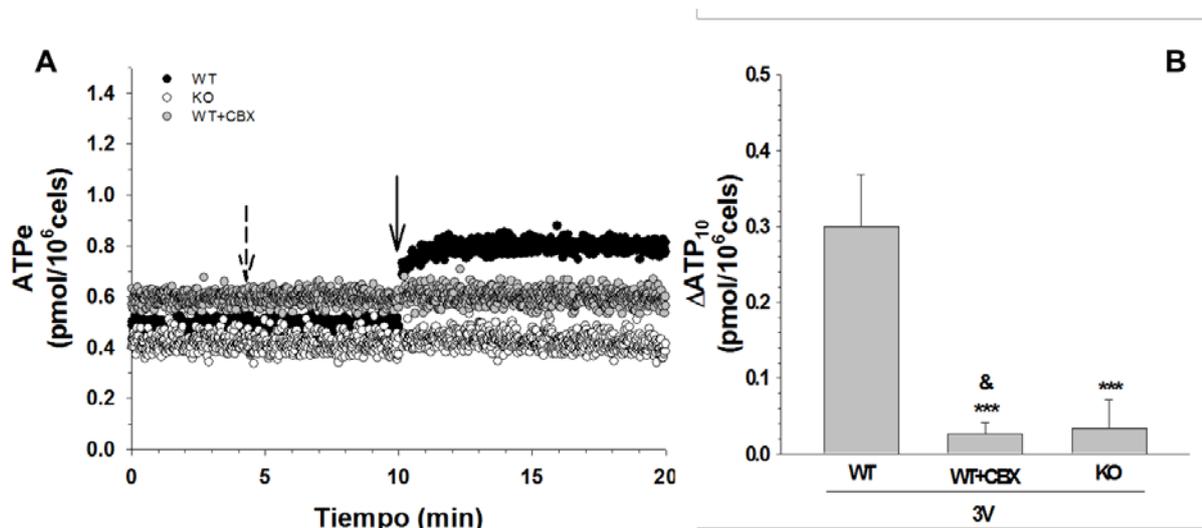
En la **Fig. 24** se observa que la pre-incubación de las células con CBX 100  $\mu$ M bloqueó completamente el incremento en la concentración de ATPe inducido por 3V.



**Figura 24. Efecto de CBX sobre la cinética de ATPe de eritrocitos expuestos a 3V.**

*Cinética de ATPe de eritrocitos pre-incubados con un bloqueante de panexina 1.* Pevio a la exposición a 3V, las células fueron pre incubadas durante 10 min con 10  $\mu$ M CBX ( $\circ$ , 3V + CBX, N=4, n=7). A fines comparativos se muestra la cinética de ATPe sin bloqueante ( $\bullet$ , 3V, Fig. 1) La flecha punteada indica el agregado de CBX y la flecha continua indica exposición a 3V. Se indican el número de determinaciones (n) de preparaciones independientes (N).

Para investigar más a fondo el papel de la panexina 1 en la liberación de ATP de eritrocitos humanos, se repitieron los experimentos utilizando eritrocitos de ratones wild type (WT) y knockout (KO) de panexina 1. De manera similar a lo observado en eritrocitos humanos, en eritrocitos de ratones WT expuestos a 3V se observó una inducción aguda de la acumulación ATPe hasta un valor de  $0,79 \pm 0,17 \text{ pmoles}/10^6$  células, respuesta que fue totalmente bloqueada por CBX. En concordancia con estos resultados, en eritrocitos de ratones KO, 3V no alteró la concentración de ATPe basal (**Fig. 25**).



**Figura 25. Salida de ATPe en eritrocitos de ratón expuestos a 3V.**

**A:** Cinética de ATPe de eritrocitos de ratón wild type (WT) y knockout (KO) de panexina 1. Las células fueron adheridas a cubreobjetos tratados con poli-D-lisina 0,001% y expuestas a 3V en presencia o ausencia de CBX  $10 \mu\text{M}$ . (●, WT, N=2, n=5; ○, KO, N=2, n=5; ●, WT+CBX, N=2, n=4). La flecha punteada indica agregado de CBX y la flecha continua indica el agregado de 3V.

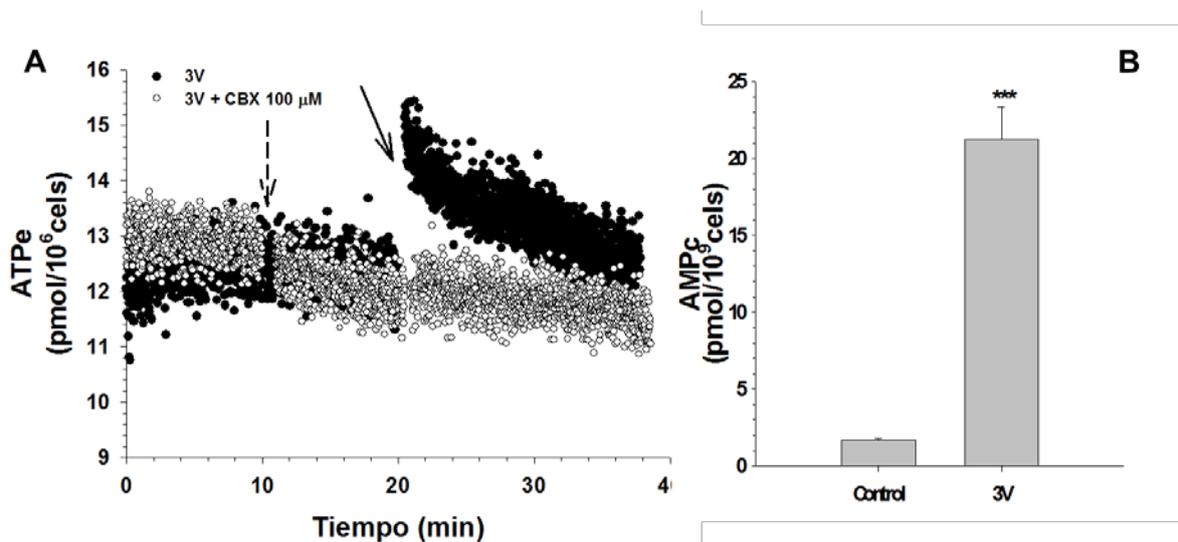
**B:** Aumento de la concentración de ATPe dependiente de 3V, calculado de los datos de A. Los valores están expresados como  $\Delta\text{ATP}_{10}$ , es decir, la diferencia entre la concentración de ATPe a los 20 min luego del estímulo y la concentración de ATPe basal. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES. (\*\*\*,  $p < 0.001$  respecto al WT; &, no significativo respecto al KO). Se indican el número de determinaciones (n) de preparaciones independientes (N).

### 3.7 Efecto de 3V en eritrocitos de *Xenopus* de perro.

Se planteó verificar si la dependencia de la liberación de ATP con el aumento de la concentración intracelular de AMPc es generalizable a eritrocitos de vertebrados no mamíferos. Para ello expusimos eritrocitos nucleados de *Xenopus laevis* a 3V. Se

trata en este caso de células nucleadas que exhiben un metabolismo energético más complejo que en el caso de eritrocitos anucleados de mamífero.

En eritrocitos de *Xenopus*, la estimulación con 3V llevó a un rápido aumento en la concentración de ATPe hasta un valor máximo de  $15,51 \pm 0,13$  pmoles/ $10^6$  células, seguido de una lenta disminución (**Fig. 26 A**). Simultáneamente se verificó un aumento de 12 veces de la concentración de intracelular AMPc (**Fig. 26 B**). Cuando las células fueron pre-incubadas con CBX  $100 \mu\text{M}$  se bloqueó completamente la liberación de ATP, al igual que lo observado en eritrocitos humanos (**Fig. 26 A**). En la **Fig. 26 A**, el decaimiento constante de la concentración de ATPe, tanto en ausencia como en presencia de 3V, se debe a la alta actividad ecto-ATPasa de estas células (ver Sección 3.9).



**Figura 26. Efecto de 3V sobre la cinética de ATPe y el contenido de AMPc de eritrocitos de *Xenopus laevis*.**

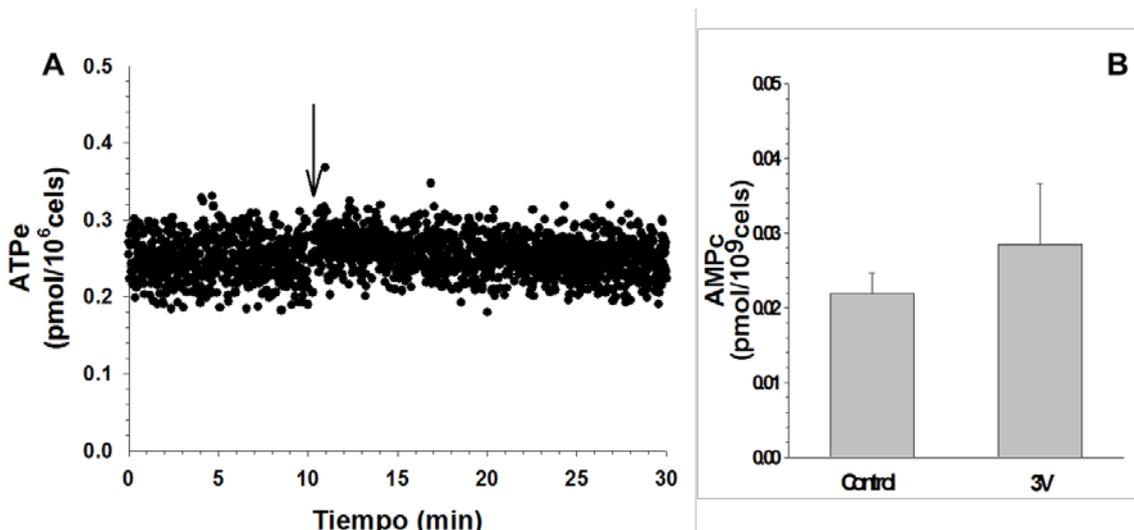
**A: Cinética de ATPe.** Las células ( $3 \times 10^5$  células) fueron depositadas sobre cubreobjetos y luego expuestas a 3V, con ( $\circ$ ,  $N=3$ ,  $n=6$ ) o sin ( $\bullet$ ,  $N=3$ ,  $n=6$ ) incubación previa con CBX  $100 \mu\text{M}$ . La flecha punteada indica el agregado de CBX y la flecha continua exposición a 3V.

**B: Contenido de AMPc.** Los eritrocitos se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente en condiciones control o en presencia de 3V. El contenido de AMPc ( $N=4$ ,  $n=4$ ) se determinó por radioinmunoensayo. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES (\*\*\*,  $p < 0.001$  respecto al control). Se indica el número de determinaciones ( $n$ ) de preparaciones independientes ( $N$ ).

Anteriormente se había demostrado que los eritrocitos de perro no presentan una vía de liberación de ATPe dependiente de AMPc [174]. Por ende, estas células pueden

ser usadas para evaluar efectos no específicos de uno o varios componentes del 3V sobre la salida de ATP.

Los resultados muestran que tanto el contenido intracelular de AMPc como la concentración de ATPe de eritrocitos de perros son parecidos (aunque no iguales) similares a los observados en eritrocitos humanos (**Fig.27**). Luego de la activación con 3V, se puede observar una tendencia hacia un aumento de la concentración de AMPc que no es significativa (de  $0,022 \pm 0,003$  a  $0,028 \pm 0,008$  pmoles/ $10^9$  células; **Fig. 27 B**), mientras que no se observan cambios en la concentración de ATPe (**Fig. 27 A**).



**Figura 27: Efecto de 3V sobre eritrocitos de perro.**

**A:** *Cinética de ATPe.* Las células fueron depositadas sobre cubreobjetos y luego expuestas a 3V (N=4; n=8). La flecha indica la exposición al estímulo.

**B:** *Contenido de AMPc.* Los eritrocitos se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente en condiciones control o en presencia de 3V. El contenido de AMPc (N=4, n=4) se determinó por radioinmunoensayo. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES. Se indican el número de determinaciones (n) de preparaciones independientes (N)

### 3.8 Empleo de la sonda *ProAluc* para estudiar la cinética de ATP superficial de eritrocitos humanos estimulados con 3V.

La utilización de la sonda *ProAluc* requiere de un anticuerpo cuyo segmento Fc una a la *ProAluc* con alta afinidad y su porción Fab se una a un antígeno de superficie de

la célula en estudio (ver **Fig. 5**, sección 2.5.3, Materiales y Métodos). Como consecuencia, fue necesario realizar una pesquisa sobre los antígenos eritrocitarios de superficie expresados en la población muestra, para luego poder seleccionar un anticuerpo apropiado.

La elección del antígeno de superficie al cuál se uniría el anticuerpo se basó en dos criterios:

- Debía estar presente en gran cantidad de copias sobre la superficie celular
- Su interacción con el anticuerpo no debía inducir respuesta (liberación de ATP) *per se*.

En base al primer criterio, se decidió realizar ensayos de aglutinación para los siguientes antígenos eritrocitarios de superficie:

- Sistema ABO. Este sistema está compuesto por glicoproteínas glicosiladas de 40-42 kDa.
- D (perteneciente al sistema antigénico Rh), que pertenece a una familia de proteínas no glicosiladas de 30-32 kDa.
- Fy<sup>a</sup> (perteneciente al sistema antigénico Duffy). Fy<sup>a</sup> pertenece a una familia de proteínas glicosiladas de 35-66 kDa presente en alrededor de  $15 \times 10^3$  copias/célula.
- M (perteneciente al sistema antigénico MNS). M pertenece a una familia de proteínas glicosiladas de 36-100 kDa presente en alrededor de  $10^5$ - $10^6$  copias/célula.

En la Tabla 6 se indican los resultados obtenidos en los ensayos de aglutinación.

Los antígenos D, Fy<sup>a</sup> y M fueron los que se encontraron presentes en el mayor número de individuos.

**Tabla 6:** Resultados de los ensayos de aglutinación para identificar la presencia de antígenos eritrocitarios en la población muestra.

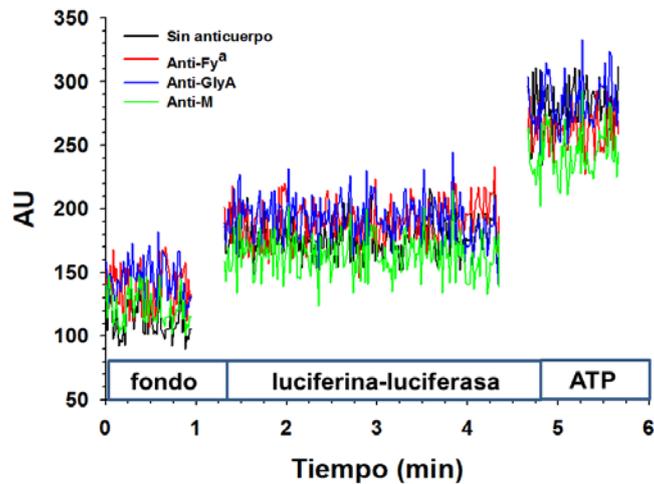
Antígeno	RESULTADO
ABO	50 % O
	50 % A
D	88%
Fy <sup>a</sup>	75%
M	88%

Los resultados están expresados como porcentaje de la población que presenta el antígeno.

En función de estos resultados, se decidió evaluar la utilidad de los anticuerpos anti-Fy<sup>a</sup> (IgG monoclonal humano. Seraclone, BioRad) y anti-M (IgM monoclonal murino. Seraclone, BioRad) para ser utilizados con la *ProAluc*.

Alternativamente, también se evaluó el anticuerpo anti-Glicorforina A (anti-GlyA. IgG monoclonal humano. Abcam). La glicorforina A es la principal glicoproteína de la membrana eritrocitaria (formando parte de la estructura troncal del Sistema antigénico MNS) y es abundante en la banda 3.

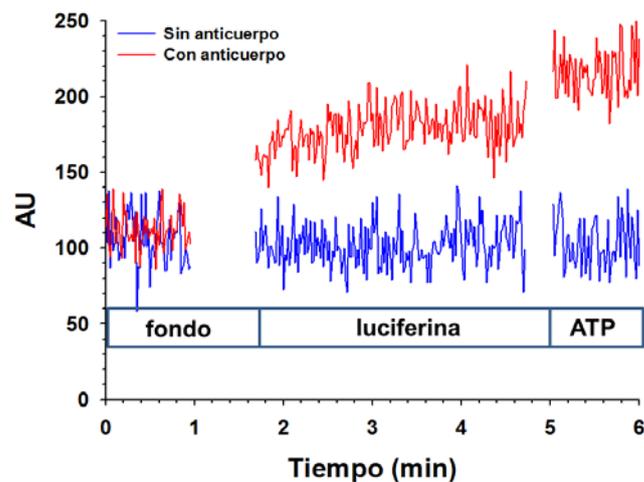
Luego se procedió a evaluar si los sistemas antígeno-anticuerpo elegidos cumplían con el segundo criterio (no inducir salida de ATP *per se*). Las células fueron adheridas a cubreobjetos pre-tratados con poli-D-lisina 0,001% e incubadas durante 1 hora con el anticuerpo primario. Luego de 3 lavados para eliminar el anticuerpo no unido, se agregó mezcla de luciferina-luciferasa y se midió la luz emitida por la muestra. Cuando se comparan las curvas de luminiscencia obtenidas con y sin incubación con anticuerpos, se observa que ninguno de los anticuerpos ensayados indujo salida de ATP por interacción con su antígeno, ya que no hay diferencia entre las curvas (**Fig. 28**).



**Figura28. Efecto de la unión antígeno-anticuerpo sobre la salida de ATP.**

*Luminiscencia en función del tiempo de eritrocitos humanos pre-tratados con anticuerpos primarios.* Las células fueron adheridas a cubreobjetos tratados con poli-D-lisina 0,001% e incubadas con anticuerpos anti-Fy<sup>a</sup>, anti-M o anti-GlyAo con vehículo (RBC-2). Los cubreobjetos fueron montados sobre el luminómetro y se registró la señal de luz basal (fondo); luego se agregaron 40  $\mu$ L de luciferina y luciferasa y, una vez estabilizada la señal, se agregó 50 nM ATP (ATP) como control positivo del aumento de la señal.

En experimentos preliminares, utilizando *ProAluc*, las células se incubaron con un anticuerpo primario y, luego de 3 lavados con RBC-2, se expusieron a ATP exógeno (50 nM) en presencia de luciferina (150  $\mu$ M). Sólo las células que fueron pre-incubadas con un anticuerpo primario fueron capaces de emitir luz, demostrando la especificidad de la unión de la *ProAluc* a la superficie de la célula (**Fig. 29**). Asimismo, las concentraciones de anticuerpo y *ProAluc* fueron ajustadas para obtener la máxima señal posible.



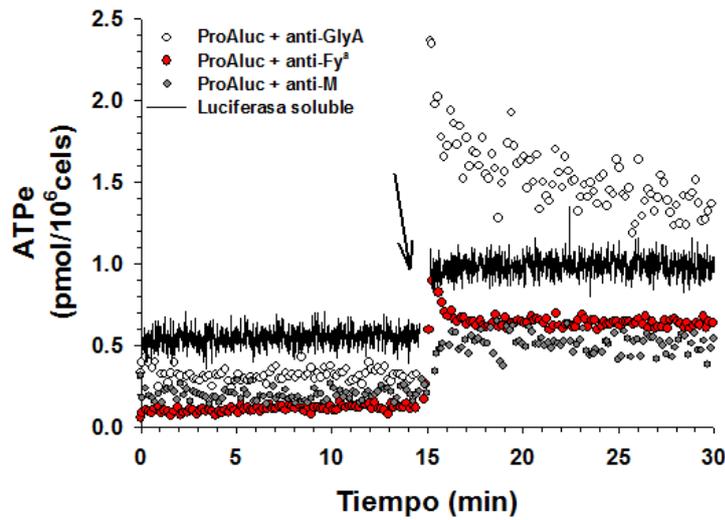
**Figura 29. Especificidad de unión de *ProAluc* a la superficie celular.**

*Luminiscencia en función del tiempo de eritrocitos humanos adheridos y pre-incubados con ProAluc.* Las células fueron adheridas a cubreobjetos tratados con poli-D-lisina 0,001% e incubadas con *ProAluc*, con incubación previa (línea roja) o sin incubación previa (línea azul) con un anticuerpo primario. Los cubreobjetos fueron montados sobre el luminómetro y se registró la señal de luz en condiciones basal (fondo); con 150  $\mu$ M de sustrato (luciferina) y una vez estabilizada la señal, con 50 nM ATP (ATP).

Si bien en presencia de antígeno D se obtuvo una alta aglutinación, no fue posible obtener señal luminiscente al incubarse con *ProAluc*. Es posible que, debido a la naturaleza del anticuerpo utilizado (ver sección 2.5.3.2, Materiales y Métodos), no se haya adherido bien el anticuerpo y, en consecuencia, no se haya unido la *ProAluc*.

En la **Fig.30** se muestran los resultados obtenidos cuando los eritrocitos son expuestos a 3V utilizando *ProAluc* como sensor de ATPe superficial. Se puede observar que la concentración basal de ATPe es similar para todos los anticuerpos utilizados ( $0,22 \pm 0,05$  pmoles/ $10^6$  células). Sin embargo, luego de la exposición a 3V la cinética obtenida fue cualitativamente diferente a aquella obtenida con luciferasa soluble, alcanzándose valores de concentración de ATPe superficial distintos según el anticuerpo utilizado. En presencia de anti M no se obtuvieron diferencias en la concentración de ATPe superficial pre y post estímulo; mientras que en presencia de anticuerpos anti-Fy<sup>a</sup> o anti-GlyA la concentración de ATPe superficial mostró un incremento agudo, seguido de un decaimiento exponencial. La mayor respuesta se

obtuvo mediante la unión de la sonda al anticuerpo anti-GlyA, alcanzando una concentración máxima post estímulo de  $2,36 \pm 1,3$  pmoles/ $10^6$  células, seguido de un decaimiento exponencial lento hasta un valor constante de  $1,20 \pm 0,64$  pmoles/ $10^6$  células. Este valor fue similar al valor máximo de ATPe obtenido con la luciferasa soluble ( $0,98 \pm 0,23$  pmoles/ $10^6$  células).



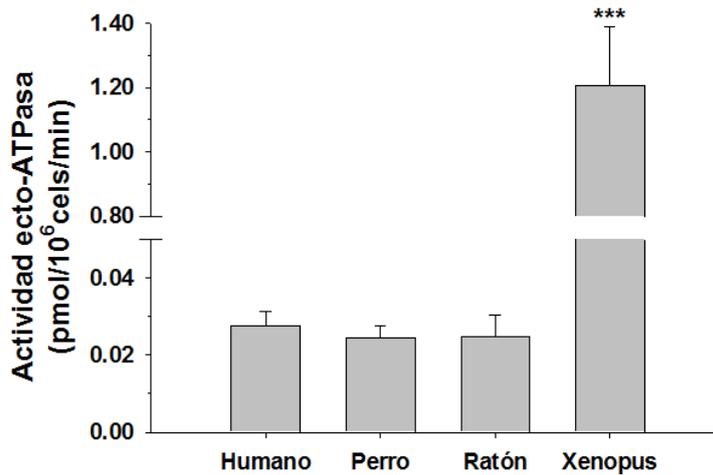
**Figura 30.** Cinética de ATPe superficial de eritrocitos humanos expuestos a 3V utilizando *ProAluc* como sensor de ATP.

*Cinética de ATPe de eritrocitos pre incubados con distintos anticuerpos primarios.* Las células fueron adheridas a cubreobjetos tratados con poli-D-lisina 0,001% y pre incubadas durante 1 h con el anticuerpo anti-M (●; N=2, n=4), anti-Fy<sup>a</sup> (●; N=2, n=3) o anti-GlyA (○; N=3, n=5). Luego de tres lavados se incubaron con *ProAluc* (125 μg/mL) durante 1 hora. Los cubreobjetos fueron montados sobre un luminómetro y se agregó luciferina. Luego de 15 min las células fueron expuestas a 3V. A fines comparativos se muestra la cinética de luciferasa soluble. Se indican el número de determinaciones (n) de preparaciones independientes (N).

### 3.9 Actividad ecto-ATPasa de eritrocitos de humanos, *Xenopus*, perro y ratón.

Se utilizaron suspensiones de eritrocitos intactos de humanos, *Xenopus*, perro y ratón para determinar el curso temporal de acumulación de  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{Pi}$  liberado de  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$  1 μM. La actividad ecto-ATPasa fue calculada como la velocidad inicial de acumulación  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{Pi}$  para cada una de las suspensiones celulares (**Fig. 31**). Como era de esperarse para eritrocitos maduros anucleados de mamíferos, en eritrocitos humanos, de perro y de ratón la actividad ecto-ATPasa observada fue muy baja

( $0,028 \pm 0,004$  pmoles Pi/ $10^6$  células/min,  $0,024 \pm 0,003$  pmoles Pi/ $10^6$  células/min y  $0,025 \pm 0,005$  pmoles/ $10^6$  células/min, en humanos, perro y ratón, respectivamente), mientras que en eritrocitos de *Xenopus* la actividad ecto-ATPasa ensayada en las mismas condiciones fue 40 veces mayor que la observada en eritrocitos de mamíferos ( $1,23 \pm 0,18$  pmoles Pi/ $10^6$  células/min).



**Figura31. Actividad ecto-ATPasa de eritrocitos de humanos, perro, ratón y *Xenopus*.**

La actividad ecto-ATPasa se determinó como la velocidad inicial de acumulación de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]Pi liberado de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP 1  $\mu$ M. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES (N=4, n=5) (\*\*\*, p< 0,001). Se indican el número de determinaciones (n) de preparaciones independientes (N).

# MASTOPARAN 7

## Introducción.

El mastoparán 7 (MST7) es un tetradecapéptido sintético derivado del mastoparán (MST), un péptido presente en el veneno de avispa. El MST7 presenta una estructura desordenada en soluciones acuosas, mientras que en presencia de vesículas unilamelares o micelas adopta una estructura en  $\alpha$ -hélice anfifílica[198]. De esta forma es capaz de intercalarse en las membranas biológicas y desencadenar varias respuestas celulares. Se ha reportado que el MST, en forma similar a los receptores acoplados a proteína G, cataliza el intercambio de GDP por GTP en las proteínas  $G_{i/o}$ [198], resultando en la disociación del trímero en sus subunidades. Esta respuesta puede ser bloqueada por la toxina pertussis. El mecanismo propuesto para este efecto es que los péptidos con estructuras  $\alpha$ -hélice como el MST y el MST7, de topología similar a las regiones transmembrana de los receptores acoplados a proteínas G, promueven la formación de lípidos a fase hexagonal II  $H_{II}$ [199], fase a la cual se unen con preferencia tanto  $G_i$  como las subunidades  $\beta\gamma$ ; mientras que la subunidad  $\alpha_i$  se une a lípidos en fase lamelar[200]. Además los eritrocitos humanos transducen el estrés mecánico y la hipoxia en liberación de ATP a través de la activación de la proteína  $G_i$ [201], por lo tanto el MST y el MST7 se utilizan como estímulos que mimetizan esos estímulos fisiológicos[154].

La vía de señalización por  $G_i$  involucra la activación de la adenilato ciclasa II (AC II), aumento de la concentración intracelular de AMPc, activación de PKA y liberación de ATP [154]. También involucra a la fosfodiesterasa 3, enzima que degrada al AMPc para finalizar la señal (ver **Fig. 5** de la Introducción) [202].

En este capítulo se estudió la cinética de ATPe de eritrocitos humanos expuestos a MST7 bajo distintos tratamientos:

- 1) Bloqueantes de las vías de salida de ATP
- 2) Medios anisomóticos
- 3) Potenciales moduladores:
  - Variación de volumen celular
  - Adhesión celular

Además se estudiaron:

- 4) La señalización intracelular inducida por el MST7:
  - AMPc,  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$  intracelulares
- 5) La actividad ecto-ATPasa
- 6) receptores P

Se muestra también estudios comparativos de las cinéticas de ATPe de otros modelos de eritrocitos (eritrocitos de perro, ratón, *Xenopus laevis* y eritrocitos de pacientes con esferocitosis hereditaria).

Al final del capítulo se presenta un modelo matemático diseñado para predecir la cinética de ATPe en respuesta al MST7, predecir los flujos de salida de ATP y evaluar la importancia relativa de los distintos procesos que afectan esta cinética.

En todos los experimentos realizados la salida de ATP es un proceso no lítico, ya que los experimentos en los que se detectó hemoglobina libre en el sobrenadante (menos del 1% de los experimentos) fueron descartados. Ver Materiales y Métodos, sección 2.7.1 *Viabilidad celular*.

#### **4.1 ATP intracelular.**

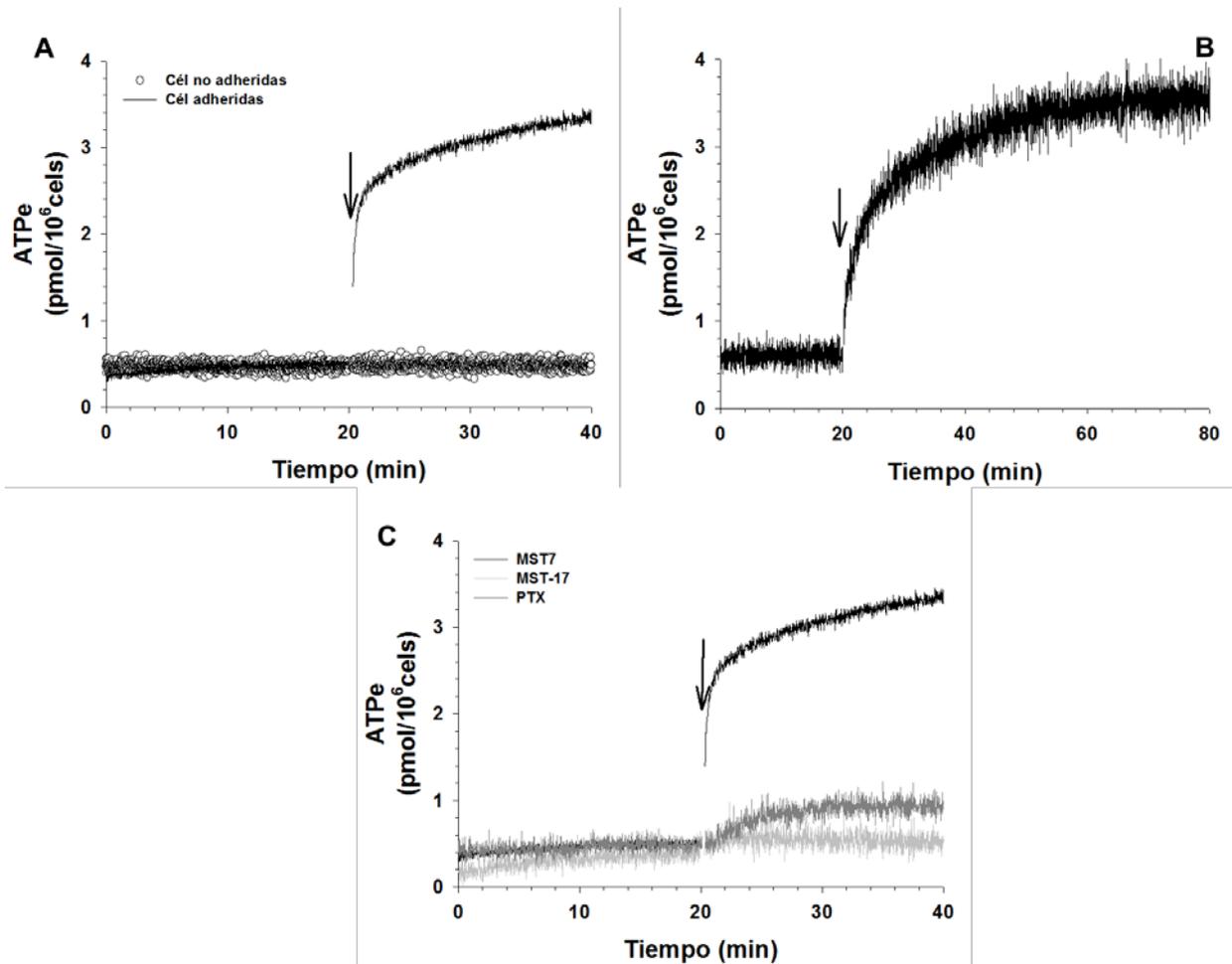
Como se mencionó en la sección 3.1 del capítulo 3, la determinación del contenido total de ATP intracelular (ATPi), sumado a la determinación del volumen celular, permite calcular la concentración de ATPi y así estimar la fuerza impulsora que controla la liberación de ATP, tanto en ausencia como en presencia de estímulos inductores de la salida de ATP.

En ausencia de MST7, el contenido de ATPi fue  $147,7 \pm 19,2$  pmoles/ $10^6$  células y el volumen corpuscular medio fue de  $90 \pm 7$  fl, por lo tanto la concentración de ATPi fue  $2,05 \pm 0,27$  mM. En presencia de MST7 el contenido de ATPi fue  $148,3 \pm 7,7$  pmoles/ $10^6$  células.

Dado que el contenido de ATPi es similar en medios con y sin MST7, la concentración de ATPi en presencia de MST7 sólo puede ser modificada por cambios en el volumen celular. Si bien el MST7 genera un ligero aumento de volumen (ver sección 4.6.5, más adelante), la concentración de ATPi fue de  $2,06 \pm 0,11$  mM, un valor que no es significativamente diferente de aquel estimado en ausencia de MST7.

#### **4.2 Cinética de ATPe de eritrocitos humanos expuestos a MST7.**

En la **Fig. 32** se muestra la cinética de ATPe de eritrocitos humanos expuestos a MST7. Los eritrocitos fueron adheridos a cubreobjetos tratados con poli-D-lisina (Cél adheridas) o depositados sobre cubreobjetos sin ningún adherente (Cél no adheridas).



**Figura 32. Cinética de ATPe de eritrocitos humanos expuestos a MST7.**

**A:** Efecto de la adhesión celular sobre la cinética de ATPe. Los eritrocitos fueron adheridos a cubreobjetos tratados con poli-D-lisina 0,001% (Cél adheridas; N=5, n=12) o depositados sobre cubreobjetos sin ningún adherente (Cél no adheridas, N=3, n=4). La flecha indica agregado de MST7 10  $\mu$ M.

**B:** Cinética de ATPe bajo exposición prolongada a MST7. Los eritrocitos fueron adheridos a cubreobjetos tratados con poli-D-lisina 0,001% y expuestos a MST7 durante 1 h. La flecha indica agregado de MST7 10  $\mu$ M.

**C:** Efecto de la toxina pertussis (PTX) y el MST17 sobre la cinética de ATPe. Eritrocitos adheridos fueron expuestos a MST7 en ausencia o presencia de PTX (100 ng/mL, 4 h) (N=3, n=5). En experimentos independientes, las células fueron expuestas a MST17 (N=3, n=4), un análogo inactivo de MST7. La flecha indica agregado de MST7 o MST17 10  $\mu$ M. Se indica en número de determinaciones (n) de preparaciones independientes (N).

En ausencia de estímulo, tanto en células adheridas como no adheridas, la concentración de ATPe permaneció estable en  $0,52 \pm 0,09$  pmoles/10<sup>6</sup> células. El tratamiento con MST7 no afectó la concentración de ATPe de eritrocitos no adheridos (**Fig. 32 A**). Sin embargo, en células adheridas el MST7 gatilló un aumento agudo en la concentración de ATPe igual a 8 veces su valor basal. Este

incremento fue seguido de una fase de aumento más lenta, alcanzando una concentración de ATPe de  $3,25 \pm 0,32$  pmoles/ $10^6$  células a los 20 minutos post-estímulo (**Fig. 32 A**).

La cinética de ATPe pudo ser descripta por la suma de dos funciones exponenciales de tiempo crecientes: una fase rápida que abarca alrededor del 70% del cambio total en la concentración de ATPe, con un  $t_{1/2} = 0,146 \pm 0,003$  min y una fase lenta con un  $t_{1/2} = 6,1 \pm 0,1$  min. En experimentos similares, usando tiempos más prolongados de exposición al MST7, la concentración de ATPe alcanzó un valor estacionario (**Fig. 32 B**).

La exposición de las células adheridas a MST17, un análogo inactivo de MST7, no produjo resultados significativamente diferentes al basal (**Fig. 32 C**). El pre-tratamiento con PTX, que desacopla  $G_{i/o}$  de sus efectores, inhibió la acumulación de ATPe en un 89% (la concentración de ATPe fue  $0,85 \pm 0,12$  pmoles/ $10^6$  células luego de 20 minutos de agregado el estímulo) (**Fig. 32 C**).

#### **4.3 Señalización intracelular.**

A continuación, se chequeó si los cambios observados en la concentración de ATPe se correlacionaban con cambios en la concentración de AMPc. La concentración de AMPc aumentó un 31% con MST7 y 79% con MST7 + CTZ (inhibidor de la fosfodiesterasa 3), mientras que la incubación con CTZ no tuvo efecto (**Fig. 33 A**).

Esto indica que en presencia de MST7, la fosfodiesterasa 3 fue capaz de limitar parcialmente el aumento en la concentración de AMPc.

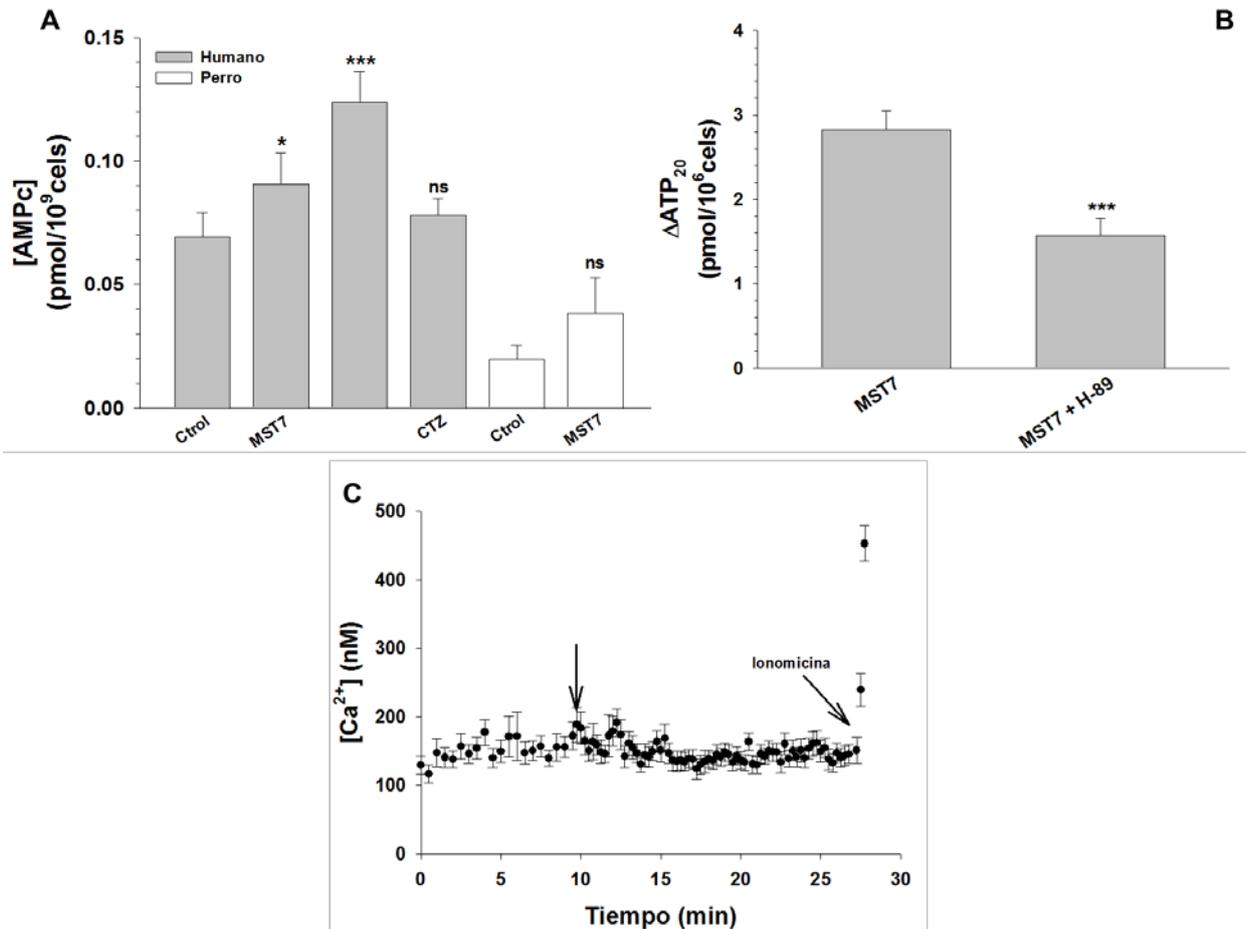
Se ha postulado que PKA, que es activada por AMPc, puede ser un importante mediador de la señalización intracelular que lleva a la activación de la salida de ATP [230]. En consecuencia estudiamos el efecto del inhibidor de PKA H-89 sobre la

cinética de ATPe. Bajo estas condiciones, H-89 inhibió el  $\Delta\text{ATP}_{20}$  en un 47 % (**Fig. 33 B**).

Paralelamente, se determinó la concentración de calcio libre intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) de los eritrocitos humanos expuestos a MST7, para evaluar su posible participación como segundo mensajero. La exposición de los eritrocitos a MST7 no afectó  $[\text{Ca}^{2+}]$  (**Fig. 33 C**).

Para continuar evaluandola cinética de ATPe inducida por MST7, realizamos experimentos utilizando eritrocitos de perro, en los cuales se ha reportado que la liberación de ATP no está acoplada a cambios en la concentración de AMPc [174].Entonces los eritrocitos de perro permitirían comprobar potenciales efectos del MST7 sobre la salida de ATP que fueran independientes de AMPc.

Como se observa en la **Fig. 33A**, comparado con eritrocitos humanos, los niveles basales de AMPc en eritrocitos de perro son relativamente bajos. En presencia de MST7 se observó un ligero aumento en la concentración de AMPc, que no fue significativo.



### Figura 33. Segundos mensajeros y señalización intracelular.

**A:** Niveles de AMPc de eritrocitos humanos y de perro expuestos a MST7. Se incubaron eritrocitos humanos (barras grises; N=5, n=22) por 10 min a temperatura ambiente en condiciones control (Ctrl) o en presencia de MST7 10  $\mu$ M, cilostazol (CTZ) 100  $\mu$ M + MST7 10  $\mu$ M o CTZ 100  $\mu$ M. Los eritrocitos de perro (barras blancas; N=6, n=11) se incubaron 10 min a temperatura ambiente en condiciones control (Ctrl) o en presencia de MST7 10  $\mu$ M. La concentración de AMPc se determinó por radioinmunoensayo. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES. (\*,  $p < 0.05$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ , ns: no significativo respecto al control).

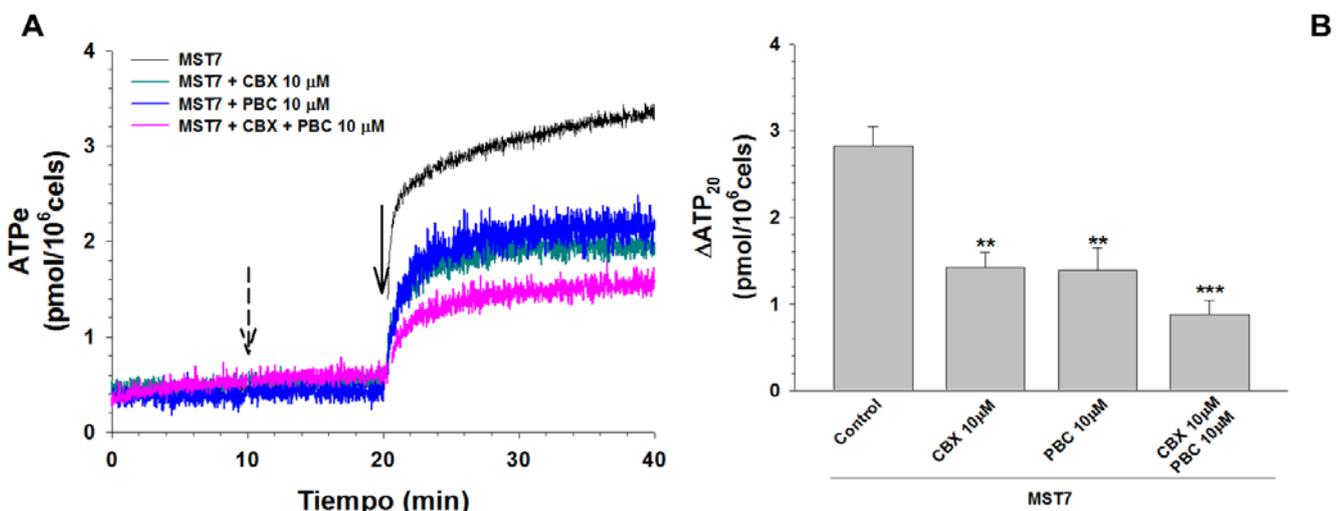
**B:** Efecto del inhibidor de PKA, H-89 sobre la concentración ATPe. Células adheridas fueron pre-incubadas con vehículo (MST7) o con H-89 10  $\mu$ M (H-89 + MST7) y luego expuestas a MST7 10  $\mu$ M (N=5, n=7). Los resultados se expresan como  $\Delta$ ATP<sub>20</sub>, es decir, la diferencia entre la concentración de ATPe a los 20 min luego del estímulo y la concentración de ATPe basal. Los resultados representan la media  $\pm$  ES (\*\*\*,  $p < 0.001$ ).

**C:** Efecto del MST7 sobre los niveles citosólicos de calcio libre ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Los cambios en función del tiempo en la  $[Ca^{2+}]_i$  se midieron continuamente por microscopía de fluorescencia usando células cargadas con Fluo-4. La flecha a los 10 minutos indica agregado de MST7 10  $\mu$ M. Al final de cada experimento, la señal fue calibrada con ionomicina en presencia de EGTA 0,5 mM (para obtener la mínima intensidad de fluorescencia) o  $CaCl_2$  2 mM (para obtener la máxima intensidad de fluorescencia). Los resultados se expresan como media  $\pm$  ES de 20-30 células (N=4). Se indica en número de determinaciones (n) de preparaciones independientes (N).

#### 4.4 Vías de salida de ATP en eritrocitos humanos y de ratón expuestos a MST7.

Los inhibidores de panexina 1 CBX y PBC bloquean la liberación de ATP de eritrocitos expuestos a 3V. Por lo tanto investigamos la posibilidad de que estos inhibidores inhiban la salida de ATP inducida por MST7.

En ausencia de inhibidores, el MST7 produjo una cinética bifásica de aumento de la concentración de ATPe (Fig. 32 A). La pre-incubación de las células con CBX 10  $\mu$ M, PBC 10  $\mu$ M o ambos inhibidores en una concentración de 10  $\mu$ M redujo de 2 a 5 veces la fase aguda inicial e inhibió casi totalmente la fase lenta de la cinética de ATPe (Fig. 34 A).



**Figura 34. Vías de salida de ATP en eritrocitos humanos.**

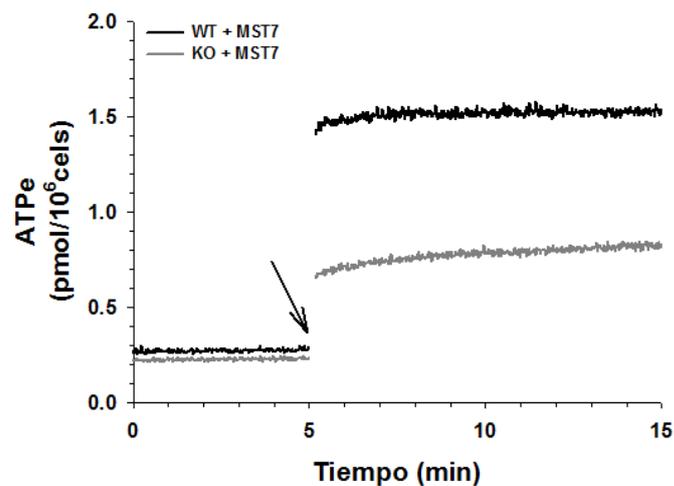
**A:** Cinética de ATPe de eritrocitos expuestos a MST7 y pre incubados con bloqueantes de panexina 1. Previo a la exposición a MST7, las células fueron adheridas a cubreobjetos tratados con poli-D-lisina 0,001% y pre-incubadas durante 10 min con carbenoxolona 10  $\mu$ M (CBX), probenecid 10  $\mu$ M (PBC), o 10  $\mu$ M de ambos, CBX y PBC. La flecha punteada indica el agregado de los bloqueantes y la flecha continua indica exposición a MST7 10  $\mu$ M.

**B:** Aumento de la concentración de ATPe dependiente de MST7 en presencia o ausencia de diferentes bloqueantes, calculada de los datos de A. Los valores están expresados como  $\Delta\text{ATP}_{20}$ , es decir, la diferencia entre la concentración de ATPe a los 20 min luego del estímulo y la concentración de ATPe basal. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES. (\*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$  respecto al Control, MST7 solo).

Consecuentemente, con respecto a la situación control (MST7 en ausencia de inhibidores) los valores de  $\Delta\text{ATP}_{20}$  se redujeron un 48-49% con CBX (10  $\mu$ M) o PBC (10  $\mu$ M) y un 68% con CBX 10  $\mu$ M + PBC 10  $\mu$ M. No se encontraron diferencias

significativas en los valores de  $\Delta\text{ATP}_{20}$  entre los diferentes bloqueantes y concentraciones usadas (**Fig. 34 B**).

Para corroborar el rol de la panexina 1 en la liberación de ATP mediada por MST7 se repitieron experimentos claves utilizando eritrocitos de ratones wild type (WT) y de ratones knockout (KO) de panexina 1.

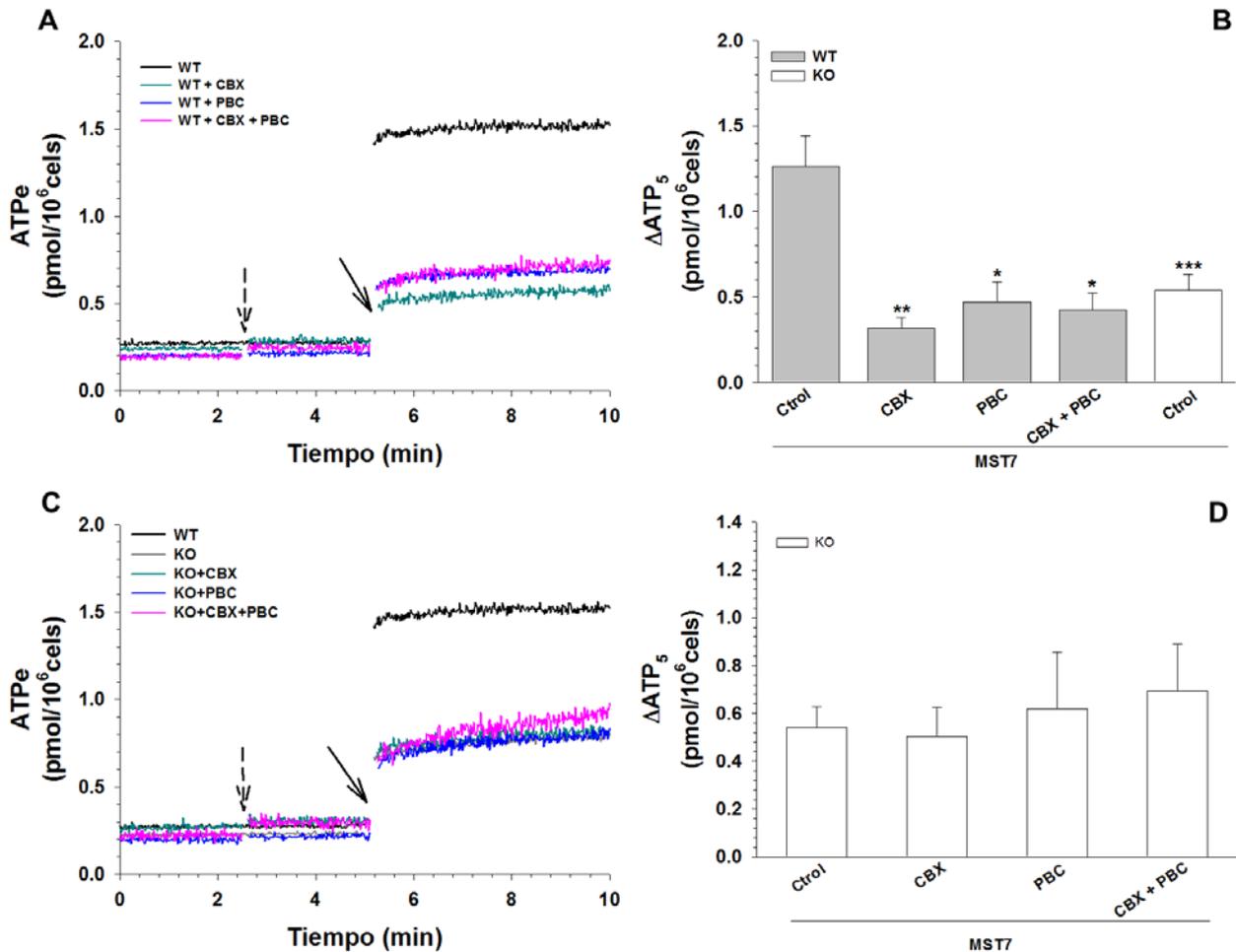


**Figura 35. Cinética de ATPe de eritrocitos de ratón WT y KO de panexina 1.**

Las células adheridas a cubreobjetos pre tratados con poli-D-lisina 0,001% fueron estimuladas con MST7 10  $\mu\text{M}$ . La flecha indica exposición al estímulo.

La exposición de eritrocitos de ratones WT a MST7 produjo un aumento agudo en la concentración de ATPe igual a 5 veces su valor basal, seguido de una fase donde la concentración de ATPe se mantuvo casi inalterada. (**Fig. 35**). En eritrocitos de ratones KO también se observó un aumento agudo en la concentración de ATPe, pero los valores absolutos fueron un 57% menor que los observados en células de ratones WT (**Fig. 35**).

En eritrocitos de ratones WT expuestos a MST7, la pre-incubación con CBX 10  $\mu\text{M}$ , PBC 10  $\mu\text{M}$  o ambos simultáneamente, produjo una reducción de 63-75% en la concentración de ATPe (**Fig. 36 A**).



**Figura 36. Vías de salida de ATPe en eritrocitos de ratón.**

**A:** Cinética de ATPe de eritrocitos de ratón WT expuestos a MST7 y pre-incubados con bloqueantes de panexina 1. Las células adheridas a cubreobjetos pre-tratados con poli-D-lisina 0,001% fueron pre-incubadas con CBX 10  $\mu$ M, PBC 10  $\mu$ M, o 10  $\mu$ M de ambos, CBX y PBC, antes de la exposición a MST7 10  $\mu$ M. La flecha punteada indica agregado de los bloqueantes y la flecha continua indica el agregado de MST7.

**B:** Aumento de la concentración de ATPe dependiente de MST7 en presencia o ausencia de los diferentes bloqueantes, calculado de los datos de A. Los valores están expresados como  $\Delta$ ATP<sub>5</sub>, es decir, la diferencia entre la concentración ATPe a los 5 min luego del estímulo y la concentración de ATPe basal. El valor de  $\Delta$ ATP<sub>5</sub> de eritrocitos de ratones KO expuestos a MST7 se muestra como una barra blanca. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES. (\*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$  versus WT expuestos a MST7).

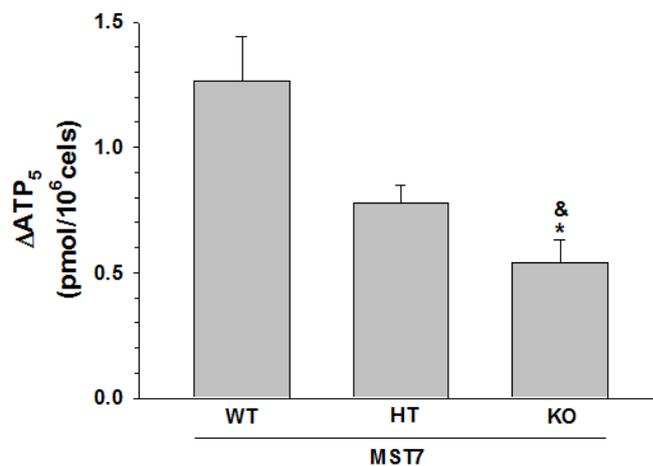
**C:** Cinética de ATPe de eritrocitos de ratón KO pre incubados con bloqueantes de panexina 1. Las células adheridas a cubreobjetos pre tratados con poli-D-lisina fueron tratadas como en A. También se muestra la cinética de ATPe de eritrocitos de ratón WT (tomada de A). La flecha punteada indica agregado de los bloqueantes y la flecha continua indica el agregado de MST7.

**D:** Aumento de la concentración de ATPe dependiente de MST7 en presencia o ausencia de los diferentes bloqueantes, calculado de los datos de C. Los valores están expresados como  $\Delta$ ATP<sub>5</sub>, es decir, la diferencia entre la concentración de ATPe a los 5 min luego del estímulo y la concentración de ATPe basal. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES.

Los valores absolutos de la concentración de ATPe (estimados como  $\Delta$ ATP<sub>5</sub>) en presencia de CBX o PBC fueron similares a los obtenidos usando eritrocitos de

ratones KO en ausencia de inhibidores (**Fig. 36 B**). No se observaron efectos significativos de CBX o PBC sobre la concentración de ATPe de eritrocitos de ratones KO expuestos a MST7 (**Fig. 36 C y D**).

Finalmente, la respuesta a MST7 fue analizada utilizando eritrocitos de ratones WT, heterocigotas (HT) y KO para panexina 1. Comparado con eritrocitos WT, el  $\Delta\text{ATP}_5$  de los eritrocitos HT y KO fue 62% y 43% respectivamente, aunque las diferencias entre las células HT y WT no fueron significativas (**Fig. 37**).



**Figure 37. Activación de la salida de ATP inducida por MST7 en eritrocitos de ratones WT, HT y KO para panexina 1.**

Las células adheridas a cubreobjetos pre tratados con poli-D-lisina 0,001% fueron expuestas a 10  $\mu\text{M}$  MST7. Se evaluaron los aumentos en la concentración de ATPe como la diferencia entre la concentración de ATPe a los 5 min luego del estímulo y la concentración de ATPe basal, indicado como  $\Delta\text{ATP}_5$ . Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES. (\*,  $p < 0.001$  respecto a WT y &,  $p < 0.05$  respecto a HT).

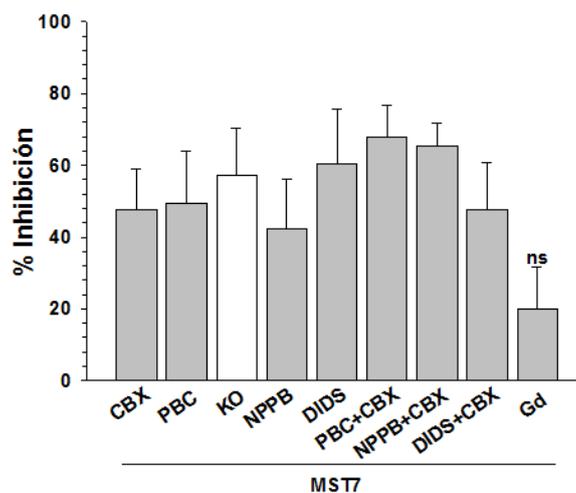
Los resultados de las **Fig. 34 a 37** indican que la inhibición de la salida de ATP por CBX y PBC es parcial, lo que sugiere que existe al menos una vía adicional de salida de ATP. Por lo tanto, se probaron otros inhibidores de potenciales vías de salida de ATP. En la **Tabla 7** se indican los inhibidores utilizados, sus concentraciones y sus blancos de acción y en la **Fig. 38** se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 7.** Inhibidores utilizados para bloquear la salida de ATP en eritrocitos humanos expuestos a MST7.

Inhibidor	Concentración (μM)	Blanco de Acción
CBX	10	Pnx1
CBX	100	Pnx1 , Cnxs
PBC	10	Pnx1, canales aniónicos
NPPB	100	Pnx1, Cnxs, MAC, VSOR
DIDS	100	Pnx1, MAC, VSOR
Gd <sup>3+</sup>	50, 100, 200	MAC, MSC
CBX+NPPB	10 + 100	
CBX+DIDS	10 + 100	

Gd<sup>3+</sup>, Gadolinio; Pnx1, panexina 1; Cnxs, conexinas; mdr, multidrugresistant; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; VSOR, Volume-Sensitive Outwardly Rectifying; MAC, maxi-anion channel; MSC, mechano-sensitive channel.

Datos extraídos de [15,58,71,73,203-206]



**Figura 38.** Grado de inhibición de las vías de salida de ATP en eritrocitos humanos y de ratón.

Porcentaje de inhibición (% inhibición) del aumento de la concentración de ATPe dependiente de MST7 inducido por diferentes bloqueantes de la salida de ATP. Se incubaron eritrocitos humanos (barras grises) con bloqueantes durante 10 min previos a la exposición al estímulo. A modo comparativo se muestra la inhibición del aumento de la concentración de ATPe de eritrocitos de ratones KO para panexina 1 (barra blanca) y el de eritrocitos humanos co-incubados con CBX+PBC y expuestos a MST7. Los resultados se expresan como % de inhibición respecto a su control.

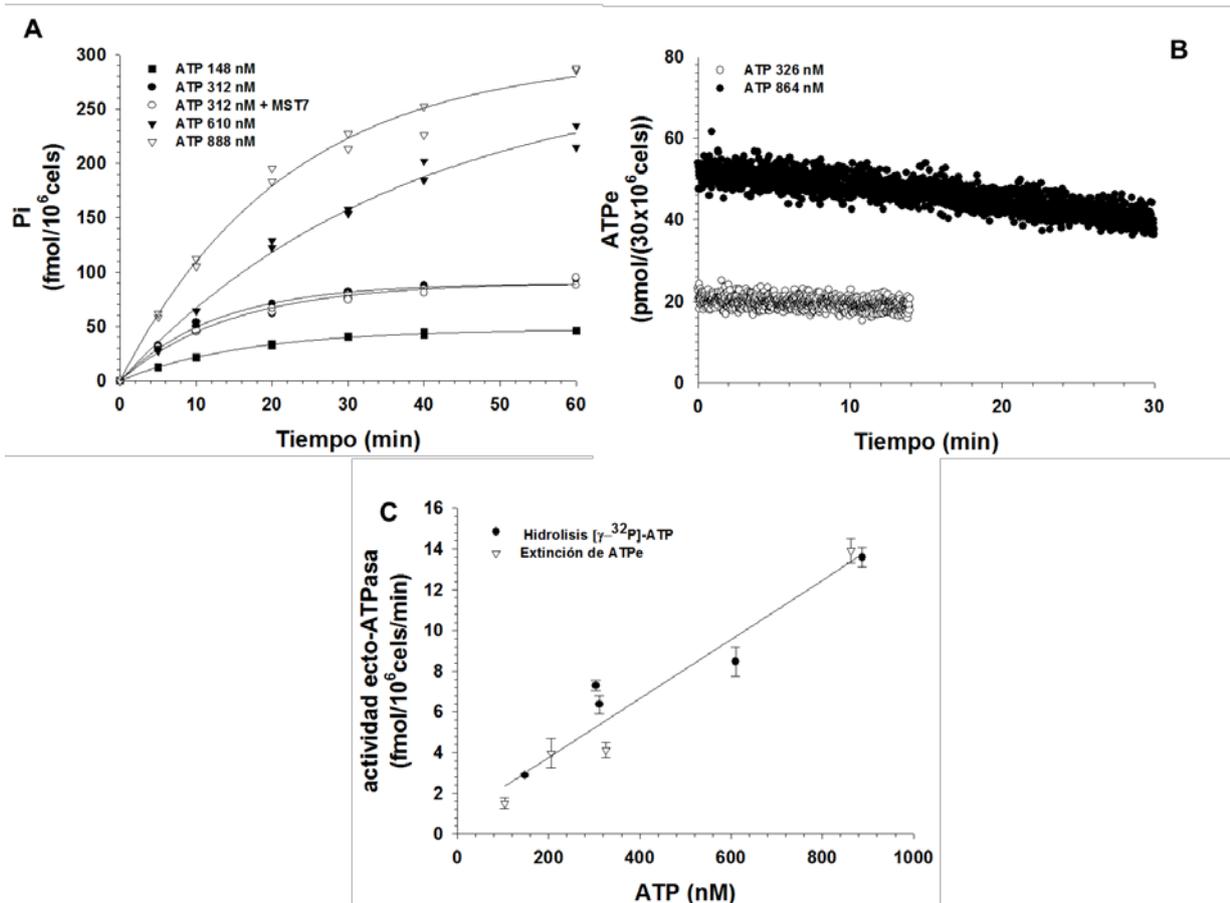
ns, no significativo ( $p > 0,5$  respecto a su control)

Puede verse que ninguno de los bloqueantes utilizados, solos o co-administrados, fueron capaces de bloquear totalmente la salida de ATP inducida por MST7. En el caso del Gd<sup>3+</sup>, no se observó bloqueo de ninguna de las vías postuladas, ya que los resultados obtenidos no se diferenciaron del control (MST7 solo).

Asimismo, no se observaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones de  $Gd^{3+}$  entre las diferentes concentraciones de CBX utilizadas (datos no mostrados).

#### **4.5 Actividad ecto-ATPasa de los eritrocitos humanos y de ratón.**

Utilizando suspensiones de eritrocitos humanos intactos, la velocidad de hidrólisis de ATP fue determinada siguiendo el curso temporal de la acumulación de  $[\gamma^{32}P]Pi$  liberado de  $[\gamma^{32}P]ATP$  (150-900 nM) (**Fig. 39 A**). La actividad ecto-ATPasa fue calculada como la velocidad inicial de acumulación de  $[\gamma^{32}P]Pi$  (estimada de la **Fig. 39 A**) de suspensiones celulares o, alternativamente, como la velocidad inicial de la extinción de ATPe medido por luminometría on-line usando células no adheridas (**Fig. 39 B**). La actividad ecto-ATPasa siguió una función lineal con la concentración de ATP en un amplio rango de concentraciones (**Fig. 39 C**). La velocidad de hidrólisis de ATPe no fue afectada por la exposición de las células a MST7 (**Fig. 39 A**).



**Figura 39. Actividad ecto-ATPasa de eritrocitos humanos intactos.**

**A:** Cinética de acumulación de [ $\gamma$ - $^{32}$ P]Pi a diferentes concentraciones de ATP. La velocidad de hidrólisis de ATPe fue determinada siguiendo la acumulación del [ $\gamma$ - $^{32}$ P]Pi liberado de [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (148-888 nM) agregado a una suspensión celular a un hematocrito de 20%. A ATP 312 nM el ensayo se realizó en presencia y ausencia de MST7. Los resultados se expresan como el contenido de Pi (fmol/ $10^6$  cels) y representan la media  $\pm$  ES. N=2, n=2 (fmol/ $10^6$  cél). Las líneas continuas representan ajustes de funciones exponenciales a los datos experimentales.

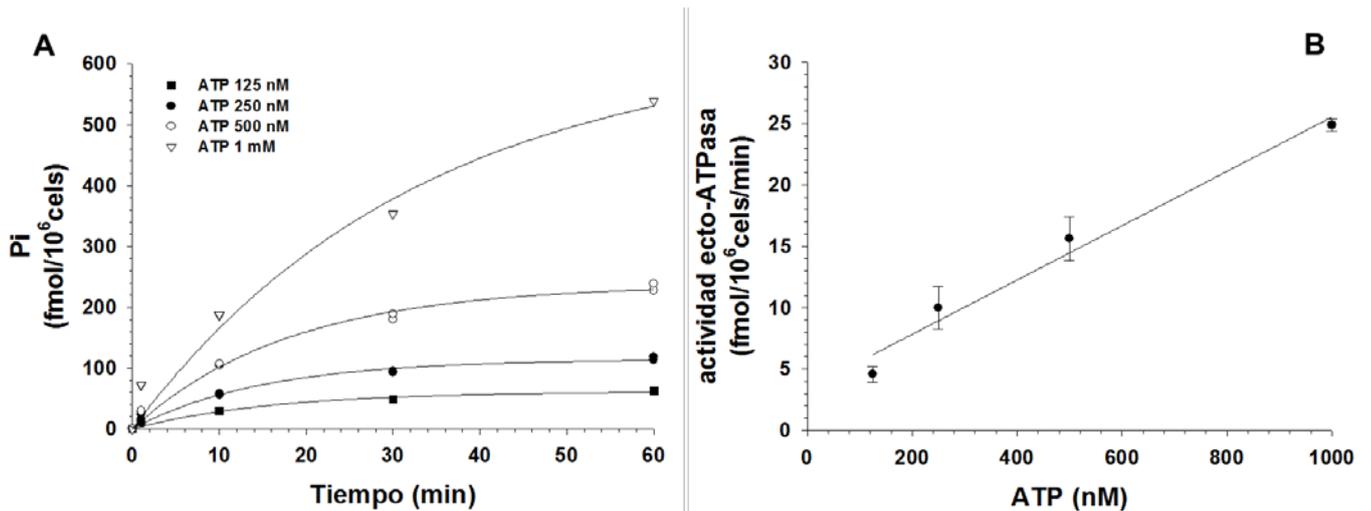
**B:** Velocidad de hidrólisis de ATPe. Fue determinada por luminometría on-line siguiendo la extinción de ATP exógeno (326 y 864 nM) agregado a una suspensión celular de  $30 \times 10^6$  células. N=2, n=2 (fmol/ $10^6$  cél).

**C:** Actividad ecto-ATPasa en función de la concentración de ATPe. Los círculos negros representan la velocidad inicial de acumulación de Pi ( $^{32}$ P]Pi) obtenida de los datos experimentales de A. Los triángulos blancos representan la velocidad inicial de consumo de ATPe (extinción de ATPe) en eritrocitos humanos no adheridos e incubados con ATP (103, 206, 326 y 864 nM, datos experimentales de B) y medidos por luminometría on-line. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ES. La línea continua representa el ajuste de una función lineal a los datos experimentales.

Se indica en número de determinaciones (n) de preparaciones independientes (N).

En forma similar, se determinó la actividad ecto-ATPasa de eritrocitos de ratón.

Primero se determinó la cinética de acumulación de [ $\gamma$ - $^{32}$ P]Pi liberado de [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (150-900 nM) (**Fig. 40 A**), y luego se calculó la actividad ecto-ATPasa. Ésta pudo ser descrita como una función lineal de la concentración de ATP (**Fig. 40 B**).



**Figura 40. Actividad ecto-ATPasa de eritrocitos de ratón intactos.**

**A:** Cinética de acumulación de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{Pi}$  a diferentes concentraciones de ATP. La velocidad de hidrólisis de ATPe fue determinada siguiendo la acumulación del  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$  liberado de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (0,125 – 0,9 mM) agregado a una suspensión celular de hematocrito 20%. Los resultados están expresados como el contenido de Pi a los distintos tiempos y representan la media  $\pm$  ES. N=2, n=2 (fmol/10<sup>6</sup> cél). Las líneas continuas representan ajustes de funciones exponenciales a los datos experimentales.

**B:** Actividad ecto-ATPasa en función de la concentración de ATP. Los círculos negros representan la velocidad inicial de acumulación de Pi ( $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$ ) obtenida de los datos experimentales de A. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ES. La línea continua representa el ajuste de una función lineal a los datos experimentales.

Se indica en número de determinaciones (n) de preparaciones independientes (N).

#### 4.6 Otros moduladores de la cinética de liberación de ATPe de eritrocitos humanos expuestos a MST7.

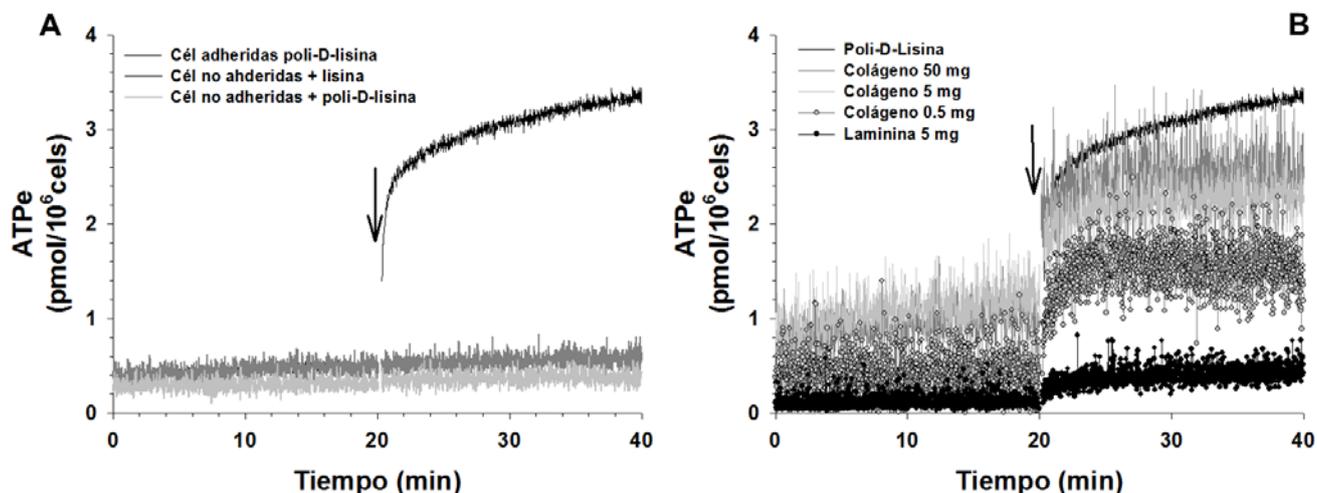
Como se vio en 4.2, a diferencia de lo observado con 3V, el MST7 no induce salida de ATP en eritrocitos humanos no adheridos, mientras que sí lo hace cuando las células se encuentran adheridas con poli-D-lisina.

Los experimentos descritos en esta sección fuerondiseñados para caracterizar el efecto de adhesión sobre la salida de ATP, y evaluar la existencia de mecanismos alternativos que pudieran inducir la salida de ATP de eritrocitos no adheridos y expuestos a MST7.

#### *4.6.1 Efecto de la adhesión celular sobre la liberación de ATP inducida por MST7.*

Como se mencionó en la sección 3.4 del capítulo de 3, se utilizó una concentración muy baja de poli-D-lisina (0,001%), ya que en estas condiciones las células se adhieren y conservan su forma discoidal [179]. Considerando que el principio de adhesión a la poli-D-lisina es la interacción entre sus cargas positivas y las cargas negativas presentes en la superficie de los eritrocitos, se diseñaron experimentos para evaluar si la carga eléctrica podía actuar como un pre-estímulo inductor de la liberación de ATP inducida por MST7. Con este fin, se depositaron  $3 \times 10^6$  células sobre cubreobjetos sin tratar y se co-incubaron con lisina soluble (67mg/mL) o poli-D-lisina soluble (0,01mg/mL). Como se muestra en la **Fig. 41 A**, la exposición de las células a MST7 no produjo respuesta.

Posteriormente, se evaluó la cinética de ATPe utilizando otros sustratos de adhesión. Las células fueron adheridas a cubreobjetos pre-tratados con laminina o concentraciones variables de colágeno y luego expuestas a MST7 (**Fig. 41 B**), observándose en todos los casos liberación de ATP. Cuando el adherente utilizado fue colágeno, la liberación de ATP observada fue similar para todas las concentraciones de colágeno utilizadas; mientras que la adhesión a laminina llevó a una menor liberación de ATP.



**Figura 41. Efecto del sustrato de adhesión sobre la cinética de ATP de eritrocitos humanos expuestos a MST7.**

**A:** Efecto de la lisina y la poli-D-lisina. Eritrocitos no adheridos fueron incubados con L-lisina soluble (67 mg/mL) (N=2, n=4) o con poli-D-lisina (0,01 mg/mL) (N=2, n=4). Los ensayos con eritrocitos adheridos se hicieron como en 1 A (N=5, n=11). La flecha indica agregado de MST7 10  $\mu$ M.

**B:** Efecto de diferentes adherentes. Los eritrocitos fueron adheridos a cubreobjetos tratados con poli-D-lisina 0,001%, 5  $\mu$ g laminina (N=2, n=4) o colágeno (0,5  $\mu$ g, 5  $\mu$ g o 50  $\mu$ g; N=2, n=4; N=2, n=4; N=2, n=4, respectivamente). La flecha indica agregado de MST7 10  $\mu$ M.

Se indica en número de determinaciones (n) de preparaciones independientes (N).

#### 4.6.2 Efecto del hematocrito sobre la liberación de ATP inducida por MST7.

En reportes previos se demostró que la exposición de los eritrocitos humanos a MST7 induce salida de ATP [71,202]. Estos resultados fueron obtenidos por mediciones off-line de ATPe (ver sección 2.5.1. Materiales y Métodos; [71]), utilizando suspensiones de hematocritos relativamente altos (20-30 %).

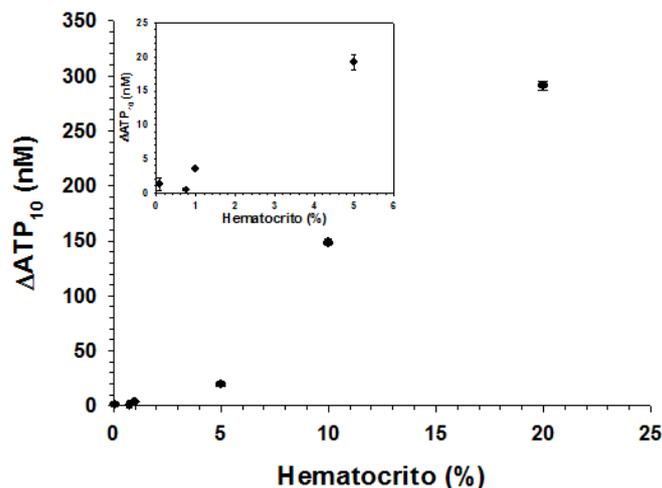
Por otro lado, todas las cinéticas de ATPe analizadas hasta aquí fueron realizadas utilizando una baja concentración de células en relación al volumen de ensayo, lo que se aproxima a un hematocrito de 0,45-0,75%.

Surgió entonces la pregunta de por qué, en células adheridas, la exposición a MST7 induce la salida de ATP a hematocritos altos [71] pero no a hematocritos bajos (resultados de esta tesis).

Para comparar los resultados obtenidos por nuestro grupo con los reportados previamente, se determinó la concentración de ATPe de eritrocitos humanos

expuestos a MST7 mediante luminometría off-line a tiempos fijos y a distintos hematocritos (**Fig.42**).

Se evaluó la respuesta de los eritrocitos a los 10 minutos de la exposición a MST7 ( $\Delta\text{ATP}_{10}$ ) con hematocritos de 0,075 a 20 %. Los resultados muestran un aumento del  $\Delta\text{ATP}_{10}$  con el aumento del hematocrito, ya que a hematocritos 5% y 20 % las concentraciones de ATPe aumentaron 4 y 17 veces el valor basal, respectivamente. En el caso de los hematocritos en el rango de 0,75% y 0,05% no se observaron cambios significativos en  $\Delta\text{ATP}_{10}$ .



**Figura 42. Concentración de ATPe en función del hematocrito para eritrocitos humanos expuestos a MST7.**

Los aumentos en la concentración de ATPe dependiente de MST7 están expresados como  $\Delta\text{ATP}_{10}$ , es decir, la diferencia entre la concentración de ATPe a los 10 min luego del estímulo y la concentración de ATPe basal. Las células se mantuvieron en suspensión a los siguientes hematocritos (en %) 0,075 – 0,75 – 1 – 5 – 10 y 20. Recuadro: detalle del gráfico principal a bajos hematocritos (0,075 – 5 %).

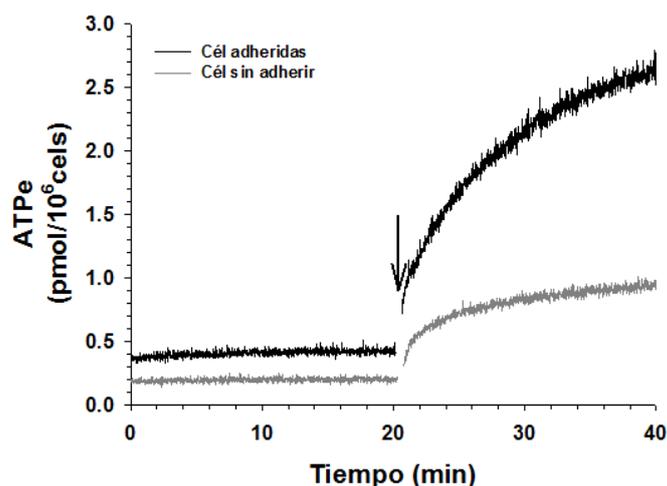
En 4.6.1 y 4.6.2, habíamos observado que el MST7 solo induce la liberación de ATP cuando las células están adheridas a un sustrato.

En base a esta observación, se planteó la posibilidad de que la adhesión pudiera estar afectando o interactuando de alguna forma con el citoesqueleto.

Para testear esta hipótesis, se repitieron los experimentos cinéticos de ATPe con y sin adhesión utilizando eritrocitos humanos provenientes de pacientes con

esferocitosis hereditaria (**Fig. 43**). Los eritrocitos de estos pacientes exhiben deficiencias en los contenidos de una o más proteínas del citoesqueleto, como espectrina ( $\alpha$  o  $\beta$ ), anquirina o proteínas transmembrana como la banda 3.

Se sembraron  $3 \times 10^6$  células en cubreobjetos pre-tratados o sin tratar con poli-D-lisina 0,001%. Tanto en ausencia como en presencia de adhesión, la concentración de ATPe previo al estímulo permaneció estable a  $0,20 \pm 0,04$  y  $0,42 \pm 0,09$  pmoles/ $10^6$  células, respectivamente. Luego de la exposición a MST7, se observó un aumento en la concentración de ATPe en ambos casos. Cuando las células se encuentran adheridas, el incremento de la concentración de ATP es lento y alcanza un valor de  $2,74 \pm 0,33$  pmoles/ $10^6$  células a los 20 min post estímulo; mientras que cuando las células no están adheridas, el aumento observado es más rápido y alcanza  $0,95 \pm 0,43$  pmoles/ $10^6$  células a los 20 min post estímulo. A diferencia de lo observado con eritrocitos de donadores sanos, se observa salida de ATP en ausencia de adhesión.



**Figura 43. Cinética de ATPe de eritrocitos expuestos a MST7, provenientes de pacientes con esferocitosis hereditaria.**

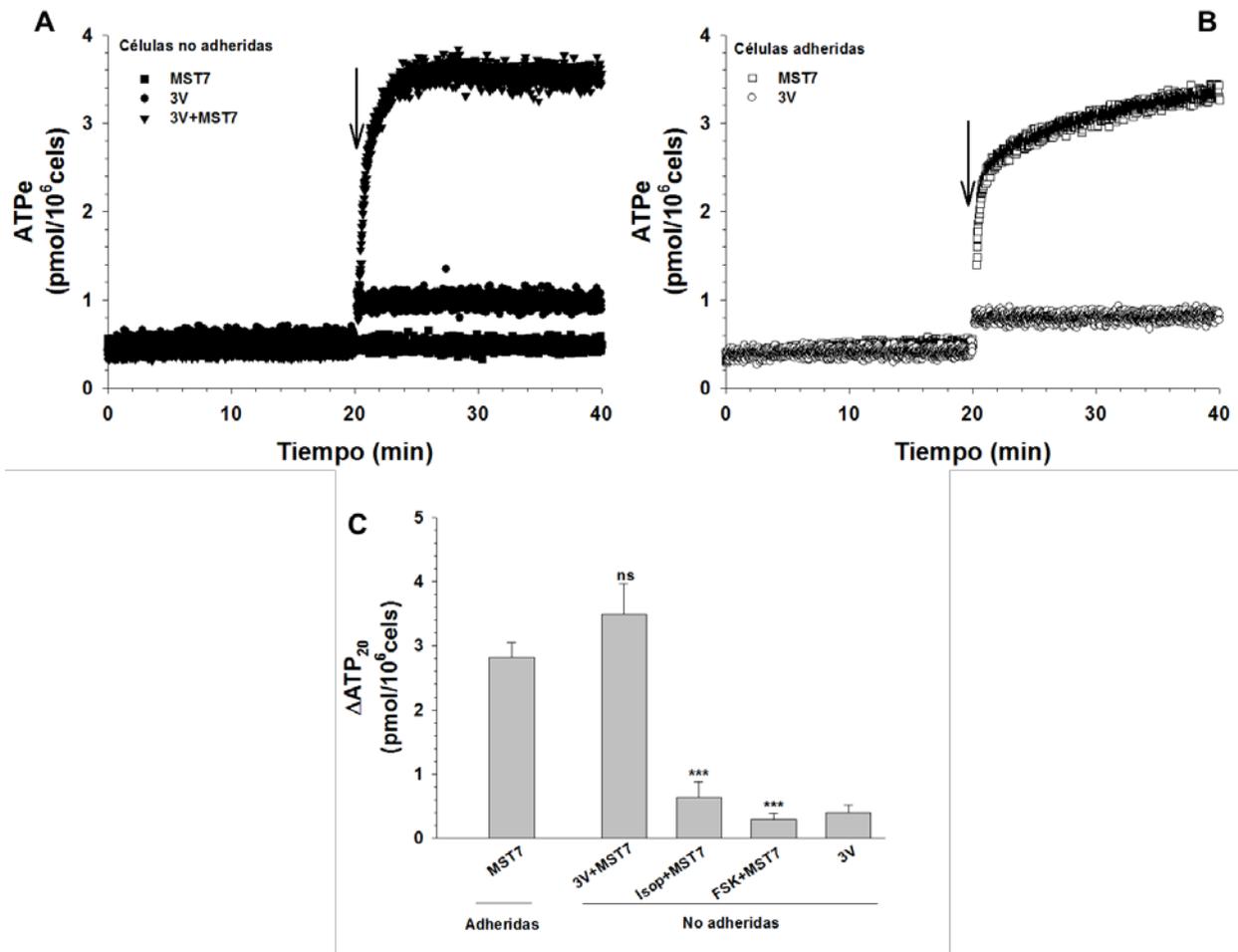
Los eritrocitos fueron adheridos a cubreobjetos tratados con poli-D-lisina (Cél adheridas; N=11, n=17) o depositados sobre cubreobjetos sin ningún adherente (Cél sin adherir, N=8, n=11). La flecha indica agregado de MST7  $10 \mu\text{M}$ .

Se indica en número de determinaciones (n) de preparaciones independientes (N).

#### *4.6.3 Efecto del 3V en la liberación de ATP inducida por MST7 en eritrocitos humanos no adheridos.*

Los experimentos de la **Fig. 44** fueron diseñados para chequear si el MST7, cuando es usado con 3V como co-estímulo, es capaz de inducir la salida de ATP en ausencia de adhesión celular. El cocktail 3V fue previamente optimizado para inducir un aumento agudo en la salida de ATP dependiente de AMPc en eritrocitos humanos [196]. Como se indicó en la sección 3.4 del capítulo 3, a diferencia del MST7, el efecto del 3V sobre la cinética de ATPe es independiente de la adhesión (**Fig. 44 A y B**).

Cuando células no adheridas fueron simultáneamente estimuladas con 3V y MST7, se obtiene un fuerte y agudo aumento en la concentración de ATPe, alcanzando  $3,4 \pm 0,6$  pmoles/ $10^6$  células a los 20 minutos de la exposición, que permanece luego constante (**Fig. 44 A**). Experimentos similares, en presencia de MST7 e isoproterenol 10  $\mu$ M o forskolina 30  $\mu$ M (dos componentes de la mezcla 3V) produjeron aumentos significativos pero mucho menores en la concentración de ATPe (**Fig. 44 C**).



**Figure 44. Efecto de 3V en la salida de ATP dependiente de MST7.**

**A:** Cinética de ATPe de eritrocitos humanos no adheridos expuestos a 3V, MST7 y MST7+ 3V. Las células se depositaron en la superficie de cubreobjetos sin tratar con ningún adherente (Cél no adheridas) y expuestas luego a 3V, MST710  $\mu$ M o MST710  $\mu$ M + 3V. La flecha indica la exposición al estímulo.

**B:** Cinética de ATPe de eritrocitos humanos adheridos expuestos a 3V y MST7. Las células fueron adheridas a cubreobjetos pre tratados con poli-D-lisina 0,001% (Cél adheridas) y expuestas a 3V o 10  $\mu$ M MST7. La flecha indica exposición al estímulo.

**C:** Liberación de ATPe inducida por diferentes estímulos. Células adheridas fueron expuestas a MST7. Células no adheridas fueron expuestas a MST7 en presencia de 3V, 10  $\mu$ M isoproterenol (Isop) o 30  $\mu$ M forskolina (FSK). A modo comparativo se muestran los resultados bajo estimulación con 3V. Los aumentos en la concentración de ATPe están expresados como  $\Delta$ ATP<sub>20</sub>, es decir, la diferencia entre la concentración de ATPe a los 20 min luego del estímulo y la concentración de ATPe basal. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES. (\*\*\*,  $p < 0.001$  y ns: no significativo versus células adheridas expuestas a MST7).

#### 4.6.4 Otros modelos celulares.

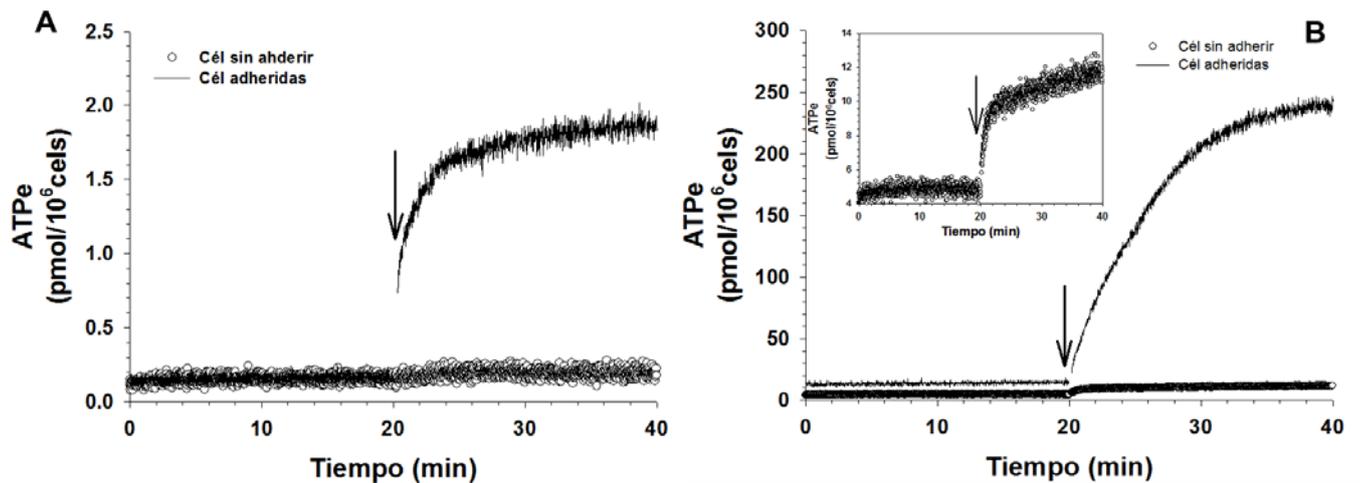
Las consecuencias de la adhesión fueron también testeadas en otros dos modelos celulares, eritrocitos de perro y de *Xenopus*.

Cómo se indicó en 4.3, la liberación de ATP en eritrocitos de perro está desacoplada a cambios en la concentración de AMPc, por lo que este modelo celular permitió estudiar posibles efectos del MST7 no asociados a cambios en la concentración de AMPc.

En forma similar a lo observado en eritrocitos humanos, la exposición de los eritrocitos de perro a MST7 no produjo efecto en células no adheridas, mientras que en células adheridas se observó un aumento agudo de la concentración de ATPe hasta  $1,87 \pm 0,75$  pmol/ $10^6$  células a los 20 min luego del estímulo (**Fig.45 A**).

Para evaluar si el efecto de la adhesión sobre la salida de ATP es generalizable a eritrocitos de vertebrados no mamíferos, se utilizaron eritrocitos de *Xenopus*.

Bajo exposición a MST7, se observó un aumento en la concentración de ATPe, tanto en presencia como en ausencia de adhesión (**Fig. 45 B**). Con células no adheridas, la cinética de ATPe fue rápida y alcanzó un valor de  $13 \pm 1,1$  pmol/ $10^6$  células a los 20 min luego del estímulo (recuadro **Fig. 45 B**); por otro lado, con células adheridas, la concentración de ATPe siguió una cinética distinta, hasta un valor de  $230 \pm 60$  pmol/ $10^6$  células.



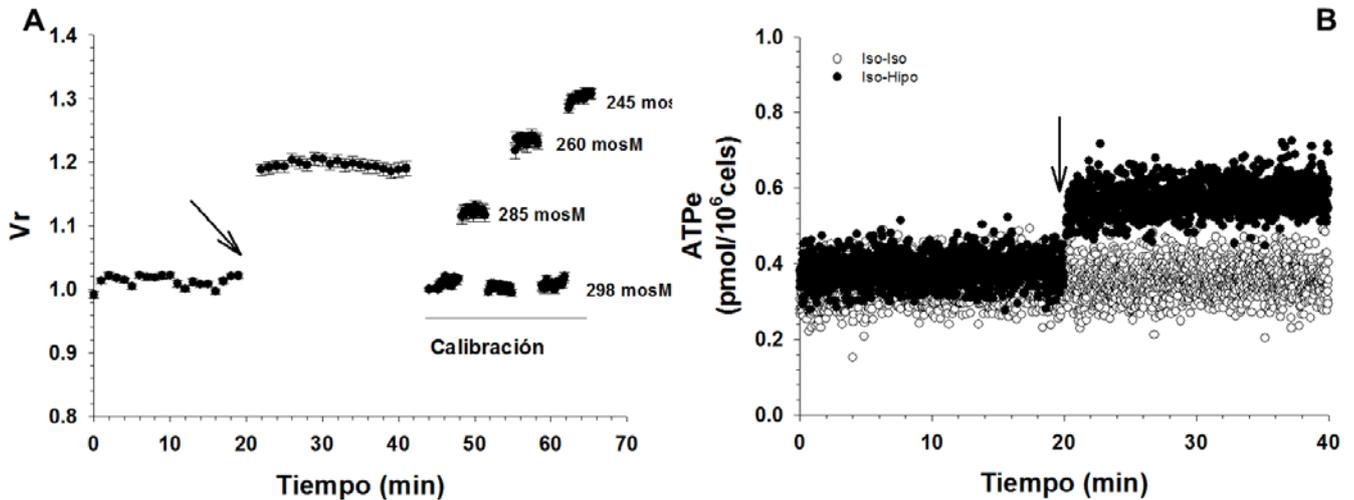
**Figure 45.** Efecto de la adhesión en la cinética de ATPe de eritrocitos de perro y *Xenopus* expuestos a MST7.

**A:** Cinética de ATPe de eritrocitos de perro. Las células fueron adheridas a cubreobjetos pre-tratados con poli-D-lisina 0,001% (Cél adheridas; N=, n=) o depositadas en la superficie de cubreobjetos sin tratar con ningún adherente (Cél sin adherir; N=, n=). La flecha indica exposición al estímulo.

**B:** Cinética de ATPe de eritrocitos de *Xenopus*. Las células fueron adheridas a cubreobjetos pre-tratados con poli-D-lisina 0,001% (Cél adheridas; N=, n=) o depositadas en la superficie de cubreobjetos sin tratar con ningún adherente (Cél sin adherir; N=, n=). La flecha indica exposición al estímulo. Recuadro: Detalle del gráfico principal mostrando la cinética de ATPe de eritrocitos no adheridos, a bajos valores de ATPe.

#### 4.6.5 Efecto del volumen celular sobre la cinética de ATPe de eritrocitos humanos expuestos a MST7.

El aumento del volumen celular induce salida de ATP en la mayoría de los tipos celulares [133]. De acuerdo a esta idea, la exposición de eritrocitos humanos a un medio hiposmótico produjo aumentos simultáneos del volumen celular ( $V_r$ ) y de la concentración de ATPe (**Fig. 46**).



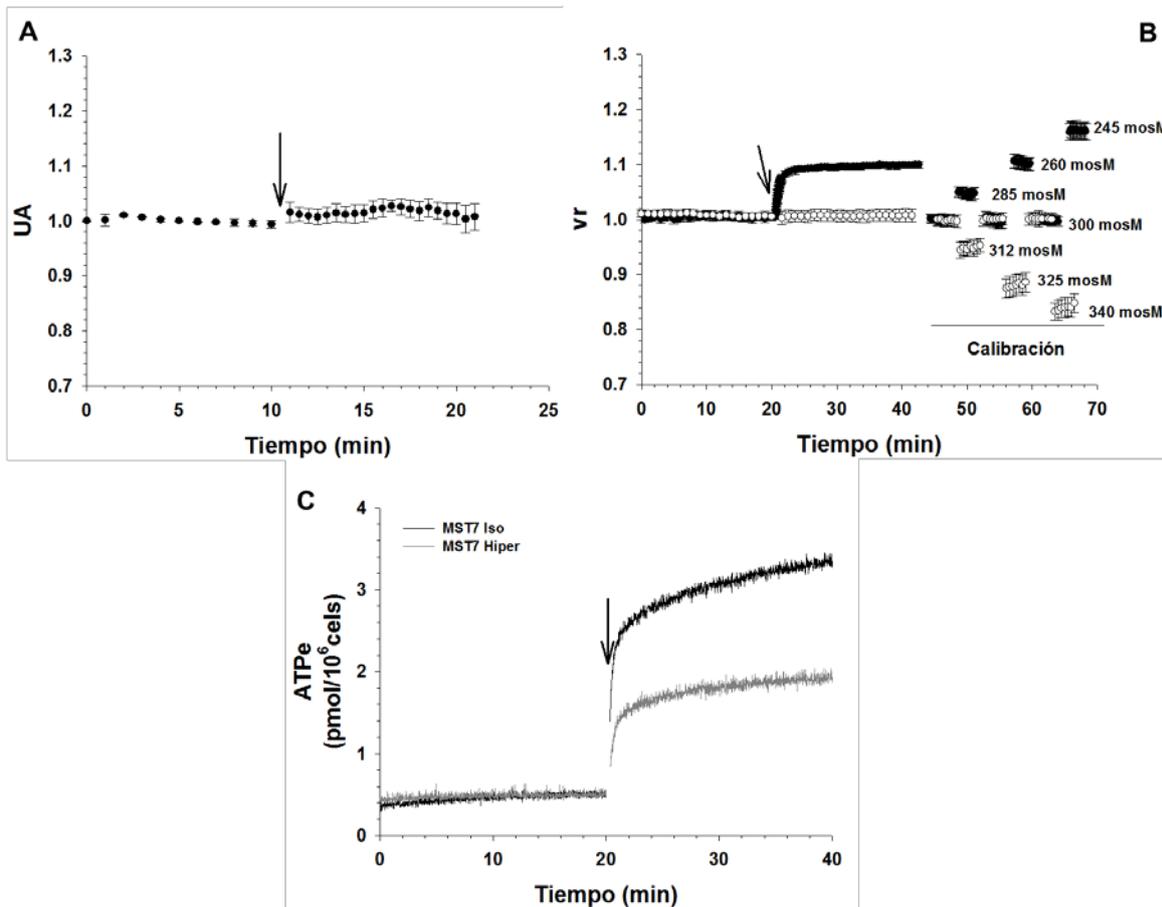
**Figura 46. Efecto del medio hiposmótico sobre las cinéticas de volumen celular y ATPe de eritrocitos humanos.**

**A:** *Volumen relativo (Vr) en función del tiempo.* Las células fueron cargadas con BCECF durante 1 h a temperatura ambiente y luego de 3 lavados con medio isosmótico (300 mosM), 400  $\mu$ L de la suspensión celular se sembraron en cubreobjetos pre-tratados con poli-D-lisina 0,001%. Luego fueron incubadas durante 20 min en un medio isosmótico (300 mosM), para luego ser expuestas a un medio hiposmótico (270 mosM). Las calibraciones se realizaron al final de cada experimento exponiendo secuencialmente a las células a medios de ensayo con las siguientes osmolaridades (en mosM) 300, 285, 260 and 245. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES de 20-30 células (N=5).

**B:** *Cinética de ATPe.* Las células fueron adheridas a cubreobjetos tratados con poli-D-lisina 0,001% en medio isosmótico (298 mosM) y luego fueron expuestas un medio hiposmótico ( $\bullet$ ; 270 mOsM) o isosmótico ( $\circ$ ).

Por lo tanto se investigó la posibilidad de que parte del efecto del MST7 sobre la cinética de ATPe fuera mediado por cambios del volumen celular.

Cuando las células son expuestas a MST7 en un medio isosmótico (RBC-2), las células no adheridas no cambian su volumen (**Fig. 47 A**), mientras que las células adheridas aumentan su volumen de forma aguda, llegando a un volumen relativo (Vr) de  $1,10 \pm 0,01$  (10 % de aumento de Vr, **Fig. 47 B**). La variación de Vr en el tiempo pudo ser descrita por la suma dos funciones exponenciales de tiempo crecientes: una fase rápida que abarca alrededor del 50% del total del cambio de volumen y una fase lenta.



**Figura 47. Efecto del volumen celular sobre la cinética de ATPe.**

**A:** Cinética de Volumen relativo ( $V_r$ , estimado como unidades de fluorescencia relativa) de eritrocitos no adheridos. Las células fueron cargadas con BCECF durante 1 h a temperatura ambiente y luego de 3 lavados con medio isosmótico (300 mosM), 400  $\mu$ L de la suspensión celular fue depositada sobre cubreobjetos sin tratar con ningún adherente. Se registró la fluorescencia basal y luego de 10 min las células fueron expuestas a MST7 en medio isosmótico. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES de 30–40 células (N=8).

**B:** Cinética de  $V_r$  de eritrocitos adheridos. Las células fueron preparadas como se indicó en 14 A. Posteriormente las células fueron incubadas en medio isosmótico (300 mosM) y luego de 20 min fueron expuestas a MST7 disuelto en medio isosmótico ( $\bullet$ , 300 mosM) o en medio hiperosmótico ( $\circ$ ; 345 mosM). Las calibraciones se realizaron al final de cada experimento exponiendo secuencialmente a las células a medios de ensayo con las siguientes osmolaridades (en mosM) 300, 312, 325 y 340. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES de 20–30 células (N=8) para el medio isosmótico y 30–40 células (N=4) para el medio hiperosmótico.

**C:** Cinética de ATPe. Las células fueron adheridas a cubreobjetos tratados con poli-D-lisina 0,001% y estimuladas con MST7 10 mM en medio isosmótico (298 mosM, MST7) o en medio hiperosmótico (345 mosM, MST7 Hiper). La flecha indica exposición al estímulo.

En todos los casos, la flecha indica exposición al estímulo. Se indica en número de determinaciones (n) de preparaciones independientes (N).

Seguidamente, se diseñó un experimento para evaluar los efectos del MST7 en ausencia de cambios de volumen. Para ello las células fueron expuestas a MST7 en un medio ligeramente hiperosmótico (345 mosM) para bloquear completamente el aumento del volumen celular (**Fig. 47 B**). Bajo estas condiciones la acumulación de

ATPe sensible a MST7 se redujo un ~50 % con respecto a la observada con MST7 en medio isosmótico(**Fig. 47 C**).

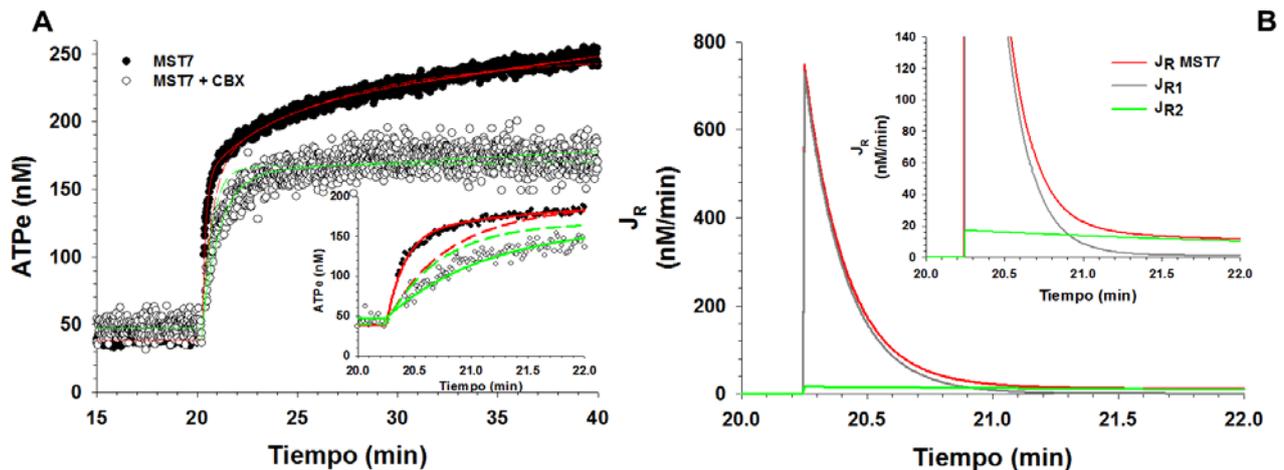
#### **4.7 Modelado de la cinética de ATPe de eritrocitos expuestos a MST7.**

Los resultados de las **Figs. 39 y 47** muestran que en eritrocitos humanos el MST7 induce un ligero aumento del volumen celular y una acumulación no lineal de ATPe. Al mismo tiempo estas células presentan actividad ecto-ATPasa en un amplio rango nanomolar de concentraciones de ATP. A continuación construimos un modelo matemático basado en los datos experimentales para evaluar en qué medida estos procesos (cambio de volumen, actividad ecto-ATPasa) controlan la cinética ATPe y para predecir la cinética del transporte transmembrana que media la salida de ATP.

##### *4.7.1 Flujos que median la salida de ATP.*

La exposición de eritrocitos humanos a CBX 10  $\mu$ M indujo una inhibición parcial de la cinética de ATPe (**Fig. 34**). Esto fue interpretado en el modelo mediante un flujo de liberación de ATP ( $J_R$ ) que requiere dos vías de salida (subflujos  $J_{R1}$  y  $J_{R2}$ ), con un subflujo ( $J_{R1}$ ) que es totalmente bloqueado por CBX (**Fig. 48 A**).

El modelo ajustado a los datos experimentales permitió simular la cinética de ATPe en ausencia y en presencia de CBX con razonable exactitud, y predecir los correspondientes subflujos que median el transporte de ATP (**Fig. 48**).



**Figura 48. Ajuste del modelo a las cinéticas experimentales de ATPe en presencia de MST7. Predicciones sobre los flujos de ATP.**

**A:** El modelo fue ajustado a las cinéticas de ATPe inducidas por MST7 en ausencia (líneas rojas) o en presencia de carbenoxolona (CBX, líneas verdes). Las líneas discontinuas representan el ajuste de un modelo donde se consideraron dos subflujos de ATP totalmente independientes, mientras que las líneas continuas representan el ajuste de un modelo que considera cierto grado de interacción entre ambos flujos. Recuadro: detalle del gráfico principal de 20 a 22 minutos.

**B:** Luego de haber obtenido el mejor ajuste del modelo a los datos experimentales (líneas continuas en A), el modelo predijo el flujo total de ATPe inducido por MST7 ( $J_R$  MST7, en nM/min) y los flujos parciales (subflujos) que son sensible a CBX ( $J_{R1}$ ) o resistente a CBX ( $J_{R2}$ ). El recuadro muestra un detalle de los valores más bajos de  $J_R$ .

Luego de la estimulación con MST7,  $J_R$  mostró un incremento agudo de  $1,5 \times 10^4$  veces el valor inicial, de 0,044 a 668 nM/min en menos de 1 segundo, seguido por una lenta disminución no lineal a un valor constante de 1,3 nM/min.  $J_{R1}$  mostró una alta amplitud inicial seguida por una disminución aguda.

Por otro lado  $J_{R2}$ , que actúa como la única vía de salida en presencia de CBX, presentó una cinética diferente. Este flujo aumentó de manera aguda a un máximo de sólo el 18% del  $J_R$  total. Sin embargo, dado que la velocidad de decaimiento fue lenta (comparado con  $J_{R1}$ ), luego de 40 segundos  $J_{R2}$  fue mayor que  $J_{R1}$  (ver recuadro en **Fig. 48 B**). En consecuencia, a partir de los 40 segundos  $J_{R2}$  se vuelve el principal subflujo que controla la salida de ATP, lo que explica la fase lenta y continua de aumento en la concentración de ATPe observada en la **Fig. 32 A**.

*Grado de independencia de las vías de salida de ATP.*

El ajuste modelo dependiente se aplicó con la restricción de que los modelos ajustados debían ajustar simultáneamente los perfiles de acumulación de ATPe en presencia y ausencia de CBX. Esto permitió evaluar la independencia de las vías de salida de ATP.

Al considerar un modelo de dos vías ( $J_{R1}$  y  $J_{R2}$  de la Ec. 12, sección 2.13, Materiales y Métodos), donde la CBX bloquea completamente la activación de  $J_{R1}$ , la suposición de vías independientes lleva a un ajuste sesgado (líneas interrumpidas en la **Fig. 48 A**). De acuerdo con el criterio de Akaike [194], se obtiene un ajuste mejor del modelo a los datos al suponer un cierto grado de interacción entre ambas vías de salida de ATP (líneas continuas en el inserto de la **Fig. 48 A**, sección 4.7.1). Es decir, se consideró que la CBX no sólo bloqueó la activación de  $J_{R1}$ , sino que también inhibió en cierto grado  $J_{R2}$  (en términos del modelo, alteró los valores de los parámetros  $k_{22}$  y  $p_{s2}$  de la Ec. 8 y 14, sección 2.13, Materiales y Métodos).

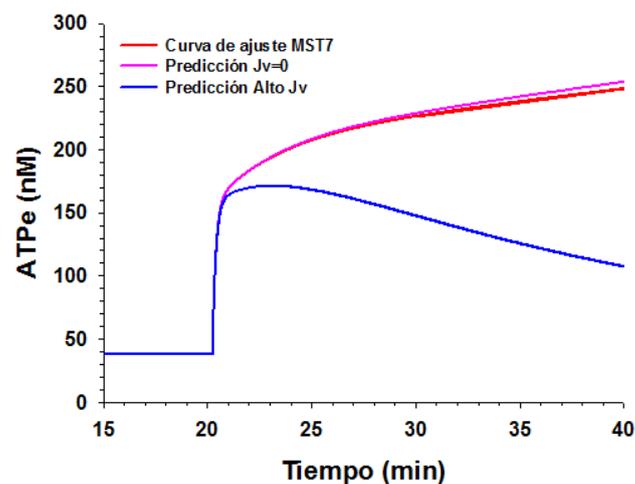
#### 4.7.2 Actividad ecto-ATPasa.

Los datos de la **Fig. 39** muestran que la actividad ecto-ATPasa de eritrocitos humanos es muy baja. Dado que el modelo matemático, al simular la cinética de ATPe, utiliza los datos experimentales de la curva de sustrato para la actividad ecto-ATPasa, era de esperar que el efecto de ésta sobre la cinética de ATPe simulada por el modelo fuera pequeña, o despreciable.

De acuerdo con esta idea, se comparó la curva de mejor ajuste de la cinética de ATPe (que tiene en cuenta la actividad ecto-ATPasa medida, **Fig. 48 A**) con una predicción de la cinética de ATPe (utilizando los mismos valores de mejor ajuste de los parámetros) suponiendo bloqueo total de la actividad ecto-ATPasa. Como se observa en **Fig. 49**, las diferencias entre las dos curvas fueron muy pequeñas.

Por el contrario, cuando se realiza una predicción de la cinética de ATPe utilizando una actividad ecto-ATPasa >40 veces superior a la medida experimentalmente (como se observa en la mayoría de los tipos celulares, [207]), la cinética de ATPe predicha muestra un comportamiento cinético distinto, con un aumento rápido de la concentración de ATPe, seguido de un lento decaimiento exponencial (**Fig. 49**).

Esto refleja que, en las condiciones experimentales, la actividad ecto-ATPasa casi no tiene efecto en la cinética de ATPe de eritrocitos humanos.



**Figura 49. Predicción del rol de la actividad ecto-ATPasa en la cinética de ATPe.**

La línea roja representa la curva de mejor ajuste del modelo a los datos experimentales (tomada de Fig. 22 A). La línea rosa representa la predicción de la cinética de ATPe suponiendo bloqueo total de actividad ecto-ATPasa ( $J_v$ ). La línea azul representa la cinética de ATPe predicha suponiendo una actividad ecto-ATPasa 43-veces mayor que la obtenida experimentalmente.

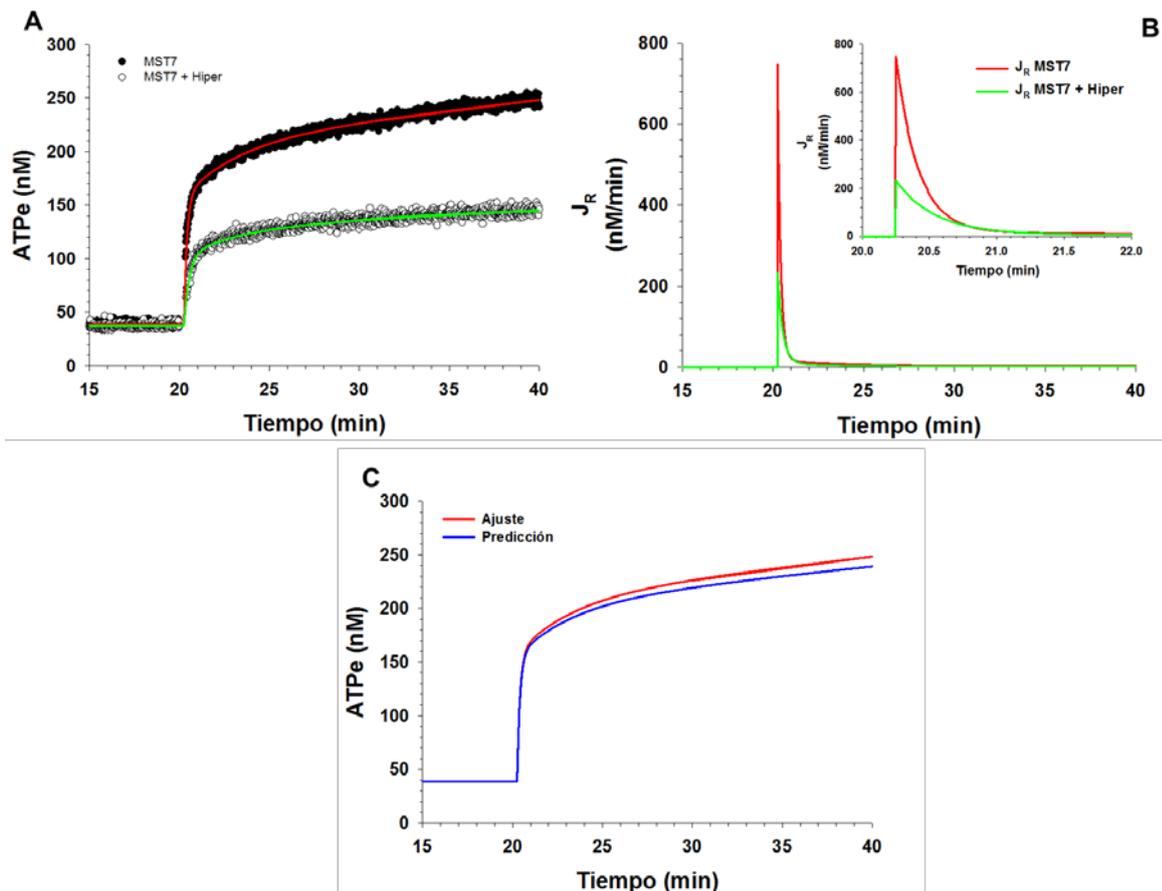
#### 4.7.3. Volumen celular.

Los resultados experimentales mostraron que en medio isosmótico el MST7 induce un aumento del volumen celular y salida de ATP. La acumulación de ATPe resultante fue fuertemente disminuida cuando las células fueron tratadas con MST7 en medio hiperosmótico, donde se bloquearon los cambios en el volumen celular (**Fig. 15 D**). Tras el ajuste del modelo a estos datos, se pudieron predecir los flujos en ambas condiciones experimentales (es decir, MST7 en medios isosmótico e hiperosmótico). En comparación con MST7 en un medio isosmótico, en un medio

hiperosmótico el pico inicial de flujo de ATP disminuyó un 70%, mientras que la fase de caída se mantuvo casi intacta (**Fig. 50 A y B**).

En principio, el cambio de  $V_r$  podría afectar la cinética de ATPe debido a dos factores: por un lado, teniendo en cuenta que el MST7 no afectó el contenido de ATPi (sección 4.1), el aumento de  $V_r$  –inducido por MST7– podría inducir una disminución de la concentración de ATP intracelular (ATPi). Como se recordará de 4.1, el ATPi es la principal fuerza impulsora de la salida de ATP. Alternativamente, el cambio de  $V_r$  podría afectar la permeabilidad al ATP.

Sin embargo, cuando se permitió en el modelo que la concentración de ATPi disminuyera como función del aumento de volumen celular, los efectos predichos sobre la cinética de ATPe fueron pequeños (**Fig. 50 C**). Estos resultados sugieren que el aumento del volumen celular dependiente de MST7 no afectó la cinética de ATP a través de un cambio en la concentración de ATPi, sino probablemente a través de un cambio en la permeabilidad al ATP (**Ecuación 3 y Tabla 5**, sección 2.13.3, Materiales y Métodos).



**Figura 50. Ajuste del modelo a las cinéticas de ATPe experimentales de eritrocitos humanos expuestos a MST7 en medio isosmótico e hiperosmótico y predicciones de los flujos correspondientes.**

**A:** Los datos experimentales (tomados de Fig. 15 D) muestran las cinéticas de ATPe de células expuestas a MST7 en medio isosmótico (MST7) y en medio hiperosmótico (MST7+ Hiper). Luego se ajustó el modelo a ambas situaciones experimentales. Las líneas representan el resultado del mejor ajuste.

**B:** El ajuste del modelo a los datos experimentales permitió calcular los flujos de salida de ATP correspondientes a la exposición de las células a MST7 en medio isosmótico (línea roja,  $J_R$  MST7) y en medio hiperosmótico (línea verde,  $J_R$  MST7 + Hiper). El recuadro muestra los primeros minutos post-estímulo del gráfico principal.

**C:** Efecto de ATPe sobre la cinética de ATPe. La línea roja representa el mejor ajuste del modelo a la cinética de ATPe (tomado de A). La línea azul representa una predicción donde se permite que la variación de volumen afecte la concentración de ATPi, y por lo tanto en el flujo de ATP, por lo que se afecta la cinética de ATPe. Esto se hizo teniendo en cuenta los cambios de volumen celular experimentales causados por el MST7 (Fig. 15 A) y usando la Ecuación 22 (sección 2.13.6, Materiales y Métodos) que considera el efecto cambio de volumen en el flujo de ATP.

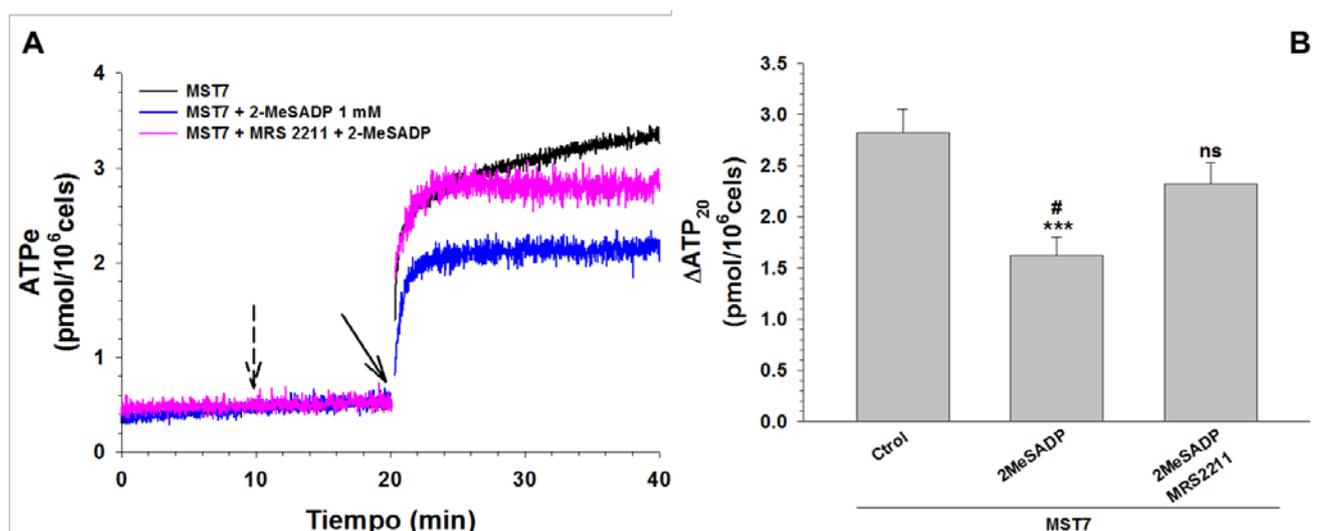
#### 4.8 Papel de los receptores P en la cinética de ATPe.

Dado que en eritrocitos humanos se ha descrito la presencia de receptores P2Y y P2X funcionales, en esta sección se evaluó la participación de estos receptores en la cinética de ATPe inducida por MST7.

#### 4.8.1 Receptor P2Y<sub>13</sub>.

El eritrocito humano exhibe receptores P2Y<sub>13</sub> funcionales con alta afinidad por ADP. Por lo tanto, evaluamos si la activación del receptor P2Y<sub>13</sub>, que induce disminución de la concentración de AMPc, es capaz de afectar la liberación de ATP.

Se determinó la cinética de ATPe dependiente de MST7 de eritrocitos humanos previamente incubados con 2-MeSADP, un potente agonista de ADP. En la **Fig.51** se muestra la cinética de ATPe en ausencia y en presencia de 2-MeSADP 1  $\mu$ M.



**Figura 51.** Efecto de la activación del receptor P2Y<sub>13</sub> sobre la cinética de ATPe de eritrocitos humanos expuestos a MST7.

**A:** Cinética de ATPe de células pre-incubadas con 2-MeSADP. Previo a la exposición a MST7, las células fueron adheridas a cubreobjetos tratados con poli-D-lisina 0,001% y pre-incubadas durante 10 min con 2-MeSADP 1  $\mu$ M (N=3, n=4) o 2-MeSADP+MRS2211 (N=3, n=4). La flecha punteada indica el agregado de los bloqueantes y la flecha continua indica exposición a MST7 10  $\mu$ M.

**B:** Aumento de la concentración de ATPe dependiente de MST7 en presencia o ausencia 2-MeSADP  $\pm$  MRS2211, calculada de los datos de A. Los valores están expresados como  $\Delta$ ATP<sub>20</sub>, es decir, la diferencia entre la concentración de ATPe a los 20 min luego del estímulo y la concentración de ATPe basal. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES. (\*\*\*,  $p < 0.001$ ; ns, no significativo respecto al Control, MST7 solo; #,  $p < 0,05$ , respecto a 2-MeSADP+MRS2211).

Se indica en número de determinaciones (n) de preparaciones independientes (N).

En ausencia de 2-MeSADP la cinética de ATPe exhibió una fase rápida de incremento, seguido de una fase más lenta (**Fig. 32 A y 51A**). Al pre-incubar las células durante 10 minutos con 2-MeSADP 1  $\mu$ M se observó una fase rápida de

aumento similar a la curva control (MST7 en ausencia de 2-MeSADP), seguido de inhibición completa de la fase lenta (**Fig. 51 A**); consecuentemente, el  $\Delta\text{ATP}_{20}$  se redujo 41% (**Fig. 51 B**).

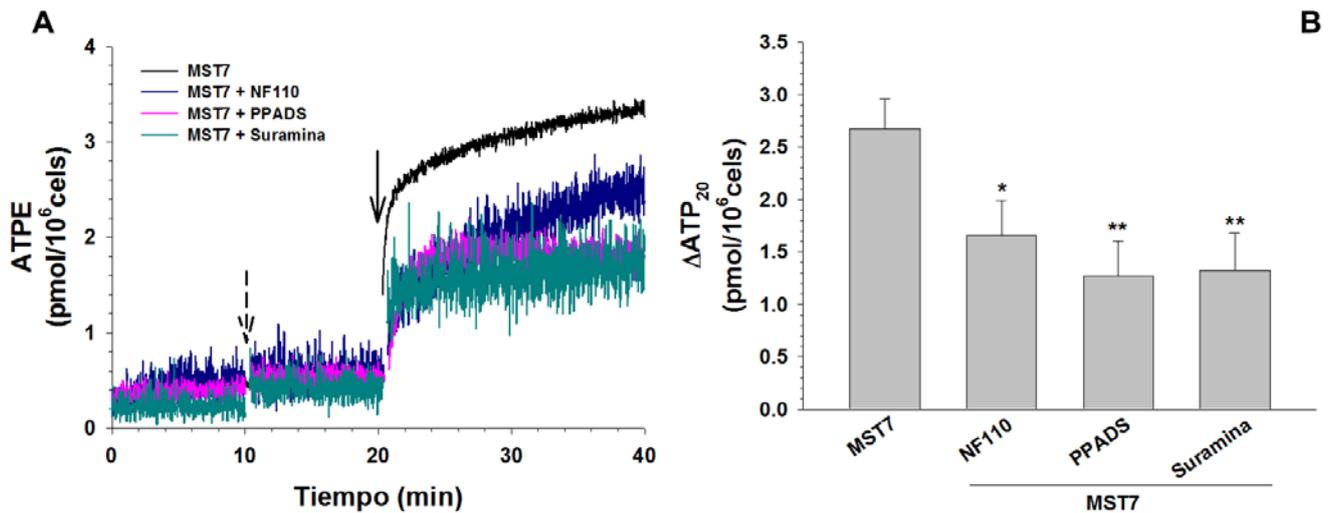
Cuando las células fueron pre-incubadas con MRS2211 10  $\mu\text{M}$ , antagonista del receptor  $\text{P2Y}_{13}$ , el efecto del 2-MeSADP sobre la cinética de ATPe fue completamente bloqueado durante los primeros 5 minutos post- estímulo, mientras que la fase lenta de aumento en la curva control no fue observada (**Fig. 51A**). Esto indica que MRS2211 sólo pudo bloquear el efecto inhibitorio de 2-MeSADP sobre la fase rápida de la respuesta. Aun así, cuando se analizan los cambios en el ATPe durante 20 min de estímulo, el valor de  $\Delta\text{ATP}_{20}$  con MST7 no es significativamente distinto a aquel observado en presencia de MST7 + 2-MeSADP + MRS2211.

#### *4.8.2 Receptor P2X.*

Se sabe que los eritrocitos exhiben receptores  $\text{P2X}_2$  y  $\text{P2X}_7$  funcionales. Sin embargo, a las concentraciones de ATPe ensayadas, el receptor  $\text{P2X}_7$  no se activa. Las células fueron expuestas a MST7 en ausencia y en presencia de diferentes bloqueantes de receptores P2X. Se utilizaron suramina y PPADS como bloqueantes genéricos de receptores P2X y NF110 para bloquear  $\text{P2X}_2$ .

La pre-incubación con NF110 10  $\mu\text{M}$ , PPADS 100  $\mu\text{M}$  o suramina 100  $\mu\text{M}$  llevó a un 40-50% de inhibición de la salida de ATPe (**Fig. 52 A y B**). No se observaron diferencias significativas entre los bloqueantes utilizados.

Los resultados obtenidos indicarían que el ATPe liberado luego de la exposición a MST7 sería capaz de activar receptores P2X, desencadenando eventos de señalización intracelular que llevan a un aumento de la salida de ATP.



**Figura 52.** Efecto de la inhibición de receptores P2X sobre la cinética de ATPe de eritrocitos humanos expuestos a MST7.

**A:** Cinética de ATPe de células pre-incubadas con antagonistas de receptores P2X. Previo a la exposición a MST7, las células fueron adheridas a cubreobjetos tratados con poli-D-lisina 0,001% y pre-incubadas durante 10 min con NF110 10  $\mu$ M (N=3, n=5), PPADS 100  $\mu$ M (N=5, n=6) o suramina 100  $\mu$ M (N=5, n=6). La flecha punteada indica el agregado de los bloqueantes y la flecha continua indica exposición a MST7 10  $\mu$ M.

**B:** Aumento de la concentración de ATPe dependiente de MST7 en presencia o ausencia de diferentes bloqueantes, calculada de los datos de A. Los valores están expresados como  $\Delta$ ATP<sub>20</sub>, es decir, la diferencia entre la concentración de ATPe a los 20 min luego del estímulo y la concentración de ATPe basal. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES. (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; no significativo respecto MST7 solo).

Se indica en número de determinaciones (n) de preparaciones independientes (N)

#### 4.9 Interacción dinámica entre volumen celular y ATPe.

Hasta aquí no se había analizado el mecanismo que media el aumento del volumen celular observado en los eritrocitos expuestos a MST7.

Se planteó la hipótesis de que el aumento de volumen dependiente de MST7 (**Fig. 47**) era inducido por entrada neta de sodio a la célula.

Entonces, se estudió la cinética de volumen de eritrocitos expuestos a MST7 en distintas condiciones. Por un lado se utilizó RBC-2 (medio estándar) conteniendo amilorida, un inhibidor del transporte de sodio a través de canales y transportadores [208-209]. Por otro lado, se utilizó un medio libre de sodio, es decir, medio RBC-2 en el cuál se reemplazó el sodio por colina, y finalmente, en

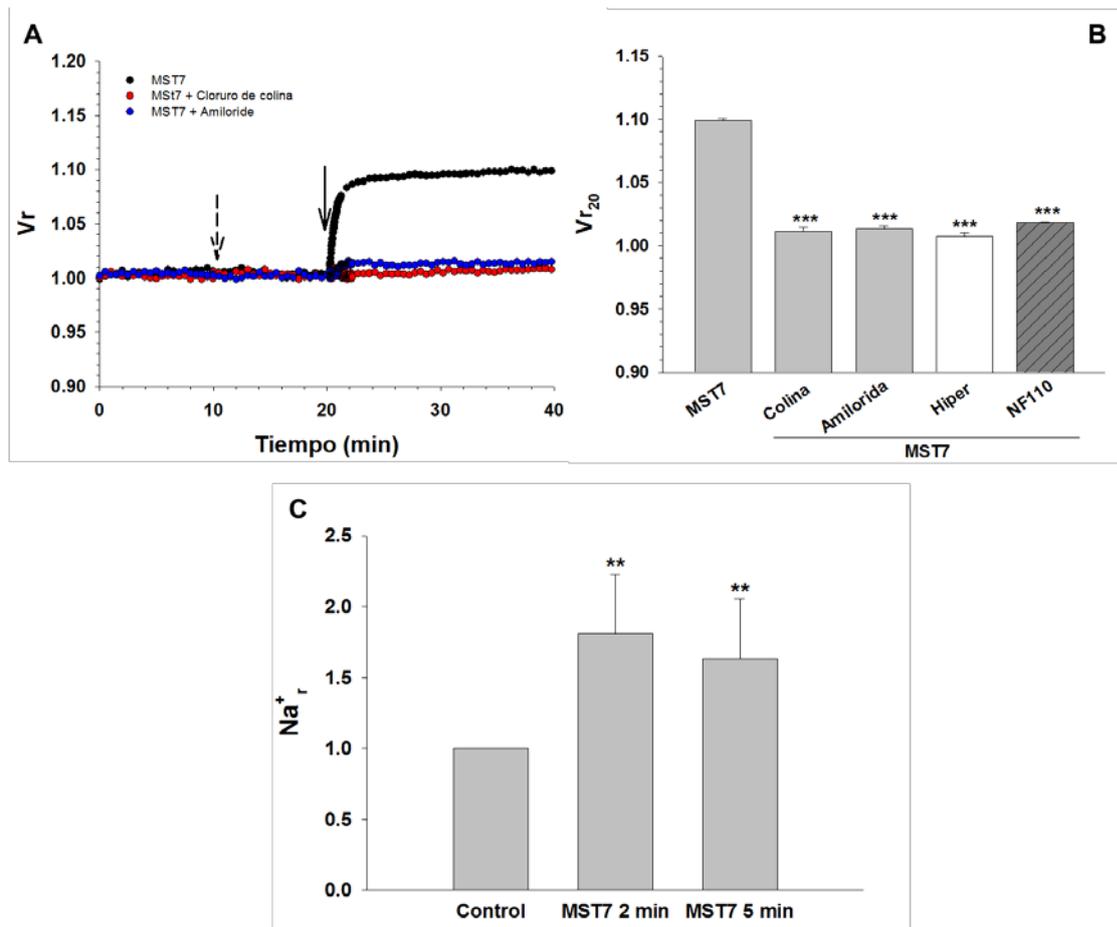
experimentos con RBC-2 se determinó el contenido de sodio intracelular en ausencia y en presencia de MST7.

Por último, dado que los experimentos de la **Fig.52** utilizando NF110 sugieren la participación de P2X<sub>2</sub> en la regulación de ATPe, y que este receptor es capaz de activar la entrada de sodio, también se evaluó el efecto de NF110.

En la **Fig. 53 A** se muestra la cinética de volumen de eritrocitos expuestos a MST7 en medio estándar con y sin amilorida, y en un medio sin sodio.

En medio estándar se observó un aumento agudo de Vr hasta  $1,10 \pm 0,01$ , valor en que el volumen permaneció estable. Sin embargo, en medio sin sodio o en medio estándar conteniendo amilorida, este aumento de Vr se redujo en un 90% con respecto a la condición control (**Fig. 53A y B**). Esta reducción de Vr es ligeramente menor que el bloqueo completo de aumento de Vr observado cuando las células fueron expuestas a MST7 en medio hiperosmótico (**Fig. 47 C**). El tratamiento con NF110 redujo un 85 % el aumento de Vr inducido por MST7 (**Fig. 53 B**).

En la **Fig. 53 C** se observa que el contenido relativo de sodio intracelular (Na<sup>+</sup><sub>i</sub>) aumentó alrededor de un 80% luego de la exposición a MST7, lo que termina de confirmar la participación de esta catión en la variación de volumen observada.



**Figura 53. Efecto del sodio sobre la cinética de Vr y de ATP de eritrocitos humanos expuestos a MST7.**

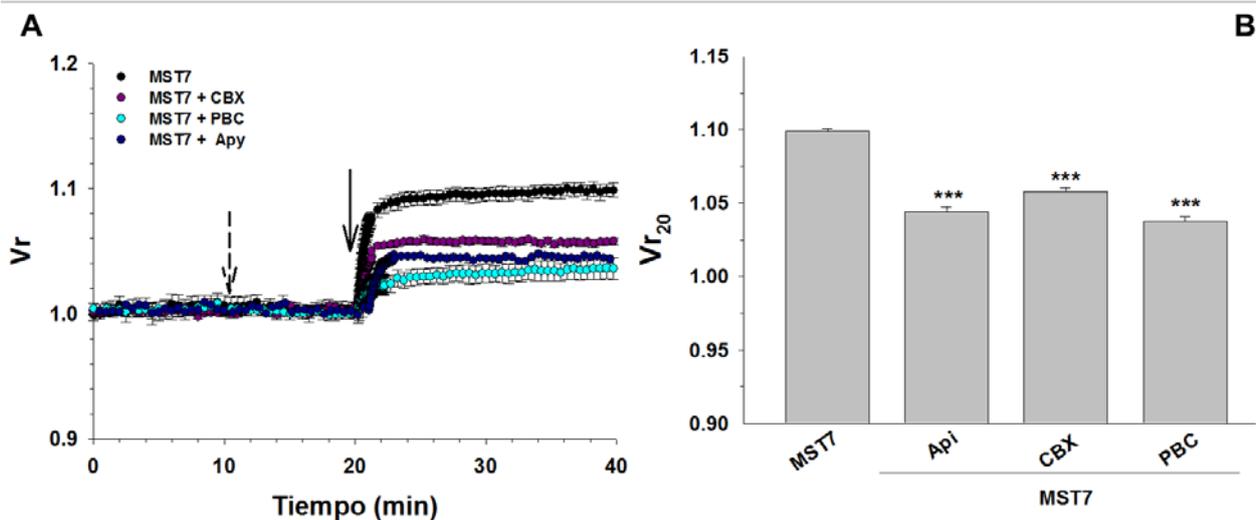
**A:** *Cinética de Vr.* Las células fueron cargadas con BCECF durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con medio isosmótico (300 mosM) se sembraron 400  $\mu$ L de la suspensión celular en cubreobjetos pre-tratados con poli-D-lisina 0,001%. Las células fueron incubadas durante 10 min en un medio isosmótico (300 mosM), para luego ser expuestas durante 10 minutos a un medio isosmótico sin sodio (con cloruro de colina) o a medio isosmótico conteniendo Amilorida 100 $\mu$ M. Para evitar la superposición de curvas no se muestra las cinéticas en medios con NF110 o en medio hiperosmótico. Sin embargo su variación final a los 20 min post estímulo se informan en B. Las calibraciones se realizaron al final de cada experimento. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES de 20-30 células (Amilorida, N=3; Colina, N=3). La flecha punteada indica inicio del tratamiento y la flecha continua indica exposición al estímulo

**B:** *Variación de Vr.* Los resultados están expresados como Vr<sub>20</sub>, es decir el Vr a los 20 min luego del estímulo. Las barras grises representan los valores de Vr<sub>20</sub> calculados a partir de A. Además se muestran los valores de Vr<sub>20</sub> obtenidos en presencia de medio hiperosmótico + MST7 (barra blanca) o medio isosmótico + NF110 + MST7. Los resultados son media  $\pm$  ES. (\*\*\*) p<0.001 respecto al control, es decir, el Vr<sub>20</sub> observado frente a MST7 en medio isosmótico).

**C:** *Variación del contenido relativo de sodio intracelular (Na<sup>+</sup><sub>r</sub>).* Las células fueron adheridas a cubreobjetos pre-tratados con poli-D-lisina 0,001% y expuestas a RBC-2 en ausencia (basal) o en presencia de MST7 durante 2 o 5 minutos. Luego se lisaron las células con TCA 20% y se determinó el contenido de sodio del sobrenadante. Los resultados están expresados como cociente respecto al contenido de sodio basal y son valores promedio  $\pm$  ES (\*\*, p<0.01 respecto al control. N=1, n=6) Se indica en número de determinaciones independientes (N).

Los resultados de la **Fig. 53 B** muestran que P2X activa el aumento de Vr. Dado que P2X debe ser activado por su ligando natural (ATPe), entonces una reducción en la concentración de ATPe debería producir una inhibición del aumento de Vr.

Entonces, se determinó la cinética de Vr de eritrocitos expuestos a MST7 en presencia de CBX o PBC 10  $\mu$ M (bloqueantes de la salida de ATP mediada por panexina 1) o de apirasa (enzima exógena que, en exceso, actúa como removedor de ATPe). El bloqueo parcial de la salida de ATP (CBX o PBC) o su remoción del medio extracelular (apirasa) indujo una disminución del 50-55% del aumento de Vr inducido por MST7 (**Fig. 54**).



**Figura 54. Efecto del ATPe sobre la cinética de Vr de eritrocitos humanos expuestos a MST7.**

**A:** *Cinética de Vr.* Las células fueron cargadas con BCECF durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con medio isosmótico (300 mosM) se sembraron 400  $\mu$ L de la suspensión celular en cubreobjetos pre-tratados con poli-D-lisina 0,001%. Las células fueron incubadas durante 10 min en un medio isosmótico (300 mosM), para luego ser expuestas durante 10 minutos a un medio isosmótico con CBX o PBC 10  $\mu$ M (bloqueantes de la salida de ATP por panexina 1) o con apirasa 10 U/mL (removedor de ATPe, Apy). Las calibraciones se realizaron al final de cada experimento. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES de 20-30 células (CBX, N=4; PBC, N=3; Apy, N=3). La flecha punteada indica inicio del tratamiento y la flecha continua indica exposición al estímulo

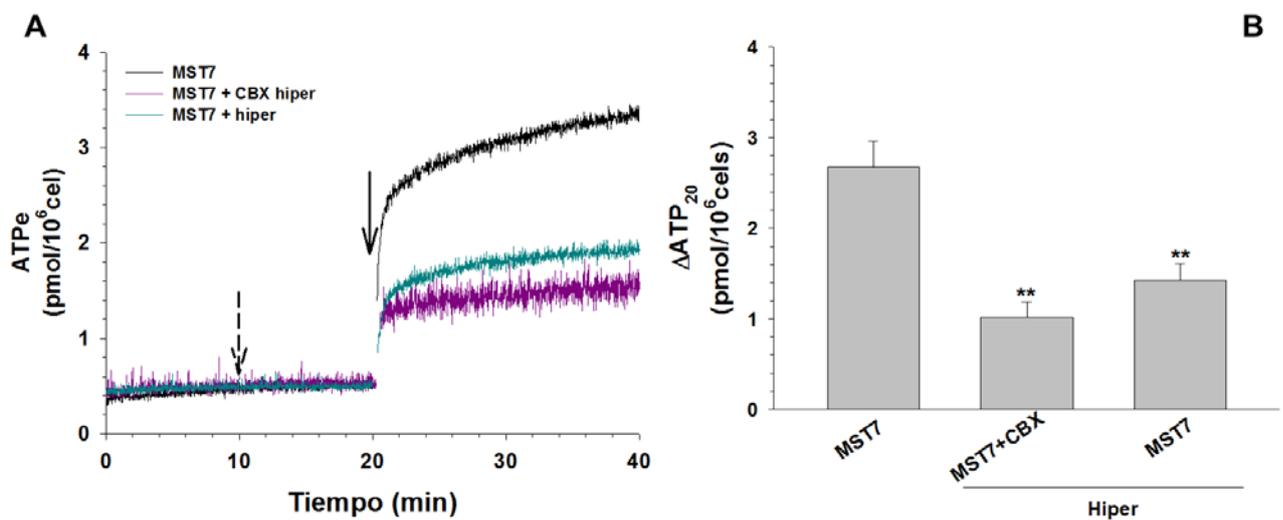
**B:** *Variación de Vr calculado de los datos de A.* Los resultados están expresados como Vr<sub>20</sub>, es decir, el Vr a los 20 min luego del estímulo. Los resultados son media  $\pm$  ES. (\*\*\*) p<0.001 respecto al control, es decir, el Vr<sub>20</sub> observado frente a MST7 en medio isosmótico).

Se indica en número de determinaciones independientes (N).

Seguidamente, nos propusimos evaluar si el componente de la salida de ATP vía panexina 1 coincidía con el componente de la salida de ATP que era sensible al

aumento de  $V_r$ . Es decir, si sólo la salida de ATP sensible a panexina 1 fuera sensible a  $V_r$ , entonces en medios hiperosmóticos (donde  $V_r$  no cambia), el CBX no debería tener efecto sobre la cinética de ATPe.

En base a esta idea, se incubaron  $3 \times 10^6$  células en un medio isosmótico y, luego de 10 min, el medio fue reemplazado por un medio hiperosmótico 345 mosM conteniendo CBX  $10 \mu\text{M}$ . Posteriormente, las células se expusieron a MST7 (**Fig. 55**).



**Figura 55. Efecto del bloqueo de panexina 1 sobre la cinética de ATPe en medio hiperosmótico.**

**A:** Cinética de ATPe de células expuestas a MST7 en medio hiperosmótico en ausencia o en presencia de carbenoxolona. Previo a la exposición a MST7, las células fueron adheridas a cubreobjetos tratados con poli-D-lisina 0,001% y se determinó el ATPe basal durante 10 min en medio isosmótico. Luego el medio fue reemplazado por un medio hiperosmótico (345 mosM) sin CBX (MST7 hiper; tomado de Fig. 15 D) o con CBX  $10 \mu\text{M}$  (MST7 + CBX hiper; N=4, n=7). La flecha punteada indica el cambio de medio y/o el agregado de CBX y la flecha continua indica exposición a MST7.

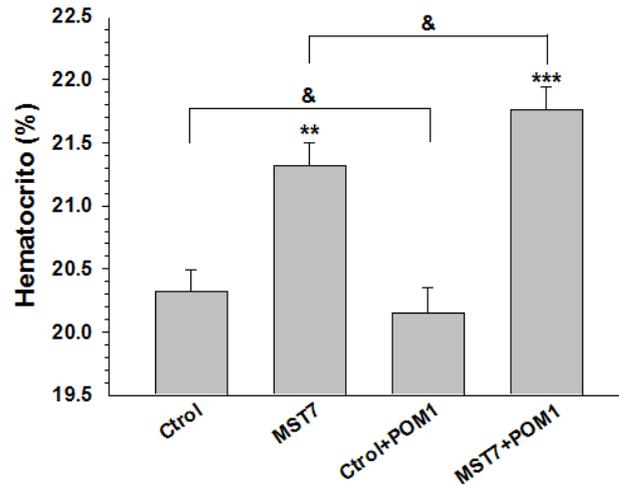
**B:** Aumento de la concentración de ATPe dependiente de MST7 en medios iso o hiperosmótico, y en ausencia y presencia de CBX, calculado de los datos de A. Los valores están expresados como  $\Delta\text{ATP}_{20}$ , es decir, la diferencia entre la concentración de ATPe a los 20 min luego del estímulo y la concentración de ATPe basal. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES.).

En la **Fig. 55** se observa que, en presencia de medio hiperosmótico + MST7, las cinéticas de ATPe son similares en ausencia y en presencia de CBX. Con ambos tratamientos la salida de ATP se bloqueó en un 50-60%, no observándose diferencias significativas entre ambos (**Fig. 55 B**).

### *Validación del aumento de Vr inducido por MST7 mediante la técnica del hematocrito.*

Todos los experimentos de esta sección fueron realizados con células adheridas y un hematocrito muy bajo (0,75%). Nos propusimos evaluar si el efecto del MST7 sobre el volumen también ocurre en una condición más fisiológica, como en suspensiones celulares a altos hematocritos. El experimento cobra relevancia teniendo en cuenta que en esta condición experimental observamos salida de ATP dependiente de MST7, aun cuando las células no estén adheridas (**Fig. 42**). Además, al estimar volumen por hematocrito, podríamos ratificar (o rectificar) un resultado obtenido con una técnica independiente. La única diferencia es que, a hematocritos altos, la actividad ecto-ATPasa puede inhibir parcialmente la acumulación de ATPe, razón por la cual una serie de experimentos fue realizado con POM-1, un inhibidor de ecto-nucleotidasas.

Entonces, suspensiones celulares de hematocrito 20% se incubaron con RBC-2 o MST7 durante 2 minutos y luego se midió el Vr mediante la determinación del hematocrito (ver sección 2.8.1 Materiales y Métodos). En la **Fig. 56** se muestra que la exposición a MST7 indujo un incremento de  $5 \pm 0,2$  %. Cuando el experimento se repitió pre-incubando las células con POM-1 la exposición a MST7 produjo un aumento de  $8 \pm 0,2$  %. Se observa un incremento mayor de Vr que, si bien no es significativamente diferente al obtenido sin POM-1, marca una tendencia hacia el aumento del Vr.



**Figura 56: Efecto del MST7 sobre el volumen celular de eritrocitos humanos no adheridos.**

Suspensiones celulares de hematocrito 20 % fueron expuestas a RBC-2 (Ctrl) o MST7 10  $\mu$ M, en presencia o ausencia de POM-1 100  $\mu$ M. Luego de 2 min de exposición al estímulo, se determinaron los hematocritos. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ES (N=5, n=46) (\*\*,  $p < 0,05$  respecto a su control; &: no significativo).

Se indica en número de determinaciones (n) de preparaciones independientes (N).

## Discusión

## **Introducción.**

En ausencia de estímulo los eritrocitos humanos exhiben un estado estacionario donde la concentración de ATPe se mantiene constante en el tiempo. Este estado estacionario depende principalmente del balance dinámico entre dos procesos: la salida de ATP de las células, que aumenta la concentración de ATPe, y la velocidad de hidrólisis de ATPe, que disminuye su concentración. En consecuencia, cualquier factor que modifique o controle directa o indirectamente alguno de estos dos procesos puede, en principio, alterar el curso temporal de la concentración de ATPe, es decir, su cinética.

En la presente tesis se analizaron los factores que controlan la cinética de ATPe de eritrocitos humanos, cuando estas células fueron expuestas a dos estímulos inductores de la salida de ATP: un cocktail  $\beta$ -adrenérgico denominado 3V y el péptido MST7.

Además de un análisis cuantitativo de la cinética de ATPe, evaluamos también potenciales moduladores de la liberación de ATP como  $Ca^{2+i}$ , AMPc, adhesión celular y volumen celular.

Con anterioridad al trabajo desarrollado en esta tesis, se pensaba que 3V y MST7 actuaban de manera parecida, activando proteínas G triméricas que llevan a la síntesis de AMP<sub>C</sub>, y posterior señalización intracelular que llevaba a la salida de ATP [141,154]. Sin embargo, los resultados de esta tesis muestran un sistema más complejo, donde aparecen otros moduladores de la salida de ATP, algunos de los cuales interactúan con el ATPe y los receptores P y participan de bucles de retroalimentación. Veremos que la naturaleza de los estímulos utilizados (3V y

MST7) es suficientemente distinta como para explicitar distintas características de la regulación de ATPe.

Si bien los resultados experimentales se enmarcan exclusivamente en el nivel de organización celular, y los estímulos utilizados son farmacológicos, se discuten las implicancias de los hallazgos en un contexto sistémico *in vivo*, donde el organismo como un todo debe responder a estímulos fisiológicos.

### 5.1 Actividad ecto-ATPasa.

Así como la salida de ATP aumenta la concentración de ATPe, la actividad ecto-ATPasa, mediada por a una o varias ecto-nucleotidasas, limita la acumulación del nucleótido en el medio extracelular. Utilizando eritrocitos enteros y viables los resultados muestran que la actividad ecto-ATPasa es funcional en un amplio rango de concentraciones nanomolares (**Fig. 39**), que es precisamente el rango de concentraciones esperables *in vivo*. En consecuencia, en principio uno podría esperar que al aumentar la concentración de ATPe, una mayor actividad ecto-ATPasa compensaría estos cambios (siguiendo su curva de sustrato). Sin embargo, la magnitud de la actividad ecto-ATPasa medida fue muy baja, lo cual es una característica común en eritrocitos de mamíferos, como se pudo verificar al ensayar la actividad ecto-ATPasa en humanos, ratón y perro (**Fig. 31**). Por el contrario, en eritrocitos nucleados, como los de *Xenopus laevis*, la actividad ecto-ATPasa es muy superior, constituyendo un importante determinante de la cinética de ATPe ([207], ver **Fig. 31**).

La baja actividad ecto-ATPasa de eritrocitos humanos tiene una serie de consecuencias prácticas y fisiológicas que es conveniente discutir:

1) en nuestras condiciones experimentales los eritrocitos se hallan en hematocritos muy bajos, ya que el volumen total de todos los eritrocitos ocupa menos del 1% del volumen de ensayo. Luego de la aplicación de un estímulo (3V o MST7), el flujo de salida de ATP es al menos 3 órdenes mayor que la actividad ecto-ATPasa, con lo cual la cinética de ATPe observada se debe casi exclusivamente a la salida de ATP.

2) ¿Puede *in vivo* una baja actividad ecto-ATPasa de eritrocitos ser importante para afectar la tasa de hidrólisis de ATP intravascular? A pesar de que el flujo de salida de ATP es muy superior a la actividad ecto-ATPasa, a hematocritos similares a la condición *in vivo*, la concentración de eritrocitos es tan alta (ocupando ~40% del volumen de sangre), que la actividad ecto-ATPasa total de estas células consumiría un 5-6% de ATP plasmático por minuto. Por lo tanto, a pesar de que en el lumen vascular los ecto-nucleotidasas de leucocitos y células endoteliales, e incluso exonucleotidasas del plasma exhiben cierto grado de actividad ATPasa [210-211], la actividad ecto-ATPasa de eritrocitos contribuye de manera significativa a la hidrólisis de ATP plasmático, ya que la relativa baja actividad ecto-ATPasa específica es compensada por la alta abundancia de estas células. Hasta el momento la contribución de la actividad ecto-ATPasa de eritrocitos a la velocidad de hidrólisis del ATP intravascular no ha sido tomada en cuenta en estudios de ecto-nucleotidasas vasculares [80,211-213].

Por otro lado, existen indicios de que en situaciones patológicas la contribución de la actividad ecto-ATPasa de eritrocitos a la cinética de ATPe podría incrementarse. Por ejemplo, en un estudio de nuestro grupo de trabajo, se observó que luego de la infección de eritrocitos por *P. falciparum*, la actividad ecto-ATPasa se incrementó 400 veces [214], mientras que el flujo de salida de ATP solo aumenta al doble.

Claramente en esta situación la contribución relativa de estos dos procesos a la cinética de ATPe está alterada como producto de la infección.

Más adelante en la discusión, el modelado matemático (ver sección 5.3.2.2) permitirá visualizar cómo el flujo de salida de ATP y la actividad ecto-ATPasa contribuyen a la cinética de ATPe en las condiciones ensayadas. Además el modelo permitirá predecir distintas situaciones fisiológicas y patológicas como las mencionadas.

## **5.2 Salida de ATP dependiente de 3V.**

Se ha postulado que el AMPc es el principal segundo mensajero que activa la salida no lítica de ATP de eritrocitos humanos [150]. Por eso diseñamos el cocktail 3V, optimizando la dosis de cada uno de sus componentes para inducir un aumento agudo y significativo de la concentración de AMPc.

Previo a la adición de 3V, la concentración de ATPe se mantuvo constante en  $12,5 \text{ nM}/10^6$  células. A esa concentración la salida de ATP puede calcularse a partir de la actividad ecto-ATPasa, ya que la constancia de la concentración de ATPe se explica suponiendo que la velocidad de ambos procesos (velocidad de salida de ATPi y velocidad de consumo de ATPe) es equivalente. Entonces, según la curva de sustrato (**Fig. 39**), la actividad ecto-ATPasa y por ende también el flujo de salida de ATP en reposo es de  $0,2 \text{ fmoles}/10^6$  células/min.

La exposición de las células a 3V produjo un incremento rápido y agudo de la concentración de ATPe, que corresponde a una velocidad inicial de liberación de ATP de  $\sim 880 \text{ fmoles}/10^6$  células/min, seguida de una rápida inactivación (**Fig. 19**). Es interesante observar que, si bien se trata de un incremento en el flujo de salida de 4400 veces su valor basal, la masa de ATP liberada es solo el 0,3 % de la

concentración de ATPi, y en consecuencia no representa un gasto energético para la célula.

### *5.2.1 Vías de salida.*

La salida de ATPe fue completamente bloqueada por carbenoxolona (CBX), un inhibidor de panexina 1 (**Fig. 24**) En varios tipos celulares esta proteína de membrana formaría un canal no selectivo a moléculas de  $M_r$  menor a 900 [197], con lo cual podría transportar ATP ( $M_r \sim 507$ ) y además se expresa en altos niveles en eritrocitos humanos [70]. Mas recientemente se observó que en eritrocitos humanos tres inhibidores de panexina 1 bloquearon la salida de ATP inducida por hipoxia, mientras que CBX fue capaz de bloquear parcialmente la salida de ATP inducida por medios hiposmóticos [71].

En nuestro caso, el bloqueo total por CBX indicaría que, al menos frente al cocktail 3V, los eritrocitos humanos exhiben una única vía de transporte de ATP que es mediada por panexina 1. El mismo resultado se obtiene utilizando eritrocitos de *Xenopus* (**Fig. 26**). Además, en eritrocitos de ratón knockout (KO) para panexina 1, el 3V no induce salida de ATP y, al igual que en humanos y *Xenopus*, CBX bloquea el flujo de ATP de eritrocitos de ratones wild type (WT).

### *5.2.2 ATP superficial.*

En la casi totalidad de los experimentos de esta tesis, la concentración de ATPe fue sensada con luciferasa soluble en un volumen de ensayo pequeño, donde la enzima mide el ATP en una columna de medio de ensayo de 100  $\mu\text{m}$  de altura con respecto al fondo de la cámara, donde están ubicadas las células (**Fig. 9**). Sin embargo, en

una única serie de experimentos se utilizó la sonda *ProAluc* para sensor el ATP directamente sobre la superficie celular (**Fig. 10**).

Entonces utilizando la sonda *ProAluc*, la cinética de ATPe superficial mostró un incremento agudo hasta un valor máximo, seguido de un decaimiento exponencial lento (**Fig. 30**). La velocidad inicial de liberación de ATP calculada fue de  $\sim 2,6$  pmoles/ $10^6$  células/min, valor 3 veces superior al obtenido con luciferasa soluble, y en el orden del valor obtenido al utilizar la misma sonda en células de astrocitoma humano [215].

La fase de decaimiento tiende a estabilizarse a una concentración de ATPe que es ligeramente mayor, pero aun así similar, al máximo valor de ATPe obtenido con la luciferasa soluble. Esta caída no lineal de la concentración de ATPe no se puede atribuir a la actividad ecto-ATPasa, que demostró ser despreciable en las condiciones experimentales (sección 5.1). Por lo tanto, hipotetizamos que la caída observada en la concentración de ATPe superficial es debida a la difusión extracelular del nucleótido, desde la superficie celular hacia zonas más alejadas de la célula.

En este contexto, la cinética de ATPe con *ProAluc* indicaría que, luego de la exposición al estímulo, el ATP se acumula de manera transiente sobre la superficie celular, donde es capaz de interactuar de manera autócrina con receptores P y ecto-nucleotidasas. Luego, la difusión extracelular reduce los niveles de ATPe hasta valores observados con luciferasa soluble, que sensa el ambiente micrométrico (0 a 100  $\mu\text{m}$ ) más alejado de las células y da idea de la potencial función parácrina.

### 5.3 Salida de ATP dependiente de MST7.

La cinética de ATPe dependiente de MST7 muestra similitudes y diferencias con la cinética de ATPe dependiente de 3V. Obviamente la fase pre-estímulo es similar: la concentración de ATPe es estable, con un eflujo de ATP de  $0,2 \text{ fmoles}/10^6$  células/min en equilibrio dinámico con una actividad ecto-ATPasa de similar magnitud. La exposición a MST7, de manera similar a 3V, produjo un incremento rápido y agudo de la concentración de ATPe, con velocidad inicial del flujo de  $\sim 2,03 \text{ pmoles}/10^6$  células/min, seguido de una inactivación gradual. Si bien, a iguales tiempos post-estímulo, los valores de concentración de ATPe alcanzado son mayores con MST7 que con 3V, aun así representan menos del 1,7 % de la concentración de ATPi, por lo tanto no constituyen un gran gasto energético para la célula.

Como veremos a continuación, la cinética de ATPe dependiente de MST7 es más compleja que en el caso de 3V, lo que justifica un estudio más extenso de los moduladores de la salida de ATP, y el uso de modelado matemático (ver sección 5.3.2.2 más adelante).

#### *5.3.1 Moduladores de la salida de ATP dependiente de MST7.*

##### *5.3.1.1 Señalización intracelular.*

Previo a esta tesis varios reportes indicaban que el MST7 induce un aumento en la concentración de AMPc que lleva a la salida de ATP de eritrocitos humanos [154].

En el presente estudio, la exposición de los eritrocitos humanos a MST7 causó un pequeño aunque significativo aumento en la concentración de AMPc (**Fig. 33**). Sin embargo, en las determinaciones on-line, sólo se observó un aumento en la

concentración de ATPe cuando las células eran adheridas a cubreobjetos pre-tratados con poli-D-lisina (**Fig. 32**).

Es decir, estábamos documentando que, además del AMPc, existían factores adicionales capaces de modular la salida de ATP inducida por MST7.

#### 5.3.1.2 La adhesión celular.

Los resultados de las **Figs.32 y 41** muestran que, en eritrocitos expuestos a MST7, solo se gatilla la liberación de ATP cuando las células se unen a poli-D-lisina u otros adherentes, mientras que el agregado de lisina o poli-D-lisina soluble no produjo ninguna respuesta.

Se comprobó que la adhesión celular *per se*, pero no un efecto electrostático (**Fig. 41**), puede actuar como modulador de la salida de ATP.

Varios autores observaron que la adhesión de eritrocitos a soportes cubiertos con poli-L-lisina, al igual que la deformación de estas células, eran capaces de reorganizar proteínas de membrana y del citoesqueleto [179-216] y que una o varias de estas proteínas son capaces de afectar la salida de ATP frente a distintos estímulos farmacológicos y fisiológicos [154].

Además, el potencial efecto de la adhesión celular sobre la liberación de ATPe cobra relevancia ya que:

- 1) la adhesión de eritrocitos aumenta con la edad biológica de las células [217].
- 2) los eritrocitos almacenados en bancos de sangre presentan un incremento en la adherencia al endotelio, tanto *in vitro* como *in vivo* [218]
- 3) durante la malaria, los eritrocitos infectados con *P. falciparum* se adhieren al endotelio vascular, y simultáneamente liberan más ATP [214].

### 5.3.1.3 Volumen celular.

En células adheridas, el MST7 induce un aumento agudo del volumen celular del ~10%. Se trata de una respuesta de poca magnitud, que pudo haber pasado desapercibida en estudios previos pero que, como veremos, tiene gran relevancia en el estudio de la cinética de ATPe de eritrocitos humanos.

Ya que en varios tipos celulares el aumento de volumen genera salida de ATP [133], hipotetizamos que éste podría ser uno de los componentes que contribuyen a la liberación de ATP inducida por MST7. En efecto, cuando se añadió MST7 disuelto en un medio ligeramente hiperosmótico, de forma de bloquear el aumento de volumen, la acumulación de ATPe se redujo en un 50 % (**Fig. 47**). Por lo tanto en eritrocitos humanos pequeños aumentos en el volumen celular, que en células adheridas inducirían fuerzas mecánicas sobre la superficie celular, fueron capaces de modular positivamente la liberación de ATP dependiente de MST7.

De acuerdo a esta idea, la concentración de ATPe aumenta cuando los eritrocitos de conejo se ven obligados a atravesar pequeños filtros [153] o cuando eritrocitos humanos circulan *in vitro* a lo largo de microcanales[219].

En apoyo de la idea de un “estrés mecánico” actuando como modulador de la liberación de ATP dependiente de MST7 se encuentra el hecho de que ambos estímulos compartirían la misma vía de señalización, induciendo liberación de ATP a través de la activación de la proteína  $G_i$ [201]. Nuestros resultados muestran que la liberación de ATP inducida por MST7 fue bloqueada en gran medida por la toxina de *Bordetellapertussis*, confirmando un mecanismo de salida de ATP dependiente de  $G_i$  (**Fig. 32**).

### 5.3.1.4 Liberación de ATP dependiente de MST7 en células sin adherir.

Los resultados discutidos hasta ahora indican que un incremento en la concentración de AMPc no induce salida de ATP a menos que las células sean “pre-activadas” por la adhesión.

Si, de acuerdo a las hipótesis vigentes, el AMPc constituía el principal agente inductor de la salida de ATP en eritrocitos humanos [141], resultó llamativo que el aumento relativo en la concentración de AMPc fuera de 12X con 3V y sólo 1,3X con MST7, mientras que el aumento en la concentración de ATPe fuera de 2X con 3V y 6X con MST7. Claramente no existe una correlación directa entre la magnitud del cambio en las concentraciones de AMPc y ATPe. Además, en el caso del MST7, las células necesitaban estar adheridas, mientras que en el caso de 3V, las células mostraban la misma respuesta en ausencia o en presencia de adhesión (**Fig.22**)

Nos preguntamos entonces, si las células no adheridas eran incapaces de responder al MST7 debido a que el aumento en la concentración de AMPc quedaba por debajo de un umbral de activación. De ahí surgió la idea de co-administrar MST7 con 3V, ya que este último cocktail está optimizado para inducir un aumento importante de la concentración de AMPc.

En los resultados de la **Fig. 44** demostramos que, en células sin adherir, la administración conjunta de 3V y MST7 indujo un incremento agudo de la concentración de ATPe que, además, es similar a la suma de la concentración de ATPe de ambos estímulos por separado (es decir, el incremento en ATP con 3V + el obtenido con MST7 sobre células adheridas).

Este "rescate" por 3V del efecto del MST7, obtenido en ausencia de adhesión, requiere un aumento robusto y persistente de la concentración de AMPc, ya que la exposición a MST7 + solo uno de los componentes de 3V (forskolina o isoproterenol) produjo sólo un ligero cambio en la concentración ATPe (**Fig. 44**).

Entonces, en eritrocitos humanos la liberación de ATP inducida por MST7 requiere uno de dos co-estímulos para operar: la adhesión celular o, en células no adheridas, una estimulación robusta de la síntesis de AMPc.

A continuación se discuten exclusivamente experimentos realizados con MST7 y células adheridas.

### *5.3.2 El flujo de salida de ATP y la regulación de la concentración de ATPe.*

#### *5.3.2.1 Vías de salida.*

La pre-incubación con CBX y/o PBC redujo la liberación de ATPe inducida por MST7. Como esta inhibición fue parcial, existirían al menos dos vías de salida de ATP, una vía mediada por panexina 1 (sensible a PBC y CBX), y una segunda vía que incluiría uno o más procesos no dependientes de panexina 1 (**Fig. 34**).

De manera consistente con los resultados en humanos, la exposición de eritrocitos de ratones WT a MST7 produjo un aumento en la concentración de ATPe que fue parcialmente inhibida en igual medida por CBX y por PBC, mientras que en los eritrocitos de ratonesKO para panexina 1 la activación de la salida de ATP fue menor que en células de ratones WT y no fue modificada por CBX y/o PBC (**Figs. 35 y 36**). Estos resultados confirman la especificidad de CBX y PBC como inhibidores de panexina 1 y, al igual que en eritrocitos humanos, sugieren la existencia de al menos dos vías de salida de ATP activadas por MST7.

Seguidamente se utilizaron una serie de inhibidores de canales aniónicos o transportadores ABC para intentar inhibir la salida de ATP no dependiente de panexina 1 (**Tabla 7, Fig. 38**). El problema es que, con excepción del  $Gd^{3+}$ , la

mayoría de estos inhibidores no son muy específicos, y de hecho pueden en mayor o menor grado inhibir a panexina 1 [15-203-220].

En consecuencia, los inhibidores no solo fueron utilizados por separado, sino también co-administrados con CBX. Si se inhibieran mecanismos adicionales a panexina 1, la co-administración redundaría en mayores porcentajes de inhibición de la salida de ATP respecto a las drogas administradas por separado.

¿Cómo se eligieron los inhibidores a testear?

Considerando que la exocitosis no ocurre en eritrocitos, la salida de ATP debe necesariamente estar mediada por canales o transportadores. Dado que a pH fisiológico la mayoría de las especies del ATP son aniónicas, focalizamos la búsqueda en canales o transportadores de Cl<sup>-</sup>, de los cuales en algunos casos existían indicios de que podían transportar ATP [18].

En ese sentido, si bien no se ha identificado a nivel molecular el maxi anionchannel (MAC), se ha postulado que puede mediar la salida de ATP y que su actividad puede ser inhibida por lantánidos como el lantano (La<sup>3+</sup>) y el gadolinio (Gd<sup>3+</sup>). Más aún, en células de fibrosarcomamurino, el MAC y la panexina 1 constituyen dos vías independientes de permeabilidad al ATP[205].

DIDS y NPPB son dos conocidos bloqueantes de canales y transportadores de cloruro, de baja especificidad [222-223]. Se sabe que el DIDS bloquea la salida de ATP de eritrocitos humanos sometidos a hipoxia [7], aunque no se analizó si parte de esta inhibición se debía a bloqueo de panexina 1. Por otro lado, en eritrocitos humanos se reportó que la infección por *P.falciparum* activaría un transportador aniónico sensible a NPPB, que podría mediar la salida de ATP [223].

Los experimentos con bloqueantes, ensayados con eritrocitos expuestos a MST7, mostraron que: 1) el  $Gd^{3+}$  no afectó significativamente la salida de ATP inducida por MST7, descartándose entonces la participación del MAC en la respuesta; 2) al ensayar NPPB y DIDS, observamos en todos los casos un grado de inhibición similar a aquel observado con CBX. No se indujo mayor inhibición cuando estos bloqueantes fueron administrados junto con CBX.

Estos resultados muestran que no pudo ser identificado el o los mecanismos de salida de ATP que operarían de manera independiente de panexina 1.

Alternativamente se podría proponer, en lugar de dos vías independientes de salida de ATP, la formación de un complejo supramolecular, donde la panexina 1 interactuaría con otros transportadores y en general con otras proteínas de membrana. Se volverá a considerar esta idea al analizar el modelado matemático de la cinética de ATPe.

#### *5.3.2.2 Modelado matemático.*

El modelo diseñado para explicar la cinética de ATPe de eritrocitos expuestos a MST7 considera directa o indirectamente gran parte de la información experimental de esta tesis (ver sección 2.13, Materiales y Métodos).

Presenta tres características clave:

1- en todo momento, la concentración de ATPe está determinada por el balance entre las velocidades de liberación de ATP y de hidrólisis de ATPe por la actividad ecto-ATPasa.

2- la salida de ATP requiere de dos vías.

3- el transporte transmembrana de ATP por estas vías está impulsado por el gradiente químico del ATP a través de la membrana celular, multiplicado por una

permeabilidad al ATP que es dinámica, en el sentido de que varía en función del tiempo del ensayo (ver Ec. 10, sección 2.13.3, Materiales y Métodos). Esta permeabilidad es compatible con la probabilidad de apertura promedio de los canales y transportadores presentes en los eritrocitos.

El modelo en un todo funciona como una hipótesis, ya que si se muestra apropiado para explicar los datos experimentales (si se ajusta a los datos), las suposiciones implícitas en sus ecuaciones son en principio compatibles con ellos.

Ya que el modelo pudo ser ajustado a los datos exitosamente, exploremos entonces algunas de estas suposiciones:

- 1- La salida de ATP requiere de dos vías independientes de salida, una de ellas mediada por panexina 1. Como se muestra en la **Fig.48**, la suposición de vías totalmente independientes, no interactuantes, lleva a un ajuste sesgado, ya que se obtiene un mejor ajuste del modelo a los datos al suponer un cierto grado de interacción entre ambas vías. Esta característica no solo es compatible con la existencia de dos vías de salida, sino también con la idea de una únicavía formada por un complejo supramolecular. Recordemos que (sección 2.13.5, Materiales y Métodos), desde el punto de vista matemático, además del modelo de dos vías propuesto, donde los flujos experimentan una transición temporal en dos pasos, los resultados también son compatibles con un único flujo que sufre una transición en tres pasos. En ese sentido, Silverman et al. [224].proponen que en neuronas y astrocitosla vía de salida de ATP podría estar formada por un complejo supramolecular llamado inflamasoma, conteniendo dos o más transportadores de ATP, incluyendo panexina 1, un receptor P y una o varias enzimas.

- 2- La actividad ecto-ATPasa fue simulada como una función lineal de la concentración de ATPe a partir de la curva de sustrato experimental (**Fig. 39**). Vimos que la actividad ecto-ATPasa es muy baja en relación a los flujos que promueven la salida de ATP. En consecuencia, el modelo ajustado predice que el bloqueo de la actividad ecto-ATPasa tiene muy poco efecto en la cinética de ATPe predicha (**Fig.49**). Por el contrario, un aumento teórico de 40X de esta actividad muestra claramente el potencial efecto modulador de la actividad enzimática sobre la cinética de ATPe. Esta predicción es interesante en vista de que en algunas condiciones fisiológicas y patológicas pueden evidenciarse grandes aumentos en la velocidad de hidrólisis de ATPe por una o varias ecto-nucleotidasas. Además, hay que tener en cuenta que el eritrocito es una célula móvil y, por lo tanto, el ATPe liberado por estas células podría ser hidrolizado por otros tipos celulares en la vasculatura.
- 3- Efecto del volumen sobre la salida de ATP. Como la concentración de ATPe observada es nanomolar y la concentración de ATPi es milimolar, en el modelo el ATPi constituye el principal parámetro termodinámico que impulsa la salida de ATP. Dado que nuestros resultados muestran que el contenido de ATPi no varía durante la exposición a MST7 (sección 4.1, capítulo 4), la concentración de ATPi debería disminuir con el aumento del volumen celular (**Fig. 47**), llevando a la concomitante disminución de la salida de ATP. Sin embargo en los eritrocitos humanos, los cambios observados sobre la concentración de ATPi (como consecuencia del aumento de volumen) al ser introducidos en las ecuaciones del modelo, predicen un efecto muy pequeño sobre la cinética de ATPe (**Fig. 50 C**). Por el contrario, el ajuste modelo dependiente a la cinética de ATPe experimental permitió calcular el flujo de

ATP predicho en ausencia de cambios de volumen (MST7 en medio hiperosmótico) o en presencia de cambios de volumen (MST7 en medio isosmótico) (**Fig. 47**), sugiriendo que los cambios en el volumen celular modifican principalmente los parámetros de permeabilidad del transporte de ATP. Es decir, la exposición de los eritrocitos a MST7 induce un pequeño aumento de volumen que, a su vez, genera una gran activación de la salida de ATP. El modelo muestra que esta activación no está afectada por la pequeña disminución en la concentración de ATPi, sino que depende principalmente de un aumento en la permeabilidad al ATP.

### *5.3.2.3 La cinética de ATPe y los bucles.*

El aumento inicial de la concentración de ATPe, que se corresponde con una fase aguda de aumento del flujo de ATP ( $J_R$ ), podría ser compatible con la existencia de un bucle de retroalimentación positivo. Estos bucles son, por su propia naturaleza, autocatalíticos. Es decir, ante la exposición a MST7, la salida de ATP redundaría en un aumento de la concentración de ATPe. Este aumento, que no es compensado por la actividad ecto-ATPasa (que es muy baja, **Fig. 39**), y que solo parcialmente podría disminuir por difusión extracelular (**Fig. 25**), podría activar la salida de ATP, cerrando de esta manera el bucle. Si este proceso no tuviera límite, la concentración de ATPe post-estímulo aumentaría indefinidamente, algo que no coincide con la cinética de ATPe observada, ni con las simulaciones de los flujos correspondientes. Más aun, un proceso de este tipo llevaría a la pérdida de una gran proporción del ATPi, reduciendo la energía metabólica disponible, situación que no se observa experimentalmente. De hecho, durante toda la cinética de ATPe, la pérdida de ATPi no supera el 1,7 %.

Entonces, si bien los primeros segundos post-estímulo son compatibles con algún sistema de retroalimentación positivo, los resultados sugieren la presencia de uno o más sistemas de retroalimentación negativos, que imponen un freno al potencial aumento descontrolado de la salida de ATP. Esto explica que el flujo de ATP, luego de unos segundos de estímulo, decaiga rápidamente, lo que lleva a que la concentración de ATPe aumente más lentamente y alcance un estado estacionario a tiempos más prolongados (**Fig. 32**).

En el análisis siguiente daremos cuenta de estos bucles de retroalimentación en el contexto de la cinética de ATPe de eritrocitos estimulados con MST7.

#### *5.3.2.4 Receptores P y regulación del volumen celular*

Los eritrocitos liberan ATP, y éste se puede acumular y ser metabolizado generando ADP, AMP y adenosina extracelulares. En principio el ATPe y sus productos metabólicos podrían modular la liberación de ATP al activar receptores P, constituyendo de esta manera bucles de retroalimentación.

De los diecinueve receptores P existentes en células eucariotas, los eritrocitos humanos sólo cuenta con unos pocos subtipos que se expresan y son funcionales: P2Y<sub>13</sub>, P2X<sub>2</sub> y P2X<sub>7</sub>.

La activación de receptores P2Y<sub>13</sub>, que exhiben alta afinidad por ADP extracelular, induce inhibición de adenilato ciclasas presentes en el eritrocito [154,225-226] y la consiguiente disminución de la concentración de AMPc. En un estudio previo [157] se demostró que en eritrocitos humanos la salida de ATP inducida por un estímulo β-adrenérgico era bloqueada por 2-MeSADP, análogo de ADP, aunque no se monitoreó la cinética de ATPe.

En nuestro sistema de estudio, con células expuestas a MST7, la pre-incubación de los eritrocitos con 2-MeSADP redujo alrededor de un 40% la acumulación de ATPe. El antagonista del receptor sólo pudo bloquear la fase rápida de la cinética de ATPe, lo que sugiere un mecanismo inhibitorio adicional aún no identificado.

Dado que en nuestras condiciones experimentales la actividad ecto-ATPasa es muy baja, no se acumularía suficiente ADP extracelular para activar P2Y<sub>13</sub>. No obstante, *in vivo*, la baja actividad ecto-ATPasa de los eritrocitos se compensa con la alta abundancia de estas células, que junto con la actividad ecto-ATPasa de las plaquetas, leucocitos y células del endotelio vascular, sumado a exonucleotidasas del plasma, puede generar concentraciones micromolares de ADP capaces de activar P2Y<sub>13</sub>. De esta forma, se generaría un mecanismo de retroalimentación negativo capaz de regular la liberación de ATP de los eritrocitos humanos.

Por otro lado, también se evaluó la participación de receptores P2X en la cinética de ATPe. Se trata de receptores ionotrópicos, cuya activación induce la entrada de cationes [114].

La pre-incubación de las células con suramina y PPADS, dos bloqueantes genéricos de receptores P2X, llevó a una inhibición parcial de la salida de ATP inducida por MST7. Debido al relativo alto valor de EC<sub>50</sub> de P2X<sub>7</sub> (100-300 µM, 117), muy superior a las concentraciones de ATPe obtenidas en nuestras condiciones experimentales (~250 nM), se descarta la participación de P2X<sub>7</sub> en la respuesta al MST7. Por lo tanto, el efecto observado sería mediado por los receptores P2X<sub>2</sub>.

Para corroborar esta hipótesis, los eritrocitos fueron tratados con NF110, un potente antagonista de receptores P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub> y P2X<sub>3</sub>, obteniéndose una inhibición de la

salida de ATP ligeramente inferior a aquella observada en presencia de suramina o PPADS, aunque las diferencias no fueron significativas (**Fig. 52**).

Entonces, estaríamos en presencia de un bucle de retroalimentación positiva, donde la exposición a MST7 genera aumento en la concentración de ATPe, que a su vez activa P2X<sub>2</sub> e induce mayor salida de ATP.

A continuación veremos que el volumen celular es el factor clave que vincula estos procesos.

#### *5.3.2.4.1 El volumen celular cierra el bucle...*

Bajo exposición a MST7, el aumento de volumen observado debería ser consecuencia de un aumento en la osmolaridad intracelular, generado por la entrada neta de uno o varios osmolitos, seguido de entrada neta de agua siguiendo su equilibrio osmótico.

Se sabe que la entrada de Ca<sup>2+</sup> en eritrocitos es capaz de activar canales de K<sup>+</sup> (canales Gardos, [227]), generando pérdida de K<sup>+</sup> y reducción del volumen. Estos cambios de volumen van en dirección contraria a los cambios observados frente al MST7 y además, como se mostró en la Fig. 33, la exposición a MST7 no modificó la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup>.

Se optó entonces por evaluar una posible entrada neta de Na<sup>+</sup> a la célula, ya que es un soluto osmóticamente y su gradiente químico-transmembrana favorece termodinámicamente el ingreso a la célula.

En varios tipos celulares sometidos a distintos estímulos fisiológicos, los cambios en la concentración de Na<sup>+</sup> intracelular ocurren entre 10-30 mM [220-230]. Este grado

de variación está en el orden de los cambios de osmolaridad intracelular requeridos para explicar los cambios volumétricos observados en presencia de MST7 (**Fig. 47**).

Esta hipótesis fue confirmada por los resultados de la **Fig. 53**, donde se puede observar que, tras la exposición a MST7 el contenido de Na<sup>+</sup> intracelular aumentó un 80 %, y paralelamente se observó el bloqueo casi total del aumento del volumen celular tras la inhibición de canales y transportadores de sodio, o cuando los experimentos se realizan en medios carentes de este catión.

Es decir, el MST7 induce un aumento de la osmolaridad intracelular a través del influjo neto de sodio, con la consiguiente entrada de agua, lo que se traduce en aumento del volumen celular. En base a los experimentos que realizamos utilizando medios isosmóticos e hiperosmóticos en presencia de MST7 (**Fig. 47**), sabemos que el aumento del volumen celular induce la salida de ATP.

Considerando que bajo exposición a MST7 el ATPe es capaz de activar receptores P2X<sub>2</sub> (**Fig. 52**), nos preguntamos entonces si estos receptores podrían mediar la respuesta de volumen inducida por MST7. Nótese que los receptores P2X forman canales catiónicos con conductancias para Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> [114]. Además se había reportado que en eritrocitos humanos la activación de receptores P2X aumentaba el flujo de cationes [161].

Entonces, resultó interesante observar que, cuando los eritrocitos fueron pre-incubados con el antagonista de P2X<sub>2</sub>, se obtuvo un bloqueo casi total del aumento del volumen celular (**Fig. 53 B**), demostrando entonces que este receptor está implicado en la activación de la liberación de ATP dependiente de volumen. Se propuso entonces la siguiente secuencia de eventos:

**Liberación de ATPi → aumento de la concentración de ATPe → activación de P2X<sub>2</sub> → influjoneo de Na<sup>+</sup> → aumento de Vr → liberación de ATPi**

*¿Cómo se frena este bucle de retroalimentación positiva?*

Uno de los frenos es el equilibrio osmótico: la entrada de Na<sup>+</sup> genera un aumento en la concentración del catión que luego se estabiliza, lo que explica un comportamiento similar en la cinética de Vr (**Fig. 53**). Es decir, el aumento de Vr se autolimita por equilibrio osmótico y actúa como freno del bucle positivo. Esta respuesta es adaptativa, ya que evita la lisis y la pérdida de grandes masas de ATPi. A su vez, la entrada transitoria –autolimitada– de sodio podría deberse a que el receptor P2X<sub>2</sub> se desensibiliza bajo exposición prolongada a su ligando, el ATPe [114]. Recordemos que se mantienen concentraciones elevadas de ATPe durante todo el tiempo de exposición al estímulo.

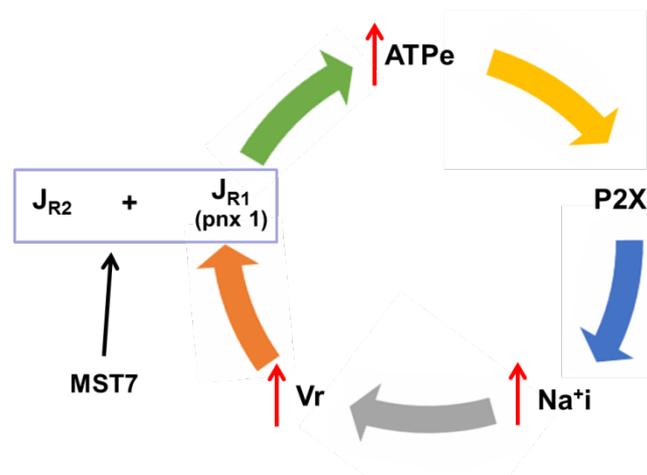
Otro potencial freno a la salida exacerbada de ATPe podría deberse a la disminución de la concentración de ATPi por aumento de volumen, aunque esto no ocurre en nuestras condiciones experimentales (sección 4.1).

Recordemos que el ATPi es la fuerza que impulsa la salida de ATP. Si bien el modelo matemático predice que ante aumentos de volumen de ~10%, los cambios en la concentración de ATPi solo inducen cambios muy pequeños en la cinética de ATPe, ante mayores aumentos de volumen la respuesta de la cinética de ATPe podría verse afectada de manera significativa.

Por último, considerando que tanto el flujo de ATP mediado por panexina 1 como el aumento de volumen controlan ~50 % de la salida de ATP, quisimos evaluar si uno o los dos flujos de salida de ATP propuestos eran sensibles al cambio de volumen.

Por lo tanto si sólo la salida de ATP sensible a panexina 1 fuera sensible a volumen, entonces en medios hiperosmóticos, donde el cambio de volumen está bloqueado, el CBX no debería tener efecto sobre la cinética de ATPe.

Los resultados de la **Fig. 55** confirman que el flujo mediado por panexina 1 es el flujo activado por el aumento de volumen. Entonces, los resultados se pueden entender con el siguiente esquema:



**Esquema 1.** Regulación recíproca entre ATPe y Vr.

La exposición a MST7 activa dos vías de salida de ATP ( $J_{R1} + J_{R2}$ ). Una vez en el medio extracelular el ATP activa receptores  $P2X_2$ , lo que lleva a un aumento en la concentración de sodio intracelular seguido de la entrada de agua; esto produce un aumento en el volumen celular que activa la salida de ATP por  $J_{R1}$ , generando así un bucle de retroalimentación positiva.

$J_{R1}$  y  $J_{R2}$ , flujos de salida de ATP;  $Na^+i$ , concentración de sodio intracelular; Vr, volumen celular; pnx 1: panexina 1

Se ilustra al MST7 activando dos flujos (o alternatively un único complejo supramolecular), donde uno de estos, el dependiente de panexina 1, está involucrado en un bucle. Nótese que el ciclo implica abandonar la noción que surgía de la interpretación de la **Fig. 47**, una noción bastante aceptada en la literatura, donde el aumento de volumen activa la liberación de ATP. Acá se ven relaciones recíprocas, de causalidad circular [231], donde el volumen activa la liberación de ATP, y el ATPe activa el aumento de volumen.

## Conclusión y Resumen

## CONCLUSIÓN

En eritrocitos humanos expuestos a 3V, el cocktail activa la vía clásica de señalización intracelular, aumentando los niveles intracelulares de AMPc y, por mecanismos aún poco conocidos, esto lleva a la salida de ATP. Bajo las condiciones experimentales ensayadas, el ATP sale por una única vía que es mediada por la panexina 1, ya sea formando el propio canal de salida de ATP o formando parte de un complejo supramolecular. Este mecanismo de liberación de ATP inducido por 3V parece conservarse en varias especies, ya que se obtuvieron resultados similares al utilizar eritrocitos de ratón y de *Xenopus laevis*.

En cambio, en eritrocitos humanos expuestos a MST7, la activación de la liberación de ATP requiere de la adhesión celular a distintos sustratos, o de un fuerte aumento en la concentración de AMPc. Además, la salida de ATP es en parte mediada por el aumento del volumen celular, inducido por MST7, a través de un mecanismo de retroalimentación positiva que involucra receptores P2X2 y la entrada de sodio a la célula.

El MST7 induciría la salida de ATP por al menos dos vías, una de ellas mediada por panexina 1. Nuestros resultados sugieren que esta vía estaría involucrada en la salida de ATP mediada por el aumento del volumen celular.

## RESUMEN

Los eritrocitos humanos liberan ATP al medio extracelular en respuesta a la deformación mecánica, la estimulación adrenérgica, la hipoxia y la acidosis. Una vez en el medio extracelular, el ATP puede interactuar con dos grupos de proteínas: los receptores purinérgicos (receptores P) y las ecto-nucleotidasas (enzimas que degradan nucleótidos en el medio extracelular).

*In vitro*, la exposición de los eritrocitos a diferentes agentes farmacológicos desencadena eventos intracelulares que activan la salida de ATP.

En la presente tesis se analizaron los factores que controlan el curso temporal de la concentración de ATP extracelular (cinética de ATPe) de eritrocitos humanos, cuando estas células son expuestas a dos estímulos: un cocktail  $\beta$ -adrenérgico denominado 3V y el péptido mastoparín 7 (MST7). Ambos estímulos inducen un aumento en la concentración de AMPc, el principal segundo mensajero que activa la salida de ATP de eritrocitos humanos.

Se resumen los resultados principales:

Cuando las células fueron expuestas a 3V, se observó un incremento agudo en la concentración de AMPc, que se tradujo en una liberación aguda y transiente de ATP. Cuando las células fueron pre-incubadas con carbenoxolona (inhibidor de canales de panexina 1) la salida de ATP inducida por 3V fue bloqueada completamente. Estos resultados indican que, frente al cocktail 3V, los eritrocitos humanos exhiben una única vía de salida de ATP que es mediada por panexina 1.

Cuando las células se expusieron a MST7, pequeños aumentos en la concentración de AMPc correlacionaron con un aumento significativo de la liberación de ATP, que fue de mayor magnitud y más prolongada que en el caso de 3V. Además, la

carbenoxolona indujo un bloqueo parcial de la salida de ATP, lo que sugirió la existencia de dos vías de salida de ATP.

Además del AMPc, se estudió la participación del volumen celular y la adhesión celular a distintos sustratos. Para ello se determinaron las cinéticas de volumen celular y de acumulación de ATPe en células adheridas a distintos sustratos, y en células sin adherir.

En células no adheridas expuestas a MST7 no se observó salida de ATP ni variación del volumen celular.

Por otro lado en células adheridas con poli-D-lisina y expuestas a MST7, la concentración de ATPe se incrementó 6 veces, mientras que en células adheridas a otros sustratos los incrementos observados fueron de diferente magnitud.

Al evaluar el volumen celular de eritrocitos adheridas a poli-D-lisina, se observó:

- 1- en medio isosmótico, el MST7 indujo un aumento de volumen de ~10%;
- 2- en MST7 disuelto en medio hiperosmótico, este aumento de volumen celular pudo ser bloqueado, mientras que la salida de ATP se redujo en un 50% (comparado con MST7 en medio isosmótico).
- 3- la inhibición de canales y transportadores de sodio produjo un bloqueo del 90% en el aumento del volumen celular inducido por MST7, mientras que la salida de ATP se redujo en un 50%;
- 4- la inhibición de receptores P2X (receptores de ATP que forman canales de cationes) bloqueó completamente el aumento de volumen celular inducido por MST7, mientras que la salida de ATP disminuyó un 50%.

En decir que en eritrocitos humanos la adhesión celular - a distintos sustratos- es un pre-estimulo necesario para inducir la salida de ATP por MST7. Esta salida es parcialmente dependiente del volumen celular.

Además, se construyó un modelo matemático que fue ajustado los datos experimentales. El modelo permitió predecir los flujos de salida de ATP asociados a la cinética de ATPe observada, tanto en presencia como en ausencia de cambios de volumen. Además permitió realizar predicciones en escenarios fisiológicos y patológicos.

## SUMMARY

Human erythrocytes (RBCs) release ATP in response to mechanical deformation, adrenergic stimulation, hypoxia and acidosis.

*In vitro*, exposure of erythrocytes to different pharmacological agents triggers intracellular events that activate ATP release.

In this thesis factors controlling the temporal evolution of extracellular ATP (ATPe) concentration were analyzed. Cells were exposed to two ATP release stimuli:  $\alpha\beta$ -adrenergic cocktail called 3V and the peptide mastoparn 7 (MST7). Both stimuli induce an increase of cAMP, the main second messenger involved in ATP release of RBCs.

Main results:

Under 3V exposure there is an acute increase of cAMP, which translated into an acute, transient release of ATP. When cells were pre-exposed to CBX (pannexin 1 inhibitor), ATP release induced by 3V was completely blocked. Thus under 3V stimulation, RBCs exhibit a single ATP conduit mediated by pannexin 1.

Under MST7 exposure, small cAMP increases correlated with a acute and strong ATP release. CBX induced a partial blockage of ATP release, thus suggesting the existence of at least two conduits for ATP release.

In addition to cAMP, the potential role of cell volume and cell adhesion on ATPe kinetics was studied.

In non-adhered cells, MST7 neither trigger ATP release nor affected cell volume.

On the other hand, in cells adhered to poli-D-lisine coverslips, and exposed to MST7, ATPe concentrations strongly increased, whereas adhesion to other adherents also activated ATP release of different magnitudes.

When analyzing cell volume of adhered cells we found:

- 1- in isosmotic medium, MST7 increased cell volume by ~10%;
- 2- in MST7 dissolved in hyperosmotic medium, cell volume increase was blocked, whereas ATP release was reduced by half.
- 3- inhibition of sodium channels and transporters reduced cell volume increase by 90%, and ATP release by 90%.
- 4- inhibition of P2X ionotropic receptors (with conductance for cations) completely blocked cell volume increase, and inhibited ATP release by 50%.

## Referencias

## REFERENCIAS

- 1- Lipmann F. (1944) *J. BiolChem* 155:55-70.
- 2- Klacklar H.M.(1944) *J. Biol. Chem.* 154:267-273.
- 3- A.N. Drury, A. Szent-Gyorgyi (1929).*J. Physiol.* 68:213-237.
- 4- Burnstock G. (1971). *Nature*229:82-283.
- 5- Burnstock G. (1972)*Pharmacol. Rev.* 24: 509-581.
- 6- Cavalier C., Ohnsorg P.M., Rohrer L., von Eckardstein A. (2012)*ArteriosclerThrombVascBiol.* 32:131-139
- 7- BergfeldG.R., Forrester T (1992). *Cardiovasc. Res.*26:40-47.
- 8- BodinP., BurnstockG. (1995) *Experientia*51(3):256-9.
- 9- Dutta A.K., Sabirov R.Z., Uramoto H., Okada Y.(2004) *J Physiol.* 15;559(Pt 3):799-812.
- 10- Hiroshi Ishizaka, LihKuo. (1996)*Circulation Research.* 78:50-57.
- 11- Phillis J.W.(2004) *Crit Rev Neurobiol.*16(4):237-70.
- 12- Yegutkin G.G., Henttinen T., Jalkanen S. (2001) *FASEB J.* 5(1):251-260.
- 13- Sabirov R.Z., Dutta A.K., Okada Y. (2001). *J. Gen. Physiol.* 118:251-266.
- 14- Espelt M.V., de Tezanos Pinto F., Alvarez C.L., Alberti G.S., Incicco J., Leal Denis M.F., Davio C., Schwarzbaum P.J. (2013) *Am J PhysiolCellPhysiol.* 304(10):C1013-26.
- 15- Lazarowski ER. (2012)*PurinergicSignal.* 8:359-373
- 16- Beigi R., Kobatake E., Aizawa M, Dubyak G.R. (1999) *Am J Physiol.*276:267-278
- 17- JansD., Srinivas S.P., Waelkens E., Segal A., Lariviere E., Simaels J., van Driessche W. (2002) *J. Physiol* 545:543-555
- 18- Sabirov R.Z., Okada Y. (2005) *PurinergicSignal.* 1:311-328.
- 19- Moser T.L., Stack M.S., Asplin I., Enghild J.J., Hojrup P., EverittL. (1996) *ProcNatlAcadSci USA* 96:2811-2816.
- 20- Chi S.L., Pizzo S.V. (2006) *Ann Med* 38:429-438.
- 21- Das B., Mondragon M.O., Sadeghian M., Hatcher V.B., Norin A.J.(1994)*J Exp Med* 180:273-281.
- 22- Bodin P, Burnstock G (2001) Purinergicsignalling: ATP release. *Neurochem Res* 26:959-969.
- 23- Pankratov Y., Lalo U., Verkhatsky A., North R.A. (2006) *Pflügers Arch Eur J Physiol.* 452:589-597.
- 24- North R.A., Verkhatsky A. (2006) *Pflügers Arch Eur J Physiol* 452:479-485.
- 25- Coco S., Calegari F., Pravettoni E., Pozzi D., Taverna E., Rosa P., Matteoli M., Verderio C. (2003) *J Biol. Chem.*278:1354-1362.
- 26- Liu G.J., Werry E.L., Bennett M.R. (2005) *Eur J Neurosci.*21:151-160.
- 27- Bowser D.N., Khakh B.S. (2007) *J Gen Physiol.* 129:485-491.
- 28- Okada S.F., O'Neal W.K., Huang P., Nicholas R.A., Ostrowski L.E., Craigen W.J., Lazarowski E.R., Boucher R.C. (2004)*J Gen Physiol.* 124(5):513-26.

- 29- Okada S.F., Nicholas R.A., Kreda S.M., Lazarowski E.R., Boucher R.C. (2006) *J BiolChem.* 281:22992-23002.
- 30- Hisadome K., Koyama T., Kimura C., Droogmans G., Ito Y, Oike M. (2002) *J Gen Physiol.* 119:511-520.
- 31- Taruno A., V. Vingtdeux, M. Ohmoto, Ma Z., Dvoryanchikov G., Li A., Adrien L., Zhao A, Leung S, Abernethy M., Koppel J, Davies P, Civan MM, Chaudhari N, Matsumoto I, Hellekant G, Tordoff MG, Marambaud P and Foskett JK. (2013)*Nature* 495:223-229.
- 32- Sabirov R.Z, Okada Y. (2009) *J Physiol.Sci.* 59:3-21.
- 33- Strange K., Emma F., Jackson P.S. (1996) *Am J Physiol* 270:C711-C730.
- 34- Higgins C.F.(1992) *Annu. Rev.Cell. Biol.* 8:67-113.
- 35- Abraham E.H., Prat A.G., Gerweck L., Seneveratne T., Arceci R.J., Kramer R (1993)*ProcNatlAcadSci USA* 90:312-316.
- 36- Reisin I.L., Prat A.G., Abraham E.H., Amara J.F., Gregory R.J., Ausiello D.A., CantielloH.F.(1994) *J BiolChem.* 269:20584-20591.
- 37- Schwiebert E.M., Egan M.E., Hwang T.H., Fulmer S.B., Allen S.S., Cutting G.R. (1995)*Cell* 81:1063-1073.
- 38- Schwiebert E.M. (1999) *Am J Physiol.* 276:C1-C8.
- 39- NaumannN., Siratska O., Gahr M., Rosen-Wolff A. (2000) *J Cyst. Fibros.* 4:157-68.
- 40- Reddy M.M., Quinton P.M., Haws C., Wine J.J., Grygorczyk R., Tabcharani J.A., Hanrahan J.W., Gunderson K.L., Kopito R.R. (1996) *Science* 271:1876-1879.
- 41- Grygorczyk R., Tabcharani J.A., Hanrahan J.W. (1996) *J Membr. Biol.* 151:139-148.
- 42- Watt W.C., Lazarowski E.R., Boucher R.C. (1998) *J BiolChem.*273:14053-14058.
- 43- Roman R.M., Lomri N., Braunstein G., Feranchak A.P., Simeoni L.A., Davison A.K., Mechetner E., Schwiebert E.M., Fitz JG (2001). *J MembrBiol.* 183:165-173.
- 44- Hassessian H., Bodin P., Burnstock G. (1993) *J Pharmacol.* 109:466-472.
- 45- Gilula N.B., Reeves O.R., Steinbach A. (1972)*Nature* 235:262-265.
- 46- Bennett M.V., Goodenough D.A. (1978)*Neurosci Res Program Bull*16:1-486.
- 47- Loewenstein W.R. (1987)*Cell*48:725-726.
- 48- Orellana J.A., Froger N., Ezan P., Jiang J.X., Bennett M.V., Naus C.C.(2011) *J Neurochem*118:826-840.
- 49- Decrock E., De Vuyst E., Vinken M., Van Moorhem M., Vranckx K., Wang N. (2009)*CellDeath Differ*16:151-163.
- 50- De Vuyst E., Wang N., Decrock E., De Bock M., Vinken M., Van Moorhem M. (2009) *Cell Calcium* 46:176-187.
- 51- Eltzschig H.K., Eckle T., Mager A., Kuper N., Karcher C., Weissmuller T. (2006)*Circ Res.* 99:1100-1108.

- 52- Wong C.W., Christen T., Roth I., Chadjichristos C.E., Derouette J.P., Foglia B.F. (2006) *Nat Med* 12:950-954.
- 53- Robertson J., Lang S., Lambert P.A., Martin P.E. (2010) *Biochem J* 432:133-143.
- 54- Toma I., Bansal E., Meer E.J., Kang J.J., Vargas S.L., Peti-Peterdi J. (2008) *Am J PhysiolRegulIntegr Comp Physiol*.294:R1769-R1776.
- 55- Song M., Yu X., Cui X., Zhu G., Zhao G., Chen J. (2009) *ExpBiolMed* (Maywood) 234:1192-1200.
- 56- Stout C.E., Costantin J.L., Naus C.C., Charles A.C. (2002) *J BiolChem*277:10482-10488.
- 57- Li H., Liu T.F., Lazrak A., Peracchia C., Goldberg G.S., Lampe P.D.(1996 ) *J Cell. Biol.*134:1019-1030.
- 58- Kang J., Kang N., Lovatt D., Torres A., Zhao Z., Lin J.(2008) *J Neurosci* 28:4702-4711.
- 59- Panchin Y., Kelmanson I., Matz M., Lukyanov K., Usman N., Lukyanov S. (2000) *Curr.Biol.* 10:R473-R474.
- 60- Ambrosi C, Gassmann O, Pranskevich JN, Boassa D, Smock A, Wang J. (2010) *J Biol.Chem.* 285: 24420-24431.
- 61- Boassa D, Ambrosi C, Qiu F, Dahl G, Gaietta G, Sosinsky G. (2007) *J Biol.Chem.* 282:31733-31743.
- 62- Thompson RJ, Jackson MF, Olah ME, Rungta RL, Hines DJ, Beazely MA (2008) *Science*322:1555-1559.
- 63- Iwabuchi S, Kawahara K. (2011) *Neuro.chemInt.*58:376-384.
- 64- Kawamura M Jr., Ruskin DN, Masino SA. (2010) *J Neurosci* 30:3886-3895.
- 65- Woehrle T, Yip L, Manohar M, Sumi Y, Yao Y, Chen Y. (2010) *J Leukoc. Biol.* 88:1181-1189.
- 66- Seminario-Vidal L, Okada SF, Sesma JI, Kreda SM, van Heusden CA, Zhu Y. (2011) *J Biol.Chem.* 286:26277-26286.
- 67- Ransford GA, Fregien N, Qiu F, Dahl G, Conner GE, Salathe M. (2009) *Am J Respir Cell MolBiol.* 41:525-534.
- 68- Godecke S, Roderigo C, Rose CR, Rauch BH, Godecke A, Schrader J. (2012) *Am J PhysiolCellPhysiol.* 302:C915-C923.
- 69- Qiu F, Gadhl G. A (2009) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296:C250-C255.
- 70- LocoveiS., BaoL., Dahlg. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:7655-7659
- 71- Sridharan M., Adderley S. P., Bowles E. A., Egan T. M., Stephenson A. H., Ellsworth M. L., Sprague R. S. (2011) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 299:H1146-1152.
- 72- BaoL., LocoveiS. DahG. (2004) *FEBS Lett.* 572:65-68.
- 73- Silverman W, Locovei S, Dahl G (2008) *Am J Physiol Cell Physiol* 295:C761-C767.
- 74- Ma W, Hui H, Pelegrin P, Surprenant A (2009) *J Pharmacol. Exp. Ther.* 328:409–418.
- 75- Sévigny J., Coté Y.P., Beaudoin A.R. (1995) *Biochem. J* 312:351-356.

- 76- Taylor A.L., Kudlow B.A., Marrs K.L., Gruenert D.C., Guggino W.B., Schwiebert E.M.(1998) *Am J Physiol* 275:1391-1406.
- 77- Nyberg M, Al-Khazraji B. K., Mortensen S P., Jackson D. N., G. Ellis Christopher, Hellsten Y. (2013) *Am J Physiol. Regul. Integr. Comp Physiol.* 305: R281-R290.
- 78- Zimmermann H, Zebisch M, Straeter N. (2012). *Purinergic Signal.* 8:437-502.
- 79- Lazarowski, E. R. Chap. I en *Current topics in membranes.* 2003. Elsevier Science. pp.59-96.
- 80- Kukulski F, Levesque SA, Sévigny J (2011) *Adv Pharmacol.* 61:263-299.
- 81- Yegutkin GG, Mikhailov A, Samburski SS, Jalkanen S (2006) *Mol Biol. Cell* 17:3378-3385.
- 82- Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H (2006) *Purinergic Signal.* 2:409-430.
- 83- Knowles A.F. (2011) *Purinergic Signal.* 7:21-45.
- 84- Zimmermann H. (2001) Ecto-nucleotidases. In: Abbracchio MP, Williams M (eds) *Handbook of experimental pharmacology. Purinergic and pyrimidergic signalling*, vol 151/I. Springer, Heidelberg, pp 209–250.
- 85- Heine P, Braun N, Zimmermann H (1999) *Eur. J Biochem.* 262:102–107.
- 86- Ziganshin A.U., Hoyle C.H., Ziganshina L.E., Burnstock G. (1994) *Br. J. Pharmacol.* 113:669-674.
- 87- Culic O., Lemmens R., Teuchy H., Vandeffel L. (1995) *Histochem. J.* 27:555-564.
- 88- Joseph S. M., Pifer M. A., Przybylski R. J. y G. R. Dubyak (2004). *Br. J. Pharmacol.* 142:1002-1014.
- 89- Machida T., Heerdt P.M., Reid A.C., Schäfer U., Silver R.B., Broekman M.J., Marcus A.J., Levi R. (2005) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313:570-577.
- 90- Levesque S.A., Lavoie E.G., Lecka J., Bigonnesse F: Sévigny J. (2007) *Br. J. Pharmacol.* 152:141-50.
- 91- Baqi Y, Weyler S, Iqbal J, Zimmermann H, Müller CE. (2009) *Purinergic Signal.* 5(1):91-106.
- 92- Müller CE, Iqbal J, Baqi Y, Zimmermann H, Röllich A, Stephan H. (2006) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16(23):5943-7.
- 93- Harden T.K., Lazarowski E.R., Boucher R.C.(1997) *Trends Pharmacol. Sci.* 18:43:46.
- 94- Zimmermann H.(1992) *Biochem. J.* 285:245-265.
- 95- Misumi Y., Ogata S., Hirose S., Ikehara Y.(1990) *J Biol. Chem.* 265:2178-2183.
- 96- Schwarzbaum P. J., Frischmann, M.E., G. Krumschnabel, R.C. Rossi and W. Wieser. (1998) *Am. J. Physiol.* 274:R1031-R1038.
- 97- Meghji P., Pearson J.D., Slakey L.L.(1995) *Biochem. J.* 308:725-31.
- 98- Berne RM. (1963) *Am J Physiol* 204:317-322.
- 99- Corriden R., Insel P.A., Chen Y., Junger W.G. (2008) *FASEB J.* 22:1179-3.
- 100- Pafundo D. E.; Mut, P.; Pérez Recalde, M., González-Lebrero, R. M., Fachino, V.; Krumschnabel, G. and P. J. Schwarzbaum. (2004) *Am. J. Physiol.* 287:R833-R843.

- 101-Cristalli G, Franchetti P, Grifantini M, Vittori S, Bordoni T, Geroni C. (1987) *J.Med.Chem.* 30(9):1686-8.
- 102-Bessodes M, Bastian G, Abushanab E, Panzica RP, Berman SF, Marcaccio EJ Jr, Chen SF, Stoeckler JD, Parks RE Jr. (1982) *Biochem.Pharmacol.* 31(5):879-82.
- 103-[Rosemberg DB](#), [Rico EP](#), [Senger MR](#), [Dias RD](#), [Bogo MR](#), [Bonan CD](#), [Souza DO](#).(2008) *Comp BiochemPhysiol B BiochemMol Biol.* 151(1):96-101.
- 104-Linden D. R., Sharkey K. A., Mawe, G. M. (2003). *J. Physiol.* 547:589-601
- 105-Burnstock G. (2007) *Cell. Mol. Life Scie.* 64:1471-83.
- 106-Fredholm B.B., Jzerman A.P., Jacobson K. A., Klotz K., Linden J. (2001) *Pharmacol. Rev.* 53:527.
- 107-Burnstock G.(2012). *Purinergic Signal* 34:218-225.
- 108-Burnstock G.(2012). *Bioessays* 34: 218–225, 2012.
- 109-Burnstock G., Ralevic V. (2013) *Pharmacol Rev.* 66(1):102-92.
- 110-Ralevic V., Burnstock G. (1998) *Pharmacol. Rev.* 50:413-492.
- 111-Cronstein B.N.(1994) *J Appl. Physiol.* 76:5-13
- 112-Olah M.E., Stiles G.L.(2000) *Pharmacol. Ther.* 85:55-75.
- 113-Vallon V. (2008) *Am J. Physiol.* 294:10-27
- 114-Hattori M., Gouaux E. (2012) *Nature* 485(7397):207-212.
- 115-Fricks I.P., Maddilet S.I., Carter R.L., Lazarowski E.R., Nicholas R.A., Jacobson K.A., Harden T.K. (2008) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 325:588-594.
- 116-Lin-Hua Jiang (2012) *Cell Health and Cytoskeleton* 4:83-101.
- 117-Namovic M.T., Jarvis M.F., Donnelly-Roberts D. (2012) *CurrProtocPharmacol.* Chapter 9:Unit 9.15.
- 118-Emmett D.S., Feranchak A., Kilic G., Puljak L., Miller B., Dolovcak S., McWilliams R., Doctor R.B., Fitz J.G.(2008) *Hepatology.* 47(2):698-705.
- 119-Surprenant A., North R.A. (2009) *Annu Rev Physiol.* 71:333- 359.
- 120-Burnstock G., Kennedy C. (2011) *Adv.Pharmacol.* 61:333-372.
- 121-Abbracchio M.P., Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. (2006). *Pharmacol Rev.* 58(3):281-341.
- 122-Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, King BF, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA, Burnstock G. (2003) *Trends Pharmacol Sci.* (2):52-5
- 123-Jacobson K.A., Boeynaems J.M. (2010) *Drug Discov. Today* 15(13-14):570-8.
- 124-Inoue K. (2008) *Cell Mol. Life Sci.* 65:3074-80.
- 125-Meyer M.P., Clarke J.D.W., Patel K., Townsend-Nicholson A. (1999) *Dev Dyn.* 214:152-8.
- 126-White N, Burnstock G. (2006) *Trends. Pharmacol. Sci.* 27:211-7.

- 127-Brinson A.E.,Harden T.K.(2001) *J.Biol.Chem.* 276:11939-11948.
- 128-North R.A. (2002) *Physiol. Rev.* 82:1013-1067.
- 129-Baurand A, Eckly A, Hechler B, Kauffenstein G, Galzi JL, Cazenave JP, Léon C, Gachet C. (2005) *MolPharmacol.* 67(3):721-33.
- 130-Lang F., Busch G.L., Völkl H.(1998) *Cell Physiol. Biochem.* 8:1-45.
- 131-Roman R. M., Wang Y., Lidofsky S. D., Feranchak A. P., Lomri N., Scharschmidt, B.F., Fitz J.G. (1997)*J. Biol. Chem.* 272:21970-21976.
- 132-Pafundo, D.E., Chara O., FaillaceM. P., KrumschnabelG., Schwarzbaum P.J. (2008)*Am. J. Physiol.* 294:R220-R233.
- 133-Hazama A., Fan H., Abdullaev I., Maeno E., Tanaka S.,Okada Y. (2000)*J. Physiol.*523:1-11.
- 134-Chara O., Espelt M.V., Krumschnabel G., Schwarzbaum P.J. (2011)*J. Exp. Zool. Part A* 315:175-202.
- 135-Locovei S., Scemes E., Qiu.F, Spray D.C., Dahl G. (2007)*FEBS Lett.* 581:483-488.
- 136-Alvarez-LefmansF.J., Reuss L.(1996).Biofísica y Fisiología celular. Ed. Universidad de Sevilla. 179-21
- 137-Pafundo D.E., Alvarez C.L., Krumschnabel G., Schwarzbaum P.J. (2010). *J. Biol. Chem.* 285:6134-6144.
- 138-Chara O., Pafundo D.E., Schwarzbaum P.J. (2009)*Bull. Math. Biol.* 71:1025-1047.
- 139-Zuo P., Picher M., Okada S.F., Lazarowski E.R., Button B., Boucher R.C., Elston T.C. (2008)*J. Biol Chem.* 283:26805-26819.
- 140-Krogh A. (1929)*Am JPhysiol*90:243-251.
- 141- Sprague R.S.,Bowles E.A, Achilleus D., EllsworthM. L.(2011)*Acta Physiol.* 202:285-292.
- 142-Lohman A.W., Billaud M., Isakson B.E. (2012)*Cardiovasc. Res.*95:269-280.
- 143-Ellsworth M. L., Forrester T., Ellis C. G., Dietrich H. H. (1995). *Am. J. Physiol.* 269:H2155-H2161.
- 144-Collins D.M., McCullough W.T, Ellsworth M.L. (1998)*Microvasc. Res.* 56, 43–53 (1998).
- 145-Harrington L.S., Evans R.J., Wray J., Norling L., Swales K.E., Vial C., Ali F., Carrier M.J, Mitchell J.A. (2007)*Mol. Pharmacol.* 72:1132-1136.
- 146-Mortensen S.P, González-Alonso J.,Bune L.T.,Saltin B., PilegaardH., Hellsten Y. (2009) *Am J Physiol.Regul.Integr. Comp Physiol.*296(4):R1140-8.
- 147-Jiang H., Zhu A.G., Mamczur M., Falck J.R., Lerea K.M., McGiff J.C. (2007)*Br J Pharmacol.* 151(7):1033-40.
- 148- Sprague R.S., Stephenson A.H., Ellsworth M.L. (2007)*Trends Endocrinol. Metab.* 18:350-355.
- 149- Suh B.C., Song S.K., Kim Y.K., Kim K.T. (1996)*J. Biol. Chem.* 271:32753-32759.
- 150- Sprague R.S., Bowles E.A., Hanson M.S., DuFaux E.A, Sridharan M., Adderley S., Ellsworth M.L., Stephenson A.H. (2008)*Microcirc.* 15(5):461-471

- 151-Adderley S.P., Sridharan M., Bowles E.A., Stephenson A.H., Ellsworth M.L., Sprague R.S. (2010)*Am J Physiol Heart CircPhysiol* 298:H587-593.
- 152-BirnbaumerL. Principles of Molecular Regulation (P.M. Conn and A.R. Means, eds) Humana Press Inc., Totowa, NJ.Cap 14 pp.149-260.
- 153-Olearczyk J.J., StephensonA.H., LonigroA.J., SpragueR.S. (2004)*Am J Physiol Heart CircPhysiol* 286:H940-945.
- 154-SpragueR.S., StephensonA.H., BowlesE.A., StumpfM.S., LonigroA.J. (2006)*Diabetes* 55:3588-3593.
- 155-Ellsworth M. L.,Ellis C.G., Goldman D., Stephenson A.H., Dietrich H.H., Sprague R.S. (2009) *Physiology* (Bethesda) 24:107-16.
- 156-Olearczyk J.J., Ellsworth M.L., Stephenson A.H., Lonigro A.J., Sprague R.S. (2004)*J Pharmacol.ExpTher* 309:1079-1084.
- 157-Wang L., Olivecrona G., Gotberg M., Olsson M.L., Winzell M.S., Erlang D. (2005)*Circ Res* 96:189-196.
- 158-Dahl G., Harris A.L. Humana Press, 2009Chapter 12 pp. 287-299.
- 159-Abraham E.H. , Sterling K.M., Kim R.J., Salikhova A.Y., Huffman H.B., Crockett M.A., Johnston N., Parker H.W., Boyle Jr. W.E., Hartov A., Demidenko E., Efird J., Kahn J., Grubman S.A., Jefferson D.M., Robson S.C., Thakar J.H., Lorico A., Rappa G., Sartorelli A.C., Okunieff P. (2001)*Blood Cells Mol Dis.* 27(1):165-80.
- 160-Campanella E., Chu H., Low P.S. (2005)*Proc. Nat. Acad. Sci.* 102:2402-2407.
- 161-Sluyter R., Shemon A.N., Barden J.A., Wiley J.S. (2004) *J Biol.Chem.*279:44749-44755.
- 162-Sluyter R., Shemon A.N., Wiley J.S. (2007)*BiochemBiophys Res Commun* 355:169-173.
- 163-Ponder E. J. (1951)*Gen. Physiol.*34:567-571.
- 164-Neary J.T, Kang Y., Willoughby K.A., Ellis E.F. (2003) *J Neurosci.* 23(6):2348-56.
- 165-Murata N., Ito S., Furuya K., Takahara N., Naruse K., Aso H., Kondo M., Sokabe M., Hasegawa Y. *BiochemBiophys Res Commun.* 2014 Sep 23
- 166-Yip L., Woehrle T., Corriden R., Hirsh M., Chen Y., Inoue Y., Ferrari V., Insel P.A., Junger W.G. (200) *The FASEB Journal* 23(6):1685-1693.
- 167-Bhalla-Gehi R, Penuela S, Churko JM, Shao Q, Laird DW.(2010) *J BiolChem.* 285(12):9147-60.
- 168-Bedell, M.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. (1997)*Genes &Development* 11:1-10.
- 169-Arnold L., TyagiR.K., Meija P., Swetman C., Gleeson J., Pérignon J.L., Druilhe P.(2011)*PLoS ONE* 6(3): e18045.
- 170-Qiu F., Wang J., Spray D.C, Scemes E., Dahl G. (2011)*FEBS Letters* 585(21):3430-3435.
- 171-Benavides F., Guénet J.L. (1997)*Medicina* (Buenos Aires) 57: 507-10.
- 172-vanDoorninck JH, French PJ, Verbeek E, Peters RH, Morreau H, Bijman J, Scholte BJ. (1995) *EMBO J.* 14(18):4403-11.

- 173- Dahl G., Qiu F., Spray D.C., Scemes E. (2009) *J Neurosc.* 29(21):7092-7097.
- 174- Sprague R. S., Ellsworth M. L., Stephenson A. H., Lonigro, A. J. (2001) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281:C1158-1164.
- 175- Sprung R., Sprague R., Spence D. (2002) *Anal. Chem.* 74:2274-2278.
- 176- Venerando B, Fiorilli A, Croci G, Tringali C, Goi G, Mazzanti L, Curatola G, Segalini G, Massaccesi L, Lombardo A, Tettamanti G. (2002) *Blood* 99(3):1064-70.
- 177- Strehler B.L. (1968) *Methods Biochem. Anal.* 16:99-181
- 178- Brown A.M. ATP and ATPase determination in red blood cells, in: J.C. Ellory, J.D. Young (Eds), *Red Cell Membranes - A Methodological Approach*, Academic Press, London, 1982, pp. 223-238.
- 179- Hategan, A., Sengupta, K., Kahn, S., Sackmann, E., and Discher, D. E. (2004) *Biophys. J.* 87:3547-3560
- 180- Kwant WO, Seeman P. (1979) *J Gen Physiol.* 55(2):208-19.
- 181- Zhang XM, Kobatake E, Kobayashi K, Yanagida Y, Aizawa M. (2000) *Anal Biochem.* 282(1):65-9.
- 182- Bradford, M.M. (1976). *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- 183- Gregory T.R. (2013) *Genome* 56(8): 457-472.
- 184- Hamann S., Kiilgaard J. F., Litman T., Alvarez-Leefmans F. J., Winther B. R., Zeuthen T. (2002) *J. Fluoresc.* 12:139-145.
- 185- Vázquez A., Tudela J., Varón R., García-Cánovas F. (1991) *J. Biochem. Biophys. Meth.* 23:45-52.
- 186- Leal Denis M.F, Incicco J.J, Espelt M.V., Verstraeten S.V., Pignataro O.P., Lazarowski E.R., Schwarzbaum P.J (2013) *Biochimica et Biophysica Acta* 1830: 4692-4707.
- 187- Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. (1985) *J Biol. Chem.* 260(6):3440-3450.
- 188- Steiner, A. L., Kipnis, D. M., Utiger, R., and Parker, C. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 64, 367-373.
- 189- Mondillo C., Patrignani Z., Reche C., Rivera E., Pignataro O. (2005) *Biol. Reprod.* 73:899-907.
- 190- Mondillo C., Pagotto R. M., Piotrkowski B., Reche C. G., Patrignani Z. J., Cymeryng C. B., Pignataro O. P. (2009) *Biol. Reprod.* 80:144-152.
- 191- Del Punta K., Charreau E. H., Pignataro O. P. (1996) *Endocrinology* 137:5337-5343.
- 192- Schwarzbaum P.J., Niederstätter H., Wieser W. (1992) *Physiological Zoology* 65(4):699-711.
- 193- Kaji D.M. (1993) *Am J Physiol Cell Physiol.* 264: C376-C382.
- 194- Akaike H. (1992) *No To Hattatsu* 24:27-133.
- 195- Hoops S., Sahle S., Gauges R., Lee C., Pahle J., Simus N., Singhal M., Xu L., Mendes P., Kummer U. (2006) *Bioinformatics* 22: 3067-3074.
- 196- Montalbetti N., Leal Denis M.F., Pignataro O.P., Kobatake E., Lazarowski E.R., Schwarzbaum P.J. (2011) *J. Biol. Chem.* 286:38397-38407.

- 197-Locovei, S., Wang, J., Dahl, G. (2006) *FEBS Lett.* 580:239–244.
- 198-Higashijima T., Burnier J., Ross E.M. (1990) *J Biol. Chem.* 265(25):1476-14186.
- 199-Vereb G, Szollosi J, Matko J, Nagy P, Farkas T, Vigh L, Matyus L, Waldmann TA, Damjanovich S. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:8053-8058.
- 200-Vögler O., Casas J., Capó D., Nagy T., Borchert G., Mantorell G., Escriba P.V. (2004) *J Biol Chem.* 279(27):36540-36545.
- 201-Sprague R., Bowles E., Stumpf M., Ricketts G., Freidman A., Hou W.H., Stephenson A., Lonigro A. (2005) *Pharmacol. Reports* 57:222-228.
- 202-Hanson M.S., Stephenson A.H., Bowles E.A., Sprague R.S. (2010) *Exp. Biol. Med.* 235(2): 256-262.
- 203-Pelegrin P., Surprenant A. (2007) *J Biol. Chem.* 282(4):2386- 2394
- 204-Delpire E., Lauf P.K. (1992) *J Membrane Biol.* 126:89-96.
- 205-Islam R., Uramoto H., Okada T., Sabirov R.Z., Okada Y. (2012) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 303:C924-C935.
- 206-Praetorius A., Leipziger J. (2009) *Purinergic Signal* 5:433-446.
- 207-Bencic D.C., Yates T.J., Ingermann R.L. (1997) *Physiol. Zool.* 70:621-630.
- 208-Moran A., Asher C., Cragoe E.J Jr, Garty H. (1988) *J Biol. Chem.* 263(36):19686-19591.
- 209-Alvarez de la Rosa D., Canessa C.M., Fyfe G.K., Zhang P. (2000) *Annu Rev Physiol.* 62:573-94.
- 210-Koziak, K., Sévigny, J., Robson, S. C., Siegel, J. B., Kaczmarek, E. (1999) *Thromb. Haemost.* 82:1538-1544.
- 211-Sévigny, J., Levesque, F. P., Grondin, G., and Beaudoin, A. R. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1334:73-88.
- 212-Sévigny J, Sundberg C, Braun N, Guckelberger O, Csizmadia E, Qawi I, Imai M, Zimmermann H, Robson SC (2002) *Blood* 99:2801-2809.
- 213-Kauffenstein G, Fürstenau CR, D'Orleans-Juste P, Sévigny J (2010) *Brit J Pharmacol.* 159:576-585.
- 214-Alvarez C.L., Schachter J., Acacia de Sá Pinheiro A., de Souza Silva L., Verstraeten S.V., Muanis Persechini P., Schwarzbaum P.J. (2014) *PLoS ONE* 9(5): e96216.
- 215-Joseph S. M., Buchakjian M. R. and Dubyak G. R. (2003) *J. Biol. Chem.* 278:23331-23342.
- 216-Gov N.S., Safran S.A. (2005) *Biophysical Journal* 88(3):1859-1874.
- 217-Oldenborg P.A., Zheleznyak A., Fang Y.F., Lagenaur C.F., Gresham H.D., Lindberg F.P. (2000) *Science* 288:2051-2054.
- 218-Zhu H., Zennadi R., Xu B.X., Eu J.P., Torok J.A., Telen M.J., McMahon T.J. (2011) *Crit. Care Med.* 39(11):2478-86.
- 219-Jagger J.E., Bateman R.M., Ellsworth M.L., Ellis C.G. (2001) *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol* 280:H2833-H2839.
- 220-Pelegrin P., Surprenant A. (2006) *EMBO J.* 2006 Nov 1; 25(21):5071-82

- 221-Myssina S. · Lang P.A. · Kempe D.S. · Kaiser S. · Huber S.M. · Wieder T. · Lang F. (2004) *Cell PhysiolBiochem* 14:241-248.
- 222- Gruenhagen J.A., Yeung E.S. (2004) *Biochim.Biophys.Acta* 1693:135-146.
- 223-Akkaya C., Shumilina E., Bobballa D., Brand B.V., Mahmud H., Lang F., Huber S.M.(2009)*PflügersArch - Eur J Physiol* 457:1035-1047.
- 224-SilvermanW.R., de RiveroVaccariJ.P., LocoveiS., Qiu F., CarlssonS.K., ScemesE., KeaneR.W., DahlG.(2009) *J. Biol. Chem.* 284:18143-18151.
- 225-Rodan S.B., Rodan G.A., Sha'afi R.I. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 428:509-515.
- 226-Rubin C.S., Erlichman J., Rosen O.M. (1972)*J Biol. Chem.* 247:6135-6139.
- 227-Maher A.D., Kuchel P.W. (2003)*Int J Biochem. Cell Biol.* 35(8):1182-97.
- 228-Hoffmann E.K., Lambert I.H., Pedersen S.F. (2009)*Physiological Reviews* 89(1):193-277.
- 229-Despa S., Islam M.A., Weber C.R.,Pogwizd S.M.,Bers D.M.(2002) *Circulation* 105:2543-2548.
- 230-Bortner C.D, Hughes F.M. Jr.,Cidlowski J A. (1997)*J Biol. Chem.*272(51):32436-32442.
- 231-Ludwig von Bertalanfy. Teoría General delos Sistemas.- 1ª ed. 4ª reimp.-Buenos Aires: Fondo de Cultura Económica, 2007.