

**DETERMINACION DE LOS FACTORES IONICOS Y MOLECULARES  
INVOLUCRADOS EN EL PROCESO  
DE ACIDIFICACION Y TRANSPORTE DE HIERRO  
EN VESICULAS ENDOCITICAS**

**Tesis  
presentada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Magister en Ciencias Biológicas  
con mención en Fisiología**

**Facultad de Ciencias**

**por**

**Victoria Eugenia Gaete Vial**

**Abril, 1990**

**Director de tesis: Dr. Marco Tulio Núñez G.  
Profesor Asociado  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile**



Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que  
la Tesis de Magister presentada por la candidata

VICTORIA EUGENIA GAETE VIAL

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito  
para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Biología, en el  
Examen de Defensa de Tesis rendido el día 8 de Enero de 1990.

Director de Tesis: Dr. Marco Tulio Núñez

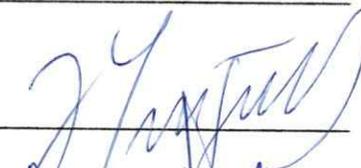


Comisión Informante:

Dra. Rosa Devés



Dr. José Minguel



Dr. Daniel Wolff



**Cristóbal**

**Rodrigo**

**Daniel**

**Cristián**

Ustedes me han dado la fuerza para seguir luchando.  
Les dedico esta Tesis porque es el fruto de mi trabajo  
realizado en tiempo que les he quitado a ustedes.  
Confío en que sabrán comprender.

Mamá



## AGRADECIMIENTOS

Cuando se ha llegado al final de un camino, inevitablemente se mira hacia atrás y se rememoran todos los momentos vividos. Es entonces cuando se hace imperioso agradecer a todas aquellas personas que colaboraron de una u otra manera a que se alcanzara la meta.

Son muchas las personas a quienes quiero agradecer:

A Fernando Zambrano, amigo y maestro, por esas largas horas de discusiones enriquecedoras, tanto en el plano académico como personal, y por los tantos y buenos consejos.

A Mireya Rojas y Eliana Canelo que siempre tuvieron tiempo para escucharme y apoyarme.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio, Cecilia Gutiérrez, Raquel Peñaloza, Eduardo López, Jorge Carvajal, Aldo Escobar, Jessica Martínez, Rubén León, que compartieron conmigo largas jornadas de trabajo y supieron matizarlas con alegría y humor, aún cuando las cosas no salían bien. Me acompañaron en los buenos y los malos momentos, y me estimularon a seguir adelante.

A mis fieles amigas Carmen Alcayaga y Macarena Moral, porque siempre estuvieron conmigo cuando las necesité.

A Ximena Cecchi, amiga leal y generosa.



A Carlos Medina, amigo de tantos años, que me ayudó a no perder la perspectiva de las cosas y que siempre me dijo las verdades por su nombre.

A Soledad Sepúlveda y Ariel Ahumada, que me dieron su amistad y consejos.

Al Dr. Johnattan Glass, por las enriquecedoras discusiones y su apoyo y estímulo constantes.

A Manuel Contreras, por su apoyo técnico en la mantención de los conejos.

Por último, pero no por ello menos importante, al Dr. Tulio Núñez quien me acogió y me entregó su tiempo y conocimientos. El supo guiarme desde muy cerca en un principio y después, no sólo me dio las alas, sino que me forzó a usarlas.

Deseo pedir disculpas y agradecer a aquellas personas que no he mencionado aquí, pero que me enriquecieron compartiendo conmigo sus experiencias y opiniones.

Sin todos ustedes habría sido difícil llegar.

## INDICE DE MATERIAS

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| DEDICATORIA  | ii          |
| AGRADECIMIENTOS  | iii         |
| INDICE DE MATERIAS   | v           |
| LISTA DE TABLAS  | ix          |
| LISTA DE FIGURAS   | x           |
| ABREVIATURAS   | xii         |
| SOLUCIONES TAMPONES  | xiv         |
| RESUMEN  | xvii        |
| ABSTRACT   | xxi         |
| I. INTRODUCCION  |             |
| 1. Antecedentes Bibliográficos                                       | 1           |
| 2. Objetivos   | 6           |
| Objetivos generales  | 6           |
| Objetivos específicos  | 7           |
| 3. Hipótesis de trabajo  | 7           |
| II. MATERIALES   | 9           |
| III. METODOS   |             |
| 1. Obtención de reticulocitos  | 10          |
| 2. Marcación de transferrina con $^{59}\text{Fe}$ y $^{125}\text{I}$ | 10          |

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| 3. Marcación de transferrina con FITC   | 11          |
| 4. Obtención de citosol   | 12          |
| 5. Obtención de vesículas endocíticas con alto contenido<br>en complejo Tf-R              | 12          |
| 6. Obtención de vesículas con alto contenido de hierro                                    | 13          |
| i) Estudio de la concentración de inhibidores<br>sobre la incorporación celular de hierro | 13          |
| ii) Procedimiento para la obtención de vesículas<br>con alto contenido de hierro          | 14          |
| 7. Estimación de la actividad ATPásica  | 15          |
| i) En vesículas intactas  | 15          |
| ii) En vesículas solubilizadas  | 15          |
| iii) Sensibilidad a inhibidores   | 15          |
| iv) Efecto de la composición iónica intra y<br>extravesicular                             | 16          |
| 8. Caracterización del proceso de acidificación   | 17          |
| i) Estimación del pH intravesicular   | 17          |
| ii) Curva de calibración  | 17          |
| 9. Flujos de cloruro  | 18          |
| i) Cinéticas de entrada   | 18          |
| ii) Cinéticas de salida   | 18          |
| 10. Flujos de sodio   | 19          |
| i) Carga de vesículas con $^{22}\text{Na}^+$  | 19          |
| ii) Cinéticas de salida   | 19          |
| iii) Cinéticas de entrada   | 19          |

|  |    |
|--|----|
| 11. Flujos de rubidio  | 20 |
| 12. Determinación de la razón $H^+$ /ATP   | 20 |
| 13. Movilización de hierro en presencia de citosol                               | 21 |
| i) Curva de concentración de citosol   | 21 |
| ii) Cinética de movilización de hierro   | 21 |
| iii) Efectores e inhibidores en la movilización                                  | 22 |
| 14. Movilización de hierro en ausencia de citosol                                | 22 |
| i) Cinética de movilización de hierro  | 22 |
| ii) Efecto de inhibidores de la acidificación en la<br>movilización              | 22 |
| iii) Efecto de la composición iónica   | 23 |
| IV. RESULTADOS   |    |
| 1. Preparación de vesículas endocíticas  | 24 |
| 2. Electroforesis en geles de poliacrilamida                                     | 25 |
| 3. Actividades ATPásicas en vesículas solubilizadas                              | 27 |
| 4. Actividades ATPásicas en vesículas intactas                                   | 29 |
| 5. Determinación del pH intravesicular   | 29 |
| 6. Dependencia de ATP en la acidificación  | 35 |
| 7. Estudio de especificidad en la acidificación                                  | 38 |
| 8. Efecto de inhibidores en la acidificación                                     | 38 |
| 9. Efecto de la composición iónica intra y<br>extravesicular en la acidificación | 42 |
| 10. Electrogenicidad de la $H^+$ -ATPasa   | 46 |
| 11. Selectividad a aniones en el proceso de<br>acidificación                     | 46 |

|   | Pág. |
|---|------|
| 12. Efecto de la composición iónica intra y<br>extravesicular en la actividad $H^+$ -ATPásica | 50   |
| 13. Cinética de la entrada y salida de cloruro  | 53   |
| 14. Cinética de la entrada y salida de sodio  | 56   |
| 15. Determinación de la razón $H^+$ /ATP  | 60   |
| 16. Balance de cargas   | 64   |
| 17. Obtención de vesículas con alto contenido de hierro                                       | 64   |
| 18. Movilización de hierro en presencia de citosol  | 66   |
| i) Curva de concentración de citosol  | 66   |
| ii) Cinética de movilización de hierro  | 66   |
| iii) Efectores en la movilización   | 69   |
| 19. Movilización de hierro en ausencia de citosol   | 69   |
| 20. Efecto de la composición iónica intra y<br>extravesicular en la movilización de hierro    | 72   |
| V. DISCUSION  | 74   |
| VI. BIBLIOGRAFIA  | 88   |
| VII. APENDICE   | 98   |

## LISTA DE TABLAS

| Tabla |  | Pág. |
|-------|--|------|
| I     | Actividad ATPásica en vesículas solubilizadas  | 28   |
| II    | Actividad ATPásica en vesículas intactas   | 30   |
| III   | Efectores en la acidificación de vesículas endocíticas   | 39   |
| IV    | Efecto de inhibidores en la acidificación de vesículas endocíticas                                 | 40   |
| V     | Efecto de la composición iónica en la acidificación de vesículas endocíticas                       | 43   |
| VI    | Efecto de aniones en la acidificación de vesículas endocíticas                                     | 49   |
| VII   | Efecto de la composición iónica en la actividad de la H <sup>+</sup> -ATPasa en vesículas intactas | 51   |
| VIII  | Balance de cargas  | 65   |
| IX    | Movilización de hierro en presencia de citosol   | 70   |
| X     | Efecto de inhibidores de la acidificación en la movilización de hierro                             | 71   |
| XI    | Efecto de la composición iónica en la movilización   | 73   |

## LISTA DE FIGURAS

| Figura |   | Pág. |
|--------|---|------|
| 1      | Electroforesis en gel de poliacrilamida                                   | 26   |
| 2      | Curva de calibración de FITC  | 32   |
| 3      | Acidificación en vesículas endocíticas                                    | 33   |
| 4      | Cinética de acidificación   | 34   |
| 5      | Cinética de disipación  | 36   |
| 6      | Dependencia de ATP en la acidificación                                    | 37   |
| 7      | Electrogenicidad de la $H^+$ -ATPasa                                      | 47   |
| 8      | Incorporación de $^{36}Cl^-$  | 54   |
| 9      | Cinéticas de entrada y salida de $^{36}Cl^-$                              | 55   |
| 10     | Cinéticas de entrada y salida de $^{22}Na^+$                              | 57   |
| 11     | Curso temporal de la salida de $^{22}Na^+$ en presencia y ausencia de ATP | 58   |
| 12     | Efecto de la composición iónica externa en la salida de sodio             | 59   |
| 13     | Determinación de $H^+$ bombeados por la $H^+$ -ATPasa                     | 62   |
| 14     | Determinación de la razón $H^+/ATP$                                       | 63   |
| 15     | Movilización de hierro en función de la concentración de citosol          | 67   |

| <b>Figura</b> |  | <b>Pág.</b> |
|---------------|--|-------------|
| 16            | Cinética de movilización de hierro           | 68          |
| 17            | Modelo de la incorporación celular de hierro | 86          |

## \*ABREVIATURAS

|            |   |
|------------|---|
| APH:       | 1-acetil-2-fenilhidrazina   |
| Brij 58:   | polioxietilen 20 cetil éter   |
| CTX:       | caribdotoxina   |
| $Cl^-_e$ : | cloruro en el medio extravascular                                   |
| DIDS:      | ácido 4,4'-diisotiociano-2,2'-disulfónico estilbena                 |
| DCCD:      | N,N'-d ciclohexilcarbodiimida                                       |
| DMD:       | 5,5 dimetil oxazolidina-2,4-diona                                   |
| DMSO:      | dimetil sulfóxido   |
| EGTA:      | ácido etilenglicol-bis-(β-aminoetiléter) N,N'-<br>tetraacético      |
| FCCP:      | carbonil cianuro 4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona                  |
| Fe-Tf:     | transferrina marcada con $^{59}Fe$ .                                |
| Fe,I-Tf:   | transferrina marcada con $^{59}Fe$ y $^{125}I$ .                    |
| FITC:      | fluoresceína isotiocianato  |
| FITC-Tf:   | transferrina marcada con FITC, además de $^{59}Fe$ y<br>$^{125}I$ . |
| Hepes:     | ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-<br>etanosulfónico            |
| NADH:      | β-nicotinamida adenina dinucleótido                                 |
| NBD-Cl:    | 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3 diazol                               |

|  |   |
|--|---|
| PMSF:  | fluoruro de fenilmetilsulfonilo   |
| $\text{Na}^+_i$ :  | sodio al interior de la vesícula  |
| $\text{NaCl}_i$ , $\text{NaCl}_e$ :                                    | cloruro de sodio al interior de la vesícula y en el medio extravascular, respectivamente                    |
| NEM:   | N-etilmaleimida   |
| NP-40:   | nonidet P-40  |
| NTA:   | nitriloacetato  |
| PK/LDH:  | piruvatoquinasa/lactato deshidrogenasa  |
| PEP:   | fosfoenolpiruvato   |
| $\text{sacarosa}_i$ , $\text{sacarosa}_e$ :                            | sacarosa en el interior de la vesícula y en el medio extravascular, respectivamente                         |
| Sepharosa anti-Tf:   | Ig G de cabra contra transferrina de conejo unido a Sepharosa 4B activada con BrCN                          |
| Tf:  | transferrina  |
| Tf-R:  | complejo transferrina-receptor  |
| Tris:  | tris (hidroximetil) aminometano   |
| TTX:   | tetrodotoxina   |
| Vesículas con $\text{NaCl}_i$ , $\text{KCl}_i$ o $\text{sacarosa}_i$ : | vesículas preparadas en los tampones indicados, de manera que tienen esas composiciones en su medio interno |
| $K_i$ :  | constante de inhibición   |
| $\text{K}^+_i$ :   | potasio interno   |
| $\text{KCl}_i$ , $\text{KCl}_e$ :                                      | cloruro de potasio al interior de la vesícula y en el medio extravascular, respectivamente.                 |

## \* SOLUCIONES TAMPONES

|                          |                                  |
|--------------------------|----------------------------------|
| Tampón Dulbecco, pH 7,4: | KCl 2,7 mM                       |
|                          | $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1,5 mM  |
|                          | $\text{MgCl}_2$ 0,49 mM          |
|                          | NaCl 137 mM                      |
|                          | $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 6,1 mM |
| Tampón NaCl, pH 7,0:     | Hepes/Tris 10 mM                 |
|                          | NaCl 100 mM                      |
|                          | EGTA/Tris 1 mM                   |
|                          | $\text{MgSO}_4$ 1 mM             |
|                          | $\text{NaN}_3$ 1 mM              |
| Tampón KCl, pH 7,0:      | Hepes/Tris 10 mM                 |
|                          | KCl 100 mM                       |
|                          | EGTA/Tris 1 mM                   |
|                          | $\text{MgSO}_4$ 1 mM             |

|  |  |
|--|--|
| Tampón sacarosa, pH 7,0:                         | Hepes/Tris 10 mM<br>Sacarosa 200 mM<br>EGTA/Tris 1 mM<br>MgSO <sub>4</sub> 1 mM                                  |
| Tampón Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH 7,0: | Hepes/Tris 10 mM<br>Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 80 mM<br>EGTA/Tris 1 mM<br>MgSO <sub>4</sub> 1 mM            |
| Tampón K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH 7,0:  | Hepes/Tris 10 mM<br>K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 80 mM<br>EGTA/Tris 1 mM<br>MgSO <sub>4</sub> 1 mM             |
| Tampón NaCl-KCl, pH 7,0:                         | Hepes/Tris 10 mM<br>NaCl 20 mM<br>KCl 80 mM<br>EGTA/Tris 1 mM<br>MgSO <sub>4</sub> 1 mM<br>NaN <sub>3</sub> 1 mM |

Tampón MES/Na, pH 7,0:      MES/Na 0,5 mM  
   NaCl 100 mM  
   EGTA/Tris 1 mM  
   MgSO<sub>4</sub> 1 mM  
   NaN<sub>3</sub> 1 mM

Tampón MES/Na-K, pH 7,0:      MES/Na 0,5 mM  
   NaCl 20 mM  
   KCl 80 mM  
   EGTA/Tris 1 mM  
   MgSO<sub>4</sub> 1 mM  
   NaN<sub>3</sub> 1 mM

Tampón glicina alcalina,  
pH 9,1:                              Glicina 0,8 M  
   NaCl 0,2 M  
   NaOH 0,2 M

## RESUMEN

La incorporación celular de hierro es un proceso que se lleva a cabo a través de endocitosis mediada por receptor. Este proceso involucra la formación de una vesícula endocítica o endosoma.

El objetivo de esta Tesis fue determinar, en vesículas endocíticas aisladas, los factores iónicos y moleculares involucrados en el proceso de acidificación, como etapa previa y necesaria para la incorporación celular de hierro.

Se demostró que la acidificación al interior de la vesícula es producto de la actividad de una  $H^+$ -ATPasa, que bombea un  $H^+$  por cada ATP hidrolizado, en forma electrogénica. Esta ATPasa es inhibida por NEM, NBD-Cl y DIDS. No se observó inhibición con vanadato, oligomicina ni estrofantidina, inhibidores de las ATPasas con intermediario fosforilado, de la  $F_1F_0$  mitocondrial y de la  $Na^+,K^+$ -ATPasa, respectivamente.

Se estudió el proceso de acidificación al interior de la vesícula endocítica usando la sonda fluorescente fluoresceína isotiocianato unida covalentemente a transferrina. Con este método se encontró que luego de tres minutos de acidificación, se producía una disminución máxima del pH de 0,7-0,8 unidades.

Para determinar los factores iónicos involucrados en el proceso de acidificación, se varió la composición iónica interna y externa de las vesículas. No se observó acidificación en ausencia de iones (sacarosa<sub>i</sub>/sacarosa<sub>e</sub>). La máxima acidificación se observó con NaCl<sub>i</sub>/KCl<sub>e</sub>. Cuando el único ion presente en el medio de incubación era Cl<sup>-</sup><sub>e</sub> (sacarosa<sub>i</sub>/Cl<sub>e</sub>), se obtuvo un 60% de la acidificación máxima, mientras que con Na<sup>+</sup><sub>i</sub> como único ion (Na<sup>+</sup><sub>i</sub>/sacarosa<sub>e</sub>), se obtuvo un 40%. Cualquier catión al interior de la vesícula no resultó equivalente en favorecer algún grado de acidificación. K<sup>+</sup><sub>i</sub> fue un mal sustituto de Na<sup>+</sup><sub>i</sub>, ya que al ser el único ion (KCl<sub>i</sub>/sacarosa<sub>e</sub>), sólo se obtuvo un 18%. En el medio externo, el anión pudo ser reemplazado, obteniéndose grados menores de acidificación, con el siguiente orden de efectividad: Cl<sup>-</sup> > Br<sup>-</sup> > I<sup>-</sup> > PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> > gluconato > SO<sub>4</sub><sup>=</sup>.

La determinación de flujos netos de Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup> se realizó mediante el uso de trazadores radiactivos. Tras la adición de ATP, la carga neta positiva generada por la entrada de H<sup>+</sup> fue disipada casi en su totalidad por una entrada de Cl<sup>-</sup> y de una salida de Na<sup>+</sup>, cuya contribución varió en función del tiempo. En el primer minuto, 38% de la carga fue disipada por Cl<sup>-</sup> y 25% por Na<sup>+</sup>; en el segundo minuto, 5% por Cl<sup>-</sup> y 14% por Na<sup>+</sup> y en el tercer minuto, 2% por Cl<sup>-</sup> y 3% por Na<sup>+</sup>. De estos resultados se pudo deducir que la gradiente eléctrica generada por la entrada de protones fue disipada tanto por una entrada de cloruros como por una salida de iones sodio. Además se encontró un flujo de entrada de Na<sup>+</sup>, dependiente de ATP, que fue atribuido a la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa.

Se encontró que tanto la acidificación como la actividad  $H^+$ -ATPásica dependían de la composición iónica de manera comparable. La diferencia fundamental fue la estimulación por  $K^+$ <sub>e</sub> en la actividad ATPásica, probablemente debida a una actividad fosfatásica, la que no estaba involucrada en la acidificación.

Las vesículas endocíticas aisladas de reticulocitos fueron capaces de movilizar alrededor del 50% del hierro presente en transferrina al ser incubadas en un medio que contenía citosol. Esta movilización fue incrementada cuando se agregó ATP, ascorbato y NADH.

Por esta razón, se probó el grado de movilización de hierro en ausencia de citosol. Se encontró que, al igual que en presencia de citosol, el 50% del hierro presente en transferrina fue dissociado y movilizado cuando las vesículas fueron incubadas en un medio que contenía solamente ATP y ascorbato. En presencia de ATP se produjo disociación, pero no disociación del hierro. Por otra parte, ascorbato por sí solo, no produjo disociación ni movilización.

A diferencia de la acidificación y de la actividad  $H^+$ -ATPásica, que requerían de  $Na^+$ <sub>i</sub> y de  $Cl^-$ <sub>e</sub> para obtener valores máximos, la movilización de hierro sólo dependió de  $Cl^-$ <sub>e</sub> como contraión del bombeo de protones.  $Na^+$ <sub>i</sub> fue inefectivo en apoyar la movilización por sí solo. Este resultado indicó que el 40% de la acidificación promovida por el sodio fue insuficiente para dissociar y, posteriormente, movilizar uno de los hierros de transferrina, en cambio, el 60% debido al cloruro, sí fue suficiente para

disociarlo.

Cuando la acidificación fue inhibida por medio de ionóforos o de inhibidores de la  $H^+$ -ATPasa, la disociación y la movilización fueron inhibidas en un 100%. Esto claramente indicó que la acidificación era una etapa indispensable en la incorporación celular de hierro.

## ABSTRACT

The general aim of this Thesis was to determine, in isolated endocytic vesicles, the ionic and molecular factors involved in the acidification process, as a necessary step in iron mobilization from this vesicles to the cytosol of the cell.

Iron is incorporated into the cells by receptor mediated endocytosis. This process involves the formation of an endocytic vesicle or endosome. This structure acidifies its internal medium due to the presence of a  $H^+$ -ATPase in the vesicle membrane, that is electrogenic, and pumps one  $H^+$  *per* ATP hydrolyzed.

The acidification produces dissociation of the iron bound to transferrin, and after being reduced, it is translocated to the cytosol of the cell. This ATPase is a distinct type of protein, different from the mitochondrial  $F_1F_0$ , because it is insensitive to oligomycin. It is also different from the plasma membrane  $Na^+,K^+$ -ATPase, because it is insensitive to ouabain and strophanthidine. The  $H^+$ -ATPase is insensitive to vanadate, a typical inhibitor of the ATPases that have a phosphorylated intermediate, but is inhibited by NEM, NBD-Cl and DIDS.

The acidification process in isolated endocytic vesicles was

investigated, using the fluorescent dye fluorescein isothiocyanate, covalently bound to transferrin. The amount of acidification three minutes after the addition of ATP was between 0.7 and 0.8 pH units. It was also determined that acidification was inhibited by NEM, DCCD and DIDS.

When acidification was studied in terms of its dependence to the ionic composition, it was found that the vesicle needed a cation in its interior, being  $\text{Na}^+$  better than  $\text{K}^+$ . In the other hand,  $\text{Cl}^-$  was needed in the external medium. Both effects were additive, and the maximal acidification was obtained with  $\text{Na}_i$  and  $\text{Cl}_e$ .

The selectivity for the anion in supporting acidification was also examined. The following selectivity sequence was determined:  $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{PO}_4^{3-} > \text{gluconate} > \text{SO}_4^{2-}$ .

It has been postulated in this Thesis that the vesicle should have a mechanism to dissipate the positive electric potential generated by the  $\text{H}^+$ -ATPase. The results just described suggest the existence of ion fluxes concomitant with the  $\text{H}^+$  flux. Determination with isotopes demonstrated that there were a net  $\text{Cl}^-$  influx and a net  $\text{Na}^+$  efflux, that compensated the positive charges in a 42% by the cation and in 45% by the anion. There was also, an ATP-dependent  $\text{Na}^+$  influx, attributable to the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase.

When the dependence of the ATPase activity with the ionic composition of the medium was determined, it was found that was basically the same than that previously described for acidification. The difference was that with  $\text{K}_e^+$ , there was an excess of activity, possibly

due to a phosphatase activity rather than an ATPase activity.

The vesicles obtained through the method described in this Thesis were capable of mobilizing iron attached to transferrin when the vesicles were incubated with cytosol. More iron mobilized was obtained if ATP, NADH or ascorbate were added to the incubation medium.

About 50% of mobilization was obtained when vesicles were incubated with ATP and ascorbate, in a medium free of cytosol. ATP alone produced dissociation but not mobilization. Ascorbate produced neither dissociation nor mobilization.

When acidification was inhibited by collapsing the  $H^+$ -gradient with an ionophore or by inhibiting the  $H^+$ -pump, mobilization was also inhibited, indicating that acidification was an essential step in iron translocation into the cell.

It was also established the dependance between mobilization and the ionic composition. Only chloride was needed in the external medium to promote mobilization, being sodium in the interior of the vesicle ineffective to mobilize iron. These results indicated that the  $\Delta pH$  reached with chloride as a counterion, was sufficient to dissociate one iron from transferrin and to promote its mobilization. In the other hand, the  $\Delta pH$  obtained using sodium as the unique counterion, was not enough to promote dissociation or mobilization.

## I. INTRODUCCION

### 1. Antecedentes bibliográficos

El hierro constituye el elemento traza más importante en los vertebrados. El rol bioquímico del hierro se manifiesta a través de la actividad de las metaloproteínas, las cuales están involucradas en el transporte de oxígeno y almacenamiento, así como en la cadena transportadora de electrones. La hemoglobina normal da cuenta del 60-70% del hierro total, mientras que la mioglobina, los citocromos y otras proteínas que unen hierro, contienen un 10%. El 20-30% restante se distribuye entre dos proteínas de almacenamiento, ferritina y hemosiderina. La transferrina, proteína encargada del transporte extracelular del hierro, sólo da cuenta del 0,1-0,2% del hierro total.

En casos de deficiencia de hierro, todas estas metaloproteínas se ven afectadas y se puede producir una disminución de la hemoglobina circulante (anemia). Por otra parte, una sobrecarga de hierro puede producir depósitos del metal y dañar seriamente algunos órganos como corazón, hígado y pulmones.<sup>1</sup>

La incorporación celular de hierro es un proceso que se verifica a través de endocitosis mediada por receptor.<sup>2</sup> En células eritroides, pueden describirse varias etapas, como la unión de ferrotransferrina a

receptores específicos ubicados en invaginaciones de la membrana plasmática, recubiertas por clatrina (coated pits),<sup>3,4</sup> la formación de vesículas endocíticas o endosomas,<sup>3,5,6</sup> la acidificación del interior de dichas vesículas,<sup>7,8</sup> la disociación de hierro de transferrina, debido a la disminución del pH,<sup>9</sup> la unión del hierro a su aceptor en la membrana de la vesícula,<sup>10,11</sup> el transporte del hierro al citoplasma de la célula<sup>12</sup> y retorno de la apotransferrina al medio extracelular para ser reutilizada en un nuevo ciclo celular de incorporación de hierro.<sup>7,13</sup> El hierro en el citoplasma de la célula es captado por transportadores citoplasmáticos y llevado a la mitocondria para la síntesis del grupo hem.

En relación al pH intravesicular, hay discrepancias en la literatura, según si es medido en vesículas *in situ* o en vesículas aisladas. Usando métodos diferentes para determinar el pH, como transferrina marcada con FITC\* en células K562 intactas<sup>7</sup> y la distribución de DMO y metilamina marcadas con <sup>14</sup>C y cloroquina en reticulocitos,<sup>8</sup> los valores obtenidos son de 5,4-5,5 al interior de vesículas endocíticas *in situ*. En cambio, usando <sup>14</sup>C-metilamina en vesículas aisladas de cerebro de bovino, el pH intravesicular obtenido es 6,7-6,9 cuando el pH del medio es 7,5.<sup>(14)</sup>

Si bien es cierto no hay acuerdo con respecto al pH final obtenido, es un hecho que, cuando menos, hay acidificación de 0,6-0,7 unidades de pH.<sup>14</sup> Uno de los aspectos que ha sido ampliamente estudiado es el rol que juega esta acidificación en la incorporación de hierro al citoplasma celular. Para ello se han usado ionóforos, aminas (agentes lisosomotrópicos) e inhibidores metabólicos que producen una elevación del pH intravesicular e inhiben la incorporación de hierro.<sup>8,9,15</sup> Esta

disminución en la incorporación de hierro observada puede ser debida a una inhibición de la disociación de hierro de transferrina o a un bloqueo en la unión del hierro a su aceptor en la membrana de la vesícula. En una línea celular de hepatomas humanos Ciechaniver *et al.*<sup>9</sup> encuentran que el principal efecto de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 mM) es la inhibición de la disociación del hierro de ferrotransferrina, posiblemente debido a la elevación del pH de la vesícula endocítica. Además encuentra que la exocitosis de transferrina está enlentecida, es decir toda la transferrina internalizada es externalizada, pero en un curso temporal mayor, mientras que la unión de ferrotransferrina a su receptor en la superficie celular y su internalización no se ven alteradas.

Por otra parte, Glass y Núñez<sup>16</sup> encuentran que la n-butilamina y el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 y 20 mM, respectivamente) retardan tanto la internalización de ferrotransferrina unida a los receptores de transferrina como la externalización de la transferrina internalizada y que, además, bloquean el transporte del hierro al citoplasma, pero, a diferencia de Ciechanover *et al.*,<sup>9</sup> la disociación no se ve afectada. La interpretación que ellos dan a estos resultados es que la inhibición en la incorporación de hierro es debida a que las aminas, a las concentraciones usadas, elevan ligeramente el pH al interior de las vesículas. Esta elevación del pH no es suficiente para inhibir la disociación de hierro, pero aumenta la concentración de hidroxilos lo suficiente como para inducir la formación de complejos insolubles de hidróxido férrico.<sup>16</sup>

Usando los ionóforos monensina y nigericina, Núñez y Glass<sup>11</sup> encuentran que dichos agentes, a concentraciones submicromolares (0,25-0,5  $\mu\text{M}$ ), afectan mínimamente la disociación de hierro de

transferrina, ya que el pH intravesicular no es elevado lo suficiente como para inhibirla, siendo la unión del hierro disociado a su aceptor en la membrana la que estaría bloqueada al aumentar la concentración de hidroxilos que compiten por el hierro con su aceptor en la membrana vesicular. Para inhibir la disociación de hierro de transferrina se requieren concentraciones mayores que 1  $\mu\text{M}$  de ionóforos.

Estos resultados indican claramente que el pH ácido al interior de la vesícula endocítica es indispensable para la disociación de hierro (inhibido por concentraciones altas de aminas y ionóforos) y para una adecuada incorporación del hierro disociado al citoplasma celular (inhibido por concentraciones bajas de aminas y ionóforos).

La capacidad de las vesículas endocíticas de variados sistemas celulares de acidificar su interior, es debida a la presencia de una  $\text{H}^+$ -ATPasa activada por  $\text{Mg}^{2+}$  que transporta protones a expensas de la hidrólisis de ATP.<sup>14,17-19</sup> Esta enzima pertenece a una familia de ATPasas presentes en sistemas de endomembranas de células eucariontes como lisosomas,<sup>20,21</sup> vesículas derivadas del Golgi,<sup>22</sup> gránulos cromafines<sup>23</sup> y en las membranas vacuolares de plantas,<sup>24</sup> *Neurospora*<sup>25</sup> y levaduras.<sup>26</sup> La  $\text{H}^+$ -ATPasa tiene características que la hacen diferente de las ATPasas de membrana plasmática y mitocondrial. A diferencia de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa de membrana plasmática, es insensible a vanadato<sup>14,17-19,21-26</sup> y no forma intermediario fosforilado durante su ciclo catalítico.<sup>27</sup> La  $\text{H}^+$ -ATPasa es sensible a NEM y NBD-Cl,<sup>17,18,22-27</sup> compuestos que inhiben la hidrólisis de ATP, por unirse al sitio catalítico y DCCD, por su parte, inhibe el transporte de protones<sup>17,28</sup> al bloquear el canal que conduce protones.<sup>29</sup> Además es insensible a

oligomicina y aurovertina, inhibidores de la ATPasa  $F_1F_0$  mitocondrial<sup>14,17,18,22,23</sup> y a la estrofantidina<sup>14</sup> y ouabaína,<sup>18</sup> inhibidores de la  $Na^+,K^+$ -ATPasa.

Todos los resultados que apuntaban hacia el hecho que este tipo de ATPasas es electrogénica, eran indirectas. Forgac *et al.*,<sup>14</sup> en vesículas de cerebro de bovino, encontraron que había una estimulación de la incorporación de  $^{14}C$ -metilamina en presencia de valinomicina (las vesículas contenían  $K^+$  en su interior) y que FCCP, un ionóforo electrogénico, la inhibía. Estos resultados apuntaban a la electrogenicidad de la ATPasa, pero no eran definitivos. Los experimentos de Xie *et al.*,<sup>30</sup> sin embargo, son concluyentes. Ellos purificaron y reconstituyeron la  $H^+$ -ATPasa de vesículas de cerebro de bovino en liposomas y solamente obtuvieron acidificación con valinomicina y  $K^+$  al interior de las vesículas.

Por lo tanto, para que haya una acidificación neta es preciso que la vesícula tenga un sistema capaz de disipar el gradiente eléctrico generado por la entrada de protones para lograr un decremento substancial del pH intravesicular. Los resultados de los estudios de requerimientos iónicos de Forgac y Cantley<sup>27</sup> apuntan a la ausencia de un contratransporte con  $Na^+$  o  $K^+$  durante la incorporación de protones, pero sí se requiere de la presencia de cloruro en el medio externo como anión permeante.<sup>19,22,31</sup>

Un posible mecanismo para la disipación del potencial de membrana positivo es la existencia de un canal aniónico. En relación a ello, están los antecedentes mostrados por Xie *et al.*,<sup>31</sup> quienes ensayan la efectividad de varios aniones para funcionar como contraión en la

mantención de la electroneutralidad en vesículas recubiertas por clatrina de cerebro de bovino, capaces de acidificar su interior debido a una ATPasa que transporta protones. Ellos encuentran que  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Br}^-$  -y  $\text{I}^-$  en menor cuantía- funcionan como contraiones, los cuales favorecen una significativa acidificación y no lo hacen otros aniones como fosfato, sulfato, gluconato y fluoruro. Por otra parte, es posible observar transporte de cloruro impulsado por un potencial positivo (debido la entrada de  $\text{K}^+$  en presencia de valinomicina) independientemente del movimiento de protones (en la ausencia de ATP), lo que apunta a la existencia de una conductividad para cloruro distinta de la vía de entrada de protones.

Glickman *et al.*<sup>22</sup> también encuentran una conductancia a cloruro en paralelo con una ATPasa que transporta protones en vesículas de Golgi de hígado de rata. Estas vesículas acumulan  $^{36}\text{Cl}^-$  cuando se genera un gradiente favorable para la entrada de potasio, en presencia de valinomicina, indicando la existencia de una conductancia a dicho anión.

## 2. Objetivos

### Objetivos generales

Esta Tesis propone utilizar una preparación de vesículas endocíticas altamente enriquecidas en el complejo ferrotransferrina-receptor para estudiar los factores iónicos que afectan el transporte de hierro desde el interior de la vesícula endocítica al citoplasma de la célula. Debido a que el proceso de movilización de hierro es bloqueado por agentes que disipan el pH intravesicular ácido, se caracterizarán los factores iónicos y moleculares que participan en la mantención del

gradiente de protones necesario para la disociación de hierro de transferrina y el transporte del hierro disociado al citoplasma de la célula.

### **Objetivos específicos**

i) Obtención de vesículas endocíticas tempranas con alto contenido del complejo ferrotansferrina-receptor.

ii) Obtención de vesículas endocíticas tempranas con alto contenido de hierro.

iii) Caracterización de actividad(es) ATPásica(s) en vesículas solubilizadas, en términos de sensibilidad a diferentes inhibidores.

iv) Caracterización de actividad(es) ATPásica(s) en vesículas intactas, en términos de requerimiento de cationes y aniones, sensibilidad a diversos inhibidores y efecto de ionóforos.

v) Caracterización del proceso de acidificación en el interior de las vesículas, en presencia de diferentes cationes y aniones, de ionóforos e inhibidores.

vi) Estudio de las condiciones generales de incubación que optimicen el transporte de hierro promovido por el citosol.

vii) Estudio de los factores electroquímicos que regulan la salida de hierro de las vesículas.

### **3. Hipótesis de trabajo**

Los antecedentes bibliográficos señalan que las vesículas acidifican su interior, aun cuando no se conocen cabalmente los mecanismos mediante los cuales se verifica dicha acidificación. La

hipótesis que se propone en esta Tesis es que, a semejanza de vesículas endocíticas de cerebro de bovino, hay una  $H^+$ -ATPasa en la membrana vesicular, que es la encargada de transportar protones al interior de la vesícula a expensas de la hidrólisis de ATP. La electrogenicidad de la enzima es un aspecto que será estudiado. Si resulta ser electrogénica, es preciso que el potencial electroquímico sea disipado de alguna manera, ya que, debido al pequeño volumen de las vesículas (su diámetro es entre 90 y 120 nm), bastará la entrada de una pequeña cantidad de protones para que el transporte se detenga, con lo cual el pH no habrá disminuido lo suficiente como para permitir la disociación de hierro de transferrina y su consiguiente transporte al citoplasma. Una alternativa es que exista una conductancia aniónica, por ejemplo de cloruro, de manera tal que al entrar un protón a través de la ATPasa, entre también un cloruro. Otra posibilidad es que exista una conductancia catiónica, como de sodio o de potasio, que permita la salida del catión al entrar el protón por la  $H^+$ -ATPasa. Con ambos tipos de canales se estaría disipando el gradiente eléctrico, con lo cual podrían seguir entrando protones y disminuir el pH hasta los valores necesarios para la disociación y transporte del hierro.

Una hipótesis alternativa es que los protones no estén entrando a través de la ATPasa, sino que ésta sólo esté generando un gradiente químico para un catión, como por ejemplo  $Na^+$ , y que este gradiente sea utilizado por protones para entrar a través de un intercambiador  $Na^+/H^+$ .<sup>(27)</sup>

## II. MATERIALES

### 1. Animales

Se usaron hembras o machos adultos, con un peso corporal entre 2,5 y 4 kg. Su dieta consistió en alimento concentrado para conejos (pellet) y agua a libre disposición. La dieta fue suplementada con verduras frescas una vez a la semana. Después de terminar de utilizar un animal, se le inyectó 0,5 ml de hierro (25 mg) intramuscular para evitar una anemia por disminución del hierro circulante.

### 2. Radioisótopos

Los isótopos radioactivos utilizados fueron  $^{59}\text{FeCl}_3$ ,  $^{86}\text{RbCl}$ ,  $^{22}\text{NaCl}$  y  $\text{Na}^{36}\text{Cl}$  de Dupont y  $\text{Na}^{125}\text{I}$  de la Comisión Chilena de Energía Nuclear.

### 3. Reactivos

Los inhibidores utilizados, como ouabaína, DCCD, amilorida, NEM, PMSF, FCCP, DIDS, NBD-Cl eran de Sigma. Vanadato era de Fisher Scientific Company. Los detergentes NP-40 y Brij 58, y los ionóforos, valinomicina, nigericina y FCCP eran de Sigma. Los reactivos para electroforesis y los Bio Gels eran de Bio-Rad. Azul de Coomassie era de Kodak. Todos los otros reactivos eran de grado analítico.

### III. METODOS

#### 1. Obtención de reticulocitos

Los reticulocitos de conejo fueron aislados a partir de sangre obtenida por sangramiento de la vena marginal de la oreja de animales tratados con el agente hemolítico APH (10 mg/Kg de peso por tres días y 5 mg/Kg de peso por dos días).<sup>32</sup> Las células se obtuvieron 4 a 7 días después de la última inyección. La sangre se recibió en tubo heparinizado, con 500 UI de heparina/10 ml de sangre.

#### 2. Marcación de transferrina con <sup>59</sup>Fe y <sup>125</sup>I

La transferrina de conejo fue purificada, saturada con <sup>59</sup>Fe y marcada con <sup>125</sup>I según Glass *et al.*<sup>32</sup> Para 2,6 mg de transferrina purificada ( $3,33 \times 10^{-8}$  moles) en 40  $\mu$ l de NaHCO<sub>3</sub> 0,25 M, se agregaron  $6,67 \times 10^{-8}$  moles de <sup>59</sup>FeCl<sub>3</sub> (37,8  $\mu$ Ci) y  $1,33 \times 10^{-7}$  moles de NTA. Se incubó 10 min a temperatura ambiente. A la Fe-Tf junto con 25  $\mu$ l de tampón glicina alcalina<sup>#</sup> se le agregaron 100  $\mu$ Ci de Na<sup>125</sup>I mezclado previamente con 20  $\mu$ l de una solución de yodo monoclóruo 3,3 mM. Se incubó 30 min a temperatura ambiente y se filtró por una columna de Bio Gel A-1.5 (23 x 0,8 cm) equilibrada en tampón Dulbecco. Se colectaron fracciones de 0,5 ml. El pico de Fe,I-Tf del perfil de elución se determinó por la

...radiactividad en un contador gamma. Se juntaron las fracciones con más radiactividad y se guardó a 4° C. La concentración de proteínas se determinó con el método de Lowry,<sup>33</sup> usando BSA como estándar.

### 3. Marcación de transferrina con FITC

La transferrina fue marcada con FITC de acuerdo al método descrito por Musgrove *et al.*,<sup>34</sup> con algunas modificaciones: para 2,6 mg de transferrina ( $3,33 \times 10^{-8}$  moles) se agregaron 50  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5 M (pH 9,0),  $6,67 \times 10^{-8}$  moles de  $^{59}\text{FeCl}_3$  (37,8  $\mu$ Ci) y  $1,33 \times 10^{-7}$  moles de NTA. Se incubó a temperatura ambiente por 10 min. A la Fe-Tf se agregaron 150  $\mu$ l de FITC 2,4 mg/ml en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5 M (pH 9,0), en alícuotas de 15  $\mu$ l, en hielo. Se incubó 5 min en hielo, se agregaron 100  $\mu$ l de Fe,I-Tf 20  $\mu$ M y 100  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5 M (pH 9,0). Esta mezcla se incubó toda la noche a 4° C, en oscuridad. Al igual que con la Fe,I-Tf, se filtró por una columna de Bio Gel A-1.5, se colectaron fracciones de 0,5 ml y se determinaron aquellas con mayor radiactividad en un contador gamma y la concentración de proteínas con el método de Lowry.<sup>33</sup> Con este método, se obtuvieron entre 4 y 5 moléculas de FITC por molécula de transferrina, determinado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 490 nm, en un espectrofotómetro Gilford 2000. La FITC-Tf así obtenida presentó una incorporación comparable a Tf. Esta fue guardada a 4° C en oscuridad y descartada después de una semana de preparación.

#### 4. Obtención de citosol

Los reticulocitos, previamente lavados con tampón Dulbecco, fueron lisados con igual volumen de tampón NaCl-KCl por congelamiento, en acetona llevada a una temperatura inferior a  $-10^{\circ}\text{C}$  con un enfriador de inmersión (cold finger), y posteriormente descongelados. El hemolisado fue centrifugado a  $48.000 \times g_{\text{max}}$  por 20 min. El sobrenadante fue desaireado por vacío y centrifugado a  $120.000 \times g_{\text{max}}$  durante 60 min, descartando el precipitado y guardando el sobrenadante (citosol) en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior.

Para efectos de concentración, se consideró 1x la del citoplasma. La concentración del citosol obtenido por el método descrito fue 0,5x.

#### 5. Obtención de vesículas endocíticas con alto contenido en complejo Tf-R

Las vesículas endocíticas fueron obtenidas según el método de Choe *et al.*,<sup>35</sup> con algunas modificaciones. Las células fueron lavadas tres veces por centrifugación a  $4.500 \times g_{\text{max}}$  con 6 volúmenes de tampón Dulbecco y posteriormente incubadas con FITC-Tf o Fe,I-Tf  $4 \mu\text{M}$ , durante 5 min a  $37^{\circ}\text{C}$  y posteriormente lavadas 3 veces con tampón Dulbecco. La FITC-Tf o la Fe,I-Tf unida externamente, fue eliminada incubando las células en plasma sanguíneo al 20% en tampón Dulbecco por 5 min en hielo. La lisis se hizo con tampón NaCl y PMSF  $0,2 \text{ mM}$  (u otro tampón que se indique), con una razón de volúmenes entre células y tampón de 1:1. Luego se congeló en acetona enfriada con un enfriador de inmersión por 15 min y se descongeló a  $4^{\circ}\text{C}$ . El hemolisado fue centrifugado a  $48.000 \times g_{\text{max}}$  20 min. El

sobrenadante resultante fue filtrado a través de una columna de Bio Gel A-5 (22 x 1,5 cm), equilibrada en el mismo tampón usado en la lisis. El pico de vesículas, determinado por las cuentas de  $^{59}\text{Fe}$  y  $^{125}\text{I}$ , fue cargado sobre 6 ml de Percoll 27% inicial y centrifugado a  $38.000 \times g_{\text{max}}$  por 30 min. La banda de vesículas ( $d=1,072 \text{ g/ml}$ ) fue colectada por goteo desde abajo y llevada a un volumen de 5 ml con el tampón usado en la columna y centrifugada a  $120.000 \times g_{\text{max}}$  por 30 min en un rotor SW-50.1. El precipitado de vesículas, ubicado sobre el colchón de Percoll, fue resuspendido por agitación, en un mínimo de volumen de solución amortiguadora usada en la columna. Las vesículas fueron utilizadas de inmediato en la determinación de las actividades ATPásicas y acidificación. El resto fue guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la determinación de proteínas y para electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.<sup>36</sup>

## 6. Obtención de vesículas con alto contenido de hierro

i) Estudio de la concentración de inhibidores sobre la incorporación celular de hierro

Para obtener vesículas con un alto contenido de hierro, se ensayó el uso de ionóforos no electrogénicos, como nigericina o monensina;<sup>8,11,18</sup> de aminas primarias, como cloruro de amonio o butilamina,<sup>8,9,15,16</sup> y de un ionóforo para protones electrogénico como FCCP.<sup>8,19</sup> Para determinar la concentración apropiada de aminas primarias y de ionóforos para inhibir la salida del hierro desde las vesículas, se hizo un estudio de incorporación de hierro a reticulocitos en presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y butilamina 10-50 mM; monensina y nigericina 1-5 mM y FCCP 1-40  $\mu\text{M}$ . Para ello, se incubaron 25

$\mu\text{l}$  de células empacadas y tampón Dulbecco en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  en presencia de los ionóforos o aminos en las concentraciones indicadas durante 5 min a 37° C. Se centrifugó a 10.000 rpm por 10 seg en una microcentrífuga Fisher modelo 59 A y se incubó a 37° C, con Fe,I-Tf 1,8  $\mu\text{M}$  en presencia del inhibidor en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ . Se sacaron alícuotas de 15  $\mu\text{l}$  a los 5, 10 y 15 min. Se lavó 3 veces por centrifugación con tampón Dulbecco. Se determinó la razón  $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$  presente en las células en un contador gamma. Con este valor y la razón  $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$  inicial de Fe,I-Tf fue posible determinar el número de ciclos de internalización de transferrina en el tiempo de incubación y establecer las concentraciones apropiadas para lograr inhibir la salida de hierro.

ii) Procedimiento para la obtención de vesículas con alto contenido de hierro

Se procedió básicamente igual que en la preparación de vesículas con alto contenido en el complejo transferrina-receptor, salvo que previo a la incubación con transferrina, las células se incubaron con las concentraciones establecidas en el punto anterior de aminos y ionóforos en tampón Dulbecco. La lisis se hizo en presencia del ionóforo o de la amina y previo a la centrifugación a  $120.000 \times g_{\text{max}}$ , las vesículas fueron incubadas en tampón de columna-BSA 2% por 10 min en hielo, para eliminar los ionóforos que estaban en la membrana de la vesícula. El resto del protocolo fue igual al descrito anteriormente. En este protocolo fue imposible determinar la concentración de proteínas, debido al alto porcentaje de BSA presente en la preparación final.

## 7. Estimación de la actividad ATPásica

### i) En vesículas intactas

La determinación de la actividad ATPásica en vesículas intactas se hizo según el método acoplado de la PK/LDH.<sup>14</sup> El medio de incubación contenía en un volumen final de 1 ml: KCl 100 mM, Hepes/Tris (pH 7,0) 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, PEP 1,25 mM, NADH 0,5 mM, EGTA/Tris 1 mM, Mg-ATP 1 mM y 5 µl de PK/LDH (3,5 U de PK y 5 U de LDH). El (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> presente en la suspensión de PK/LDH fue eliminado por centrifugación a 10.000 rpm en una microcentrífuga Fisher modelo 59 A y el precipitado, resuspendido en agua. Alternativamente el (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fue eliminado por filtración en pequeñas columnas (1 ml) de Bio Gel A-1.5. La reacción se inició con la adición de 30-50 µg de vesículas y se le determinó el cambio de absorbancia a 340 nm como función del tiempo, a 25° C. La actividad H<sup>+</sup>-ATPásica de las vesículas se calculó como la diferencia entre la actividad ATPásica total y la actividad en presencia de NEM 1mM.

### ii) En vesículas solubilizadas

Para la determinación de la actividad ATPásica en vesículas solubilizadas, se utilizó el mismo procedimiento anterior, salvo que se agregó 0,2% del detergente no iónico, Brij 58 al medio de incubación.<sup>18</sup>

### iii) Sensibilidad a inhibidores

Para la medición de las actividades ATPásicas de vesículas intactas y solubilizadas en presencia de inhibidores como NEM, estrofantidina, oligomicina, DIDS, NBD-Cl y DCCD en las concentraciones indicadas, se

utilizó el método de la PK/LDH. Las vesículas se preincubaron con los inhibidores en hielo entre 1 y 2 horas, previo a la determinación de actividades. Se encontró que en 1 hora se alcanzaba el máximo de inhibición.

Se prepararon las soluciones de inhibidores, 100 veces más concentradas (aquellas disueltas en etanol) y 200 veces más concentradas (aquellas disueltas en DMSO) las que fueron guardadas a  $-20^{\circ}$  C. Las soluciones concentradas fueron:

estrofantidina 5 mM en etanol;

oligomicina 500  $\mu$ M en etanol;

NEM 20 mM en agua;

DCCD 10 mM en etanol;

NBD-Cl 10 mM en DMSO.

Las soluciones de trabajo, se prepararon el mismo día del experimento diluyéndolas en agua. La concentración final de los inhibidores fueron las indicadas y la de etanol y de DMSO, no excedieron el 1% y el 0,5% respectivamente. Posteriormente se descartaron.

#### iv) Efecto de la composición iónica intra y extravesicular

En vesículas intactas se determinó la dependencia de la actividad ATPásica respecto de la composición iónica. Para ello, se prepararon vesículas en presencia de tampón  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y tampón  $\text{K}_2\text{SO}_4$  y se determinó la actividad ATPásica sensible a NEM 1 mM en medios con tampones NaCl, KCl y sacarosa.<sup>18,37,38</sup>

## **8. Caracterización del proceso de acidificación**

### **i) Estimación del pH intravesicular**

Para estimar el grado de acidificación de las vesículas, se determinó el decaimiento de la fluorescencia de FITC unida covalentemente a transferrina con longitudes de onda de excitación de 490 y 450 nm y de emisión de 520 nm en un espectrofluorímetro Perkin Elmer MPF-2A. La cubeta contenía entre 30 y 50  $\mu\text{g}$  de vesículas, en un volumen final de 1,5 ml de tampón NaCl u otro que se indique, además de algún inhibidor o efector cuando correspondió. La reacción se inició con la adición de Mg-ATP/Tris 1mM. La temperatura del ensayo fue de 25° C.

### **ii) Curva de calibración**

Los pHs intravesiculares se estimaron a partir de una curva de calibración de cambios de fluorescencia en función del pH, en las mismas condiciones del ensayo, pero sin Mg-ATP/Tris y en presencia del detergente no iónico, NP-40 0,2%. El pH del medio se varió con alícuotas de HCl o NaOH 0,1 N y se determinó la razón de intensidades de fluorescencia excitando a 490 y 450 nm en función del pH del medio. Con estos datos se construyó una curva de calibración para cada preparación y también para las diferentes composiciones iónicas intravesiculares.

## 9. Flujos de cloruro

A partir de una solución de  $\text{H}^{36}\text{Cl}$  0,48 M (0,25 mCi/ml), se preparó una solución de trabajo  $\text{Na}^{36}\text{Cl}$  0,1 M ajustando a pH 7,0 con NaOH 1 N.

### i) Cinéticas de entrada

El ensayo consistió en incubar a 25° C, 100-120  $\mu\text{g}$  de vesículas NaCl, con 20  $\mu\text{l}$  de solución  $\text{Na}^{36}\text{Cl}$  100 mM (1  $\mu\text{Ci}$ ) y tampón NaCl pH 7,0 suficiente para completar 100  $\mu\text{l}$ . A tiempos variables entre 1 y 3 min se sacaron alícuotas de 23  $\mu\text{l}$  que se agregaron sobre 0,4 ml de tampón NaCl helado y se filtró a través de filtros Millipore (tipo GS, 0,22  $\mu\text{m}$ ) pretratados con tampón NaCl. Las vesículas retenidas en los filtros se lavaron 3 veces con 2 ml de tampón NaCl. El experimento se realizó en presencia y en ausencia de Mg-ATP/Tris 1 mM. Los filtros, previamente secos, fueron puestos en líquido de centelleo y contados en un contador beta.

### ii) Cinéticas de salida

En estos experimentos, las vesículas (entre 100 y 120  $\mu\text{g}$ ) fueron cargadas con  $\text{Na}^{36}\text{Cl}$  100 mM por 60 min a 37° C y luego diluidas 50 veces en tampón NaCl y Mg-ATP/Tris 1 mM a 25° C. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de incubación, como se describió en el punto anterior. El flujo neto de  $^{36}\text{Cl}^-$  se determinó de la diferencia entre los flujos de entrada y de salida.

## 10. Flujos de sodio

A partir de una solución de  $^{22}\text{NaCl}$  40  $\mu\text{M}$  (1 mCi/ml), se preparó una solución de trabajo  $^{22}\text{NaCl}$  0,1 M con NaCl 0,2 M.

### i) Carga de vesículas con $^{22}\text{Na}^+$

Se incubaron 120-150  $\mu\text{g}$  de vesículas NaCl<sub>1</sub> con 8  $\mu\text{l}$  de la solución de trabajo  $^{22}\text{NaCl}$  0,1 M (4  $\mu\text{Ci}$ ) durante 60 min a 37° C o toda la noche a 4° C.

### ii) Cinéticas de salida

En un volumen final de 1 ml se incubaron 8  $\mu\text{l}$  de vesículas cargadas con  $^{22}\text{Na}^+$  (25-30  $\mu\text{g}$ ) con tampón NaCl-KCl en la presencia y ausencia de Mg-ATP/Tris 1 mM. Los tiempos de incubación variaron desde 0 a 3 min a 25° C. Luego se filtró a través de Millipore como se describió anteriormente. Los filtros fueron contados en un contador gamma.

### iii) Cinéticas de entrada

Se incubaron 70-90  $\mu\text{g}$  de vesículas con tampón NaCl<sub>1</sub> con 2  $\mu\text{l}$  de la solución de trabajo de  $^{22}\text{NaCl}$  0,1 M (1  $\mu\text{Ci}$ ) y tampón KCl, para tener NaCl 20 mM, KCl 80 mM en el medio externo, en la presencia y ausencia de Mg-ATP/Tris 1 mM. El volumen final fue de 100  $\mu\text{l}$  y la temperatura del ensayo, de 25° C. Entre 0 y 3 min se sacaron alícuotas que contenían de 15 a 20  $\mu\text{g}$  de vesículas. Se recibieron sobre 0,4 ml de tampón NaCl helado, se filtraron, lavaron y contaron como se describió anteriormente. El flujo neto de salida de sodio se obtuvo de la diferencia entre los flujos de salida y de entrada.

### 11. Flujos de rubidio

Los flujos de entrada y salida de  $^{86}\text{Rb}^+$  se realizaron con protocolos similares a los de  $^{22}\text{Na}^+$  a partir de una solución de  $^{86}\text{RbCl}$  25,5 mM (13,3 mCi/ml).

### 12. Determinación de la razón $\text{H}^+/\text{ATP}$

Para determinar la razón entre los  $\text{H}^+$  bombeados por ATP hidrolizado, se utilizó una aproximación de una ecuación derivada por Thayer y Hinkle:<sup>39</sup>

$$\ln (H^+ / \text{ATP}) = \ln h - k_7 t \quad (\text{ver Apéndice})$$

donde  $H^+$  son los moles de protones bombeados al tiempo  $t$ ,  $\text{ATP}$  son los moles de ATP hidrolizado al tiempo  $t$ ,  $h$  es la razón de protones bombeados por ATP hidrolizado,  $k_7$  es la constante de velocidad de fuga de protones y  $t$  es el tiempo de incubación.

Las vesículas fueron preparadas en presencia de tampón MES/Na. El experimento consistió en incubar vesículas (1 mg) en 1 ml de tampón MES/Na-K, hasta que el pH del medio de incubación se equilibró en 7,000. La reacción se inició con la adición de Mg-ATP 1 mM (en su forma disódica, pH 7,0) y se registró el cambio de pH durante 3 min a 25° C. Al cabo de dicho tiempo, la reacción se detuvo agregando el detergente no iónico NP-40 al 0,2%. Para correlacionar el  $\Delta\text{pH}$  con el número de moles de  $\text{H}^+$ , se tituló con alícuotas de HCl 1 mM estándar en la misma cubeta que contenía las vesículas solubilizadas. Se repitió el mismo experimento en presencia de NEM 2 mM. Con este procedimiento se determinó el número total de  $\text{H}^+$  bombeados por la  $\text{H}^+$ -ATPasa en 3 minutos de reacción. Paralelamente se determinó la cinética de acidificación en vesículas que contenían FITC-Tf en su interior (ver sección 8 de este capítulo). Con estos

dos experimentos, se estimó el número de  $H^+$  bombeados en función del tiempo. Los cambios de pH fueron registrados usando un pHmetro Beckmann 71 unido a un amplificador operacional y a un registrador para dar una escala total de 10 mV.<sup>39</sup>

Graficando  $\ln (\Delta H^+ / \Delta ATP)$  en función del tiempo, se obtuvo  $k$  de la intersección en la ordenada y la pendiente correspondió a  $k_7$ .

### 13. Movilización de hierro en presencia de citosol

Para la realización de estos experimentos, se utilizó la preparación de vesículas con alto contenido de hierro (ver Sección 6 de este Capítulo).

#### i) Curva de concentración de citosol

Se incubaron vesículas con tampón  $NaCl_4$  en presencia de citosol 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,45x en tampón  $KCl$  por 5 min a 37° C. Se filtró por filtros Millipore tipo GS, tamaño de poro 0,22  $\mu m$ , pretratados con BSA al 2% en tampón  $NaCl$ . Los filtros fueron lavados 3 veces con tampón  $NaCl$  y contados en un contador gamma.

#### ii) Cinética de movilización de hierro

Se incubaron a 37° C vesículas con tampón  $NaCl_4$  en 0,5 ml de medio que contenía citosol a la concentración establecida en el experimento anterior, diluido en tampón  $KCl$ . Se sacaron alícuotas de 100  $\mu l$  a tiempos variables entre 1 y 10 min. Los filtros fueron lavados y contados como en el punto anterior.

### iii) Efectores e inhibidores en la movilización

Se incubaron vesículas con tampón NaCl, con citosol 0,3 x en un volumen final de 100  $\mu$ l de tampón NaCl-KCl. Además el medio tenía cuando correspondió: Mg-ATP/Tris 1 mM, ascorbato/Tris 5 mM, NADH 2,5 mM, FCCP 20  $\mu$ M, nigericina 10  $\mu$ M o NEM 2 mM. Las vesículas fueron incubadas 5 min a 37 $^{\circ}$  C y filtradas como se indicó anteriormente.

## 14. Movilización de hierro en ausencia de citosol

Las vesículas utilizadas en estos experimentos correspondieron a la preparación con alto contenido en hierro.

### i) Cinética de movilización de hierro

Se incubaron vesículas con tampón NaCl, a 37 $^{\circ}$  C, en 0,5 ml de medio que contenía Mg-ATP/Tris 1 mM y ascorbato/Tris 1 mM en tampón KCl (pH 7,0). Se sacaron alícuotas de 100  $\mu$ l a tiempos variables entre 1 y 10 min, se filtraron por Millipore, se lavaron y se contaron como se describió anteriormente.

### ii) Efecto de inhibidores de la acidificación en la movilización

Se incubaron vesículas con tampón NaCl, a 37 $^{\circ}$  C durante 5 min en tampón KCl con las siguientes adiciones, cuando correspondió: ascorbato/Tris 1 mM, Mg-ATP/Tris 1 mM, NEM 1 mM, FCCP 20  $\mu$ M, nigericina 20  $\mu$ M. Se filtraron, se lavaron y contaron.

Para determinar el porcentaje de hierro dissociado de transferrina, se incubaron vesículas en las mismas condiciones que para la movilización,

pero la reacción se detuvo con la adición de NP-40 al 2% que disipó instantáneamente el gradiente de pH y desferroxamina 0,5 mM que queló el hierro dissociado de transferrina. Se agregó Sepharosa-Anti Tf y se incubó por 3-4 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Las esferas de Sepharosa fueron lavadas abundantemente con tampón KCl y se determinó el porcentaje de hierro dissociado comparando la razón  $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$  de la transferrina unida a la Sepharosa con la razón de la transferrina presente originalmente en las vesículas.

### iii) Efecto de la composición iónica

Se incubaron vesículas con diferentes composiciones iónicas internas (tampones NaCl, KCl y sacarosa) en presencia de ascorbato/Tris 0,5 mM y Mg-ATP/Tris 1 mM con tres tampones diferentes: NaCl, KCl y sacarosa durante 3 min a 37° C, en un volumen final de 300  $\mu\text{l}$ . La mezcla se preincubó 1 min a la misma temperatura y la reacción se inició con la adición de Mg-ATP. Al cabo del tiempo de incubación, las vesículas se filtraron, lavaron y contaron como se describió anteriormente.

## IV. RESULTADOS

### 1. Preparación de vesículas endocíticas

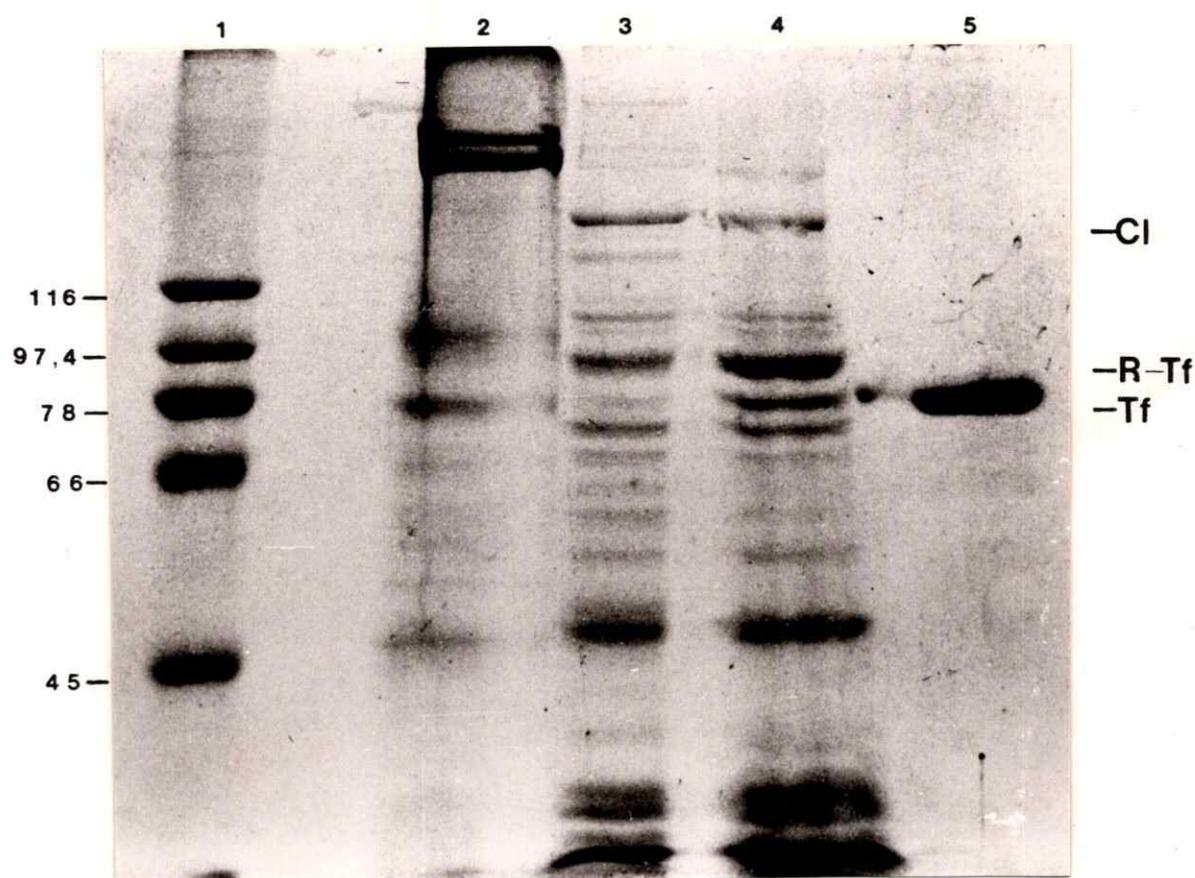
La preparación de vesículas endocíticas desarrollada en el laboratorio tiene la ventaja, con respecto a la de Choe *et al.*,<sup>35</sup> que toma menos tiempo en obtener las vesículas aisladas, lo que permite hacer mediciones de actividades ATPásicas y acidificaciones el mismo día de la preparación. Este hecho es importante, ya que mediciones de acidificación realizadas a las 18 horas de preparadas las vesículas, presentan un 50% de disminución de la actividad.

Los rendimientos para las diferentes etapas de purificación, con respecto a la transferrina asociada a la célula (determinada como radiactividad de  $^{125}\text{I}$ ), fueron: lisis, 40%; filtración por Bio Gel, 70%; gradiente de Percoll, 60%, y centrifugación a alta velocidad, 95%. El rendimiento en proteínas estuvo relacionado con el porcentaje de reticulocitos presentes en la suspensión original de células, variando entre 50 y 250  $\mu\text{g}$  proteínas/ml células.

## 2. Electroforesis en geles de poliacrilamida

En la Fig. 1, se muestra una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 7,5%, teñido con azul de Coomassie.<sup>36</sup> En él se muestran las distintas etapas de la preparación de vesículas endocíticas detallada en los Métodos. Es interesante destacar el gran enriquecimiento de la banda de Tf y de la del R-Tf en las vesículas colectadas de la gradiente de Percoll (carril 4) con respecto a la etapa anterior (carril 3). Básicamente, ambas etapas presentan las mismas bandas, una de 150.000 correspondiente a clatrina (Cl); una banda de 85.000, que corresponde al receptor de transferrina (R-Tf); una banda de 78.000, que corresponde a transferrina (Tf), y una banda de 43.500, correspondiente a la banda 5 o actina de glóbulo rojo (Ac). Además presenta otras bandas de 180.000, 100.000, 93.000, 70.000, 64.000, 50.000, 43.000 y otras dos bandas de 34.000 y 33.000 que no fueron identificadas. Otro aspecto importante de la preparación de vesículas obtenida (carril 4) es la ausencia de espectrina (bandas 1 y 2) de membrana plasmática (carril 2).

Además, se muestran las bandas típicas de membrana plasmática de glóbulo rojo: banda 1 (240.000), banda 2 (220.000), banda 3 (95.000), bandas 4 y banda 5 o actina de glóbulo rojo (43.000) en la fracción de membrana plasmática de reticulocito obtenida de la centrifugación a  $48.000 \times g_{max}$  (carril 2); una preparación pura de transferrina de conejo, realizada en el laboratorio (carril 5), y los estándares de peso molecular (carril 1), con los respectivos pesos moleculares. De mayor a menor se muestran  $\beta$ -galactosidasa, con 116.000; fosforilasa b, con 97.400; transferrina de conejo, con 78.000; seroalbúmina de bovino, con 66.000, y ovoalbúmina, con 45.000.



### FIGURA 1: Electroforesis en gel de poliacrilamida

Gel de poliacrilamida al 7,5%, con un gel empacador al 4%, teñido con Azul de Coomassie.<sup>35</sup> Carril 1, estándares de peso molecular:  $\beta$ -galactosidasa (116.000); fosforilasa B (97.400); transferrina de conejo (78.000); seroalbúmina de bovino (66.000) y ovoalbúmina (45.000); carril 2, 100  $\mu$ g de membrana plasmática; carril 3, 100  $\mu$ g de vesículas provenientes de la columna de Bio Gel; carril 4, 100  $\mu$ g de vesículas provenientes del gradiente de Percoll y carril 5, 3  $\mu$ g de transferrina de conejo purificada.

### 3. Actividades ATPásicas en vesículas solubilizadas

La caracterización de las distintas actividades ATPásicas se hizo utilizando inhibidores conocidos para cada una de ellas. La determinación fue realizada en presencia de detergente, en donde los inhibidores tienen libre acceso a la proteína, ya que no está presente la barrera de la membrana. El detergente utilizado fue Brij 58, un detergente no iónico que no inhibe la actividad  $H^+$ -ATPásica presente en las vesículas.<sup>18</sup> El método utilizado para determinar la hidrólisis del ATP fue el sistema acoplado de la piruvato quinasa-deshidrogenasa láctica.<sup>14</sup>

Los resultados de la Tabla I indican que tanto estrofantidina (inhibidor de la  $Na^+,K^+$ -ATPasa), como oligomicina (inhibidor de la  $F_1F_0$  mitocondrial), no inhibieron sustancialmente la actividad total de vesículas endocíticas solubilizadas. De las concentraciones de NEM ensayadas, 1 mM inhibió en un 27% la actividad total. Es posible suponer que en la actividad ATPásica total se detectaron otra(s) ATPasa(s) que es(son) menos sensible(s) a NEM, ya que con 2 mM aún había un 55% de actividad remanente.<sup>17,22-27</sup>

NBD-Cl produjo una inhibición de un 30% y DCCD, no inhibió la actividad ATPásica en vesículas solubilizadas.

Si bien es cierto DIDS no es un inhibidor específico de la actividad ATPásica, fue incluido en esta tabla con el objeto de comparar su efecto en vesículas intactas y acidificación.

TABLA I

## ACTIVIDAD ATPásica EN VESÍCULAS SOLUBILIZADAS

| Inhibidor                 | % Actividad $\pm$ d. e |
|---------------------------|------------------------|
| Estrofantidina 50 $\mu$ M | 89,6 $\pm$ 6,4         |
| Oligomicina 5 $\mu$ M     | 84,7 $\pm$ 12,3        |
| NEM 1 mM                  | 72,8 $\pm$ 18,3        |
| NEM 2 mM                  | 54,8 $\pm$ 14,1        |
| DIDS 10 $\mu$ M           | 81,0 $\pm$ 14,9        |
| NBD-Cl 50 $\mu$ M         | 69,7 $\pm$ 13,5        |
| DCCD 100 $\mu$ M          | 121,5 $\pm$ 9,2        |

## TABLA I: Actividad ATPásica en vesículas solubilizadas

El medio de incubación a pH 7,0 contenía, en un volumen final de 1 ml (en mM): NaCl 50, KCl 50, Hepes/Tris 10, MgSO<sub>4</sub> 1, PEP 1,25, NADH 0,5 mM, EGTA/Tris 1, Mg-ATP/Tris 1, 5  $\mu$ l PK/LDH (3,5 U PK/5 U LDH), Brij 58 0,2% y el inhibidor en la concentración indicada. Las vesículas fueron preincubadas por 60 min en hielo con los inhibidores (tiempo suficiente para obtener inhibición máxima). La reacción se inició con la adición de 30-50  $\mu$ g de vesículas y se determinó la absorbancia a 340 nm. El ensayo se realizó a 25° C. La actividad ATPásica del control fue de  $4,07 \times 10^{-8} \pm 1,7$  moles de ATP/mg de proteínas/3 min (n=3). El efecto de los inhibidores se expresa como el promedio del porcentaje de actividad del control  $\pm$  la desviación estándar, para 3 determinaciones independientes.

#### 4. Actividades ATPásicas en vesículas intactas

Se caracterizaron las actividades ATPásicas en vesículas intactas, donde se consideran otros factores, como la relación lípido-proteína o gradientes eléctricos y químicos que pudieran estar en juego en el normal funcionamiento de las ATPasas en las vesículas. Los resultados se muestran en la Tabla II. La actividad ATPásica total no se vio afectada ni por oligomicina ni por estrofantidina mientras que DCCD inhibió en un 17% la actividad total. NEM, otro inhibidor de la misma  $H^+$ -ATPasa,<sup>40</sup> inhibió la actividad total en un 25% con 1 mM. NBD-Cl es un potente inhibidor de la  $H^+$ -ATPasa de vesículas de cerebro de bovino<sup>27</sup> y en vesículas de reticulocitos produjo una inhibición de la actividad total de un 37%, valor comparable al obtenido en vesículas solubilizadas.

Por otra parte, DIDS inhibió la actividad total en un 70%, a diferencia del 19% obtenido en vesículas solubilizadas.

#### 5. Determinación del pH intravesicular

Como ya se mencionó anteriormente, el proceso de acidificación en las vesículas endocíticas es debido a una  $H^+$ -ATPasa que bombea protones hacia el interior a expensas de la hidrólisis de ATP.<sup>14,17-19</sup> Una manera de detectar este cambio en el pH intravesicular fue mediante el uso de FITC, una sonda fluorescente, cuya fluorescencia sufre un apagamiento en un rango de pH entre 5 y 7. Por esta razón, esta molécula fue unida covalentemente a transferrina,<sup>34</sup> la cual es endocitada por la célula y permanece unida dentro de la vesícula. La internalización de FITC-Tf con respecto a Tf es comparable. De esta manera fue posible detectar el cambio en el pH intravesicular directamente. Para correlacionar los

TABLA II

## ACTIVIDAD ATPásica EN VESÍCULAS INTACTAS

| Inhibidor                 | % Actividad $\pm$ d.e. |
|---------------------------|------------------------|
| Oligomicina 5 $\mu$ M     | 96,2 $\pm$ 7,2 (4)     |
| Estrofantidina 50 $\mu$ M | 94,2 $\pm$ 6,8 (4)     |
| DCCD 100 $\mu$ M          | 82,9 $\pm$ 6,0 (4)     |
| NEM 1 mM                  | 74,5 $\pm$ 7,3 (4)     |
| NEM 2 mM                  | 54,2 $\pm$ 17,6 (7)    |
| NBD-Cl 50 $\mu$ M         | 62,8 $\pm$ 19,8 (3)    |
| DIDS 10 $\mu$ M           | 29,9 $\pm$ 0,9 (2)     |

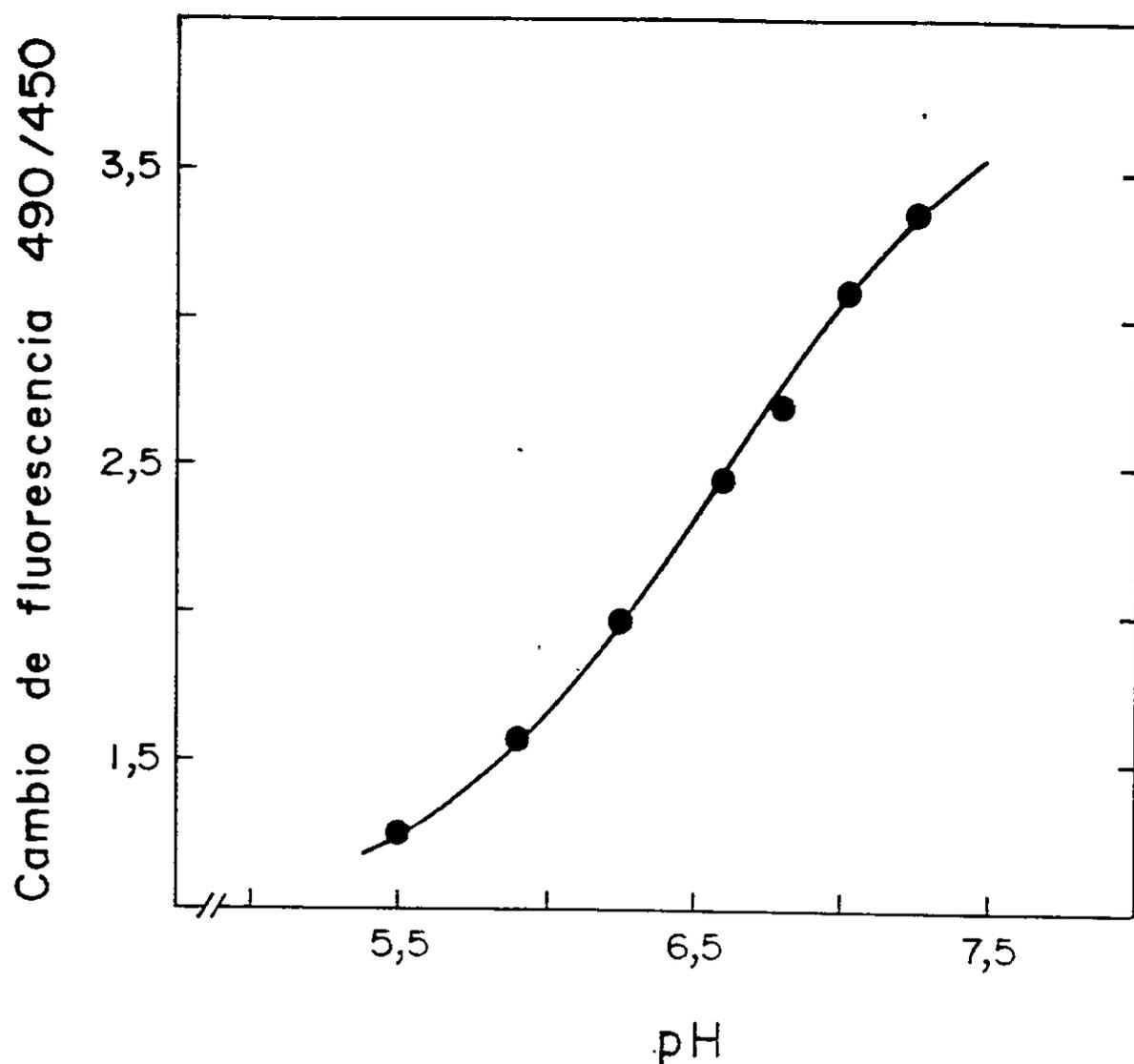
## TABLA II: Actividad ATPásica en vesículas intactas

El medio de incubación a pH 7,0 contenía, en un volumen final de 1 ml (en mM): KCl 100, Hepes/Tris 10, MgSO<sub>4</sub> 1, PEP 1,25, NADH 0,5 mM, EGTA/Tris 1, Mg-ATP 1 y 5  $\mu$ l PK/LDH (3,5 U PK/5 U LDH) y el inhibidor en la concentración indicada. La reacción se inició con la adición de 30-50  $\mu$ g de vesículas, cuya composición iónica interna fue (en mM): NaCl 100, Hepes/Tris 10, MgSO<sub>4</sub> 1, EGTA/Tris 1. Las vesículas fueron preincubadas por 60 min en hielo con el inhibidor correspondiente (tiempo suficiente para una inhibición máxima) y se determinó la absorbancia a 340 nm. La temperatura del ensayo fue de 25<sup>o</sup> C. La actividad ATPásica del control fue de  $4,46 \times 10^{-8} \pm 1,76$  moles de ATP/mg proteína/3 min (n=10). El efecto del inhibidor se expresa como el promedio del porcentaje de la actividad del control  $\pm$  la desviación estándar. El número entre paréntesis representa el número de determinaciones independientes.

cambios en la fluorescencia con el pH, se construyó una curva de calibración para cada preparación, en un medio con iguales condiciones que los ensayos, con la misma cantidad de vesículas con FITC-Tf en su interior, en presencia de detergente. De esta manera la FITC es capaz de detectar los cambios de pH del medio, el cual se fue acidificando por la adición de HCl y se registraron los cambios de fluorescencia (expresado como la razón 490/450) como función del pH. La curva obtenida se muestra en la Fig. 2. Lo importante de destacar es que FITC respondió en el rango de pH en que se verificó la acidificación.

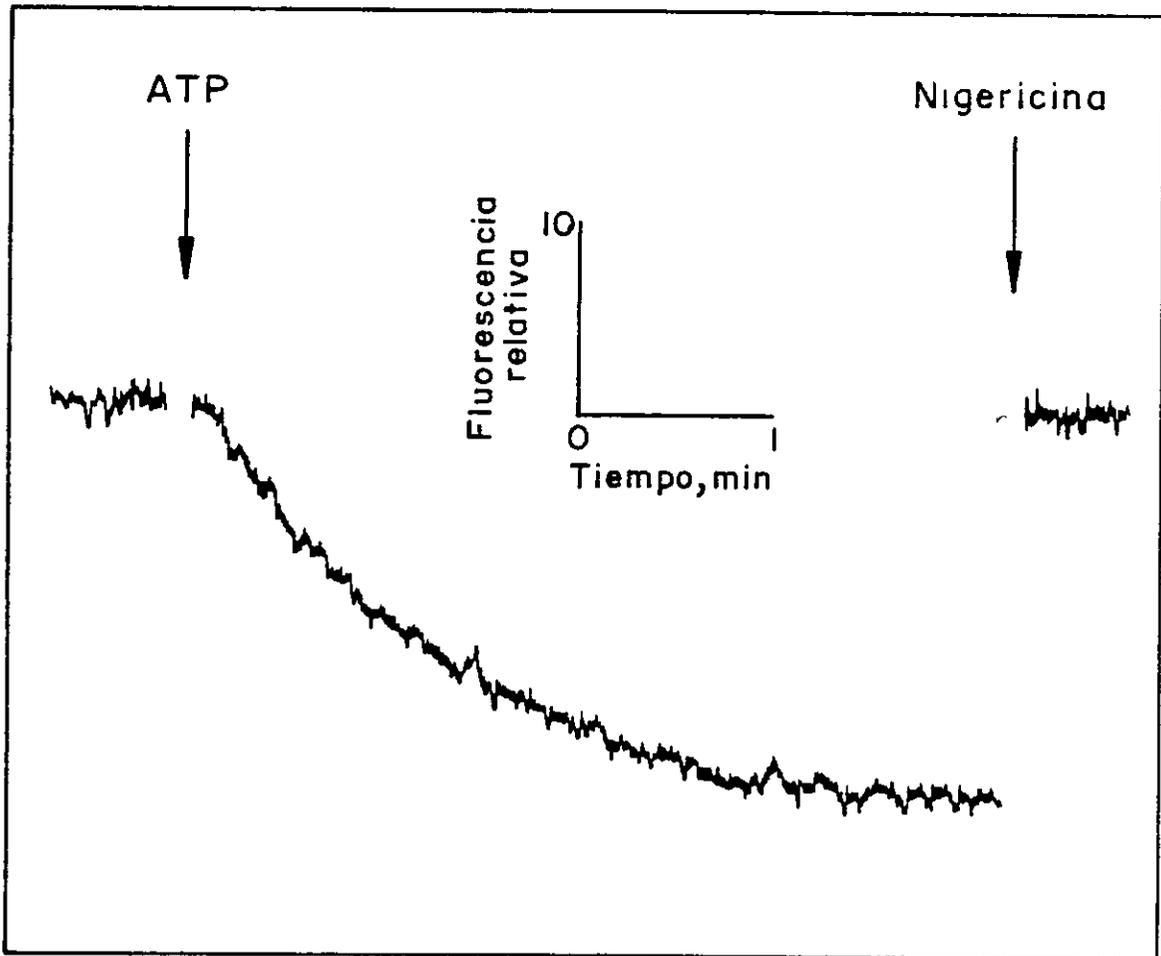
Un experimento típico de acidificación consistió en seguir en un espectrofluorímetro la disminución de la fluorescencia de la FITC-Tf en el interior de las vesículas a dos longitudes de onda de excitación, de 490 y 450 nm, y una longitud de onda de emisión de 520 nm.<sup>34</sup> Luego de obtenida una línea base, se agregó Mg-ATP. El tipo de registro obtenido es el que se muestra en la Fig. 3. En ella vemos como decayó la fluorescencia tras la adición de Mg-ATP, proceso que se verificó en alrededor de tres minutos, al cabo de cuyo tiempo el registro se aplanó. La adición de nigericina, un ionóforo no electrogénico que intercambia un protón por un potasio en favor de sus gradientes electroquímicos, fue usada para colapsar el gradiente de protones generado por la  $H^+$ -ATPasa. La vuelta a la línea base en el registro indicó que el decaimiento en la fluorescencia era un reflejo de una disminución del pH al interior de la vesícula.

Cuando los cambios de fluorescencia de un registro fueron transformados en valores de pH, mediante la apropiada curva de calibración (Fig. 2), se obtuvo una cinética de acidificación como la de la Fig. 4. En ella vemos que, a los 25° C, la acidificación se verificó en los



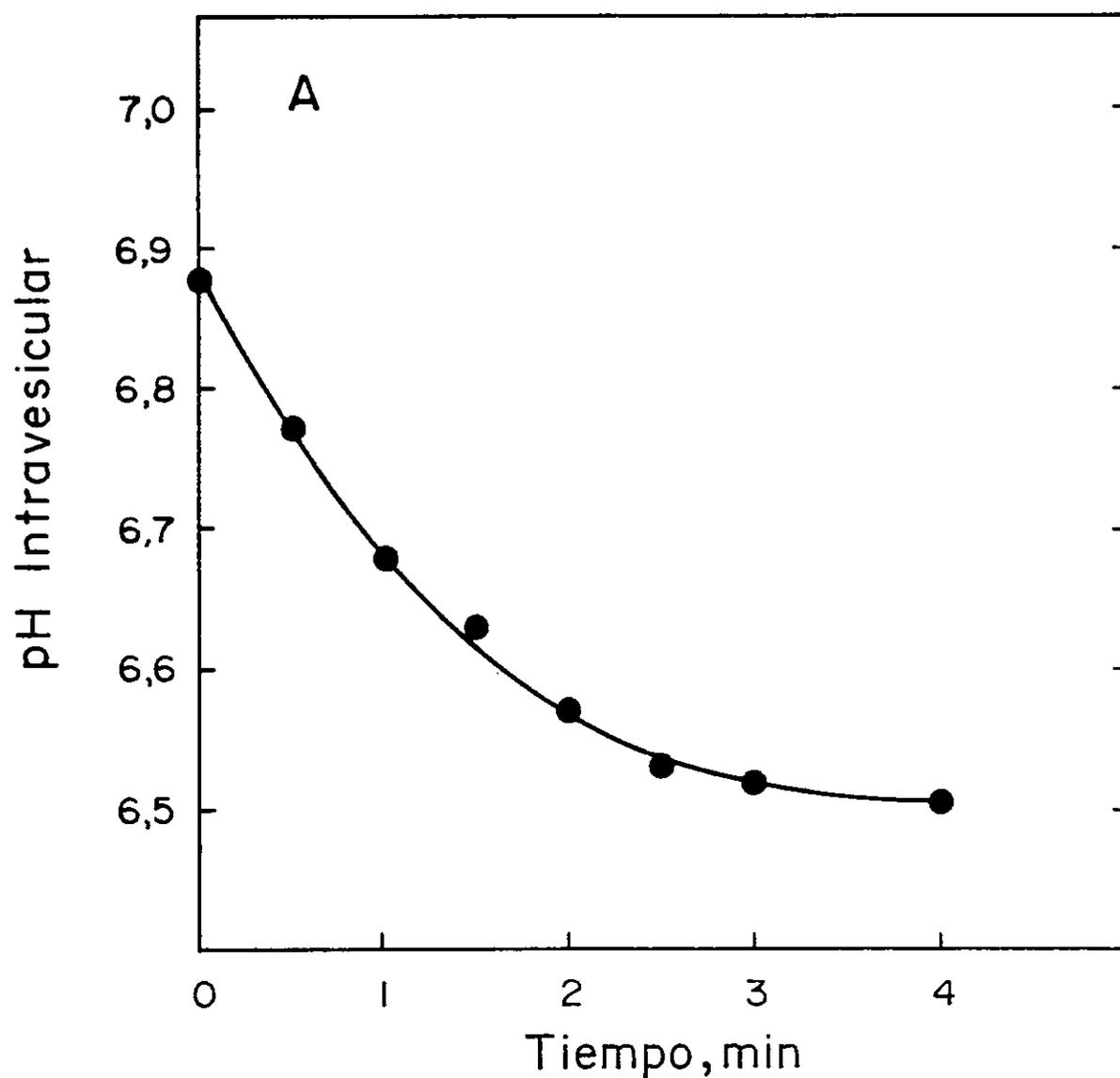
**FIGURA 2: Curva de calibración de FITC**

La cubeta contenía, en un volumen final de 1,5 ml, 50  $\mu\text{g}$  de vesículas con FITC-Tf, NP-40 al 0,2% y tampón KCl. El pH se varió en el rango de 7,5-5,5 con alícuotas de HCl o NaOH 0,1 N. La temperatura fue de 25° C, con una razón de longitudes de onda de excitación de 490/450 y de 520 nm la de emisión.



### FIGURA 3: Acidificación en vesículas endocíticas

Se determinó el grado de acidificación en vesículas a una razón de longitudes de onda de excitación de 490/459 y de emisión, de 520 nm. La cubeta contenía 50  $\mu\text{g}$  de vesículas con tampón KCl; y llevadas a 1,5 ml de medio con tampón KCl. La primera flecha indica el inicio de la reacción con Mg-ATP 1 mM y la segunda flecha indica la adición de nigericina 3  $\mu\text{M}$ . La temperatura fue de 25° C.



**FIGURA 4: Cinética de acidificación**

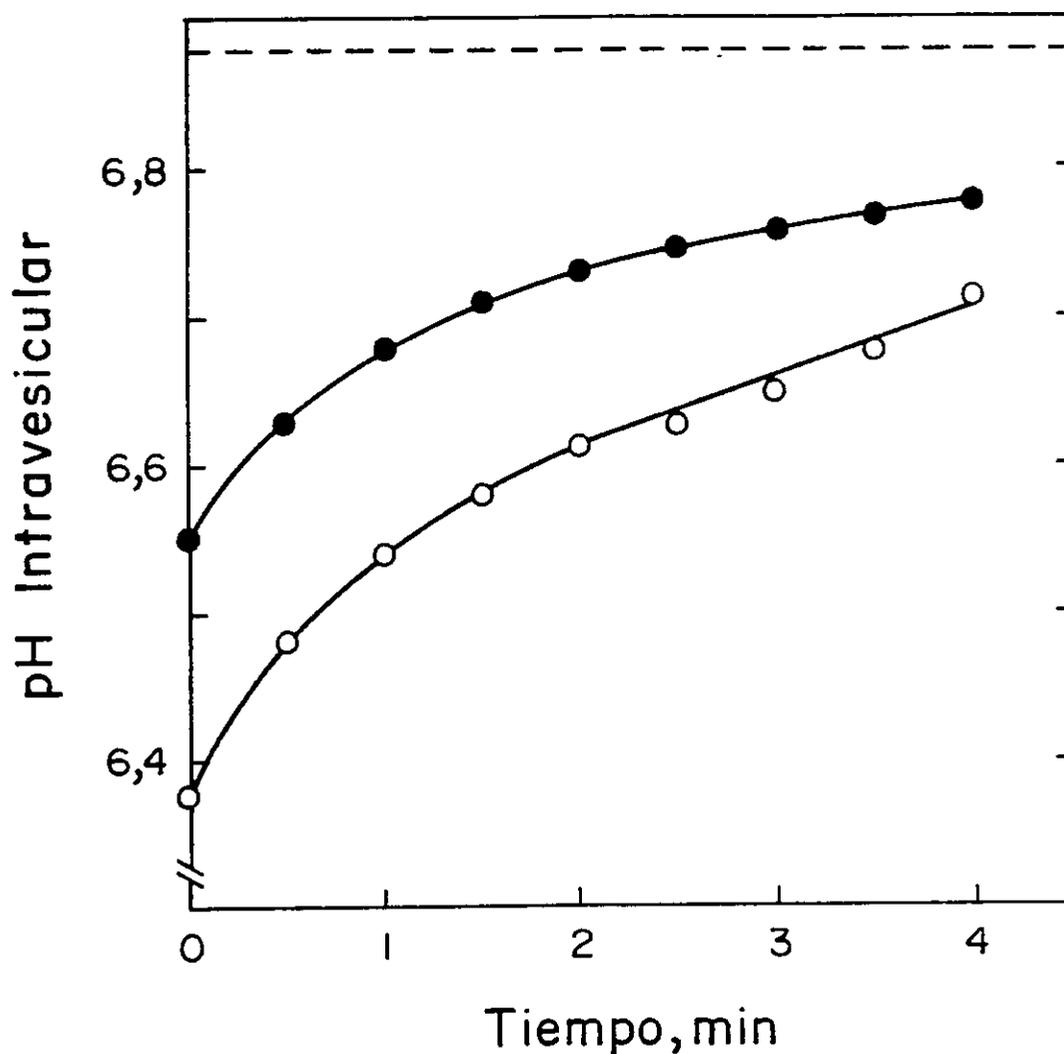
Curva construida a partir de un registro similar al de la Fig. 3, con la correspondiente curva de calibración. Las condiciones iónicas internas y externas fueron las mismas que las descritas en la Fig. 3.

tres primeros minutos después de la adición de ATP y que el valor máximo obtenido en dicho tiempo fue de 0,36 unidades de pH, en las condiciones iónicas establecidas en este experimento.

En la Fig. 5 se muestra una cinética de fuga de protones a 25° C, a las 3 horas de preparadas. Para este experimento, las vesículas tenían en su interior un pH inferior a 7,0, de manera que al incubarlas en un tampón a un pH mayor, en ausencia de Mg-ATP, fuera posible determinar si había aumento del pH al interior de las vesículas. A tiempo 0, las vesículas recién preparadas tenían en su interior un pH de 6,55 y al diluirlas en un medio de pH final 6,88 se produjo una alcalinización del medio intravesicular, debido al gradiente químico favorable para la salida de protones, hasta alcanzar un pH de 6,76 a los tres minutos. Este componente de fuga de protones pareciera estar siempre presente, ya que también se observa en vesículas preparadas 18 horas antes. No es posible comparar ambas cinéticas ya que como unas vesículas fueron dializadas 2 horas y las otras, toda la noche, los pHs internos no son iguales, es decir, las concentraciones de protones fueron distintas y la velocidad de fuga es función del  $\Delta$  de concentración inicial.

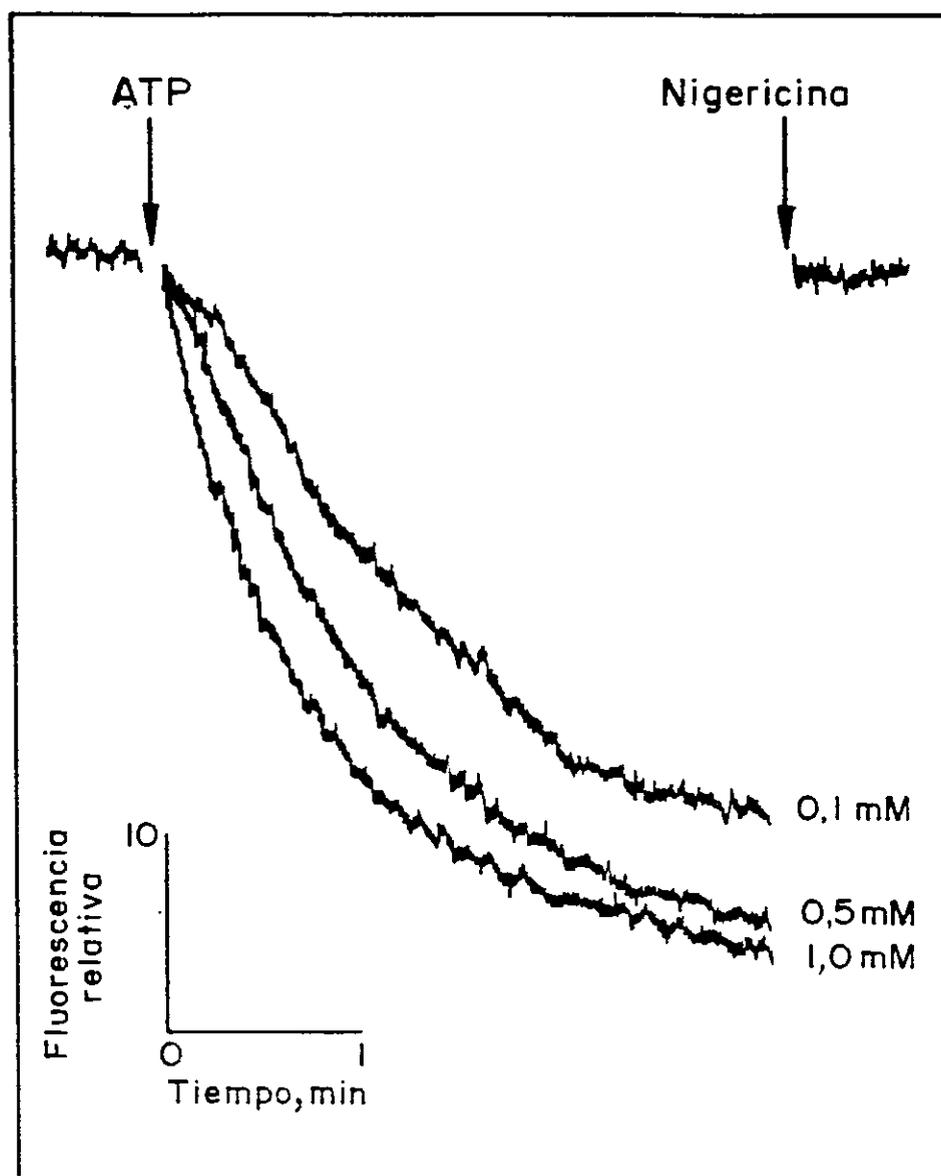
### **6. Dependencia de ATP en la acidificación**

La dependencia de la acidificación a diferentes concentraciones de Mg-ATP se muestra en la Fig. 6. Con 1 mM Mg-ATP se obtuvo la máxima acidificación, ya que con 2 mM, el registro fue muy similar al de 1 mM (dato no mostrado) y con 100  $\mu$ M Mg-ATP se obtuvo el 50% de la acidificación. Por esta razón, la concentración de Mg-ATP usada fue de 1 mM en todos los experimentos de acidificación. Esta concentración no fue



**FIGURA 5: Cinética de disipación**

Vesículas fueron dializadas contra un medio de pH 5,5 durante 2 horas (círculos cerrados) o toda la noche (círculos abiertos). Los pHs intravesiculares iniciales fueron 6,55 y 6,38 respectivamente. Se determinó fluorométricamente el aumento del pH, por un aumento de la fluorescencia al incubar las vesículas en 1,5 ml de tampón KCl pH 6,88 (línea discontinua) en ausencia de ATP.



### FIGURA 6: Dependencia de ATP en la acidificación

Se muestra el decaimiento de la fluorescencia de FITC-Tf con una longitud de onda de excitación de 490/450 y de emisión de 520. La cubeta contenía 40  $\mu\text{g}$  de vesículas con tampón  $\text{NaCl}$ , y tampón  $\text{KCl}$  suficiente para 1,5 ml. La reacción se inició con la adición de 0,1; 0,5 o 1,0 mM  $\text{Mg-ATP}$ . La temperatura del ensayo fue de 25 $^{\circ}$  C. La adición de nigericina fue de 3  $\mu\text{M}$ .

limitante y, por lo tanto, la detención de la acidificación que se produjo alrededor de los tres minutos fue debida a otros factores que se discutirán más adelante.

### **7. Estudio de especificidad en la acidificación**

En la Tabla III se muestran los  $\Delta\text{pH}/3$  min de acidificación tras la adición de Mg-ATP y de GTP. Con Mg-ATP 1 mM se obtuvo una acidificación casi máxima, ya que aun doblando la concentración, sólo se logró aumentar en un 14% la acidificación. GTP no fue capaz de inducir acidificación y no compitió con ATP, ya que al agregar este último luego de haber adicionado GTP, se obtuvo una acidificación comparable al control.

### **8. Efecto de inhibidores en la acidificación**

En un intento por correlacionar la acidificación con la actividad ATPásica responsable de dicho proceso, se determinó el grado de acidificación tras la adición de Mg-ATP, en presencia de diferentes inhibidores. Los resultados se muestran en la Tabla IV y están expresados como porcentaje de acidificación del control. La acidificación no fue inhibida por vanadato 100  $\mu\text{M}$ , lo que concuerda con los resultados de otros autores para esta enzima.<sup>14,17,19,21-27</sup> Oligomicina tampoco produjo inhibición,<sup>14,17,18,21-23</sup> y la inhibición con estrofantidina fue de un 12%.<sup>14</sup> NEM produjo una inhibición de la acidificación en un 87% con 1 mM, mientras que la actividad ATPásica total en vesículas intactas (Tabla II) sólo fue inhibida en un 25% con esa misma concentración. Estos experimentos sugieren claramente que en la vesícula endocítica hay más de una actividad ATPásica, pero aquella responsable de la acidificación es

**TABLA III**  
**EFFECTORES EN LA ACIDIFICACION DE VESICULAS**  
**ENDOCITICAS**

| Adición                  | $\Delta\text{pH}/3\text{min}$ |
|--------------------------|-------------------------------|
| Mg-ATP 0,1 mM            | -0,29                         |
| 0,5 mM                   | -0,49                         |
| 1,0 mM                   | -0,62                         |
| 2,0 mM                   | -0,72                         |
| GTP 0,5 mM               | -0,01                         |
| GTP 0,5 mM + Mg-ATP 1 mM | -0,60                         |

**TABLA III: Efectores en la acidificación de vesículas endocíticas**

El medio de incubación a pH 7,0 contenía en un volumen final de 1,5 ml (en mM): KCl 100, Hepes/Tris 10,  $\text{MgSO}_4$  1, EGTA/Tris 1, el nucleótido en la concentración indicada y 30-50  $\mu\text{g}$  de vesículas. La composición iónica interna de las vesículas era (en mM): NaCl 100, Hepes/Tris 10,  $\text{MgSO}_4$  1, EGTA/Tris 1 (pH 7,0). La reacción se inició con la adición de Mg-ATP y se determinó el decaimiento de la fluorescencia a una razón de longitudes de onda de excitación de 490/450 y 520 nm de emisión. La temperatura del ensayo fue de 25<sup>o</sup> C. Los resultados corresponden a un experimento representativo.

TABLA IV

EFFECTO DE INHIBIDORES EN LA ACIDIFICACION DE  
VESICULAS ENDOCITICAS

| Inhibidor                 | Acidificación,<br>% del control $\pm$ d.e. |     |
|---------------------------|--|-----|
| Vanadato 100 $\mu$ M      | 105,4 $\pm$ 11,2                           | (2) |
| Oligomicina 1-3 $\mu$ M   | 104,4 $\pm$ 13,6                           | (3) |
| Estrofantidina 50 $\mu$ M | 88,9                                       | (1) |
| Amilorida 0,5-1 mM        | 85,1 $\pm$ 10,2                            | (5) |
| NEM 0,5 mM                | 35,1 $\pm$ 28,3                            | (2) |
| NEM 1 mM                  | 12,7 $\pm$ 5,4                             | (3) |
| DCCD 10 $\mu$ M           | 72,7 $\pm$ 3,3                             | (2) |
| DIDS 10 $\mu$ M           | 55,3 $\pm$ 15,3                            | (2) |
| DIDS 100 $\mu$ M          | 7,8 $\pm$ 0,42                             | (2) |

**TABLA IV: Efecto de inhibidores en la acidificación de vesículas endocíticas**

El medio de incubación a pH 7,0 contenía en un volumen final de 1,5 ml (en mM): KCl 100, Hepes/Tris 10, MgSO<sub>4</sub> 1, EGTA/Tris 1, el efector o inhibidor en la concentración indicada y 30-50 µg de vesículas. La composición iónica interna de las vesículas era (en mM): NaCl 100, Hepes/Tris 10, MgSO<sub>4</sub> 1, EGTA/Tris 1 (pH 7,0). Las vesículas fueron preincubadas por 1 hora en hielo con los inhibidores como vanadato, oligomicina, estrofantidina, NEM, DCCD y DIDS. Amilorida fue introducida por congelamiento-descongelamiento. La reacción se inició con la adición de Mg-ATP 1 mM y se determinó el decaimiento de la fluorescencia a la razón de longitudes de onda de excitación 490/450 y 520 nm de emisión. La temperatura del ensayo fue de 25° C. La acidificación del control fue de 0,42 unidades de pH/3 min (n=9). Los resultados corresponden al porcentaje de la acidificación del control ± la desviación estándar, entre paréntesis se muestra el número de determinaciones.

sensible a NEM, lo que concuerda con lo descrito en la literatura.<sup>17,22-27</sup> DCCD inhibió un 27% la acidificación en vesículas de reticulocitos a la concentración ensayada (Tabla III). DIDS ha sido utilizado como un inhibidor de las conductancias de cloruro,<sup>41</sup> aunque por su modo de acción, no es específico. La inhibición por DIDS 10  $\mu\text{M}$  fue de 45%, concentración que inhibe el 50% de los canales de cloruro en glóbulo rojo,<sup>41</sup> mientras que con 100  $\mu\text{M}$  se inhibió el 92% de la acidificación, lo que concuerda con los resultados entregados por otros autores en el sentido de que DIDS a esa concentración inhibe la  $\text{H}^+$ -ATPasa.<sup>31</sup>

### **9. Efecto de la composición iónica intra y extraventricular en la acidificación**

En experimentos de reconstitución en liposomas, ha sido postulado que la  $\text{H}^+$ -ATPasa presente en vesículas de cerebro de bovino es electrogénica.<sup>30</sup> Si la  $\text{H}^+$ -ATPasa presente en vesículas de reticulocitos es la misma, es preciso imaginar la existencia de un mecanismo capaz de disipar el potencial de membrana positivo, generado por la entrada de los protones. Dos buenas alternativas parecieran ser la entrada de aniones paralelamente con la entrada de protones, o bien la salida de cationes. Para abordar estas posibilidades se hicieron tres preparaciones de vesículas simultáneamente, una con  $\text{NaCl}$ , otra con  $\text{KCl}$ , y una tercera con sacarosa, (ver sección 5 del capítulo de Métodos). A cada una de estas preparaciones se les determinó el grado de acidificación en presencia de los tampones  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$  y sacarosa en el medio externo, tras la adición de  $\text{Mg-ATP}$  1 mM. Los resultados se muestran en la Tabla V.

Lo primero que surge de estos resultados es que se requirió de la

TABLA V

EFFECTO DE LA COMPOSICION IONICA EN LA  
ACIDIFICACION DE VESICULAS ENDOCITICAS

| Composición<br>iónica externa | Composición<br>iónica interna | $\Delta\text{pH} \pm \text{d.e}$ |
|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Sacarosa                      | Sacarosa                      | $-0,04 \pm 0,03$                 |
| Sacarosa                      | KCl                           | $-0,09 \pm 0,01$                 |
| Sacarosa                      | NaCl                          | $-0,34 \pm 0,03$                 |
| KCl                           | Sacarosa                      | $-0,46 \pm 0,05$                 |
| KCl                           | KCl                           | $-0,46 \pm 0,11$                 |
| KCl                           | NaCl                          | $-0,78 \pm 0,10$                 |
| NaCl                          | Sacarosa                      | $-0,51 \pm 0,05$                 |
| NaCl                          | KCl                           | $-0,42 \pm 0,16$                 |
| NaCl                          | NaCl                          | $-0,63 \pm 0,12$                 |

**TABLA V: Efecto de la composición iónica en la acidificación de vesículas endocíticas**

La composición iónica interna de las vesículas era (en mM): Hepes/Tris 10, EGTA/Tris 1,  $MgSO_4$  1 y la sal indicada 100 mM, pH 7,0, excepto sacarosa que fue 200 mM. La composición iónica externa en un volumen final de 1,5 ml fue 30-50  $\mu$ g de vesículas y tampón NaCl, KCl o sacarosa. La reacción se inició con la adición de Mg-ATP 1 mM. Se determinó el grado de acidificación en 3 min con una razón de longitudes de onda de excitación de 490/450 y 520 nm de emisión. La temperatura del ensayo fue de 25° C. Los valores mostrados son el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar.

presencia de iones, tanto en el interior como en el exterior de la vesícula, ya que aquellas con  $\text{sacarosa}_i/\text{sacarosa}_e$  no presentaron acidificación. Por otra parte, se requirió de un catión al interior de la vesícula, siendo  $\text{Na}^+$  más efectivo que  $\text{K}^+$ , ya que con  $\text{Na}^+_i/\text{sacarosa}_e$  se obtuvo un 44% de la acidificación máxima, mientras que con  $\text{K}^+_i/\text{sacarosa}_e$  sólo se obtuvo un 12%.

Con respecto a la dependencia de un anión en el medio externo en la acidificación, se vio que era necesario  $\text{Cl}^-_e$  para obtener una acidificación parcial, ya que las vesículas con  $\text{sacarosa}_i$  en medios con  $\text{NaCl}_e$  y  $\text{KCl}_e$  presentaron acidificaciones similares (65 y 59%, respectivamente), lo que estaba corroborando que era el  $\text{Cl}^-_e$  responsable de dicha acidificación ya que no había  $\text{Na}^+$  en el medio intravesicular.

Por último, la predicción de que  $\text{Na}^+_i$  y  $\text{Cl}^-_e$  era la condición más favorable para obtener una máxima acidificación, se vio confirmada con vesículas con  $\text{NaCl}_i/\text{NaCl}_e$ , donde se obtuvo un 81% de la acidificación máxima, y con  $\text{NaCl}_i/\text{KCl}_e$ , con la que se obtuvo el máximo grado de acidificación.

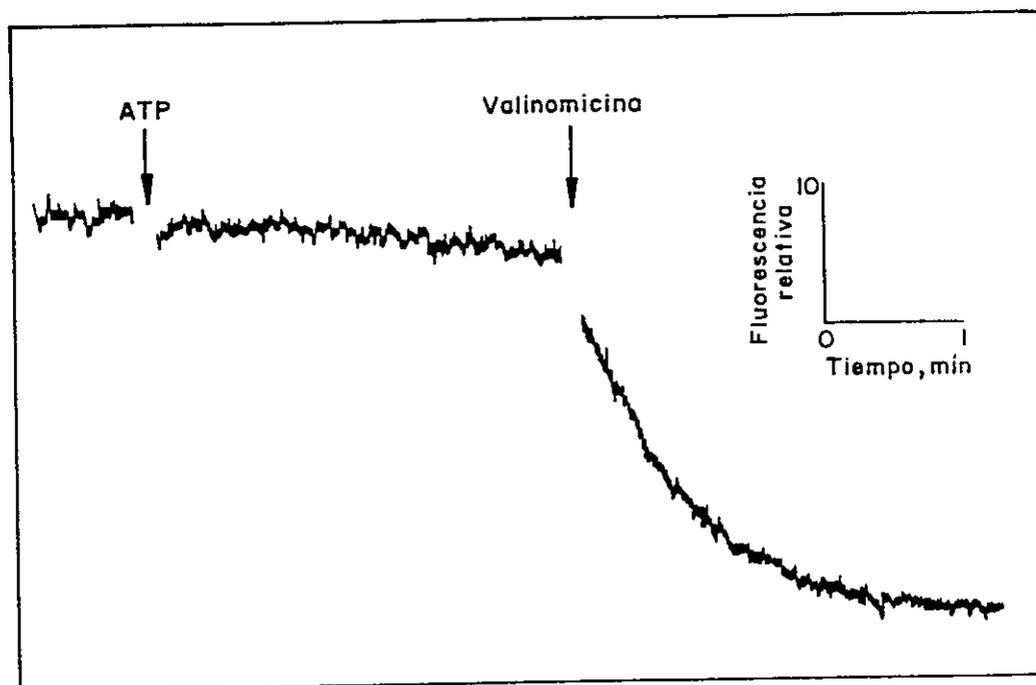
El efecto de  $\text{Na}^+_i$  y  $\text{Cl}^-_e$  en la acidificación fue aditivo:  $\text{Na}^+$  contribuyó con aproximadamente el 40% y  $\text{Cl}^-$  con el 60% de la acidificación total ( $\text{NaCl}_i/\text{sacarosa}_e$  y  $\text{sacarosa}_i/\text{KCl}_e$ , respectivamente).

### 10. Electrogenicidad de la $H^+$ -ATPasa

Como se mencionó anteriormente, la  $H^+$ -ATPasa de cerebro de bovino<sup>30</sup> es electrogénica y los resultados de dependencia iónica de la Tabla V hacen pensar que la de reticulocitos también. Es por esta razón que se investigó el carácter electrogénico de la ATPasa responsable de la acidificación en vesículas de reticulocitos. Para ello, se prepararon vesículas con  $KCl_i$  (ver sección 5 del capítulo de Métodos) y se determinó el grado de acidificación tras la adición de  $Mg$ -ATP en un medio externo con tampón sacarosa. Se escogió esa combinación iónica ya que  $K^+$  no favorecía la acidificación como catión interno y no había un anión en el medio externo que apoyara la acidificación (Tabla V). El registro obtenido se muestra en la Fig. 7. El pH intravesicular inicial fue de 6,96. Después de 3 minutos de la adición de ATP, el pH interno varió a 6,90. Este pequeño cambio correspondió a unos cuantos protones que fueron bombeados al interior de la vesícula luego de la adición de ATP, lo que generó un potencial eléctrico positivo que se opuso a la entrada de más protones. Sin embargo, cuando se agregó valinomicina al medio, el pH intravesicular bajó a 6,20, obteniéndose un  $\Delta pH$  total de 0,76 unidades. En un experimento paralelo se determinó que este  $\Delta pH$  fue similar al grado máximo de acidificación obtenido con  $NaCl_i/KCl_e$  (Tabla V).

### 11. Selectividad a aniones en el proceso de acidificación

Se estudió el efecto de diferentes aniones en el medio externo sobre la acidificación para determinar el grado de selectividad. Para ello, se prepararon vesículas endocíticas con tampón  $K_2SO_4$  en su interior (ver



### FIGURA 7: Electrogenicidad de la $H^+$ -ATPasa

El experimento consistió en determinar el cambio de fluorescencia en vesículas con tampón  $KCl_3$  en un medio con tampón sacarosa. Las condiciones fueron como las descritas en la Fig. 2. La primera flecha indicó la adición de  $Mg$ -ATP 1 mM y luego de tres minutos de reacción, la segunda flecha indicó la adición de valinomicina 2  $\mu M$ .

sección 5 del capítulo de Métodos) y se determinó la velocidad inicial de acidificación y la acidificación máxima después de 3 minutos de haber agregado Mg-ATP. Los medios externos tuvieron las sales de potasio de los aniones que se muestran en la Tabla VI. La razón por la cual se escogió  $K_2SO_4$  en el medio interno fue porque de esta manera la acidificación obtenida puede ser atribuída al anión en el medio externo, ya que ni potasio ni sulfato contribuyen mayormente en dicho proceso.

De los aniones ensayados, cloruro fue el más efectivo, tanto en el grado de acidificación ( $\Delta pH/3$  min) como en la velocidad inicial de acidificación. Le siguieron en efectividad  $Br^- > I^- > PO_4^{3-} > gluconato^- > SO_4^{2-}$ . Los valores de velocidad inicial reflejaron mejor la preferencia por un anión, ya que aniones que promovían condiciones subóptimas de acidificación, con el tiempo tendieron a acercarse a los valores obtenidos con cloruro. La secuencia obtenida con las velocidades iniciales de acidificación fue  $Cl^- : Br^- : I^- : PO_4^{3-} : gluconato^- : SO_4^{2-} = 1,0 : 0,71 : 0,3 : 0,28 : 0,19 : 0,14$ . Resultó interesante que no sólo cloruro satisfizo la acidificación, sino que los otros aniones también pudieron apoyarla. Estos resultados concuerdan con la literatura,<sup>18,31</sup> en el sentido que el transporte de protones es dependiente de la presencia de un anión permeante en el medio externo, siendo efectivos tanto cloruro como bromuro y ioduro, aunque este último en menor cuantía.

TABLA VI

**EFFECTO DE ANIONES EN LA ACIDIFICACION DE  
VESICULAS ENDOCITICAS**

| Anión     | Veloc. inicial de<br>acidificación<br>(UF <sup>#</sup> /min) | ΔpH/3 min |
|-----------|--|-----------|
| Cloruro   | 21   | -0,68     |
| Bromuro   | 15   | -0,58     |
| Ioduro    | 6,3  | -0,50     |
| Fosfato   | 5,8  | -0,33     |
| Gluconato | 4  | -0,30     |
| Sulfato   | 3  | -0,26     |

# Unidades de fluorescencia

**TABLA VI: Efecto de aniones en la acidificación de vesículas endocíticas**

El medio de incubación a pH 7,0, contenía en 1,5 ml finales (en mM): 30-50 μg de vesículas, Hepes/Tris 10, EGTA/Tris 1, MgSO<sub>4</sub> 1 y 100 de la sal potásica del anión especificado, excepto el K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que fue 80. La composición iónica interna de las vesículas fue (en mM): Hepes/Tris 10, EGTA/Tris 1, MgSO<sub>4</sub> 1 y gluconato de potasio 100 (pH 7,0). La reacción se inició con la adición de Mg-ATP 1 mM y se observó el decaimiento de la fluorescencia a una razón de longitudes de onda de excitación 490/450 y 520 nm de emisión. La temperatura del ensayo fue de 25° C. Los resultados corresponden a un experimento representativo.

## 12. Efecto de la composición iónica intra y extravésicular en la actividad $H^+$ -ATPásica

Como hay una dependencia entre la acidificación y la composición iónica, es posible suponer que es debida a una dependencia entre la actividad ATPásica y la composición de los medios intra y extravésiculares. Para establecer este hecho, se determinó la actividad  $H^+$ -ATPásica (en presencia de NEM 1 mM) en función de la composición del medio. Para ver el efecto de  $Na^+$  y  $K^+$ , independiente del efecto de  $Cl^-$ , se hicieron dos preparaciones simultáneas de vesículas, una con tampón  $K_2SO_4$  y otra con tampón  $Na_2SO_4$  en su interior. Las actividades ATPásicas se determinaron en medios que contenían los tampones NaCl, KCl o sacarosa. El estudio se hizo en presencia de estrofantidina 50  $\mu$ M, para inhibir la  $Na^+,K^+$ -ATPasa presente en vesículas endocíticas. Los resultados se muestran en la Tabla VII. Vemos que en ausencia de  $Cl^-$  en el medio externo ( $K^+_i/sacarosa_e$ ) la actividad  $H^+$ -ATPásica representó un 9% del máximo (recordemos que  $K^+$  no contribuye a disipar el gradiente eléctrico). En cambio, la presencia de  $Cl^-$  en el medio externo ( $K_2SO_4_i/NaCl_e$  o  $KCl_e$ ) favoreció la actividad  $H^+$ -ATPásica, obteniéndose entre un 74 y un 93% de la actividad máxima. Por otra parte,  $Na^+$  en el interior como único ion capaz de disipar el gradiente eléctrico ( $Na^+_i/sacarosa_e$ ), contribuyó con un 34% de dicha actividad. La actividad máxima se obtuvo con  $Na^+$  en el interior y  $Cl^-$  en el medio externo ( $Na^+_i/KCl_e$ ). Por lo tanto, en términos generales, la actividad ATPásica tuvo los mismos requerimientos iónicos que el proceso de acidificación.

TABLA VII

EFFECTO DE LA COMPOSICION IONICA EN LA ACTIVIDAD  
DE LA  $H^+$ -ATPasa EN VESICULAS INTACTAS

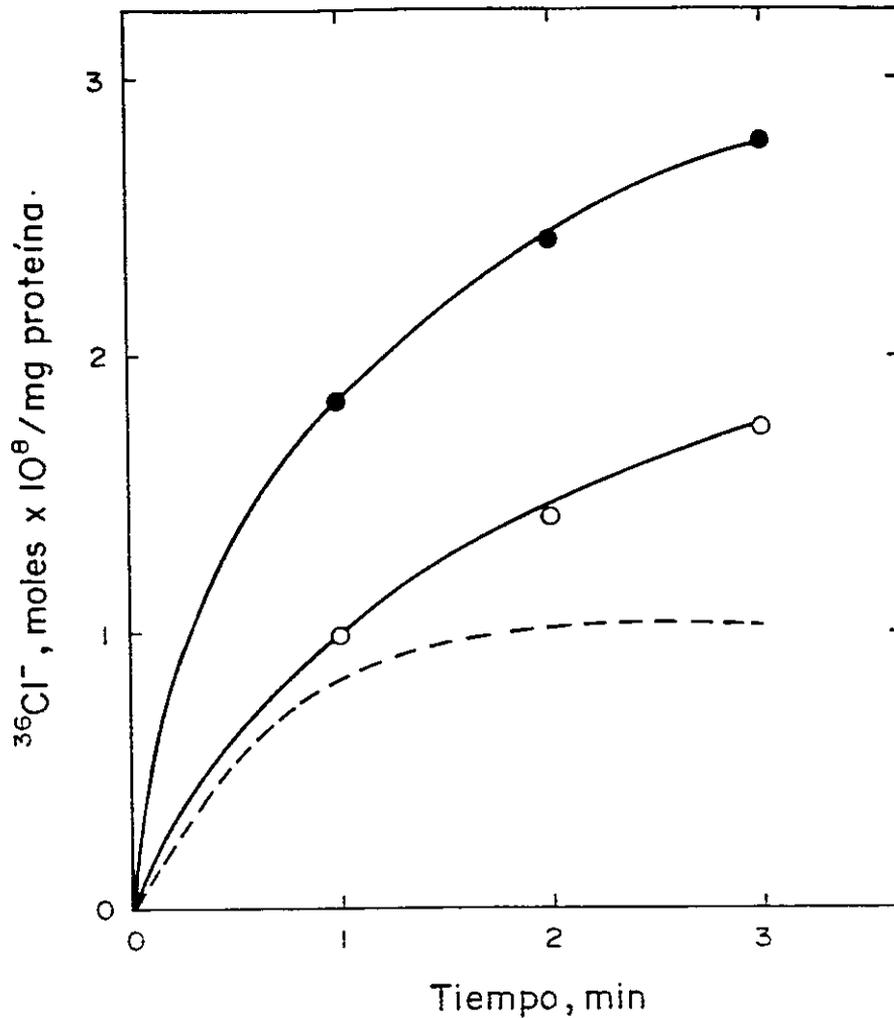
| Composición<br>iónica interna | Composición<br>iónica externa | Actividad $\pm$ d.e.<br>(moles $\times 10^6$ /3 min/mg prot) |
|-------------------------------|-------------------------------|--|
| $K_2SO_4$                     | Sacarosa                      | $0,23 \pm 0,13$  |
| $K_2SO_4$                     | KCl                           | $2,35 \pm 1,46$  |
| $K_2SO_4$                     | NaCl                          | $1,88 \pm 1,16$  |
| $Na_2SO_4$                    | Sacarosa                      | $0,85 \pm 0,01$  |
| $Na_2SO_4$                    | KCl                           | $2,54 \pm 1,57$  |
| $Na_2SO_4$                    | NaCl                          | $2,28 \pm 1,49$  |

**TABLA VII: Efecto de la composición iónica en la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa en vesículas intactas**

El medio de incubación contenía en 1,0 ml final (en mM): Hepes/Tris 10, MgSO<sub>4</sub> 1, EGTA/Tris 1, PEP 1,25, NADH 0,5, 5 µl de PK/LDH (3,5 U PK y 5 U LDH), Mg-ATP 1, estrofantidina 0,05, NaCl o KCl 100 o sacarosa 200 (pH 7,0). El ensayo se realizó a 25° C, en presencia y ausencia de NEM 1 mM. La reacción se inició con la adición de 30-50 µg de vesículas cuya composición iónica interna era (en mM): Hepes/Tris 10 (pH 7,0), MgSO<sub>4</sub> 1, EGTA/Tris 1 y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 80. Se determinó la absorbancia a 340 nm. El valor de la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa se obtuvo de la diferencia entre el valor sin NEM (ATPasa total) y el con el inhibidor. Los resultados corresponden al promedio de 2 experimentos con sus respectivas desviaciones estándar.

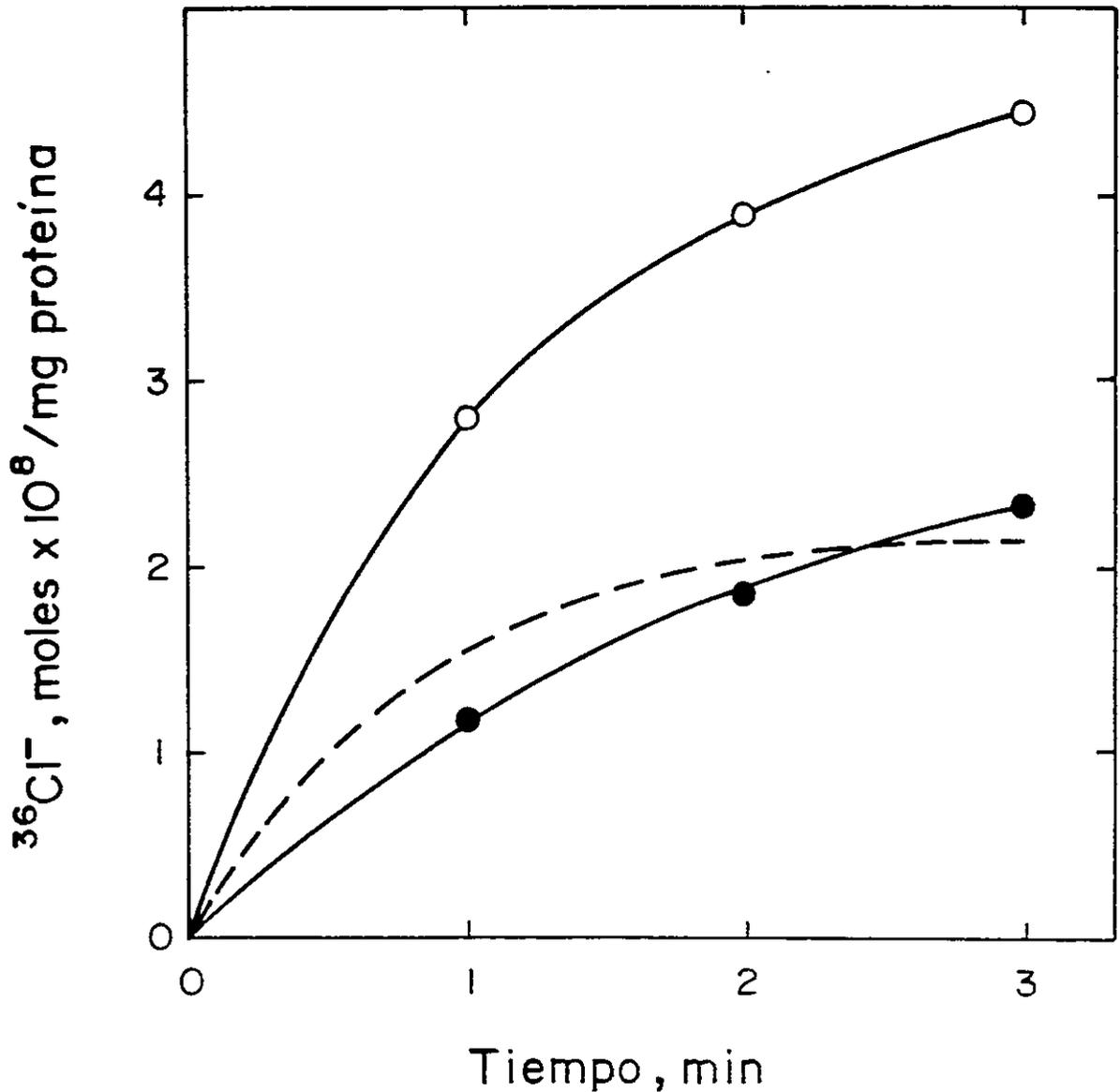
### 13. Cinética de la entrada y salida de cloruro

Los experimentos anteriores permitieron proponer que la entrada de un anión y la salida de un catión serían dos buenas alternativas para disipar el gradiente eléctrico al interior de la vesícula. Hasta ahora ha sido demostrado que se requiere de la presencia de sodio al interior de la vesícula y de cloruro en el medio externo para obtener una máxima acidificación. Fue entonces preciso demostrar que efectivamente existían dichos flujos iónicos y, más aún, que había un balance de cargas entre el flujo de entrada de protones, el flujo de entrada de cloruro y el flujo de salida de sodio. La Fig. 8 muestra la cinética de entrada de  $^{36}\text{Cl}^-$  en presencia y ausencia de ATP. El experimento consistió en incubar vesículas con  $\text{NaCl}$ , 100 mM (ver sección 9 del capítulo de Métodos) en un medio con  $\text{Na}^{36}\text{Cl}$  100 mM en presencia y ausencia de  $\text{Mg-ATP}$  1 mM. La entrada del isótopo en ausencia del nucleótido representa la distribución del isótopo en el equilibrio, ya que se tenía la misma concentración de cloruro dentro de la vesícula que fuera, pero el isótopo estaba sólo en el medio externo. La incorporación de  $^{36}\text{Cl}^-$  en presencia de ATP corresponde a la entrada del anión que contribuyó a disipar el gradiente eléctrico generado por la entrada de protones a través de la  $\text{H}^+\text{-ATPasa}$ . Por lo tanto, la diferencia entre ambas cinéticas representa la incorporación de  $^{36}\text{Cl}^-$  asociado a la acidificación, correspondiendo a un flujo de entrada de  $1,03 \times 10^{-6}$  moles/mg de proteína/3 min. Cuando la incorporación de  $^{36}\text{Cl}^-$  fue calculada a partir de las cinéticas de entrada y de salida de  $^{36}\text{Cl}^-$  a concentraciones equimolares de  $\text{Cl}^-$  en presencia de  $\text{Mg-ATP}$  (Fig. 9), el valor bajo estas condiciones fue comparable al obtenido en la Fig. 8.



### FIGURA 8: Incorporación de $^{36}\text{Cl}^-$

El ensayo consistió en incubar a  $25^\circ\text{C}$  100  $\mu\text{g}$  de vesículas con tampón  $\text{NaCl}_i$ , con 40  $\mu\text{l}$  de solución  $\text{Na}^{36}\text{Cl}$  100 mM y tampón  $\text{NaCl}$  suficiente para completar 200  $\mu\text{l}$ . A los tiempos indicados se sacaron alícuotas y se filtraron a través de filtros Millipore. El experimento se realizó en presencia (círculos cerrados) y en ausencia (círculos abiertos) de  $\text{Mg-ATP/Tris}$  1 mM. La curva discontinua representa la incorporación neta de  $^{36}\text{Cl}^-$  asociada a la acidificación, calculada como la diferencia entre ambas cinéticas de entrada.



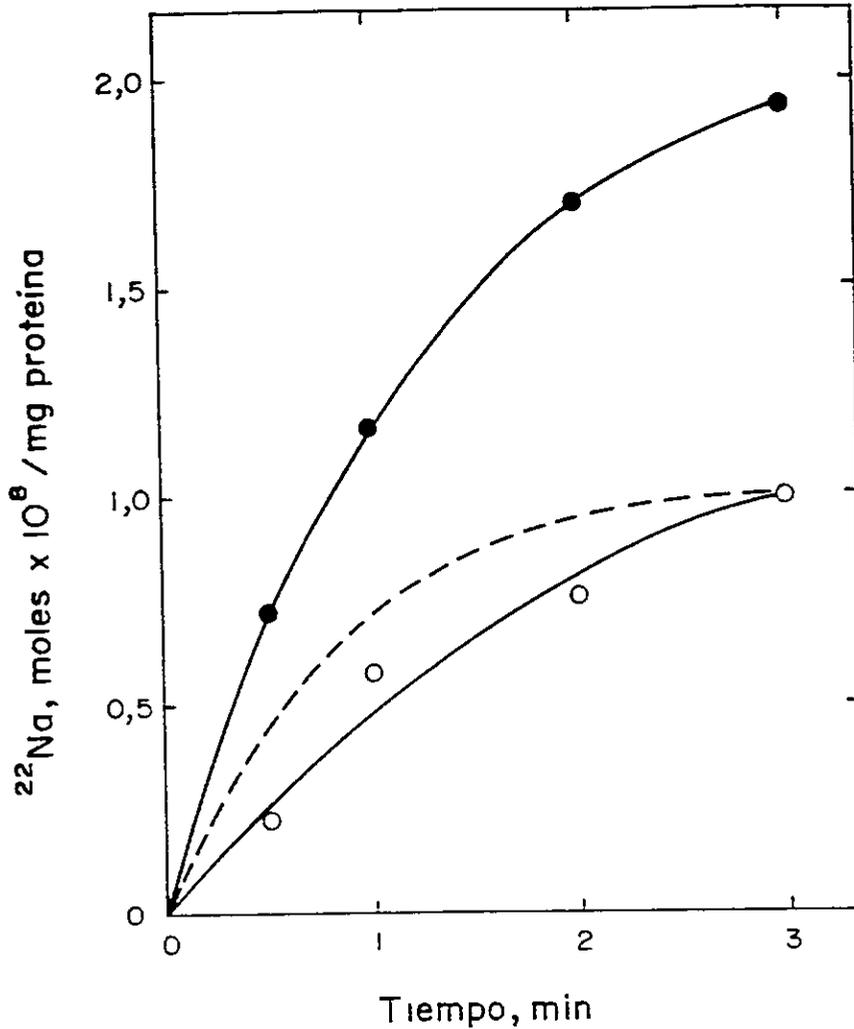
**FIGURA 9: Cinéticas de entrada y salida de  $^{36}\text{Cl}^-$**

Para la entrada de  $^{36}\text{Cl}^-$  en presencia de Mg-ATP 1, mM (círculos abiertos) se procedió igual que en la Fig. 8, pero se usaron 110  $\mu\text{g}$  de vesículas. Para la salida de  $^{36}\text{Cl}^-$  (círculos cerrados) se cargó previamente 100  $\mu\text{g}$  de vesículas con 20  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}^{36}\text{Cl}$  100 mM en tampón NaCl, durante 60 min a 37° C. La cinética de salida se determinó incubando las vesículas cargadas con  $^{36}\text{Cl}^-$ , a 25° C, en presencia de Mg-ATP 1 mM los tiempos indicados. Se filtró y se lavó como se indicó anteriormente. La incorporación neta se calculó como la diferencia entre la entrada y la salida (curva discontinua). La composición iónica interna y externa fue tampón NaCl.

#### 14. Cinética de la entrada y salida de sodio

De los resultados mostrados en la Tabla V se concluyó que se requería de sodio al interior para obtener una máxima acidificación. Es por esta razón que se estudió la cinética de entrada y salida de  $^{22}\text{Na}^+$ . Para determinar el sentido neto del movimiento del ion, se realizaron experimentos en paralelo con vesículas con  $\text{NaCl}_i$ , en que se determinó la incorporación y la salida del isótopo en presencia de Mg-ATP (Fig. 10). La diferencia entre ambas cinéticas resultó en una salida neta del ion, con una magnitud de  $1,0 \times 10^{-6}$  moles/mg de proteína/3 min. Sólo con un gradiente químico favorable para la salida de sodio ( $\text{NaCl}_o$  100 mM/ $\text{NaCl}_i$  20 mM) se observó flujo neto de salida, no produciéndose flujo neto en ausencia de un gradiente químico. La adición de ATP en el medio de incubación incrementó el flujo de entrada de  $\text{Na}^+$  (Fig. 11), corroborando la presencia de una bomba de sodio. Sin embargo, como se dijo anteriormente, en presencia de ATP y un gradiente de salida para  $\text{Na}^+$ , el flujo neto fue de salida.

Con respecto a la entidad responsable del transporte de sodio, no está claro. En los experimentos de la Fig. 12, se muestran los flujos de salida de  $^{22}\text{Na}^+$  de vesículas con  $\text{NaCl}_i$  100 mM y fueron incubadas en tres medios de composición iónica distinta: con  $\text{NaCl}$  100 mM, con  $\text{NaCl}$  80 mM,  $\text{KCl}$  20 mM y con  $\text{KCl}$  100 mM. Obviamente había una permeabilidad para sodio en las vesículas y la velocidad de salida fue menor cuando había  $\text{KCl}$  en el medio que cuando había  $\text{NaCl}$ . Este resultado apunta a un transportador más que a un canal como estructura responsable de los flujos de sodio.<sup>47</sup> Sin embargo, no se logró ver inhibición de los flujos de



**FIGURA 10: Cinéticas de entrada y salida de  $^{22}\text{Na}^+$**

Para determinar la salida de  $^{22}\text{Na}^+$  (círculos cerrados) se incubaron 130  $\mu\text{g}$  de vesículas, con tampón  $\text{NaCl}_i$ , con  $^{22}\text{NaCl}$  100 mM durante 60 min a 37° C. En un volumen final de 1 ml, se incubaron, a 25° C, con tampón  $\text{NaCl-KCl}$ , 13  $\mu\text{l}$  de vesículas cargadas con  $^{22}\text{Na}^+$  y  $\text{Mg-ATP}$  1 mM. Se sacaron alícuotas a los tiempos indicados, se filtraron y lavaron como en la Fig. 8.

Para determinar la entrada de  $^{22}\text{Na}^+$  (círculos abiertos), se incubaron a 25° C, en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ , 80  $\mu\text{g}$  de vesículas con tampón  $\text{NaCl}_i$  con  $^{22}\text{NaCl}$  100 mM,  $\text{Mg-ATP}$  1 mM y tampón  $\text{NaCl-KCl}$ . Se sacaron alícuotas a los tiempos indicados y se filtraron por Millipore. Para determinar la salida neta de sodio, se hizo la diferencia entre ambas cinéticas (curva discontinua).

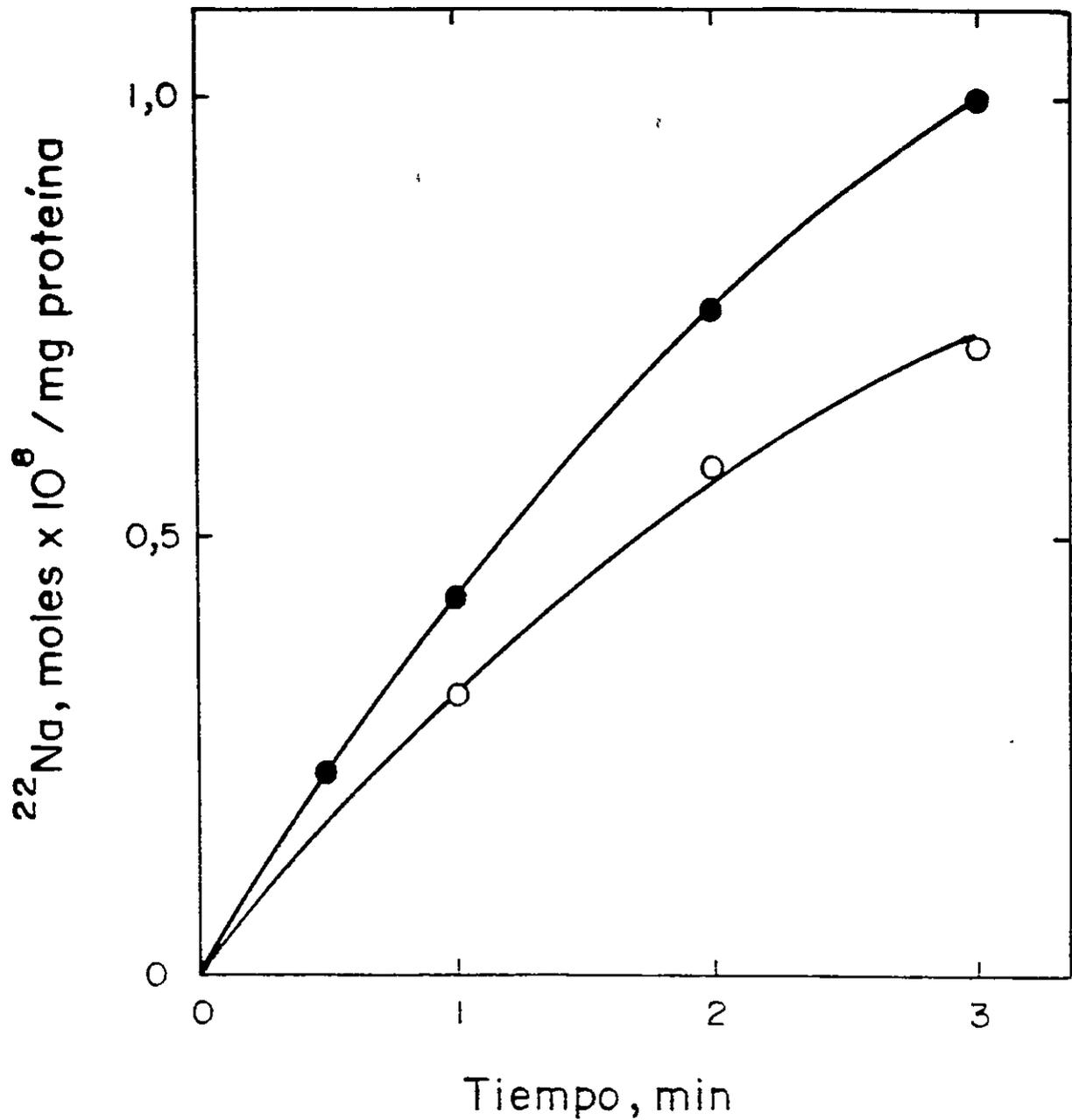
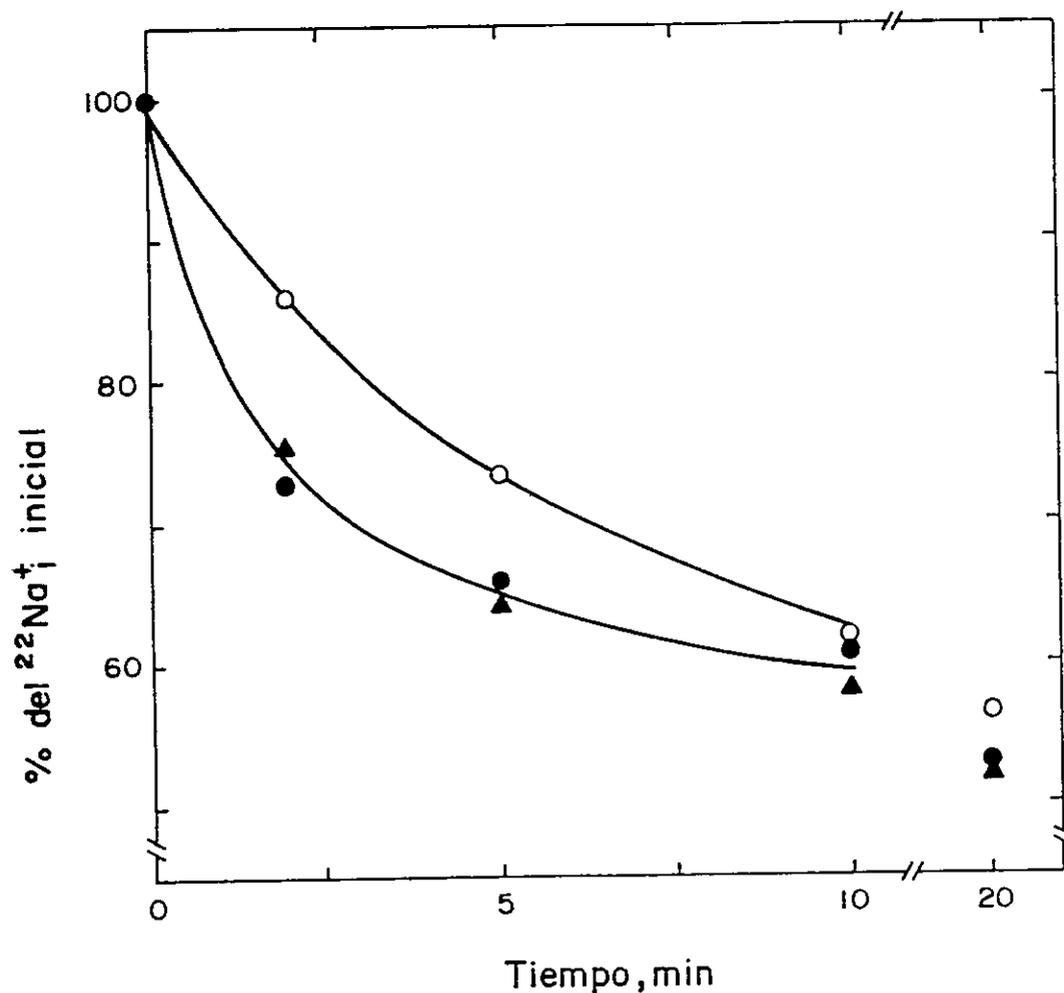


FIGURA 11: Curso temporal de la entrada de  $^{22}\text{Na}^+$  en presencia y ausencia de ATP

Las cinéticas de entrada de  $^{22}\text{Na}^+$  se determinaron en las mismas condiciones que en la Fig. 10. Los círculos abiertos corresponde a la entrada en ausencia y los cerrados en presencia de Mg-ATP 1 mM.



**FIGURA 12: Efecto de la composición iónica externa en la salida de sodio**

Las cinéticas de salida de  $^{22}\text{Na}^+$  se determinaron en las mismas condiciones que en la Fig. 10, pero en ausencia de ATP. La composición iónica de las vesículas fue tampón NaCl ( $^{22}\text{NaCl}$  100 mM) y las del medio externo, fueron: tampón KCl 100 mM (círculos abiertos), tampón NaCl 100 mM (círculos cerrados) y tampón NaCl 80 mM-KCl 20 mM (triángulos).

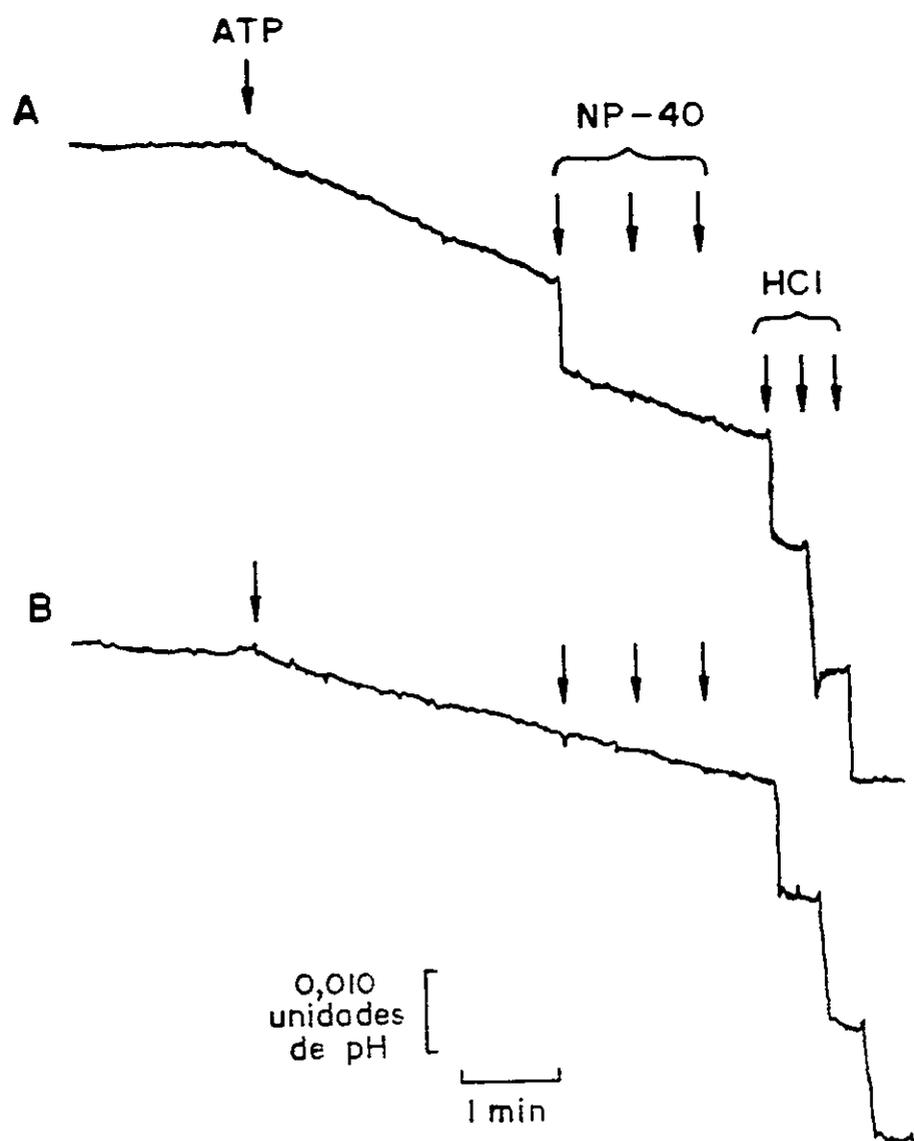
sodio con amilorida 1 mM, que es un inhibidor de intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de variados sistemas<sup>44-46</sup> con  $[\text{K}_i]$  menores que 1 mM.

### 15. Determinación de la razón $\text{H}^+/\text{ATP}$

Se postuló inicialmente la necesidad de un sistema disipador del potencial eléctrico. Como alternativas, estaban un transporte de cloruro y uno de sodio. Habiéndose encontrado estos flujos, fue preciso determinar la relevancia de los flujos de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Na}^+$  como compensadores de la carga eléctrica generada por el bombeo de protones. Para ello, fue necesario determinar la actividad específica del bombeo de protones por las vesículas, tras la adición de Mg-ATP. No fue posible determinar directamente la cantidad de protones bombeados, pues en vez de detectarse una alcalinización del medio extravésicular por la entrada de protones a través de la ATPasa, bajo las condiciones de pH establecidas para los experimentos, es decir, pH 7,0, la hidrólisis de ATP produce protones, lo que lleva a una acidificación del medio de incubación.<sup>48</sup>

La estrategia usada fue determinar la razón entre los protones bombeados y el ATP hidrolizado (razón  $\text{H}^+/\text{ATP}$ ), para lo cual se diseñó el protocolo descrito en la sección 12 del capítulo de Métodos. Con este protocolo se obvia el componente de acidificación producido por la hidrólisis de ATP a pH 7,0 y se considera en su determinación el componente de fuga de protones desde la vesícula. La determinación de la razón  $\text{H}^+/\text{ATP}$ , que es una constante bajo condiciones experimentales fijas,<sup>39</sup> permitió posteriormente determinar el monto de protones bombeados sobre la base de la determinación de la actividad ATPásica sensible a NEM 1 mM.

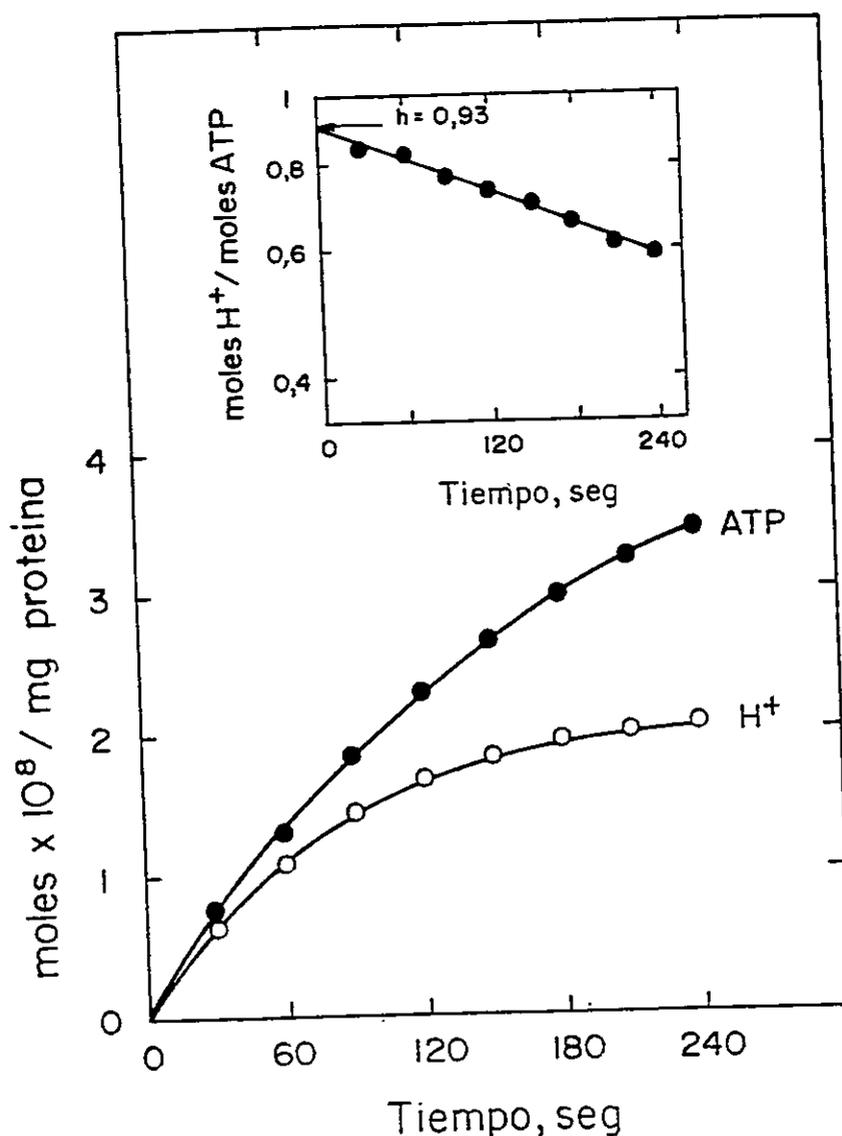
Se incubaron vesículas endocíticas a pH 7,0 en un medio al mismo pH y tras agregar Mg-ATP se midió la acidificación del medio luego de solubilizar las vesículas con el detergente no iónico, NP-40 después de 3 minutos de iniciada la reacción con el nucleótido (Fig. 13). Esta acidificación se interpretó como los protones que habían entrado a través de la  $H^+$ -ATPasa debido a la hidrólisis del ATP y que se liberaron al medio por acción del detergente. Como no era posible determinar la cinética del flujo de protones directamente, pues se requería de una cantidad muy grande de vesículas (al menos 1 mg de proteína por punto), se estableció la cinética de acidificación usando FITC-Tf (Fig. 4) y a partir de ésta y el monto total de protones bombeados, se dedujo la cinética de bombeo por la ATPasa responsable de la acidificación (Fig. 14). Paralelamente se determinó la hidrólisis de ATP sensible a NEM en función del tiempo (Fig. 14). Se construyó un gráfico semilogarítmico de los  $H^+$  bombeados/ATP hidrolizado en función del tiempo de incubación (Fig. 14, inserto). La curva obtenida es una recta cuya intersección con la ordenada corresponde a  $h$ , la estequiometría de la reacción, y la pendiente corresponde a  $k_f$ , la constante de velocidad de fuga de  $H^+$ .<sup>(39)</sup> El promedio de tres experimentos independientes obtenido para  $h$  fue de  $0,93 \pm 0,07$  y para  $k_f$  fue de  $1,43 \pm 0,49 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ . El valor de  $h$  fue utilizado para obtener la cantidad de protones bombeados a partir de los datos de hidrólisis de ATP sensible a NEM.



**FIGURA 13: Determinación de  $H^+$  bombeados por la  $H^+$ -ATPasa**

**A.** Registro del cambio de pH de la incubación de 1 mg de vesículas con tampón MES/ $Na_2$  en 1 ml de tampón MES/Na-K a pH 7,000, con agitación constante. La temperatura fue de 25° C. Se inició la reacción con Mg-ATP 1 mM. La reacción se detuvo a los tres minutos con la adición de NP-40. Dos adiciones posteriores no provocaron cambio en el pH del medio. Las tres últimas flechas corresponden a la adición de  $1 \times 10^{-8}$  moles de  $H^+$  (como HCl) cada una.

**B.** Registro del pH bajo las mismas condiciones que en A, excepto que se realizó en presencia de NEM 2 mM.



**FIGURA 14: Determinación de la razón H<sup>+</sup>/ATP**

La cinética de bombeo de H<sup>+</sup> por la H<sup>+</sup>-ATPasa (círculos abiertos) se determinó a partir de una cinética de acidificación similar a la de la Fig. 4, considerando los resultados obtenidos en la Fig 13. La cinética de hidrólisis de ATP de la H<sup>+</sup>-ATPasa (círculos cerrados) fue obtenida a partir de las actividades ATPásicas sensibles a NEM 2 mM. En el inserto se graficó el logaritmo de las razones de los H<sup>+</sup> bombeados/ATP hidrolizado en función del tiempo. La intersección con la ordenada representa a  $h$  (razón H<sup>+</sup>/ATP) y la pendiente es  $k_f$  (constante de velocidad de fuga de H<sup>+</sup>).<sup>39</sup>

## 16. Balance de cargas

Si bien era cierto que había una entrada neta de  $\text{Cl}^-$  (Fig. 8) y una salida neta de  $\text{Na}^+$  (Fig. 10), fue preciso demostrar que el movimiento de estas cargas estaba compensando la entrada de  $\text{H}^+$  por la bomba. Para ello se determinaron, en la misma preparación, los tres flujos netos. Los resultados se muestran en la Tabla VIII. Vemos que a los 3 minutos de reacción, tiempo en que se ha producido la acidificación a  $25^\circ\text{C}$ , el flujo de  $\text{Cl}^-$  dio cuenta del 45% de las cargas y el de  $\text{Na}^+$ , del 42%. Estos resultados concuerdan bastante bien con los datos obtenidos en la acidificación para  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Tabla V).

## 17. Obtención de vesículas con alto contenido en hierro

Una vez conocidas las condiciones para obtener una máxima acidificación, fue preciso determinar si bajo dichas condiciones, las vesículas presentaban algún grado de movilización de hierro. Para ello se requirió de vesículas con alto contenido en hierro, ya que las vesículas ricas en complejo transferrina-receptor tenían sólo alrededor de un 20% del hierro original presente en transferrina. Por esta razón se ensayaron aminas primarias, como  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y *n*-butilamina, y ionóforos, como monensina y nigericina, para inhibir la disociación del hierro de transferrina al subir el pH del medio intravesicular. Estos reactivos no fueron efectivos en inhibir la disociación de hierro desde transferrina, y se obtuvieron vesículas con valores similares de saturación.

Por esta razón se probó el efecto de FCCP, un ionóforo para protones electrogénico, el cual mueve protones en favor de su gradiente electroquímico. Como la vesícula acidifica su interior a expensas de la

TABLA VIII

## BALANCE DE CARGAS

| Tiempo<br>(seg) | H <sup>+</sup> bombeados<br>(moles x 10 <sup>8</sup> / mg prot) | Entrada neta Cl <sup>-</sup><br>(moles x 10 <sup>8</sup> / mg prot) | Salida neta Na <sup>+</sup><br>(moles x 10 <sup>8</sup> / mg prot) |
|-----------------|---|---|--|
| 30              | 1,05 ± 0,22   | 0,67 ± 0,30   | 0,41 ± 0,08  |
| 60              | 2,09 ± 0,45   | 1,20 ± 0,55   | 0,79 ± 0,21  |
| 90              | 2,56 ± 0,37   | 1,29 ± 0,59   | 1,07 ± 0,31  |
| 120             | 2,84 ± 0,39   | 1,35 ± 0,61   | 1,23 ± 0,42  |
| 150             | 3,05 ± 0,44   | 1,40 ± 0,63   | 1,28 ± 0,55  |
| 180             | 3,15 ± 0,46   | 1,42 ± 0,62   | 1,31 ± 0,59  |

TABLA VIII: Balance de cargas

El flujo neto de entrada de H<sup>+</sup> se calculó a partir de la actividad ATPásica sensible a NEM 1 mM, utilizando una razón H<sup>+</sup> bombeado/ATP hidrolizado (*h*) de 0,93. Los flujos netos de salida de <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> y de entrada de <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> se calcularon de la diferencia entre la entrada y la salida del isótopo en presencia de ATP. La composición iónica interna de las vesículas (en mM) era: Hepes/Tris 10, NaCl 100, MgSO<sub>4</sub> 1, EGTA/Tris 1, NaN<sub>3</sub> 3 (pH 7,0) y la del medio externo era: Hepes/Tris 10, MgSO<sub>4</sub> 1, EGTA/Tris 1, NaN<sub>3</sub> 3, NaCl 20, KCl 80 y Mg-ATP 1 (pH 7,0). Los valores son el promedio de tres experimentos independientes ± desviación estándar.

$H^+$ -ATPasa, el ionóforo los saca, con una velocidad mayor que la ATPasa, impidiendo que el pH baje y, por ende, inhibiendo la disociación de hierro de transferrina. Cuando el FCCP fue eliminado del medio, no se produjo reacidificación. La concentración de FCCP usada en la preparación fue de 30  $\mu$ M, suficiente para producir la inhibición del transporte del hierro.

### 18. Movilización de hierro en presencia de citosol

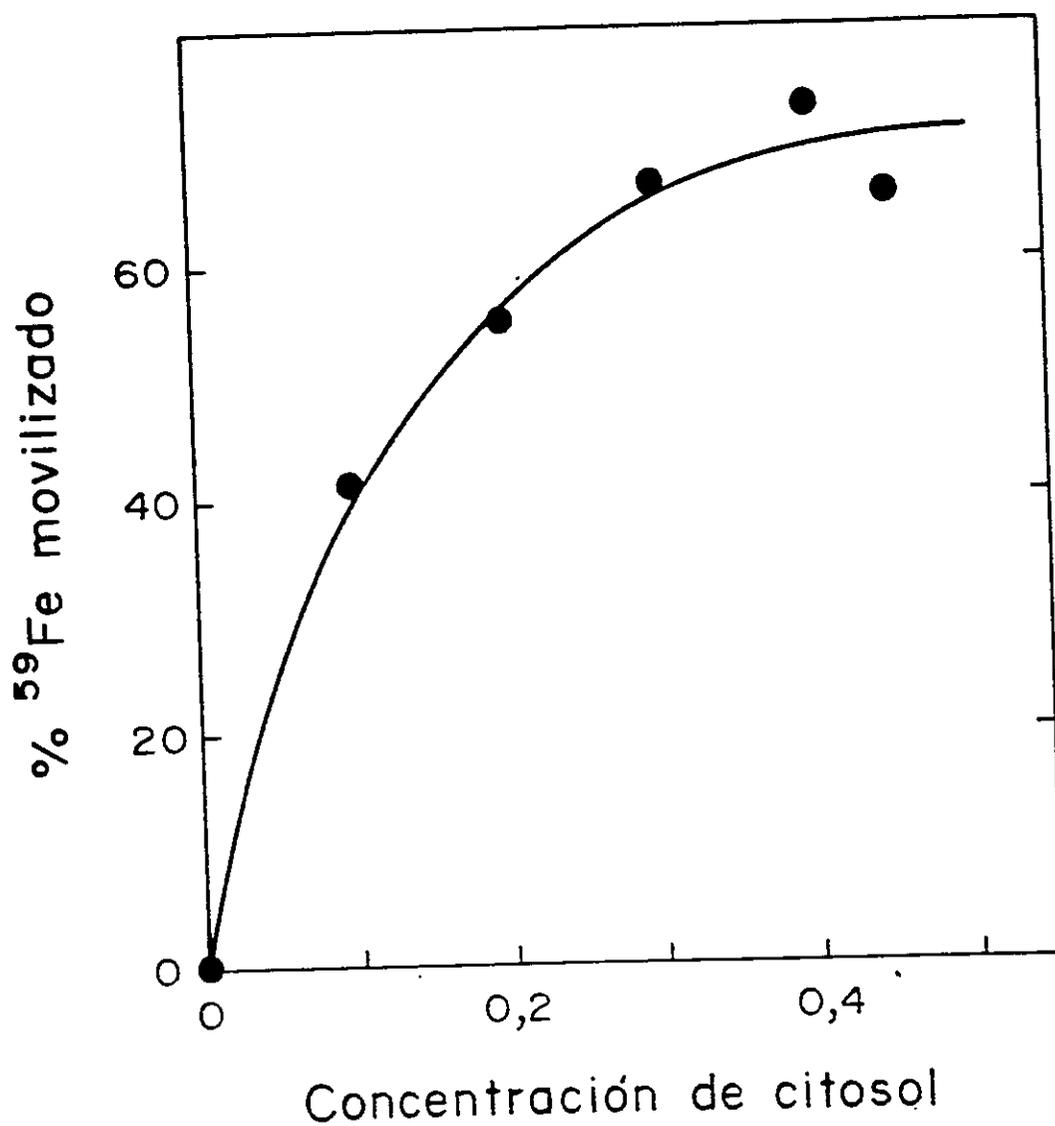
El citoplasma proveniente de células en balance metabólico debía contener los compuestos necesarios para promover la movilización del hierro contenido al interior de las vesículas endocíticas. Por ello, se preparó citosol para establecer el grado de movilización.

#### i) Curva de concentración de citosol

En la Fig. 15 se muestra el porcentaje de  $^{59}Fe$  movilizado desde las vesículas al ser incubadas con distintas concentraciones de citosol por 5 minutos, a 37° C. Las concentraciones ensayadas fluctuaron entre 0,1 y 0,45x, encontrándose que con 0,40x se obtenía el máximo de movilización en las condiciones señaladas. Por otra parte, surgió el problema que con citosoles muy concentrados había dificultad en la filtración, pues la viscosidad del medio de ensayo era muy grande.

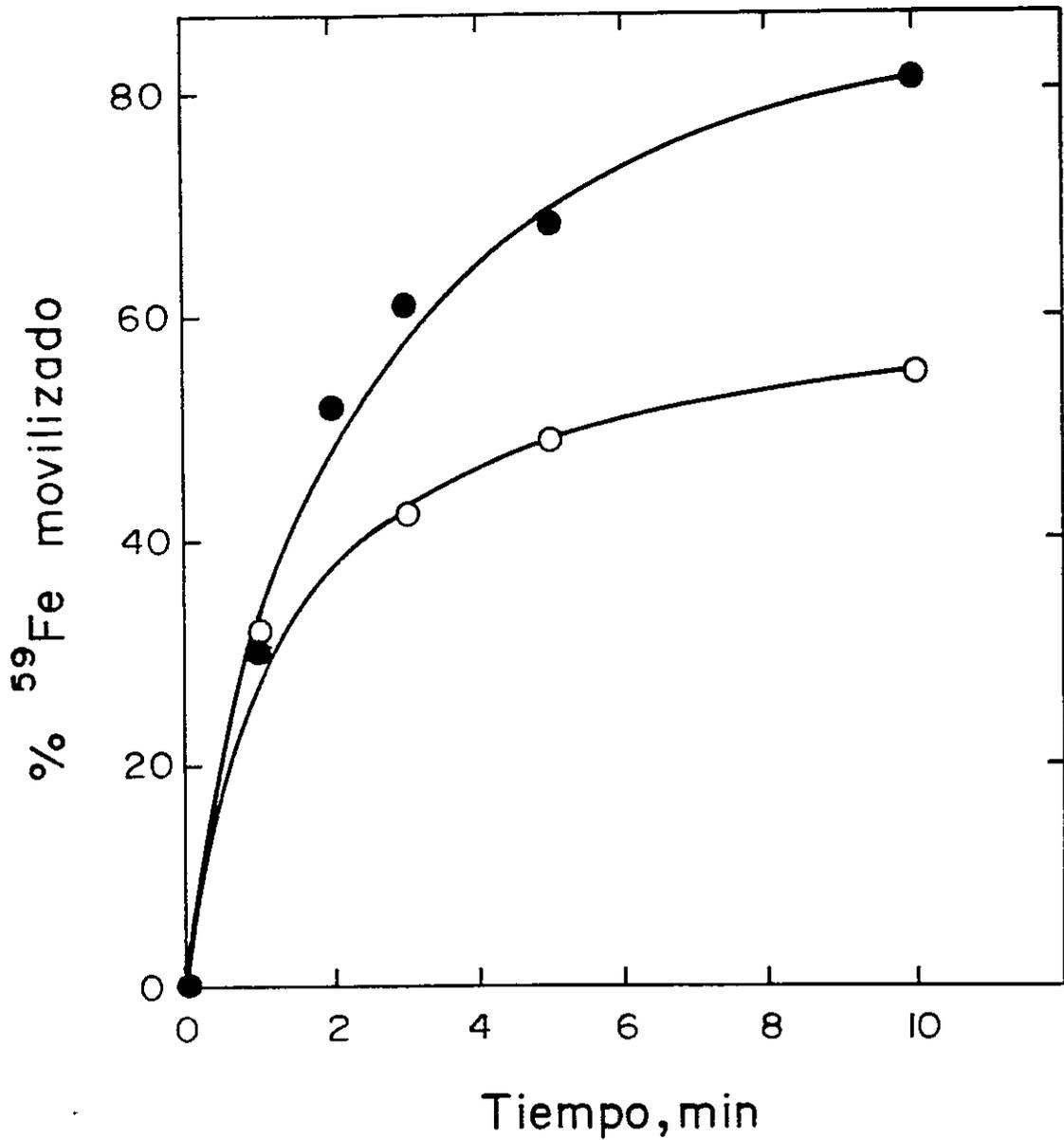
#### ii) Cinética de movilización de hierro

En la Fig. 16 se muestra un experimento representativo de la cinética de salida de hierro con citosol 0,4x. Lo importante de destacar es que a los 5 minutos de incubación, se movilizó alrededor del 70% del hierro presente en las vesículas.



**FIGURA 15: Movilización de hierro en función de la concentración de citosol**

Se incubaron vesículas con diferentes concentraciones de citosol (considerando 1x la concentración del citosol en la célula) en tampón KCl durante 5 min a 37° C. Se filtró por Millipore, los cuales se lavaron y contaron.



**FIGURA 16: Cinética de movilización de hierro**

Se incubaron vesículas con tampón  $\text{NaCl}$ , en tampón  $\text{KCl}$ , en presencia de citosol 0,4x (círculos cerrados) o de ascorbato 2 mM y ATP 2 mM (círculos abiertos) a  $37^\circ\text{C}$ . Se sacaron alícuotas a los tiempos indicados, se filtraron y lavaron como se describió anteriormente.

### iii) Efectores en la movilización

En un intento por establecer los factores estaban actuando en la movilización del hierro, se probaron diversos efectores. Los resultados se muestran en la Tabla IX. ATP incrementó la movilización en un 3% sobre el citosol. Por otra parte, se ensayaron inhibidores de distinto tipo de la acidificación, encontrándose que todos inhibían la movilización de hierro: FCCP, un ionóforo electrogénico; nigericina, un ionóforo no electrogénico, y NEM, un inhibidor de la  $H^+$ -ATPasa. Cuando se probó el efecto de un reductor de  $Fe^{3+}$  como ascorbato, se encontró que estimulaba fuertemente la movilización con respecto a citosol + ATP. NADH, un sustrato de una óxido-reductasa presente en células hepáticas,<sup>49</sup> también estimuló la movilización.

### 19. Movilización de hierro en ausencia de citosol

Si la acidificación estaba interviniendo en la movilización de hierro desde las vesículas y se requería de un poder reductor, debería ser posible reproducir las movilizaciones obtenidas con citosol, pero solamente en presencia de ATP y ascorbato. Estos resultados se muestran en la Fig. 16. La cinética es la misma que en presencia de citosol, la diferencia radica en que el valor máximo es menor.

Paralelamente se hicieron experimentos en los cuales se determinó el porcentaje de disociación y de movilización de hierro en un medio a pH 7,0, en ausencia de citosol. Los resultados se muestran en la Tabla X. Efectivamente, vemos que ATP y ascorbato fueron eficaces en promover la disociación de hierro desde transferrina y la consiguiente movilización. Hay que destacar que ATP promovió la disociación del hierro, pero no su

**TABLA IX**  
**MOVILIZACION DE HIERRO EN PRESENCIA DE**  
**CITOSOL**

| Condición                  | % <sup>59</sup> Fe movilizado |
|----------------------------|-------------------------------|
| Tampón                     | 0                             |
| Citosol                    | 39,8                          |
| Citosol + ATP              | 43,5                          |
| Citosol + ATP + Ascorbato  | 57,2                          |
| Citosol + ATP + NADH       | 58,2                          |
| Citosol + ATP + FCCP       | 2,5                           |
| Citosol + ATP + Nigericina | 0                             |
| Citosol + ATP + NEM        | 0,7                           |

**TABLA IX: Movilización de hierro en presencia de citosol**

Las vesículas, cuya composición iónica interna era (en mM): Hepes/Tris 10, NaCl 100, MgSO<sub>4</sub> 1, EGTA/Tris 1, NaN<sub>3</sub> fueron incubadas a 37° C, en un medio a pH 7,0 que contenía (en mM): Hepes/Tris 10, NaCl 20, KCl 80, EGTA/Tris 1, MgSO<sub>4</sub>, NaN<sub>3</sub> 3. Cuando correspondió, se adicionaron: Mg-ATP/Tris 1 mM, ascorbato 5 mM, NADH 2,5 mM, FCCP 20 µM, nigericina 10 µM, NEM 2mM, citosol 0,3%. Los resultados corresponden a un experimento representativo.

**TABLA X**  
**EFFECTO DE INHIBIDORES EN LA MOVILIZACION**  
**DE HIERRO**

| Condición              | % <sup>59</sup> Fe disociado | % <sup>59</sup> Fe movilizado |
|------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Tampón                 | 2,1 ± 1,3                    | 0,1 ± 0,2                     |
| ATP                    | 53,0 ± 8,1                   | 7,7 ± 4,5                     |
| Ascorbato              | 4,3 ± 5,8                    | 2,2 ± 2,8                     |
| ATP + ascorbato        | 58,1 ± 0,6                   | 51,3 ± 4,3                    |
| ATP + ascorb. + FCCP   | 4,9 ± 1,9                    | 4,0 ± 3,6                     |
| ATP + ascorb. + niger. | 2,4 ± 3,0                    | 3,0 ± 2,8                     |
| ATP + ascorb. + NEM    | 3,1 ± 1,9                    | 1,3 ± 1,1                     |

**TABLA X: Efecto de inhibidores de la acidificación en la movilización de hierro**

Las vesículas fueron incubadas 5 min a 37° C en un medio a pH 7,0, cuya composición era (en mM): Hepes/Tris 10, KCl 100, MgSO<sub>4</sub> 1, EGTA/Tris 1, con las siguientes adiciones cuando correspondió: Mg-ATP 1 mM, ascorbato 1 mM, FCCP 20 µM, nigericina 20 µM, NEM 1 mM. La composición iónica interna de las vesículas era (en mM): Hepes/Tris 10, NaCl 100, MgSO<sub>4</sub> 1, EGTA/Tris 1, pH 7,0. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos ± la desviación estándar

movilización. Ascorbato, en cambio, por sí solo, fue incapaz de disociar y de movilizar el hierro.

Se ha postulado que la acidificación es una etapa necesaria en el transporte de hierro al citoplasma de la célula,<sup>11,16</sup> razón por la cual se probó el efecto de diferentes inhibidores de la acidificación (Tabla X). FCCP, NEM y nigericina inhibieron la salida del hierro debido a su inhibición del proceso de acidificación.

## **20. Efecto de la composición iónica intra y extravésicular en la movilización de hierro**

Por último, se pretendió establecer una relación entre la movilización y la composición del medio. Para ello se prepararon vesículas con NaCl<sub>i</sub>, con KCl<sub>i</sub> y con sacarosa<sub>i</sub> y se determinó el porcentaje del hierro movilizado en tres medios de diferente composición iónica: tampones NaCl, KCl y sacarosa, en presencia de ascorbato 0,5 mM y de Mg-ATP 1 mM (Tabla XI). Todas las condiciones mostradas fueron equivalentes (alrededor de un 35% de movilización), excepto aquellas en las que había sacarosa en el medio externo (NaCl<sub>i</sub>/sacarosa<sub>e</sub>; KCl<sub>i</sub>/sacarosa<sub>e</sub> y sacarosa<sub>i</sub>/sacarosa<sub>e</sub>). En estos casos se movilizó alrededor de un 13% del hierro.

TABLA XI

## EFECTO DE LA COMPOSICION IONICA EN LA MOVILIZACION

| Composición<br>iónica interna | Composición<br>iónica externa | % Movilización<br>± d.e. |
|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| NaCl                          | Sacarosa                      | 13,1 ± 4,0               |
| NaCl                          | KCl                           | 32,8 ± 6,3               |
| NaCl                          | NaCl                          | 31,7 ± 7,7               |
| KCl                           | Sacarosa                      | 14,4 ± 3,8               |
| KCl                           | KCl                           | 37,9 ± 4,5               |
| KCl                           | NaCl                          | 34,7 ± 6,0               |
| Sacarosa                      | Sacarosa                      | 13,8 ± 4,3               |
| Sacarosa                      | KCl                           | 35,2 ± 6,2               |
| Sacarosa                      | NaCl                          | 31,1 ± 8,7               |

TABLA XI: Efecto de la composición iónica en la movilización

La composición iónica interna de las vesículas era (en mM): Hepes/Tris 10,  $MgSO_4$  1, EGTA/Tris 1 y NaCl o KCl 100 o sacarosa 200, pH 7,0. El medio de incubación a pH 7,0 contenía en un volumen final de 300  $\mu$ l (en mM): Hepes/Tris 10,  $MgSO_4$  1, EGTA/Tris 1 y NaCl o KCl 100 o sacarosa 200, ascorbato 1 y Mg-ATP/Tris 1. Las vesículas fueron incubadas a 37° C por 3 min y filtradas por Millipore. Los resultados están expresados como % de movilización con respecto al hierro originalmente presente en las vesículas. Los valores son el promedio de 6 determinaciones independientes ± la desviación estándar.

## V. DISCUSION

Para determinar los factores iónicos involucrados en la acidificación de las vesículas endocíticas, fue indispensable contar con un método para obtener vesículas aisladas, libres de contaminaciones de membrana plasmática, mitocondrias o lisosomas, que pudieran llevar a conclusiones erróneas. Por otra parte, se requirió que el tiempo empleado en obtener las vesículas fuese lo más corto posible, ya que debido a la naturaleza transitoria de las vesículas endocíticas, las estructuras proteicas involucradas en el proceso sufren pérdida de sus respectivas actividades.

La ausencia de contaminación con membrana plasmática se determinó con la electroforesis (Fig. 1). La preparación de vesículas carece de las bandas típicas de la membrana y, en cambio, muestra un alto enriquecimiento de las bandas de Tf y R-Tf. Este hecho indica que el procedimiento seguido permitió eliminar proteínas solubles y vesículas formadas a partir de membrana plasmática durante el proceso de lisis.

Por otra parte, el hecho que estrofantidina, un típico inhibidor de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa de membrana plasmática,<sup>50</sup> inhibiera la actividad ATPásica total de vesículas solubilizadas (Tabla II), refleja la presencia de dicha proteína en las vesículas que, por lo demás, ha sido descrita en vesículas endocíticas de células de ovario de hamster.<sup>51</sup> La explicación de por qué

estrofantidina produjo una menor inhibición de la actividad ATPásica de vesículas intactas (Tabla II) que en vesículas solubilizadas (Tabla I), es que el sitio de inhibición está situado en el lado intravesicular y estrofantidina debe pasar al interior de la vesícula para inhibir. Este inhibidor es un compuesto hidrosoluble, aunque menos que ouabaína,<sup>50</sup> y por lo tanto puede que el tiempo de preincubación con estrofantidina haya sido insuficiente, obteniéndose una inhibición menor.

Una posible contaminación con lisosoma fue descartado de la preparación, porque en presencia de GTP no se produjo inhibición (Tabla III). Es sabido que la  $H^+$ -ATPasa lisosomal es la misma que la que se encuentra en vesículas endocíticas, pero en el lisosoma está presente la nucleósido 5'-difosfoquinasa, que convierte el ADP en ATP en presencia de GTP.<sup>31</sup>

De la inhibición de la actividad ATPásica total, tanto en vesículas solubilizadas como intactas (Tablas I y II) con oligomicina, un inhibidor descrito para ATPasa  $F_1F_0$  mitocondrial, puede deducirse que podría haber un porcentaje de dicha enzima en la preparación, pero ésta no participa en la acidificación, ya que oligomicina no inhibió dicho proceso (Tabla IV).

Las características de la  $H^+$ -ATPasa de reticulocitos coinciden bastante bien con la descrita en otros sistemas celulares en varios aspectos. Los pesos moleculares de las distintas subunidades que conforman la  $H^+$ -ATPasa de vesículas endocíticas de cerebro de bovino son 100.000, 73.000, 58.000, 40.000, 38.000, 34.000, 33.000, 19.000 y 17.000.<sup>(40)</sup> En la electroforesis de la Fig. 1 (carril 4) se observan varias bandas con pesos moleculares de 100.000, 70.000, 43.000, 34.000 y

33.000 que podrían corresponder a las de las subunidades de la  $H^+$ -ATPasa. La zona de pesos moleculares inferiores a 20.000 no fue resuelta por el gel usado. Naturalmente que para establecer si efectivamente se trata de dichos polipéptidos, habría que purificar la  $H^+$ -ATPasa de reticulocitos y hacer los estudios inmunológicos apropiados.

La caracterización de la  $H^+$ -ATPasa en término de inhibidores de otras ATPasas permitió establecer que la  $H^+$ -ATPasa de reticulocitos corresponde a la misma  $H^+$ -ATPasa de otros sistemas. NEM, NBD-Cl y DCCD son compuestos que la inhiben. Mientras los dos primeros modifican grupos SH del sitio catalítico<sup>27</sup>, lo que se refleja en las inhibiciones comparables tanto en vesículas solubilizadas como intactas (Tablas I y II), DCCD bloquea el canal que conduce protones en vesículas de cerebro de bovino,<sup>29</sup> razón por la cual, sólo se observó inhibición de la actividad ATPásica en vesículas intactas (Tabla II), y en forma más acentuada, en la acidificación (Tabla IV). Además estos resultados demuestran que hay un alto grado de acoplamiento entre la actividad hidrolítica del ATP por la subunidad catalítica y la conducción de protones por la subunidad que constituye el canal. El tipo de inhibición de NBD-Cl y NEM hace que no constituyan inhibidores específicos de la  $H^+$ -ATPasa, encontrándose que también inhiben a la  $Na^+,K^+$ -ATPasa.<sup>50</sup>

Vanadato, un inhibidor de las enzimas que forman un intermediario fosforilado estable,<sup>27</sup> no inhibió la actividad hidrolítica de la  $H^+$ -ATPasa (dato no mostrado) ni tampoco la acidificación (Tabla IV), lo que concuerda con las  $H^+$ -ATPasas de otros sistemas.<sup>14,17-19,21-26</sup>

DIDS es un compuesto que modifica los grupos amino y guanidino de diversas proteínas,<sup>31</sup> razón por la cual no es específico. Sin embargo se le

conoce como inhibidor de las conductancias de cloruro,<sup>41</sup> aunque también se ha encontrado que inhibe la  $H^+$ -ATPasa de vesículas de cerebro de bovino, alterando los grupos SH, de un modo similar a NEM o NBD-Cl.<sup>31</sup> Este efecto se reflejó en la inhibición de las actividades ATPásicas (Tablas I y II) y en el proceso de acidificación (Tabla IV).

Los resultados de la inhibición de los flujos de cloruro por DIDS no fueron fáciles de analizar (dato no mostrado). Se encontró que había dos componentes con diferentes sensibilidades al inhibidor: un primer componente, con una alta sensibilidad ( $\sim 1 \mu M$ ), que da cuenta de alrededor del 70% del flujo de cloruro, y un segundo componente con una baja sensibilidad ( $> 100 \mu M$ ).

Como la  $H^+$ -ATPasa de reticulocito es electrogénica al igual que la de cerebro de bovino,<sup>28</sup> es necesario que haya un cotransporte aniónico, también electrogénico para que se verifique el bombeo de protones. Por otra parte, el cloruro compensa un 47% de la carga que entra a través de la ATPasa. Por lo tanto, un canal sería la estructura indicada para disipar este gradiente. Sin embargo, la  $K_i$  del canal de cloruro de glóbulo rojo, para DIDS es de  $10 \mu M$ ,<sup>41</sup> y con concentraciones alrededor de  $1 \mu M$  se obtuvo gran parte de la inhibición del componente sensible.

Por otra parte, el intercambiador  $Cl^-/HCO_3^-$  tiene una  $K_i$  para DIDS de  $0,1 \mu M$ ,<sup>41</sup> pero es electroneutro. Sin embargo, en eritrocitos se han descrito flujos netos unidireccionales a través del intercambiador.<sup>52</sup> Se han propuesto dos modelos que explican, en parte, estos flujos: uno de "slippage", que consiste en el retorno del transportador vacío, y el de "tunneling", en el cual el cloruro se mueve a través del transportador sin

cambios configuracionales.<sup>53</sup> Cualquiera sea el modelo que mejor explique el fenómeno, lo concreto es que el intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  es capaz de transportar cloruro electrogénicamente, aunque a una velocidad 10.000 veces menor que la velocidad de intercambio.<sup>54</sup>

Por último, el transportador de cloruro de vesículas de cerebro de bovino recubiertas por clatrina has sido aislado y reconstituido.<sup>55</sup> Este transportador es una entidad diferente de la  $\text{H}^+$ -ATPasa, y moviliza cloruro electrogénicamente, disipando, en parte, el potencial eléctrico debido a los  $\text{H}^+$ . Es sensible a DIDS y muestra una marcada preferencia por  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Br}^-$  con respecto a  $\text{F}^-$ ,  $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y gluconato, resultado que es similar al obtenido en la acidificación de vesículas de reticulocitos (Tabla VI). En todo caso, con los antecedentes presentados no es posible establecer el tipo de estructura que realiza el transporte de cloruro.

La hipótesis alternativa que planteaba que la acidificación en vesículas endocíticas podría llevarse a cabo debido a la actividad de una ATPasa que generara un gradiente electroquímico para un catión como  $\text{Na}^+$  (por ejemplo la  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPasa) y que este gradiente fuera utilizado para la entrada de protones a través de un intercambiador, como el  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , fue descartada. Si así fuera, bastaría con tener un gradiente de salida de sodio para tener acidificación. Sin embargo, en ausencia de ATP y con un gradiente favorable para la salida del catión, no se produjo acidificación (dato no mostrado). Por otra parte, la inhibición de la acidificación con estrofantidina y amilorida (Tabla IV), inhibidores de la  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPasa y del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ <sup>(44,50)</sup> respectivamente, fue leve. Por lo tanto, es posible suponer que la  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPasa está más bien participando en una

función regulatoria.

La contribución de sodio en la disipación del potencial eléctrico fue de un 42% (Tabla VIII), lo que hace suponer que un posible rol de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa es mantener la concentración necesaria de sodio al interior de la vesícula, para permitir un grado máximo de acidificación. Debido a que la vesícula endocítica se forme por una invaginación de la membrana plasmática, la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa queda en una disposición tal que bombea iones sodio hacia el interior de la vesícula y iones potasio hacia el citoplasma. Esta proteína sería la responsable del flujo de entrada de sodio dependiente de ATP (Fig. 11). En cambio, el rol atribuido a la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa en vesículas endocíticas de células de ovario de hamster fue de regular el pH final alcanzado. Los autores postulan que como la ATPasa es electrogénica, genera un potencial eléctrico positivo al interior de la vesícula, lo que limita la acidificación debida a la  $\text{H}^+$ -ATPasa. Por esta razón, encuentran que en presencia de ouabaína se alcanzan pHs intravesiculares mayores.<sup>57</sup> Sin embargo, en vesículas de reticulocitos, la acidificación no se vio estimulada por estrofantidina (Tabla IV) ni por ouabaína (dato no mostrado).

El otro sistema de transporte de sodio que se encontró, fue de mayor magnitud que el anterior y produjo un flujo neto de salida en favor de un gradiente de concentración (Fig. 10). No hay evidencia de que en la célula las vesículas tengan una concentración de sodio mayor que la del citoplasma. Sin embargo, es posible imaginar que durante el proceso de formación de la vesícula, algo del líquido extracelular es atrapado, cuya concentración de sodio es mayor que la del citoplasma, generándose un gradiente químico para la salida del catión. Por lo tanto, es posible que

*in situ*, la vesícula presente las condiciones descritas, es decir un gradiente de concentración favorable para la salida neta de sodio y la presencia de ATP en el citoplasma. Hay que considerar que estos resultados están oscurecidos por la presencia de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa en las vesículas, por lo que debieran realizarse con estrofantidina en el medio para ver la real magnitud de los flujos.

No es claro la identidad responsable del flujo de salida de sodio. TTX, un inhibidor de canales de sodio sensibles a voltaje,<sup>42</sup> no afectó la acidificación (dato no mostrado). Por otra parte, se observó un mayor flujo de salida en vesículas con NaCl 100 mM en su medio interno y NaCl 20 mM en el medio externo que cuando el medio externo tenía KCl 100 mM (Fig 8). Este comportamiento es típico de un sistema de transporte y no de un canal.<sup>47</sup> Para que el sodio contribuya a disipar el potencial eléctrico es preciso que se mueva electrogénicamente, lo que descarta al intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que es electroneutro.<sup>56</sup> Además es sensible a amilorida<sup>44</sup> y los flujos de sodio no se vieron afectados por dicho inhibidor (dato no mostrado). Podría tratarse de una estructura como la que hay en las membranas de túbulo T,<sup>58</sup> el transportador  $3 \text{Na}^+ / 1 \text{Ca}^{2+}$ , que además es sensible a amilorida, a concentraciones alrededor de 10 mM y es electrogénico. Sin embargo, con los antecedentes mostrados, no es posible establecer la estructura involucrada en el flujo de salida de sodio.

Resulta interesante el hecho que se necesite que estén operando dos mecanismos para compensar la entrada de protones a través de la  $\text{H}^+$ -ATPasa en vesículas endocíticas. En el primer minuto entró el 85% del cloruro total y el 15% restante, entre el segundo y tercer minuto de la

acidificación. De esta manera, bajo las condiciones del ensayo, el cloruro resultó ser el responsable mayoritario de disipar el gradiente eléctrico en la fase rápida de la acidificación (primer minuto). Con respecto al sodio, la velocidad con la que salió es menor que la de entrada de protones. En contraste con el flujo de  $\text{Cl}^-$ , el 94% del sodio total que entró, lo hizo en los dos primeros minutos (60% en el primero y 34% en el segundo). Por lo tanto, el flujo de sodio fue responsable de la disipación del gradiente eléctrico en etapas posteriores de la acidificación. O sea, en el tercer minuto de la acidificación la compensación de la carga fue mínima, debido a que la actividad de la  $\text{H}^+$ -ATPasa también se redujo al mínimo (Fig. 14).

Bajo las condiciones iónicas óptimas señaladas en la Tabla V, se obtuvieron acidificaciones de 0,7-0,8 unidades de pH, valor similar al obtenido en vesículas aisladas de cerebro de bovino.<sup>14</sup> De esta observación y del análisis de los flujos iónicos involucrados en la disipación del gradiente eléctrico, surge la pregunta acerca de cuál es el mecanismo responsable de detener el bombeo de protones. Se trata del potencial eléctrico o del potencial químico generados por el gradiente de protones?

Un análisis del experimento de la Fig. 6 arrojó claras indicaciones acerca de los mecanismos que regulan el pH final que alcanzaron las vesículas. En vesículas con  $\text{KCl}$  y sacarosa, la acidificación fue mínima. Bajo estas condiciones iónicas los sistemas de disipación de gradiente eléctrico (entrada de cloruro y salida de sodio) son inoperantes, por lo que no puede haber disipación del potencial eléctrico positivo generado por la entrada de algunos protones. De lo anterior se deduce que un sistema disipador del gradiente eléctrico generado por la entrada de protones es indispensable para obtener grados significativos de acidificación. Sin

embargo, pareciera ser que el punto final de la acidificación está gobernado por el potencial químico de protones ( $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ ), ya que al agregar valinomicina, se genera una conductancia para  $\text{K}^+$ , lo que a su vez, produce un potencial eléctrico negativo al interior de la vesícula, el cual se mantiene fijo (clampeado) por la presencia de valinomicina y de  $\text{K}^+$ . La formación de un potencial de membrana negativo induce una acidificación comparable a la obtenida con  $\text{NaCl}_i/\text{KCl}_e$ . No obstante, no se obtienen valores mayores de acidificación, aunque el potencial eléctrico negativo persista. Por lo tanto, el factor que regula el punto final de la acidificación en las vesículas endocíticas es el pH interno. Aunque el potencial eléctrico está siendo disipado, el potencial químico para protones ha crecido lo suficiente como para hacer que la velocidad de fuga se iguale en magnitud con la velocidad de bombeo, que es en sentido contrario, de manera tal que lo que se observa es que la acidificación se ha detenido.

Otra alternativa podría ser que los  $\text{H}^+$  estuvieran afectando directamente la subunidad catalítica de la  $\text{H}^+$ -ATPasa, o bien sobre el canal que conduce los protones. Estudios de la cinética de la actividad ATPásica sensible a NEM 1 mM mostraron un curso temporal similar al de la acidificación (Fig. 13), por lo que, en esta ATPasa, la actividad hidrolítica de ATP está acoplada al bombeo de protones, de modo que cualquiera de las dos estructuras que esté inhibida, redundará en una detención de la acidificación.

El efecto de la alta concentración de  $\text{H}^+$  no puede ser sobre las estructuras involucradas en la disipación del potencial eléctrico, ya que en las condiciones señaladas en el experimento de la Fig. 6, no estaban

operando.

Tanto la actividad  $H^+$ -ATPásica (Tabla VII) como la acidificación (Tabla V) dependen de la misma manera de la composición iónica, lo que corrobora el hecho que hay un buen acoplamiento entre la hidrólisis del ATP y el bombeo de protones. En ambos casos se obtiene una actividad máxima en la condición  $Na^+_i/KCl_e$  y la condición menos favorable es  $K^+_i/sacarosa_e$ . Sin embargo, una diferencia notable constituye el caso  $K^+_i/KCl_e$ . En la actividad ATPásica se obtiene un valor casi máximo (93%), mientras que en estas mismas condiciones, la acidificación es de un 59%. Es posible que esta discrepancia sea debida a una actividad ATPásica dependiente de potasio en el medio externo, que no participa en la acidificación y que es inhibida por NEM a concentraciones mayores que la  $H^+$ -ATPasa. También podría tratarse de una actividad fosfatásica dependiente de  $K^+$ .<sup>50</sup> Sin embargo, este exceso de actividad no pudo deberse a la  $Na^+,K^+$ -ATPasa, ya que había estrofantidina en el medio de incubación. No se hicieron mayores estudios para caracterizarla, ya que dicha actividad no estaba involucrada en el proceso de acidificación.

Si bien es cierto que  $Na^+_i$  y  $Cl^-_e$  fueron requeridos para contribuir a disipar el gradiente eléctrico debido a la entrada de  $H^+$  a través de la ATPasa y obtener una acidificación máxima (Tablas VII y V), la salida del hierro hacia el medio extravascular sólo dependió de  $Cl^-_e$  (Tabla XI). Es posible que el pH necesario para disociar el hierro de transferrina, sea crítico. Como la acidificación obtenida en presencia de sodio como único

contraion es de un 40% del máximo, lo que equivale a un  $\Delta\text{pH}$  de 0,3 unidades, sea insuficiente contra el 60% de la acidificación máxima debida a cloruro, es decir, un  $\Delta\text{pH}$  de 0,42-0,45 unidades (Tabla V). Por lo tanto, de todo lo anterior es posible concluir que acidificaciones de 0,5 unidades de pH redundarán en una disociación de uno de los hierros, mientras que se requieren de más de 0,8 unidades para lograr la disociación del segundo hierro.

El hecho que se obtuviera movilización en presencia de ATP y ascorbato, en ausencia de citosol (Tabla X), indica que el primero es utilizado por la  $\text{H}^+$ -ATPasa para acidificar el interior de la vesícula, disociando el hierro de transferrina, y el segundo reduce el hierro para que pueda ser transportado hacia el lado citoplasmático. Estos resultados confirman las observaciones hechas por Núñez *et al.*<sup>10</sup> quienes demostraron en reticulocitos intactos, que el hierro debía ser reducido de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  antes de aparecer en el citoplasma de la célula. El uso de inhibidores de la acidificación en la movilización (Tabla X), permitió establecer que la disminución del pH es un proceso indispensable para la disociación del hierro de transferrina, previo a su transporte al citoplasma de la célula.

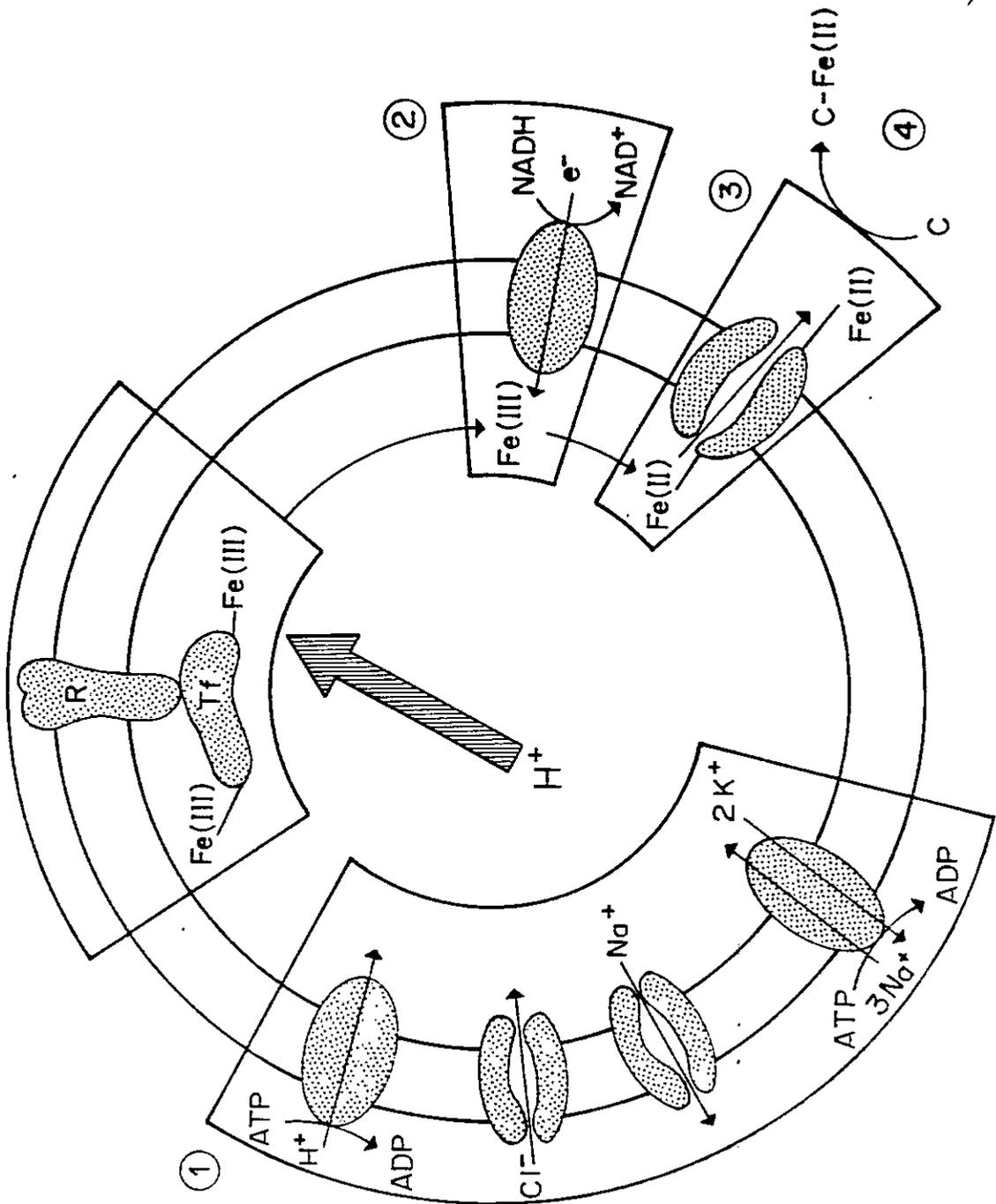
No se hicieron estudios para determinar si el ascorbato participa en una reducción del hierro enzimáticamente, a través de alguna oxido-reductasa como la NADH-transferrina diférrica-reductasa de hepatocitos<sup>49</sup> o si es transportado al interior de la vesícula, reduciendo directamente al hierro.<sup>59</sup>

Con todo lo anterior, fue posible formular un modelo que incluye todas las estructuras moleculares involucradas en la incorporación celular del

hierro (Fig. 17). En ella se esquematizó la vesícula endocítica y una molécula de transferrina (Tf) con sus dos hierros, unida al receptor de transferrina (R).

En la sección 1, se representa el sistema de acidificación, compuesto de la  $H^+$ -ATPasa, que bombea protones electrogénicamente a expensas de la hidrólisis de ATP; el transportador de cloruro, que los mueve hacia el interior de la vesícula, en favor de un gradiente eléctrico; el transportador de iones sodio, que saca dichos cationes en favor de un gradiente químico, y la  $Na^+,K^+$ -ATPasa, que restituye el gradiente químico para  $Na^+$ . Todas estas estructuras funcionan como un todo para que entren los protones suficientes para producir una disminución sustancial del pH requerido para disociar ambos hierros de transferrina.

En la sección 2, se muestra una NADH óxido-reductasa, cuya función es reducir el hierro para que un transportador, señalado en la sección 3, lo movilice hacia el citoplasma, donde es captado por transportadores citoplasmáticos (sección 4).



**FIGURA 17: Modelo de la incorporación celular de hierro**

El esquema muestra una vesícula endocítica, con el receptor de transferrina (R) y transferrina diférrica (Tf). La sección 1 representa el sistema de acidificación, compuesto por la  $H^+$ -ATPasa, la conductancia a  $Cl^-$ , la conductancia a  $Na^+$  y la  $Na^+,K^+$ -ATPasa. La sección 2 corresponde al sistema reductor, compuesto por una NADH oxido-reductasa. La sección 3 es el transportador de hierro de membrana, y la 4, el sistema citosólico de transporte de hierro.

## VI. BIBLIOGRAFIA

1. May, P.M. y Williams, D.R. (1980) The Inorganic Chemistry of Iron Metabolism. En "Iron in Biochemistry and Medicine, II" pp 1-26. A. Jacobs y M. Worwood Eds. Academic Press London and New York.
2. Iacopetta, B.J. y Morgan, E.H. (1983) The Kinetics of Transferrin Endocytosis and Iron Uptake from Transferrin in Rabbit Reticulocytes. *J. Biol. Chem.* 258:9108-9115.
3. Dickson, R.B., Hanover, J.A., Willingham, M.C. y Pastan, I. (1983) Prelysosomal Divergence of Transferrin and Epidermal Growth Factor during Receptor-Mediated Endocytosis. *Biochemistry* 22:5667-5674.
4. Hopkins, C.R. (1985) The Appearance and Internalization of transferrin Receptors at the Margins of Spreading Human Tumor Cells. *Cell* 40:199-208.
5. Enns, C.A., Larrick, J.W., Soumalainen, H., Schroder, J. y Sussman, H.H. (1983) Co-migration and Internalization of Transferrin and its

Receptor on K562 Cells. *J. Cell Biol.* 97:579-585.

6. Hopkins, C.R. (1983) Intracellular Routing of Transferrin and Transferrin-Receptors in Epidermoid Carcinoma A431 Cells. *Cell* 35: 321-330.
7. Van Renswoude, J., Bridges K.R., Harford, J.B. y Klausner, R.D. (1982) Receptor-Mediated Endocytosis of Transferrin and the Uptake of Fe in K562 Cells: Identification of a Nonlysosomal Acidic Compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6186-6190.
8. Paterson, S., Armstrong, N.J., Iacopetta, B.J., McArdle, H.J. y Morgan, E.H. (1984) Intravesicular pH and Iron Uptake by Immature Erythroid Cells. *J. Cell. Physiol.* 120:225-232.
9. Ciechanover, A., Schwartz, A.L., Dautry-Varsat, A. y Lodich, H.F. (1983) Kinetics of Internalization and Recycling of Transferrin and the Transferrin Receptor in a Human Hepatoma Cell Line. *J. Biol. Chem.* 258:9681-9689.
10. Núñez, M.T., Cole, E.S. y Glass, J. (1983) The Reticulocyte Plasma Membrane Pathway of Iron Uptake as Determined by the Mechanism of  $\alpha,\alpha'$ -Dipyridyl Inhibition. *J. Biol. Chem.* 258:1146-1151.
11. Núñez, M.T. y Glass, J. (1985) Iron Uptake in Reticulocytes. *J. Biol. Chem.* 260:14707-14711.

12. Núñez, M.T. y Glass, J. (1983) The Transferrin Cycle and Iron Uptake in Rabbit Reticulocytes. *J. Biol. Chem.* 258:9676-9680.
13. Hopkins, C.R. y Trowbridge, I.S. (1983) Internalization and Processing of Transferrin and the Transferrin Receptor in Human Carcinoma A431 Cells. *J. Cell Biol.* 97:508-521.
14. Forgacs, M., Cantley, L., Wiedenmann, B., Altstiel, L. y Branton, D. (1983) Clathrin-Coated Vesicles Contain an ATP-Dependent Proton Pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1300-1303.
15. Paterson, S. y Mrgan, E.H. (1980) Effect of Changes in the Ionic Environment of Reticulocytes on the Uptake of Transferrin-Bound Iron. *J. Cell. Physiol.* 105:489-502.
16. Glass, J. y Núñez, M.T. (1986) Amines as Inhibitors of Iron Transport in Rabbit Reticulocytes. *J. Biol. Chem.* 261:8298-8302.
17. Stone, D.K., Xie, X-S. y Racker, E. (1983) An ATP-driven Proton Pump in Clathrin-coated Vesicles. *J. Biol. Chem.* 258:4059-4062.
18. Van Dyke, R.W., Steer, C.J. y Scharschmidt, B.F. (1984) Clathrin-Coated Vesicles from Rat Liver: Enzymatic Profile and Characterization of ATP-Dependent Proton Transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3108-3112.

19. Yamashiro, D.J., Fluss, S.R. y Maxfield, F.R. (1983) Acidification of Endocytic Vesicles by an ATP-Dependent Proton Pump. *J. Cell Biol.* 97:929-934.
20. Schneider, D.L. (1981) ATP-dependent acidification of intact and disrupted lysosomes. *J. Biol. Chem.* 256:3858-3864.
21. Harikumar, P. y Reeves, J.P. (1983) The Lysosomal Proton Pump Is Electrogenic. *J. Biol. Chem.* 258:10403-10410.
22. Glickman, J., Croen, K., Kelly, S. y Al-Awqati, Q. (1983) Golgi Membranes Contain an Electrogenic H<sup>+</sup> Pump in Parallel to a Chloride Conductance. *J. Cell Biol.* 97:1303-1308.
23. Dean, G.E., Fishkes, H., Nelson, P.J. y Rudnick, G. (1984) The Hydrogen Ion-pumping Adenosine Triphosphatase of Platelete Dense Granule Membrane *J. Biol. Chem.* 259: 9569-9574.
24. Wang, Y. y Sze, H. (1985) Similarities and Differences between the Tonoplast-type and the Mitochondrial H<sup>+</sup>-ATPases of Oat Roots *J. Biol. Chem.* 260:10434-10443.
25. Bowman, E.J. (1983) Comparison of the Vacuolar ATPase of *Neurospora crassa* with the Mitochondrial and Plasma Membrane ATPases. *J. Biol. Chem.* 258:15238-15244.

26. Uchida, E., Ohsumi, Y. y Anraku, Y. (1985) Purification and Properties of  $H^+$ -translocating,  $Mg^{2+}$ -Adenosine Triphosphatase from Vacuolar Membranes of *Saccharomyces cerevisiae* *J. Biol. Chem.* 260:1090-1095.
27. Forgac, M. y Cantley, L. (1984) Characterization of the ATP-dependent Proton Pump of Clathrin-coated Vesicles. *J. Biol. Chem.* 259:8101-8105.
28. Sun, S-Z., Xie, X-S. y Stone, D.K. (1987) Isolation and Reconstitution of the Dicyclohexylcarbodiimide-sensitive Proton Pore of the Clathrin-coated Vesicle Proton Translocating Complex *J. Biol. Chem.* 262:14790- 14794.
29. Arai, H., Berne, M. y Forgac, M. (1987) Inhibition of the Coated Vesicle Proton Pump and Labeling of a 17,000-Dalton Polypeptide by N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide. *J. Biol. Chem.* 262:11006-11011.
30. Xie, X-S., Tsai, S-J. y Stone, D.K. (1986) Lipid Requirements for Reconstitution of the Proton-translocating Complex of Clathrin-coated Vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8913-8917.
31. Xie, X-S., Stone, D.K. y Racker, E. (1983) Determinants of Clathrin-coated Vesicles Acidification. *J. Biol. Chem.* 258:14834-14838.

32. Glass, J; Núñez, M.T. y Robinson, S.H. (1980) Transferrin-Binding and Iron-Binding Proteins of Rabbit Reticulocyte Plasma Membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 598:293-304.
33. Lowry, O.L.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
34. Musgrove, E., Rugg, C., Taylor, I. y Hedley, D. (1984) Transferrin Receptor Expression During Exponential and Plateau Phase Growth of Human Tumor Cells in Culture. *J. Cell. Physiol.* 118:6-12.
35. Choe, H.R.; Moseley, S.T.; Glass, J. y Núñez, M.T. (1987) Rabbit Reticulocyte Coated Vesicles Carrying the Transferrin-Transferrin Receptor Complex: I. Purification and Partial Characterization. *Blood* 70:1035-1039.
36. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
37. Russell, J.T. (1984)  $\Delta\text{pH}$ ,  $\text{H}^+$  Diffusion Potentials, and  $\text{Mg}^{2+}$  ATPase in Neurosecretory Vesicles Isolated from Bovine Neurohypophyses. *J. Biol. Chem.* 259:9496-9507.
38. Johnson, R.G., Carty, S.E. y Scarpa, A. (1985) Coupling of  $\text{H}^+$  Gradients to Catecholamine Transport in Chromaffin Granules *Ann. N.Y.*

*Acad. Sci.* 456:254-267.

39. Thayer, W.S. y Hinkle, P.C. (1973) Stoichiometry of Adenosine Triphosphate-driven Proton Translocation in Bovine Heart Submitochondrial Particles. *J. Biol. Chem.* 248:5395-5402.
40. Arai, H., Berne, M., Terres, G., Terres, H., Puopolo, K. y Forgac, M. (1987) Subunit Composition and ATP Site Labeling of the Coated Vesicle Proton-translocating Adenosinetriphosphatase. *Biochemistry* 26:6632-6638.
41. Landry, D.W., Reiteman, M., Cragoe, Jr. E.J. y Al-Awqati, Q. (1987) Epithelial chloride channel. *J. Gen. Physiol.* 90:779-798.
42. Begenisich, T. 1987. Molecular properties of ion permeation through sodium channels. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16:247-263.
43. Cecchi, X., Wolff, D. y Canessa, M. (1987) Charybdotoxin blocks the Ca-activated-K-channel in HbAA and HbSS human red cells. *J. Gen. Physiol.* 90,129a.
44. Paris, S. y Pouyssegur, J. (1983) Biochemical characterization of the amiloride-sensitive  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport in chinese hamster lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 258:3503-3506.

45. Grinstein, S. y Furuya, W. (1984) Amiloride-sensitive  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Exchange in Human Neutrophils: Mechanism of Activation by Chemotactic Factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122:755-762.
46. Shimada, T. y Hoshi, T. (1987) Role of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiport in Intracellular pH Regulation by Rabbit Enterocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 901:265-272.
47. Devés, R y Krupka, R.M. 1978. Testing Transport Models with Substrates and Reversible Inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* 513:156-172.
48. Alberty, R.A. (1968) Effect of pH and Metal Ion Concentration on the Equilibrium Hydrolysis of Adenosine Triphosphate to Adenosine Diphosphate. *J. Biol. Chem.* 243:1337-1343.
49. Sun, I.L., Navas, P., Crane, F.L., Morré, D.J. y Löw, H. (1987) NADH Diferric Transferrin Reductase in Liver Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* 262:15915-15921.
50. Schuurmans Stekhoven, F., Bonting, S.L. (1981) Transport Adenosine Triphosphatases: Properties and Functions. *Physiol. Rev.* 61:1-76.
51. Fuchs, R., Schmid, S. y Mellman, I. (1989) A Possible Role for  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in regulating ATP-Dependent Endosome Acidification.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:539-543.

52. Knauf, P.A., Furhmann, G.F., Rothstein, S. y Rothstein, A. (1977) The Relationship between Anion Exchange and Net Anion Flow across the Human Red Blood Cell Membrane. *J. Gen. Physiol.* 69:363-386.
53. Fröhlich, O. (1984) Relative Contributions of the Slippage and Tunneling Mechanisms to Anion Net Efflux from Human Erythrocytes. *J. Gen. Physiol.* 84:877-893.
54. Knauf, P.A., Law, F-Y. y Marchant, P.J. (1983) Relationship of Net Chloride Flow across the Human Erythrocyte Membrane to the Anion Exchange Mechanism. *J. Gen. Physiol.* 81:95-126.
55. Xie, X-S., Crider, B.P. y Stone, K.D. (1989) Isolation and Reconstitution of the Chloride Transporter of Clathrine-Coated Vesicles. *J. Biol. Chem.* 264:18870-18873.
56. Sachs, G., Faller, L.D. y Rabon, E. (1982) Proton/Hydroxyl Transport in Gastric and intestinal epithelia. *J. Membrane Biol.* 64:123-135.
57. Cain, C.C., Sipe, D.M. y Murphy, R.F. (1989) Regulation of Endocytic pH by the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in Living Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:544-548.
58. Donoso, P. e Hidalgo, C. (1989) Sodium-Calcium Exchange in

Transverse Tubules Isolated from Frog Skeletal Muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 97:8-16.

59. Orringer, E.P. y Roer, M.E.S (1978) An Ascorbate-Mediated Transmembrane-Reducing System of the Human Erythrocyte. *J. Clin. Invest.* 63:53-58.

## VII. APENDICE

Thayer y Hinkle<sup>39</sup> hicieron el cálculo de la razón  $H^+/ATP$  a partir de la siguiente ecuación:

$$h = \frac{B_0 \Delta pH_0 e^{(ZC_M/B)t}}{S_0 X} \quad (1)$$

donde:

$$X = \frac{\theta_1}{\theta_1 - ZC_M/B} [1 - e^{-(\theta_1 - (ZC_M/B)t)}] + \frac{\theta_2}{\theta_2 - ZC_M/B} [1 - e^{-(\theta_2 - (ZC_M/B)t)}] \quad (2)$$

$h$  = estequiometría  $H^+/ATP$

$B_0$  = capacidad amortiguadora del medio externo

$\Delta pH_0$  = cambio de pH del medio externo

$C_M$  = conductancia efectiva a  $H^+$  de la membrana

$Z$  = factor de conversión eléctrico igual a  $2.303 RT/F$  (donde  $R$  es la cte. de los gases,  $F$  es Faraday y  $T$  es la temperatura absoluta)

$S_0$  = cantidad inicial de ATP

En el sistema utilizado por los autores, la cinética de hidrólisis del ATP se ajustaba a dos exponenciales de primer orden donde  $a_1$  y  $a_2$  eran constantes de velocidad de ambos componentes.

En el caso de vesículas endocíticas de reticulocitos, hay sólo un componente en la cinética de hidrólisis de ATP, de modo que  $a_2$  es cero, y  $X$  queda reducido al primer término.

Por otra parte, como  $ZC_M/B \ll a_1$ , entonces la ecuación (2) queda:

$$X = 1 - e^{-a_1 t}$$

Con lo anterior, la ecuación (1) se transforma en:

$$h = \frac{E_0 \Delta pH_0 e^{(ZC_M/B)t}}{S_0 (1 - e^{-a_1 t})} \quad (3)$$

Como  $E_0$  está expresado en moles de  $H^+$ /unidad de pH, el producto  $E_0 \Delta pH_0$  representa los moles de  $H^+$  que desaparecen del medio externo. Análogamente, el producto del denominador  $S_0 (1 - e^{-a_1 t})$  representa los moles de ATP hidrolizados.

Por lo tanto, reordenando la ecuación (3), se tiene que:

$$h = \frac{H^+}{ATP} e^{(ZC_M/B)t} \quad (4)$$

Sacando logaritmo natural y reordenando:

$$\ln H^+ / ATP = \ln h - (ZC_M/B)t \quad (5)$$

en donde  $ZC_M/B$  representa la constante de fuga de  $H^+$  ( $k_1$ ).

Entonces, la ecuación (5) finalmente queda:

$$\ln H^+ / ATP = \ln h - k_1 t \quad (6)$$

y graficando  $\ln H^+/ATP$  en función del tiempo  $t$ , se tiene que de la intersección con la ordenada se obtiene la razón  $H^+/ATP$  y la pendiente representa  $k_1$ .