BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Universidad de Santiago de Compostela

Estudio de los mecanismos de acción de ficotoxinas marinas

Laura Alejandra Ardilla De la Rosa Carrillo

Tesis de Doctorado

Facultad: Veterinaria

Director: Dr. Luis M. Botana

2001

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Estudio de los mecanismos de acción de ficotoxinas marinas

Tesis Doctoral
Laura A. A. de la Rosa Carrillo
Lugo, abril de 2001

Luis Miguel Botana López, Catedrático de Farmacología de la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada "Estudio de los mecanismos de acción de ficotoxinas marinas", recogida en la presente memoria, de la que es autor la Licenciada en Oceanología, por la Universidad Autónoma de Baja California, México, **Dña. Laura Alejandra Ardilla de la Rosa Carrillo**, ha sido realizada bajo su codirección y cumple las condiciones exigidas para que su autor pueda optar al grado de **Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela**, por lo que da su aprobación para la correspondiente lectura y defensa.

Para que conste a los efectos oportunos, firma la presente en Lugo, a 6 de febrero de 2001.

MIGUEL DE CERVANTES

Luis M. Botana López
Doctor en Farmacia
Codirector de Tesis

Laura A. A. de la Rosa Carrillo

Mercedes Rodríguez Vieytes, Profesor Titular de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada "Estudio de los mecanismos de acción de ficotoxinas marinas", recogida en la presente memoria, de la que es autor la Licenciada en Oceanología, por la Universidad Autónoma de Baja California, México, **Dña. Laura Alejandra Ardilla de la Rosa Carrillo**, ha sido realizada bajo su codirección y cumple las condiciones exigidas para que su autor pueda optar al grado de **Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela**, por lo que da su aprobación para la correspondiente lectura y defensa.

Para que conste a los efectos oportunos, firma la presente en Lugo, a 6 de febrero de 2001.

MIGUEL DE CERVANTES

Mercedes Rodríguez Vieytes
Doctor en Biología
Codirector de Tesis

Laura A. A. de la Rosa Carrillo

A Emilio

A Alejo, León Laura y Tito

A E.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Agradecimientos

El trabajo expuesto en la presente memoria es el resultado de casi cinco años de investigación realizada en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela, bajo la dirección de los profesores Dr. Luis M. Botana López y Dra. Mercedes Rodríquez Vieytes, a quienes deseo agradecer la oportunidad que me ofrecieron para iniciarme en la investigación, apoyándome con los medios técnicos y materiales, pero sobretodo con su amistad y confianza a lo largo de este periodo.

Igualmente importante ha sido el apoyo, consejo y amistad de los demás miembros del Departamento: a las doctoras Natalia, Ana, Amparo y Maricarmen, y a los casi doctores Carlos, Jorge, Olga y Yolanda, así como a Maite, Naty y Jagueline.

Agradezco también al personal del Centro de Transfusión de Galicia, del Hospital Xeral de Lugo por su colaboración a la realización de este trabajo.

A los Dr. T. Yasumoto y K. J. James por la donación de algunas de las ficotoxinas utilizadas en esta investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt, México) por la concesión de una beca para estudios doctorales en el extranjero, que me permitió realizar esta investigación.

A todos aquellos amigos que de una u otra manera han hecho que mi estancia en España fuera más agradable (especialmente los fines de semana).

Por último a Emilio por su constante apoyo (personal y "profesional"), por su amor y paciencia que me ayudaron a superar todas esas crisis y malos momentos.

ABREVIATURAS:

AC: Adenilato ciclasa
AD: Acido Domoico
ADN: Acido desoxiribonucleico
ADPRc: Adenosin-5´-difosfato-ribosa cíclica
AE: Anion Exchanger (Intercambiador aniónico)
AMPc: Adenosin-3´,5´-monofosfato cíclico
AO: Acido Ocadaico
ARN: Acido ribonucleico
ASP: Amnesic Shellfish Poisoning
ATP Adenosin-5´-Trifosfato
AZ: Azaspirácido
AZP: Azaspiracid Poisoning
BCECF-AM: 2´,7´-bis(carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceína éster acetoximetilo
BCR: Receptor antigénico de linfocitos B
Bis-oxonol: bis-(1,3-ácido dietiltiobarbitúrico)trimetina oxonol
$[Ca^{2+}]i$: Concentración citosólica de calcio
CaM: Calcio-calmodulina
CD: Cluster of Diferentiation
CFP: Ciguatera Fish Poisoning
ChC: Cloruro de cheleritrina
CICR: Calcium Induced Calcium Release (liberación de calcio inducida por calcio)
Con-A: Concanavalina A
CRAC: Calcium Release Activated Channels (Canales activados por la liberación de calcio).
CTX: Ciguatoxina
DAG: Diacilglicerol
DIDS: 4,4´-diisotiocianatoestilbeno-2,2´-ácido disulfónico
DMSO: Dimetilsulfóxido
DSP: Diarrhetic Shellfish Poisoning
DTX: Dinofisistoxina
EDTA: Tetra-acetato de etilendiamina
EGTA: Tetra-acetato de etilenglicol
ER: Retículo endoplasmático
FSK: Forskolina
GDP: Guanosin-5´-difosfato
GF109203X: Bisindolilmaleimida 1
GMP: Guanosin-5´-monofosfato
GTP: Guanosin-5´-trifosfato
GTX: Gonyautoxina
H89 ó H-89: N-[2-(p-bromocinamilamino)etil]-5-isoquinolisulfonamida·2HCl
HEPES: N-[2-hidroxietil]piperazina-N´-[ácido 2-etanosulfónico]
IBMX: 3-isobutil,1-metilxantina
Ig: Inmunoglobulina
IL-2: Interleucina 2
IP_3: Inositol 1,4,5-trifosfato
IP_3R: Receptor del Inositol 1,4,5-trifosfato
IP_4: Inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfato
MHC: Mayor Histocompatibility Complex (Complejo mayor de histocompatibilidad)
MTX: Maitotoxina
NHE: $Na^+ H^+$ Exchanger (Intercambiador sodio protones)
NK: Células agresoras naturales
NSP: Nerotoxic Shellfish Poisoning
PbTx: Brevetoxina
PDE: Fosfodiesterasa

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

PHA: Fitohemaglutinina
pHi: pH citosólico
pHo: pH extracelular
PI: Fosfatidil Inositol
PI-3K: Fosfatidil inositol 3-cinasa
PIP_2: Fosfatidil Inositol 4,5-bifosfato
PKA: Cinasa de proteína dependiente de AMPc
PKC: Cinasa de proteína C
PLC: Fosfolipasa C
PMA: forbol 12-miristato 13-acetato
PMCA: ATPasa de calcio de la membrana plasmática
PP: Fosfatasa de proteína
PSP: Paralytic Shellfish Poisoning
PTK: Cinasa de tirosina
PTPasa: Fosfatasa de tirosina
PTX: Pectenotoxina
PWM: Mitógeno de la fitolaca
RyR: Receptor de rianodina
SEM: Error estándar de la media
SERCA: ATPasa de calcio del retículo sarco-endoplasmático
SKF 96365: 1-[β-[3-(4-metoxifenil)propoxil}-4-metoxifenil]-1H-imidazol·HCl
SOC: Store Operated Channels (Canales operados por reservorios)
SQ22,536 o SQ: 9-(tetrahidro-2-furanil)-9-H-purina-6-amina
STX: Saxitoxina
Tc: Células T citotóxicas
TCR: Receptor antigénico de linfocitos T
Tg: Tapsigargina
Th: Células T colaboradoras
Tox Col: Toxina colérica
TPA: forbol 12-miristato 13-acetato
TRIS: Tris(hidroximetil)amino-metano
VOC: Voltage Operated Channels (canales operados por voltaje)
YTX: Yessotoxina

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

INDICE

1 Introducción 3

1.1 Ficotoxinas marinas 5

1.1.1 Toxinas DSP 5

1.1.2 Toxinas PSP 9

1.1.3 Toxinas ASP 10

1.1.4 Toxinas NSP 11

1.1.5 Toxinas relacionadas con la ciguatera (CFP) 12

1.1.6 Otras ficotoxinas marinas 15

1.2 El linfocito humano como modelo celular para el estudio de los mecanismos de acción de toxinas DSP 16

1.2.1 Heterogeneidad de los linfocitos. 17

1.2.2 Activación y modulación de la función linfocitaria 19

1.3 Señales de transducción 21

1.3.1 Proteínas G 21

1.3.2 Mensajeros intracelulares o segundos mensajeros 22

1.3.2.1 Calcio 22

1.3.2.2 AMP cíclico 25

1.3.3 Cinasas y fosfatasas de proteína 26

1.3.3.1 Cinasas de tirosina 26

1.3.3.2 Cinasas de serina/treonina 27

1.3.3.3 Fosfatasas de proteína 28

1.3.4 Fosfatidil inositol 3-cinasa (PI 3-cinasa, PI 3-K) 30

1.4 Transporte de iones a través de las membranas celulares: Mecanismos reguladores del pH citosólico 30

1.4.1 Intercambiador Na^+/H^+ 31

1.4.2 Transportadores de HCO_3^- 32

1.4.2.1 Intercambiadores Cl^-/HCO_3^- 33

1.4.2.2 Cotransportadores Na^+-HCO_3^- 34

1.4.3 ATPasas de H^+ 35

2 Objetivo 37

3 Material y métodos 41

3.1 Reactivos y medios 43

3.2 Células 44

3.2.1 Obtención y purificación de linfocitos humanos 44

3.2.2 Células de neuroblastoma humano..... 45

3.3 Determinación de la concentración intracelular de iones y del potencial de membrana, mediante el uso de indicadores fluorescentes 46

3.4 Medición de fluorescencia 48

3.5 Técnicas de acidificación y alcalinización intracelular..... 51

3.6 Determinación de la capacidad tampón del citosol de linfocitos humanos, y cálculo del flujo de H^+ 52

3.7 Análisis estadístico 54

4 Resultados y Discusión 55

4.1 Estudio de los mecanismos de acción del ácido ocadaico 57

4.1.1 Caracterización de los mecanismos reguladores del pHi en linfocitos humanos57

4.1.2. Regulación de la actividad de los transportadores de membrana implicados en la alcalinización citosólica, por diferentes rutas de transducción. 77

4.1.2.1. Regulación por cinasas 77

4.1.2.2. Implicación del citoesqueleto..... 84

4.1.3. Efecto del ácido ocadaico sobre la actividad de los mecanismos reguladores del pHi en linfocitos humanos 87

4.2 Estudio de los mecanismos de acción de la yessotoxina 98

4.2.1 Efecto de la YTX sobre los niveles de $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos humanos 98

4.2.2 Efecto de la YTX sobre el potencial de membrana de linfocitos y células de neuroblastoma humanos..... 118

2.2.3 Interacción Ca^{2+} AMPc en linfocitos humanos 121

4.3 Estudio de los mecanismos de acción de la maitotoxina 130

4.4 Estudio de los mecanismos de acción del azaspirácido 140

5 Conclusiones 149

6 Bibliografía 153

El presente trabajo de tesis doctoral ha generado las siguientes publicaciones:

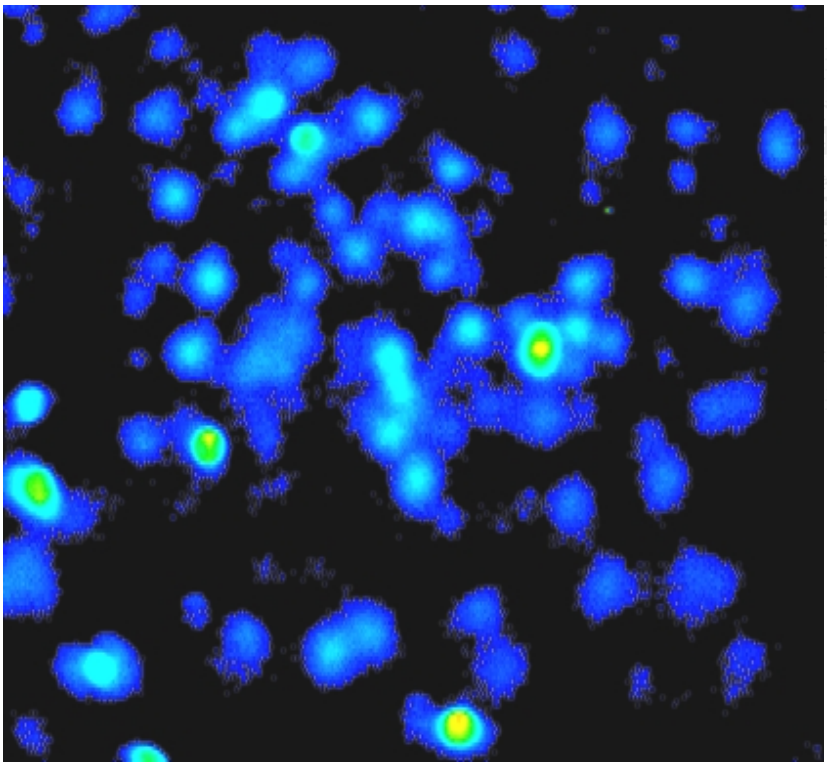
Evidence for an electrogenic, negatively protein kinase A-modulated, Na^+-dependent HCO_3^- transporter in human lymphocytes. L. A. de la Rosa, A.G. Cabado, M.A. Botana, J.I. Vidal, M.R. Vieytes y L.M. Botana **Pflügers Archive European Journal of Physiology.** 1999, 437 (6), 935-943.

Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin. L. A. de la Rosa, A. Alfonso, N. Vilariño, M.R. Vieytes y L.M. Botana **Biochemical Pharmacology.** En prensa.

Maitotoxin-induced Ca^{2+} entry in human lymphocytes: modulation by kinases, Ca^{2+} channel blockers and yessotoxin. L. A. de la Rosa, A alfonso, N. Vilariño, M.R. Vieytes, T. Yasumoto y L.M. Botana. **Cellular Signalling.** En prensa.

Modulation of thapsigargin-induced calcium mobilization by cyclic AMP-elevating agents in human lymphocytes is insensitive to the protein kinase A inhibitor H-89. L. A. de la Rosa, N. Vilariño, M.R. Vieytes y L.M. Botana. **Cellular Signalling.** En prensa.

Introducción



Linfocitos cargados con Fura2
λ_{exc} 340 nm; λ_{em} 520 nm
Línea basal exp. con AZ

Los episodios de intoxicaciones humanas producidas por la ingestión de productos marinos contaminados con toxinas de origen fitoplanctónico representan en muchas ocasiones un riesgo para la salud pública. El estudio de los múltiples factores implicados en estos acontecimientos es, por tanto, de gran importancia. El presente trabajo pretende contribuir al conocimiento de los mecanismos mediante los cuales algunas de estas toxinas marinas ejercen su acción en células humanas. Para ello, se hará una breve descripción de las principales toxinas producidas por microalgas marinas, a continuación, se describirá el modelo celular empleado en nuestro estudio, así como las señales y procesos celulares que serán estudiados en este trabajo de investigación.

1.1 Ficotoxinas marinas

Las ficotoxinas marinas son metabolitos secundarios producidos por algunas especies de microalgas fitoplanctónicas pertenecientes, la mayoría, al grupo de los dinoflagelados. Sin embargo, su mayor importancia radica en que estas microalgas tóxicas son consumidas y sus toxinas bioacumuladas por otros organismos marinos, como moluscos o peces, que luego son utilizados para consumo humano. Debido a sus importantes efectos sobre la salud pública, las toxinas marinas se clasifican generalmente según el tipo de intoxicación o envenenamiento que producen.

1.1.1 Toxinas DSP

Dentro de este grupo se describirán toxinas con efectos patológicos diversos, pero que han sido aisladas en asociación con las toxinas productoras del síndrome DSP (de Diarrhetic Shellfish Poisoning). Este tipo de intoxicación produce trastornos puramente gastrointestinales, como diarrea, náusea, vómito y dolor abdominal, que aparecen de 30 minutos a unas pocas horas después del consumo de los moluscos. No se ha conocido ningún caso de intoxicación mortal. La primera vez que este tipo de alteraciones se correlacionó con la existencia de una toxina presente en los tejidos grasos de mejillones fue a finales de la década de los 70 en Japón (269), aunque seguramente esta intoxicación era conocida desde hacía largo tiempo en este país (267). Actualmente, las toxinas DSP están ampliamente distribuidas en todo el mundo, siendo especialmente importantes en Europa y Japón, donde aparecen de manera estacional (13, 243).

Las toxinas productoras de DSP son el ácido ocadaico (AO) y sus derivados, muchos de los cuales son productos del metabolismo de los moluscos. Los derivados del AO son llamados dinofisistoxinas (DTXs) por uno de los géneros de dinoflagelados productores: *Dinophysis* y *Prorocentrum*,

El AO y las DTXs son poliéteres liposolubles, cuya estructura química se muestra en la figura 1.1. Estas toxinas, además de producir diarrea, también poseen efectos como promotoras de tumores.

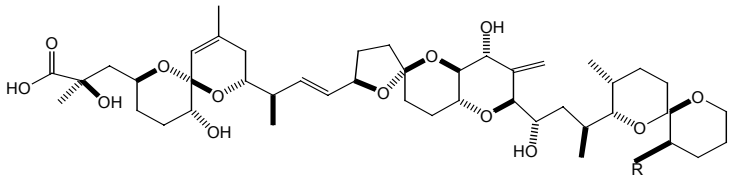


Figura 1.1. Representación esquemática del ácido ocadaico y uno de sus derivados.

Como se mencionó anteriormente, en este grupo se incluyen otras toxinas, de naturaleza química más o menos similar al AO, que no producen diarrea y cuyo mecanismo de acción es probablemente diferente, pero que se han encontrado en muestras contaminadas con DSP. Sin embargo, conviene aclarar que una de ellas, el azaspirácido, no puede ser detectada por el método habitual de detección de toxinas DSP, por lo que algunos autores han propuesto la creación de un nuevo grupo de toxinas marinas formado por el azaspirácido y sus derivados. A continuación se describen las principales ficotoxinas marinas asociadas a DSP.

A) Pectenotoxinas (PTXs)

Fueron descubiertas en las glándulas digestivas de vieiras *Patinopecten yessoensis* contaminadas con DSP y hasta el momento se han aislado 10 derivados diferentes. Se trata de una serie de compuestos poliéteres macrocíclicos con un anillo de lactona (figura 1.2a). Al igual que las toxinas productoras de diarrea, son sintetizadas por dinoflagelados del género *Dinophysis*; algunas de las PTXs caracterizadas son productos de la biotrasnformación en los moluscos consumidores. Las que se han estudiado hasta el momento presentan un efecto hepatotóxico (65).

B) Yessotoxinas (YTXs)

La primera de este tipo de toxinas fue aislada de las mismas vieiras que las PTXs; hasta la fecha se han identificado otros 6 análogos naturales de este compuesto y se han producido 6 derivados de manera experimental. La estructura química de las YTXs, que es muy similar a la de las brevetoxinas y ciguatoxinas (descritas más adelante), posee 11 anillos éter encadenados, con una cadena lateral insaturada; sin embargo, difiere de éstas últimas, en que su cadena principal en más larga, posee al menos dos ésteres sulfónicos y no presenta grupos carbonilo (figura 1.2b). La YTX y sus análogos han sido detectados en diversas partes del mundo (Japón, Italia, Nueva Zelanda y Chile); y son producidas por los dinoflagelados *Protoceratium reticulatum* y *Lingulodinium polyedrum* (*Gonyaulax polyedra*) (65). La YTX tiene un efecto cardiotóxico en ratón, mientras que un derivado desulfatado de la misma presenta un efecto hepatotóxico en los mismos animales. A pesar de que la toxicidad de la YTX por vía intraperitoneal es la mayor de las toxinas DSP, por vía oral su toxicidad es muy inferior (227).

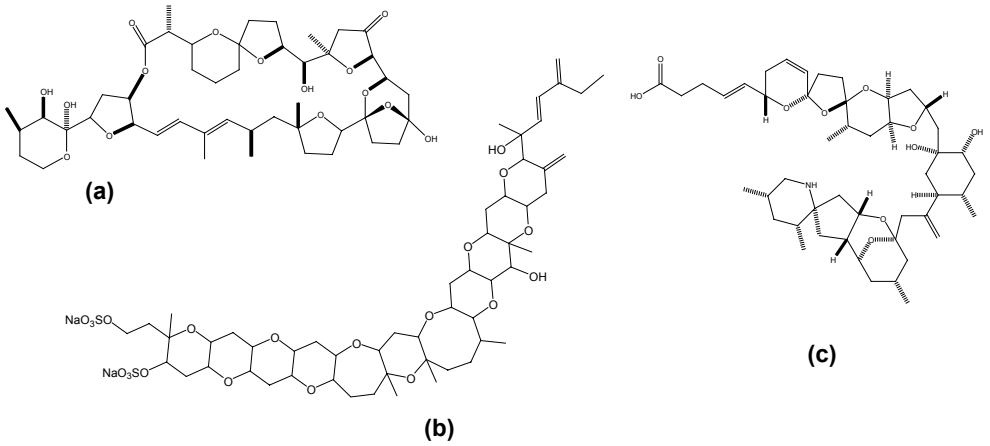


Figura 1.2. Representación esquemática de las toxinas asociadas a DSP. **(a)** Pectenotoxina1 **(b)** Yessotoxina **(c)** Azaspirácido

BIBLIOTECA VIRTUAL

C) Azaspirácido

Esta toxina fue descubierta recientemente, después de una intoxicación ocurrida en Holanda en 1995, tras la ingestión de mejillones contaminados, importados de Irlanda. Los síntomas de dicha intoxicación fueron parecidos a los del síndrome DSP, aunque se había comprobado que los mejillones no contenían cantidades significativas de este tipo de toxinas (115). De la carne de estos mejillones se extrajo una nueva toxina denominada azaspirácido (AZ) por estar formada por anillos azaspiro de 5 y 6 miembros, uno de ellos conteniendo nitrógeno (figura 1.2c). En ratones, esta nueva toxina provocó lesiones en páncreas e hígado. Se han encontrado dos análagos del AZ y, debido a que este grupo de moléculas es estructural y toxicológicamente distinto de otras toxinas, se ha decidido incluirlas en un nuevo grupo (AZP de Azaspiracid Poisoning) (164). Se desconoce el origen del AZ y derivados, sin embargo, es probable que estas toxinas sean también producidas por dinoflagelados, ya que el patrón de metilaciones de su estructura es típico de metabolitos de estas microalgas (115). A pesar de que ha habido casos de envenenamiento por AZP en diversos países de Europa, los mejillones contaminados siempre han provenido de Irlanda.

En la figura 1.2 se presentan las estructuras de las toxinas más representativas de cada uno de los tres grupos antes descritos.

Las toxinas DSP productoras de diarrea (AO y derivados), PTXs y YTXs son todas detectadas mediante el mismo procedimiento de bioensayo en ratón, por esta razón este método de detección es considerado como el más seguro y es el único método oficialmente utilizado para el control de la aparición de toxinas DSP en moluscos destinados para el consumo humano (246). Con el propósito de reducir o evitar el uso de animales y mejorar la sensibilidad, se han desarrollado una gran variedad de métodos alternativos mediante técnicas analíticas y bioquímicas: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (2, 85,

142), cromatografía líquida con detección mediante espectrometría de masas (LC/MS) (173) y espectrometría de masas "tandem" (LC/MS/MS) (64), detección mediante anticuerpos (ELISA) (241) y medición de la inhibición de fosfatasas detectada por ultravioleta (238) o fluorescencia (247). Sin embargo, estas técnicas son específicas para las toxinas OA y algunos de sus derivados, por lo que en muchos casos se aplican en conjunción con el bioensayo. Los métodos más apropiados, como alternativa al bioensayo, para la detección de PTXs y YTXs son los métodos analíticos HPLC y espectrometría de masas (65). Por último, el bioensayo en ratón ha demostrado no ser suficientemente sensible para la detección de AZ por lo que se han desarrollando métodos de detección para esta toxina mediante las técnicas LC/MS y LC/MS/MS (115).

Como hemos visto las toxinas que hemos incluido y descrito en el grupo DSP presentan una gran heterogeneidad. En la siguiente tabla se resumen algunas de sus características principales, para efectos de comparación se muestran sus valores de toxicidad aguda mediante inyección intraperitoneal en ratones, sin embargo, como se ha mencionado antes estos valores no siempre se corresponden con la toxicidad por vía oral.

TABLA 1.1. Principales características de algunas toxinas DSP o asociadas a DSP (modificado de (267)).

TOXINA	Fórmula	PM	LD50 (µg/kg p.c.)	Tejido afectado	Origen
Acido ocadaico	$C_{44}H_{68}O_{13}$	804	200	intestino	Dinophysis
Dinofisistoxina1	$C_{45}H_{70}O_{13}$	818	160	intestino	*Dinophysis*
Pectenotoxina1	$C_{47}H_{70}O_{14}$	874	250	hígado	*Dinophysis*
Yessotoxina	$C_{55}H_{80}O_{21}S_2Na_2$	1186	100	corazón	*Protoceratium*
Azaspirácido	$C_{47}H_{71}NO_{12}$	841	150	hígado-páncreas	?

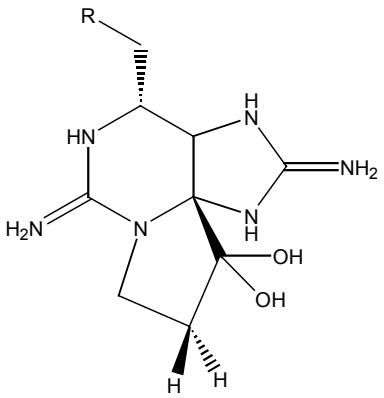
De todo este grupo, solo se conocen los mecanismos de acción de las toxinas productoras de DSP (AO y derivados). Estas toxinas son potentes inhibidoras de las fosfatasas de proteína PP1 y PP2A, dos de las principales fosfatasas de proteína que existen en el citosol de las células eucariotas (13, 248). El mecanismo de inhibición es a través de la unión de las toxinas a la subunidad catalítica de la enzima. Debido a que las fosfatasas de proteína son enzimas clave en los mecanismos de señalización celular; están involucradas en la regulación de la mayoría de los procesos celulares. Por lo tanto, los efectos del AO en células, son muy variados; de hecho, esta toxina se utiliza ampliamente como una herramienta farmacológica para estudiar señales de transducción en múltiples modelos celulares. Aunque su mecanismo de acción no es selectivo, el AO es ligeramente más potente en células neuronales (es tóxico a concentraciones que no afectan a otro tipo de células) (70, 224). Por tal motivo se ha sugerido que el efecto diarreogénico del AO puede estar regulado por el sistema nervioso, como demostraría la presencia de náusea y vómito en pacientes afectados por DSP (248). Sin embargo, también se ha propuesto que la diarrea producida por AO puede ser el resultado de la hiperfosforilación de proteínas, que controlan la secreción de Na^+ en células intestinales; así como de elementos del

citoesqueleto, que influyen en la permeabilidad de las membranas celulares (60, 248). Estudios *in vivo* han demostrado que, a diferencia de otras toxinas diarreicas, como la toxina colérica; el AO no aumenta la secreción de Cl^- de las células epiteliales intestinales, sino que, en su lugar, afecta a la microcirculación intestinal y aumenta la permeabilidad paracelular del epitelio (109, 234).

Los mecanismos de acción de las PTXs y YTXs no se conocen pero de acuerdo a los efectos y lesiones que producen en ratones experimentales, y a su estructura química, se cree que la primera puede tener un mecanismo similar al de algunos oligopéptidos cíclicos (faloidina) mientras que la segunda podría actuar como una neurotoxina del tipo de las brevetoxinas o ciguatoxinas (65).

1.1.2 Toxinas PSP

Este tipo de intoxicación es, de todas las aquí descritas, la más ampliamente distribuida en el ámbito mundial y su existencia ha sido conocida desde hace mucho tiempo. El síndrome PSP (de Paralytic Shellfish Poisoning) se caracteriza por una serie de alteraciones neuromusculares que aparecen poco después (aproximadamente 1 h) de la ingestión de moluscos contaminados. Sus síntomas, dependiendo de la gravedad de la intoxicación pueden ser: malestar general, parestesia facial, astenia, distenia, ataxia, disnea, hipotensión, taquicardia, disfagia, desórdenes gastrointestinales, cefalea y parada cardio-respiratoria (131). Las toxinas responsables de este envenenamiento pertenecen todas a un grupo homogéneo de más de 21 compuestos polares, llamados en conjunto saxitoxinas, caracterizados por presentar un esqueleto heterocíclico nitrogenado. Dependiendo de los sustituyentes en R (figura 1.3) las saxitoxinas se dividen en 4 grupos, que en orden descendente de toxicidad son: carbamato, decarbamoilo, sulfocarbamoilo y desoxidecarbamoilo (toxicidad no probada). Algunos de estos derivados son productos del metabolismo de los bivalvos (243).



	R
STX (carbamato)	$OCONH_2$
GTX5 (B1) (sulfocarbamoilo)	$OCONHSO_3^-$
dcSTX (decarbamoilo)	OH
doSTX (desoxidecarbamoilo)	H

Figura 1.3. Representación esquemática de toxinas PSP. Se muestra una toxina representativa de cada uno de los cuatro grupos existentes, determinados por el grupo funcional R.

Las saxitoxinas son producidas por dinoflagelados de los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium*; toxinas muy similares son producidas por muchos otros organismos procariotas y eucariotas, no relacionados con la intoxicación PSP (208). La presencia de toxinas PSP en moluscos bivalvos se determina por medio de bioensayo en ratón aunque, como complemento a éste, se aplican otras técnicas analíticas como espectrofotometría y HPLC (246).

Las saxitoxinas producen parálisis del sistema neuromuscular debido a que bloquean la propagación de los impulsos nerviosos, al unirse selectivamente al sitio 1 del canal de Na^+ de la membrana plasmática de células excitables, e impedir su apertura. Por su alta polaridad es poco probable que atraviesen la barrera hematoencefálica, por lo que su sitio de acción más probable, sería sobre los canales de Na^+ de las uniones neuromusculares (243).

1.1.3 Toxinas ASP

La intoxicación de tipo ASP (de Amnesic Shellfish Poisoning) es una de las últimas que se han descrito ya que los primeros casos datan de 1987 y se registraron en Montreal, Canadá. Este síndrome se caracteriza por la ocurrencia de trastornos gastrointestinales seguidos de alteraciones del sistema nervioso central: náusea, vómito, calambres abdominales, diarrea, dolor de cabeza, desorientación, pérdida de la memoria a corto plazo, ataques y coma; sin embargo, la aparición de estos síntomas depende de la gravedad de la intoxicación, la cual es muy variable entre individuos (158).

La toxina responsable de este envenenamiento es el ácido domoico (AD), un pequeño aminoácido tricarboxílico, termoestable e hidrosoluble, cuya estructura química, que se presenta en la figura 1.4, es muy similar a la de los aminoácidos neuroexcitadores ácido glutámico y ácido kaínico (263). A diferencia de otras ficotoxinas marinas, que son producidas por dinoflagelados, el ácido domoico es producido por microalgas del grupo de las diatomeas. Las diatomeas productoras son algunas especies pertenecientes a los géneros *Nitzschia* y *Pseudonitzschia*, sin embargo, la producción de toxina por estas microalgas, depende de numerosos factores ambientales que aún no han sido del todo identificados. Se han detectado florecimientos de diatomeas productoras de AD en algunos puntos de Norteamérica y Europa. El método de detección empleado se basa en HPLC de extractos acuosos de mejillón (158).

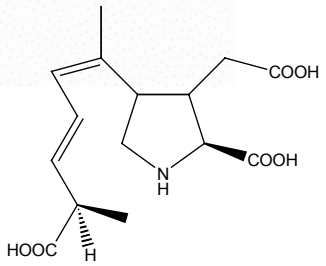


Figura 1.4. Representación esquemática del ácido domoico.

El mecanismo de acción del AD coincide con el de otros aminoácidos neuroexcitadores. En neuronas de hipocampo de rata se une a los receptores del ácido kaínico, que son

similares, a los receptores del ácido glutámico o glutamato. La activación de estos receptores activa a su vez una serie de mecanismos de transducción de señales intracelulares, como la elevación de los niveles citosólicos del ion Ca^{2+} y activación de la cinasa de proteína C. Existen muchas otras rutas intracelulares que pueden contribuir a la acción de estas sustancias, dependiendo del tipo de receptor que activan y de célula en que éste se expresa. Se cree que la alteración en los niveles de Ca^{2+} intracelular producida por la activación de receptores kaínicos de las neuronas puede estar directamente relacionada con la actividad neurotóxica del ácido domoico (158).

1.1.4 Toxinas NSP

Este grupo está formado por las brevetoxinas (PbTx), las cuales están también asociadas con episodios de mortalidad masiva de peces, aves y mamíferos marinos (243, 268). El síndrome NSP (de Neurotoxic Shellfish Poisoning) se caracteriza por la aparición de diversos síntomas de carácter neurológico, de menor severidad que los producidos por las toxinas PSP. Sus principales síntomas son: náusea, sensación de hormigueo y entumecimiento, pérdida del control motor y dolor muscular severo. Las brevetoxinas también pueden entrar en contacto con el ser humano en forma de un aerosol que se inhala en la brisa marina cerca de una marea roja de *Gymnodinium breve*, el dinoflagelado que las produce. Este organismo es originario de las costas de Florida y el Golfo de México, sin embargo, recientemente se han identificado otras especies fitoplanctónicas (*Gymnodinium* cf. *breve*, *Chatonella* spp., *Fibrocaspa japonica*, etcétera) que producen toxinas similares a las PbTx, en las aguas costeras de Japón y Nueva Zelanda (243).

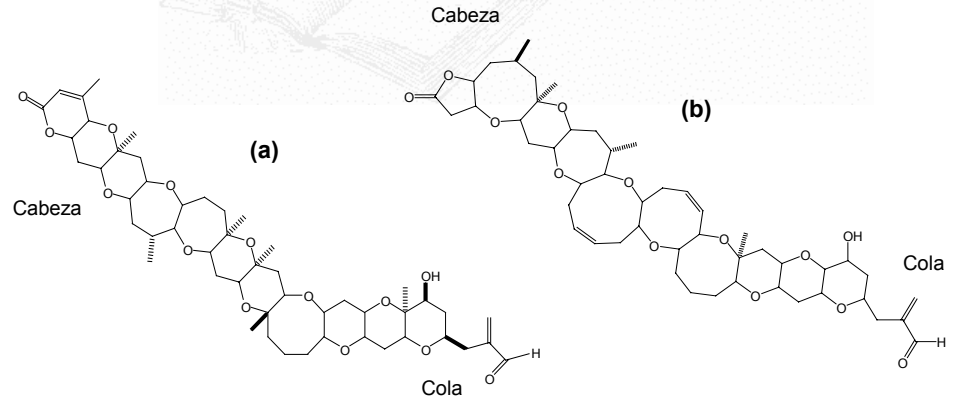


Figura 1.5. Esqueletos base de brevetoxinas. **(a)** PbTx-2 o brevetoxina B, representante del esqueleto tipo 1. **(b)** PbTx1 o brevetoxina A, representante del esqueleto tipo 2.

Existen 10 brevetoxinas naturales, todas ellas derivadas de dos esqueletos básicos, que se muestran en la figura 1.5. Se trata de poliéteres liposolubles formados por un anillo de lactona y 10 anillos éter, que dan lugar a una estructura en forma de escalera.

Las PbTx tienen un mecanismo de acción muy bien caracterizado a nivel celular-molecular. Al igual que las toxinas PSP se unen con gran afinidad y especificidad a los canales de Na^+ dependientes de voltaje, sin embargo el sitio de unión es distinto (sitio 5) lo que hace que su efecto sobre la actividad del canal sea también diferente. De hecho, las PbTx provocan la apertura de los canales de Na^+ e inhiben su inactivación, con lo cual producen una activación transitoria de las células excitables, musculares o nerviosas, seguida de un bloqueo de la excitabilidad celular. La afinidad de las PbTx por el canal de Na^+ depende de la estructura específica de la toxina y está directamente relacionada a la toxicidad de la misma, aunque las rutas de transducción que desencadena la unión de la toxina al receptor celular siguen siendo estudiadas. Además, las PbTx, junto con las ciguatoxinas y muchos derivados sintéticos de ambas se utilizan ampliamente en fisiología y biología molecular para caracterizar los mecanismos de acción de los canales de Na^+ dependientes de voltaje (15).

Los métodos empleados para la detección de PbTx están basados en el principio de unión receptor-ligando. Los receptores utilizados son canales de Na^+ o anticuerpos específicos y el ligando, es decir la toxina, se cuantifica mediante el desplazamiento competitivo que produce de un derivado marcado con moléculas radiactivas o fluorescentes (15).

1.1.5 Toxinas relacionadas con la ciguatera (CFP)

La ciguatera es una enfermedad conocida en el Caribe desde la época de la conquista española. Se trata de una intoxicación debida a la ingestión de peces que han acumulado ficotoxinas a través de la cadena alimenticia (de ahí CFP, Ciguatera Fish Poisoning). Este tipo de intoxicación es típico de áreas tropicales y subtropicales con arrecifes coralinos, donde viven una variedad de dinoflagelados tóxicos que pueden ser consumidos por peces herbívoros que bioacumulan las toxinas para luego transmitirlas al ser humano directamente o a través de otros peces carnívoros (103).

La ciguatera provoca una serie de síntomas neurológicos, gastrointestinales y, en menor medida, cardiovasculares, siendo los neurológicos los más importantes (103). Las afecciones gastrointestinales (náusea, vómito, diarrea) se presentan entre 2 y 6 horas después del consumo del pescado, seguidas por los síntomas de tipo neurológico (perturbaciones sensoriales, fatiga y debilidad, dolor de cabeza, vértigo, mareos, salivación y sudación, parálisis, etc.). La gravedad de la intoxicación es variable, aunque rara vez llega a ser mortal; además los síntomas y la gravedad también varían según el tipo de pez (carnívoro o herbívoro) y de la localización geográfica (en el Caribe los síntomas dominantes son los gastrointestinales, mientras que en el Pacífico dominan los síntomas neurológicos). Esto puede deberse a diferencias en la estructura química de las principales toxinas implicadas en la ciguatera (las ciguatoxinas) o a variabilidad en el tipo de toxinas presentes en los arrecifes (243).

Como ya se mencionó anteriormente, los arrecifes coralinos son el hábitat de múltiples dinoflagelados bentónicos tóxicos, cuyas toxinas pueden tener mecanismos de acción

diversos. En la tabla 2 se resumen algunos de estos organismos y las toxinas que producen.

TABLA 2. Toxinas producidas por dinoflagelados bentónicos asociados a los arrecifes coralinos (243).

Especie	Toxina	Sitio de acción
Gambierdiscus toxicus	Ciguatoxinas	Canales de Na^+ dep. de voltaje
	Maitotoxina	? (dependiente de Ca^{2+})
Coolia monotis	Cooliatoxina	?
Ostreopsis spp	Ostreocina (palitoxina)	ATPasa de Na^+ /K^+
Prorocentrum spp	A. ocadaico	Fosfatasas de proteína
Amphidinium spp	Anfidinilidas	? (antifúngico)

De todas estas, las únicas toxinas que están directamente implicadas en la ciguatera son las ciguatoxinas (CTXs), poliéteres liposolubles cuya estructura química es muy similar a la de las brevetoxinas (PbTx), previamente descritas.

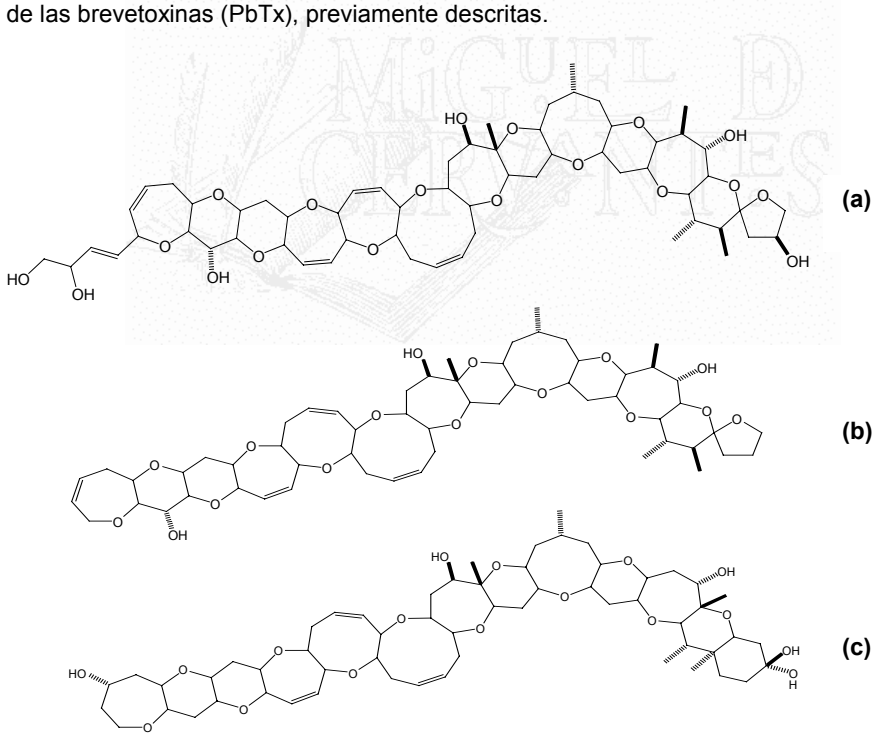


Figura 1.6. Representantes de las 3 cadenas principales básicas de CTXs. **(a)** CTX1 (P-CTX1). **(b)** CTX3C. **(c)** C-CTX1

Existen más de 20 CTXs con tres cadenas principales básicas (figura 1.6) los dos primeros tipos corresponden a CTXs del Pacífico (P-CTXs), mientras que el tercero ha sido

aislado en el Caribe (C-CTX). Los derivados más oxigenados de las CTXs con productos del metabolismo de los peces (243).

La palitoxina, o su análogo la ostreocina, son otras toxinas asociadas a los arrecifes coralinos que producen una intoxicación con síntomas similares a los de la ciguatera, aunque de mucha mayor gravedad y con un alto índice de mortalidad (clupeotoxismo). Por otro lado la maitotoxina (MTX), un poliéter con una estructura química extraordinariamente grande y compleja (figura 1.7), es la principal toxina producida por *Gambierdiscus toxicus* (el mismo organismo productor de las CTXs), sin embargo, no se bioacumula en los tejidos de los peces. Por lo tanto, a pesar de ser por vía intraperitoneal la ficotoxina más potente que se conoce, su contribución a los trastornos de la ciguatera no parece significativa.

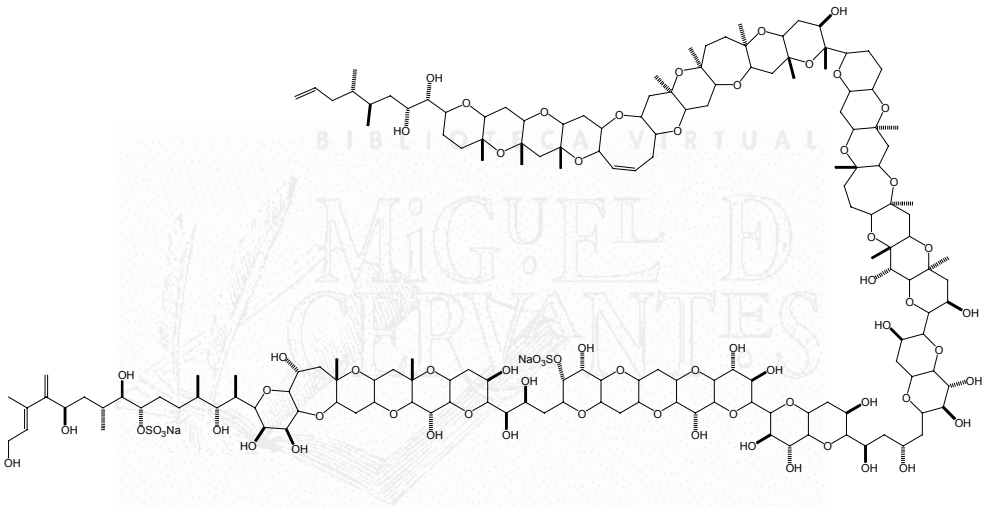


Figura 1.7. Representación esquemática de la maitotoxina (MTX), producida por *Gambierdiscus toxicus*.

El resto de las ficotoxinas asociadas a arrecifes coralinos (incluyendo el AO, que se ha descrito previamente como productor de DSP) no se acumulan de manera significativa en los tejidos de peces comestibles, por lo que no se ha confirmado su impacto sobre la salud humana, por esta vía.

Como se ha mencionado antes, la estructura de las CTXs es muy parecida a la de las PbTx por lo que no es extraño que su mecanismo de acción sea el mismo. Esto es, las CTXs se unen al sitio 5 del canal de Na^+ de células excitables (principalmente células del sistema nervioso), lo que provoca la apertura de dichos canales a potenciales de membrana de reposo; la entrada de iones Na^+ a su vez activa una serie de señales intracelulares (movilización de Ca^{2+}, aumento de volumen celular) que finalmente pueden dar lugar a las perturbaciones de la conducción nerviosa, típicas de la ciguatera (139). El mecanismo de acción de la palitoxina es diferente; se une también a una proteína de la membrana plasmática, pero en este caso es la ATPasa de Na^+/K^+; una enzima que, a través de la hidrólisis de ATP, obtiene la energía necesaria para expulsar iones Na^+ e introducir iones K^+

al citosol celular, de esta forma logra mantener el gradiente de ambas especies iónicas, el cual es utilizado en numerosas funciones celulares. La unión de la palitoxina inhibe el funcionamiento de la ATPasa y produce la formación de un poro, permeable a cationes monovalentes, en la membrana citoplasmática. Estas alteraciones de la membrana celular desencadenan una serie de señales intracelulares que pueden dar lugar a contracciones de músculo liso y esquelético (139). Como la ATPasa de Na^+/K^+ es una enzima presente en células de todos los tejidos, es posible que la acción de la palitoxina no sea tan específica como la de las CTXs.

Por último, el mecanismo de acción de la MTX también ha sido ampliamente estudiado, aunque hasta la fecha no se ha podido identificar el sitio específico de acción de esta toxina. Básicamente la MTX es un potente activador de canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática de gran cantidad de tipos celulares, sin embargo, la identidad de estos canales y el mecanismo de activación, no están del todo claros. En ratones de experimentación, inyectada por vía intraperitoneal, produce alteraciones patológicas severas en corazón, estómago, hígado y timo (67).

BIBLIOTECA VIRTUAL

1.1.6 Otras ficotoxinas marinas

Los avances en el estudio de las intoxicaciones producidas por ficotoxinas son constantes, por lo que continuamente se descubren nuevas toxinas o derivados de otras ya conocidas. En este apartado se citan brevemente dos grupos de ficotoxinas marinas que comienzan a ser caracterizados.

A) Toxinas producidas por cianobacterias marinas

Las cianobacterias tóxicas han sido siempre consideradas como un problema propio de agua dulce, sin embargo, recientemente se han encontrado toxinas de origen cianobacterial también asociadas a casos de intoxicación por alimentos de origen marino. En algunos episodios de intoxicación por consumo de macroalgas comestibles se ha identificado a la aplisiatoxina como la toxina responsable del incidente; esta toxina es producto de la cianobacteria marina *Lyngbya majuscula*. Esta misma especie de cianobacteria es el origen de la Lingbiatoxina-A (figura 1.8a) implicada en una intoxicación mortal por ingestión de tortuga marina en la isla de Madagascar (267).

Por otro lado, la hepatotoxina microcistina ha sido también detectada en aguas marinas (10). Esta última toxina es, como el AO, una inhibidora de fosfatasas de proteína PP1 y PP2A, aunque su estructura química es muy diferente a la de la toxina DSP, como se puede observar en la figura 1.8b. Además, la microcistina se caracteriza por una gran selectividad hacia las fosfatasas del tejido hepático; esta selectividad está dada por la dificultad que tiene esta toxina para atravesar las membranas celulares, lo cual, en el caso de las células hepáticas, consigue mediante el sistema de transporte de los ácidos biliares (243).

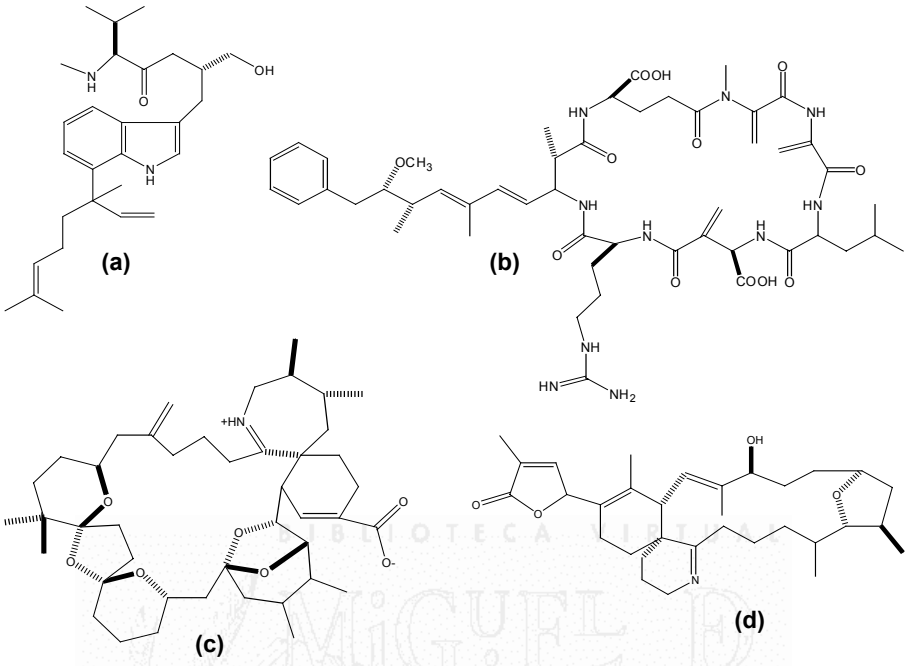


Figura 1.8. Toxinas producidas por cianobacterias: **(a)** Lingbiatoxina A. **(b)** Microcistina. Toxinas de "acción rápida": **(c)** Pinatoxina A. **(d)** Gimnodimina.

B) Toxinas de "acción rápida"

Esta denominación recibe un grupo de compuestos macrocíclicos nitrogenados, (figura 1.8c y 1.8d). Para dos de estos compuestos (prorocentrólidos y gimnodimina) se ha comprobado que su origen biogenético está en dinoflagelados de los géneros *Prorocentrum* y *Gymnodinium*; debido a su naturaleza polar, estas toxinas no son extraídas junto con las toxinas liposolubles características de las microalgas mencionadas. Además de estos dos compuestos, se han aislado de tejidos de moluscos bivalvos otras toxinas con una estructura química similar: pinatoxina A (1.8c) y espirolidas; ambas activadoras de canales de Ca^{2+}. Las toxinas de este grupo se caracterizan por provocar una respuesta muy rápida (muerte en pocos minutos) en el bioensayo en ratón, aunque solo la pinatoxina ha estado implicada en un episodio de neurotoxicidad en humanos (115).

1.2 El linfocito humano como modelo celular para el estudio de los mecanismos de acción de toxinas DSP

Los linfocitos son glóbulos blancos especializados en el reconocimiento específico de los agentes patógenos, proceso indispensable para llevar a cabo la respuesta inmunitaria. Se encuentran en grandes cantidades en la sangre, por lo que su obtención y aislamiento resultan relativamente sencillos. Por este motivo se escogió esta célula como modelo de

estudio, ya que es una de las pocas células de origen humano a las que se puede tener fácil acceso, sin necesidad de recurrir a las líneas celulares derivadas de células tumorales.

Por otro lado, se ha decidido estudiar a las toxinas de tipo DSP debido, en parte, a su importancia en las costas de Europa y de la Comunidad Autónoma Gallega en particular, donde su presencia afecta de manera significativa a las actividades económicas de la acuicultura e industria de alimentos (246). Además, como ya se mencionó, el grupo de las toxinas tipo DSP engloba sustancias con actividades biológicas muy diversas y cuyos mecanismos de acción, en algunos casos, son completamente desconocidos.

1.2.1 Heterogeneidad de los linfocitos.

Los linfocitos representan aproximadamente el 20% de los leucocitos totales que circulan en el torrente sanguíneo. La mayoría de los linfocitos presentes en la circulación son pequeños linfocitos, miden entre 5 y 8 µm y poseen un núcleo muy compacto rodeado por un citoplasma escaso; estas células circulantes pueden ser células T o B en reposo, células T o B de memoria, o linfocitos T efectores o inmunomoduladores (9).

Según la forma de reconocer el antígeno (molécula extraña que origina la respuesta inmune), el órgano específico donde se desarrollan y sus funciones esenciales, existen dos tipos básicos de linfocitos: los linfocitos T, que se desarrollan en el timo y son responsables de la respuesta inmunitaria mediada por células y los linfocitos B que en los adultos se producen y desarrollan en la médula ósea y que son las células productoras de anticuerpos.

Entre los linfocitos circulantes, están también las células agresoras naturales (NK) y los linfocitos granulares grandes, ambos son morfológicamente distintos de los linfocitos pequeños pues son de mayor tamaño (más de 10 µm) y presentan un citoplasma más abundante y con gránulos; además, las primeras, no expresan receptores antigénicos en su superficie (170, 187).

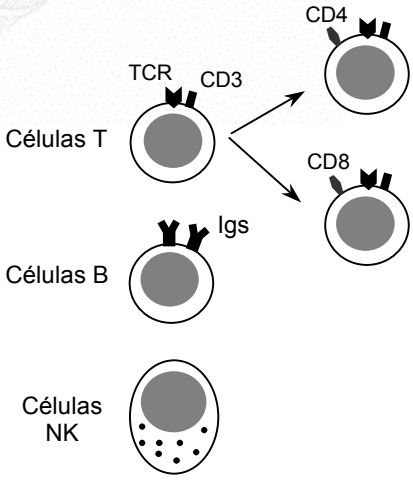


Figura 1.9. Tipos de linfocitos circulantes.

A) Linfocitos T

Estos linfocitos reconocen al antígeno solamente cuando fragmentos de éste son presentados en la superficie de otras células del cuerpo (células diana o células presentadoras de antígeno), que han ingerido o que han sido infectadas por microorganismos. El reconocimiento del antígeno se lleva a cabo mediante la interacción de proteínas presentes en la membrana plasmática del linfocito y de la célula diana. Las primeras son los receptores antigénicos de células T (TCR, de T-cell Receptor) y las

segundas son las moléculas MHC (de Major Histocompatibility Complex). Asimismo, existen otras moléculas accesorias al TCR que se expresan en la superficie de los linfocitos T: CD3, CD4 y CD8. La molécula CD3 está presente en todos los linfocitos T, mientras que las CD4 y CD8 distinguen a las dos clases más conocidas de células T: células T colaboradoras (Th), que expresan CD4; y células T citotóxicas (Tc), que expresan CD8. Cuando son activadas por un antígeno, la función de las células T colaboradoras consiste en estimular la actividad de otras células del sistema inmunitario (linfocitos B, macrófagos, células T citotóxicas), esta función la llevan a cabo mediante la producción de diversos mediadores peptídicos, denominados citocinas, linfocinas o interleucinas, que actúan como mensajeros intercelulares. Por otro lado, las células T citotóxicas actúan destruyendo directamente a la célula presentadora de antígeno (257).

B) Linfocitos B

Los linfocitos B son menos abundantes que los T, pues representan entre el 5 y 15 % de los linfocitos circulantes. Estas células reconocen antígenos libres, disueltos en la sangre o en los órganos linfoides secundarios y sus receptores antigénicos (BCR, de B Cell Receptor) son las inmunoglobulinas (Ig), es decir los anticuerpos. Existe cinco isotipos de Ig humanas: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Las dos primeras son las más comúnmente expresadas en las membranas celulares de los linfocitos B de la sangre, aunque éstos pueden cambiar el isotipo de Ig que producen. Antes de ser activados por un antígeno, los linfocitos B solamente producen Ig que permanecen ligadas a la membrana plasmática, pero una vez estimulados por el antígeno, y por células T colaboradoras, pasan a producir una gran cantidad de anticuerpos solubles que actúan sobre los antígenos de diversas maneras: inactivándolos, en el caso de virus y toxinas, o facilitando su destrucción por otros mecanismos del sistema inmunitario. Además los anticuerpos también funcionan como moléculas señalizadoras entre los diversos tipos celulares del sistema inmune. Por último las células B también expresan en su membrana moléculas MHC, por lo que pueden actuar como células presentadoras de antígeno para los linfocitos T colaboradores (59).

C) Células agresoras naturales (NK)

Representan hasta un 15% de los linfocitos sanguíneos, pero se distinguen de ellos en que no reconocen antígenos específicos. En lugar de esto, su función consiste en lisar cierto tipo de células sanguíneas, tumorales o infectadas por virus, aunque los receptores y mecanismos que determinan que células deben ser atacadas no han sido del todo caracterizados. Por el contrario están mejor caracterizados los receptores inhibitorios, expresados en las membranas de células NK. Cuando estos receptores interaccionan con moléculas de tipo MHC inhiben la función citolítica de la célula NK; en cambio, cuando las receptores inhibitorios no son capaces de encontrar una molécula MHC normal, se desencadenan los mecanismos de lisis celular (233, 270). La existencia e importancia de este tipo de receptores también han sido reconocidas en los otros dos tipos de células linfoides (120, 222). En la figura 1.9 se presenta un esquema de los tipos celulares que han sido descritos en este apartado.

1.2.2 Activación y modulación de la función linfocitaria

Los linfocitos T y B se activan cuando un antígeno se une a sus receptores TCR o Ig respectivamente. Esta activación está compuesta de varios procesos: en primer lugar los antígenos inducen a las células a reproducirse, lo que da lugar a una proliferación de células hijas, denominadas clonas, que, al ser descendientes de una sola célula madre, expresan exactamente el mismo receptor antigénico de ésta última. A continuación las clonas se diferencian y maduran para dar lugar a células de memoria y células efectoras, siendo éstas últimas las que llevan a cabo la respuesta inmunitaria, mediante la producción de anticuerpos, citocinas o factores citotóxicos.

Sin embargo todos estos procesos no dependen únicamente de la unión del antígeno, sino que son estrictamente modulados y en algunos casos totalmente dependientes de la unión de otras moléculas señalizadoras a sus receptores específicos. Las más importantes de estas moléculas inmunomoduladoras son las citocinas o interleucinas producidas por células T y otros inmunocitos, o las moléculas asociadas a los receptores antigénicos en linfocitos T (CD3, CD4, CD8); asimismo, las respuestas inmunitarias también están reguladas por una gran variedad de hormonas, neurotransmisores y otros mediadores lipídicos como las prostaglandinas.

Además de todos estos agonistas fisiológicos, existen moléculas que producen activación linfocitaria *in vitro* al unirse de manera inespecífica a diversos receptores de membrana, incluido el receptor antigénico. Estas moléculas son proteínas derivadas de plantas y bacterias, conocidas colectivamente como lectinas mitogénicas; algunos ejemplos son la fitohemaglutinina (PHA), concanavalina A (Con-A) o el mitógeno de la fitolaca (PWM). También se utilizan como mitógenos o activadores linfocitarios, anticuerpos creados para unirse específicamente con el receptor CD3 de células T.

La unión de los diversos agonistas (antígenos, mitógenos o inmunomoduladores) con sus receptores de membrana, provoca una serie de señales intracelulares de transducción que finalmente dan lugar a una respuesta celular determinada. En el caso de antígenos y mitógenos, se cree que las señales intracelulares que desencadenan son muy similares, por lo que dan lugar a las mismas respuestas, es decir proliferación y maduración celular y mecanismos efectores de la respuesta inmune. En la figura 1.10 se presenta un esquema de algunas de las señales de transducción que desencadena la unión de un anticuerpo antiCD3 a la membrana de un linfocito T (39, 175).

La unión ligando-receptor (antiCD3-CD3) produce la activación de una (o varias) cinasa de proteína que fosforila residuos de tirosina (PTK). La activación de esta cinasa produce fosforilación de una forma de la enzima fosfolipasa C (PLCγ1) que se encuentra libre en el citosol celular, y de una pequeña proteína (p36) que se asocia a la PLC. La fosforilación de la PLC, y su asociación con p36 produce una migración de esta enzima hacia la membrana celular donde se encuentra su sustrato, que es un fosfolípido de membrana, el fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP_2). La PLC hidroliza el PIP_2 para dar lugar a dos mensajeros intracelulares el inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DAG). El primero provoca una liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares del retículo endoplasmático (ER), lo que

a su vez produce una entrada de Ca^{2+} del exterior celular; el DAG activa a una cinasa de proteína de residuos serina/treonina, la cinasa de proteína C (PKC). El aumento de calcio citosólico ($[Ca^{2+}]i$) puede contribuir a la activación de PLC y PKC; además la unión de iones Ca^{2+} a la proteína calmodulina (CaM) activa a su vez otras cinasas como la CaM cinasa IV, o fosfatasas como la calcineurina (también llamada PP2B).

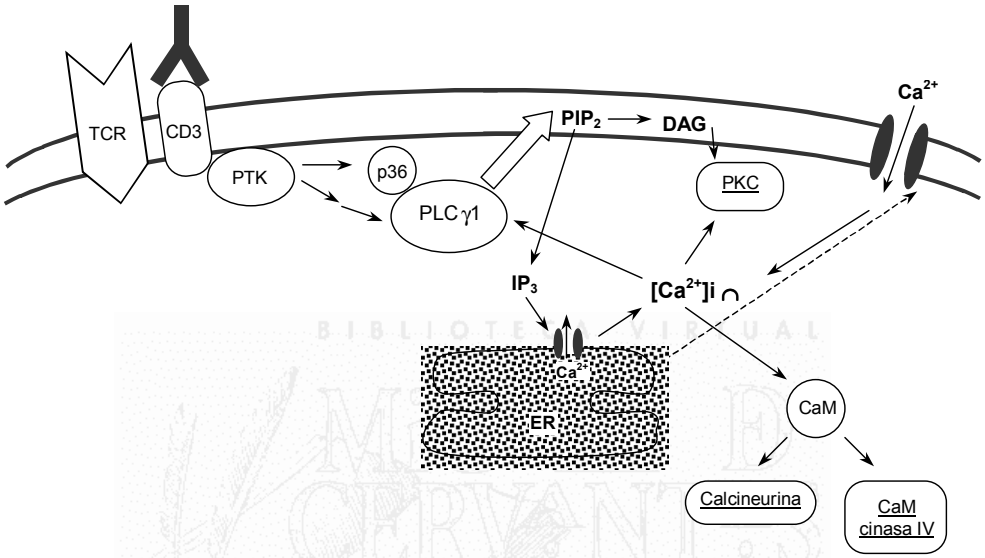


Figura 1.10. Activación de linfocitos T. Algunos mecanismos de transducción de señales que se desencadenan tras la unión de un ligando al receptor CD3.

PKC, CaM cinasa IV y calcineurina pueden activar a numerosas enzimas y factores de transcripción genética, que finalmente darán lugar a la producción de la interleucina-2 (IL-2). La importancia de la activación de la PKC y del aumento de Ca^{2+} citosólico en la producción IL-2 se ha demostrado mediante el empleo de herramientas farmacológicas que activan directamente a la PKC o producen un aumento de Ca^{2+} por mecanismos no fisiológicos, estas dos acciones pueden dar lugar a la producción de IL-2 en ausencia de estimulación antigénica o mitogénica (195); sin embargo, estudios más recientes han demostrado que los ésteres de forbol, utilizados para activar la PKC también son capaces de activar a la proteína $p21^{ras}$ (39), una GTPasa implicada en la transducción de señales desde receptores de membrana hasta el núcleo celular, en muchos tipos de células (87, 145).

Aunque hasta el momento se ha descrito la descripción de los mecanismos de transducción de señales intracelulares de linfocitos T, diversos estudios en células B han demostrado que las señales básicas de la activación linfocitaria (activación de PTKs, aumento de $[Ca^{2+}]i$ y activación de $p21^{ras}$), son comunes a ambos tipos de células (59).

El siguiente paso para la activación linfocitaria consiste en la expresión del receptor específico para la IL-2 (IL-2R) en la membrana celular de las células activadas. Cuando el IL-2R se expresa en la membrana de linfocitos y es ocupado por la citocina correspondiente

(IL-2), se desencadenan otras señales de transducción intracelulares que finalmente dan lugar a la proliferación, diferenciación celular y desarrollo de la respuesta inmunitaria que corresponda al tipo de linfocito activado. Una descripción más detallada de algunos mecanismos de transducción de señales intracelulares se presenta a continuación.

1.3 Señales de transducción

Cuando los receptores de membrana son ocupados por moléculas extracelulares específicas (ligandos o agonistas) se vuelven activos, de forma que generan una cascada de señales intracelulares que alteran el comportamiento de las células. Las señales se transmiten desde el receptor hacia el interior celular generalmente mediante dos tipos de proteínas: las proteínas G heterotriméricas o las cinasas de tirosina; ambas, a su vez, pueden activar enzimas ligadas a la membrana que producen pequeñas moléculas solubles que actúan como mensajeros intracelulares y que pueden estimular diversos procesos de fosforilación-desfosforilación de proteínas intracelulares.

BIBLIOTECA VIRTUAL

1.3.1 Proteínas G

Se llaman así las proteínas que ligan e hidrolizan GTP. Existen dos grandes grupos de proteínas G las proteínas G heterotriméricas, formadas por tres subunidades y que sirven de enlace entre los receptores de membrana y otras moléculas intracelulares; y las proteínas G monoméricas de bajo peso molecular, o GTPasas; que participan en diversos procesos celulares como el transporte de vesículas de exocitosis, además de actuar como mecanismos de transducción de señales. La proteína $p21^{ras}$ es un ejemplo de proteína G monomérica, que participa en la transducción de señales relacionadas con la iniciación de la proliferación celular en muchos modelos celulares, incluyendo los linfocitos. Ambos tipos de proteínas G se activan al unirse al GTP; la hidrólisis de esta molécula, para dar lugar a GDP, provoca la inactivación de la proteína GTPasa.

Las proteínas G heterotriméricas (83) se localizan junto a la membrana plasmática, asociadas a una gran variedad de receptores para muy diversos estímulos extracelulares, por ejemplo, luz, hormonas, neurotransmisores o factores quimiotácticos (157). Están formadas por tres subunidades: α, con actividad GTPasa, y β y γ que funcionalmente actúan como una sola unidad. La unión del ligando al receptor hace que la subunidad α se una a GTP con lo cual se activa y disocia de las subunidades $\beta\gamma$. Una vez disociadas, tanto la unidad α como el dímero $\beta\gamma$ pueden interaccionar con otras proteínas de membrana, como PLC, adenilato ciclasa (AC) o canales iónicos, y modificar su actividad.

Existen por lo menos 12 tipos de subunidades α, con funciones más o menos específicas, algunas de las cuales se expresan en unos tipos celulares muy limitados (217). Generalmente se clasifican de acuerdo a su sensibilidad a dos toxinas bacterianas: la toxina colérica, que inhibe la actividad GTPasa, y la toxina pertusis, que inhibe la unión del complejo $\alpha\beta\gamma$ al receptor de membrana. Por lo tanto, la toxina colérica actúa como un activador de proteína G, pues evita que la hidrólisis de GTP provoque la inactivación de α y

su unión con βγ; mientras que la toxina pertusis actúa como un inhibidor puesto que impide que el receptor de membrana active a la proteína G.

Las proteínas G con subunidades αs, αi y αq se expresan en casi todos los modelos celulares estudiados. La primera es sensible solamente a la toxina colérica y su principal sustrato es la enzima adenilato ciclasa (AC), que sintetiza AMP cíclico; αi es sensible a toxina pertusis y también puede interaccionar con la AC, aunque inhibiéndola; αi y αs también activan canales iónicos (157). En la figura 1.11 se presenta un esquema que ilustra la doble regulación de la AC por proteínas G heterotriméricas. Por último, Gαq activa a la isoforma β de la PLC y es insensible a la toxina pertusis (68).

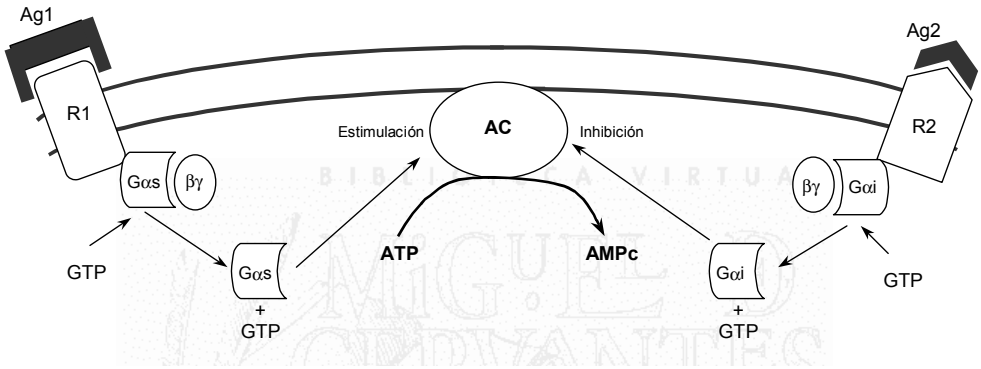


Figura 1.11. Modulación de la actividad de la adenilato ciclasa (AC) por la activación de receptores (R1 y R2) asociados a proteínas G. El R1, activado por un agonista (Ag1) estimula a la AC a través de la subunidad αs de la proteína G; mientras que la activación de R2, activa a la proteína Gαi, la cual inhibe la actividad de AC.

Las proteínas G se pueden activar mediante herramientas farmacológicas como el análogo de GTP, GTPγS o por el ion AlF_4^-.

1.3.2 Mensajeros intracelulares o segundos mensajeros

Son moléculas pequeñas que se difunden fácilmente a través del citosol y modifican la actividad de enzimas intracelulares o de canales iónicos, generalmente a través de su unión con cinasas o fosfatasas de proteína. El ion Ca^{2+} y el AMP cíclico son mensajeros ubicuos que regulan gran cantidad de procesos biológicos, como replicación o proliferación celular, secreción, contracción y relajación muscular, percepción de olores, memoria y aprendizaje, etcétera. Existen muchas otras moléculas que pueden actuar como segundos mensajeros: IP_3, DAG, IP_4 (inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfato), GMP cíclico, ADP-ribosa cíclica (ADPRc).

1.3.2.1 Calcio

La activación de la enzima fosfolipasa C (PLC) ya sea a través de proteínas G (PLCβ) o de cinasas de tirosina (PLCγ), produce una hidrólisis de PIP_2 que da lugar a dos segundos mensajeros: el DAG activa la cinasa C mientras que el IP_3 se une a un receptor intracelular

(IP_3R) del retículo endoplasmático (ER). El IP_3R es a su vez un canal de calcio por el que se libera Ca^{2+} de los reservorios intracelulares donde se acumula este ion. El vaciamiento de los reservorios de Ca^{2+} del ER genera, por un mecanismo aún desconocido, la apertura de otros canales permeables a Ca^{2+} localizados en la membrana plasmática, por los que entra Ca^{2+} desde el exterior celular, donde la concentración de este ion es también mucho mayor que en el citosol. A la entrada de calcio activada por el vaciamiento de reservorios se le denomina entrada capacitativa (178) y a los canales por los que entra el Ca^{2+} se les llama CRAC (de Calcium Release Activated Channels, canales activados por la liberación de calcio) (110) o SOC (de Store Operated Channels, canales operados por reservorios), aunque aún se desconoce su identidad molecular. El Ca^{2+} liberado de los reservorios también puede activar o sensibilizar otros IP_3R para que liberen más Ca^{2+}. Todo este proceso representa el mecanismo más común mediante el cual las células no excitables elevan sus niveles de Ca^{2+} citosólico ($[Ca^{2+}]i$) en respuesta a un estímulo extracelular.

El aumento de $[Ca^{2+}]i$ puede a continuación activar a varias cinasas y fosfatasas o modificar la actividad de diversos canales iónicos, para llevar a cabo alguna respuesta celular determinada. Para finalizar la señal de Ca^{2+}, este ha de volver a sus niveles basales, que son muy bajos en el citosol gracias a la actividad de diversas enzimas transportadoras de iones. Las ATPasas de Ca^{2+}, presentes en la membrana del ER (SERCAs por Sarco(Endo)plasmic Reticulum Calcium ATPase), bombean Ca^{2+} hacia el interior de los reservorios, mientras que las ATPasas de la membrana plasmática (PMCAs por Plasma Membrane Calcium ATPase) y el intercambiador Na^+/Ca^{2+} llevan el Ca^{2+} hacia el exterior celular. Algunas de las herramientas farmacológicas más utilizadas para estudiar los mecanismos de la entrada capacitativa, son los fármacos inhibidores de las SERCAs como la tapsigargina (Tg) o el ácido ciclopiazónico que producen un vaciamiento de reservorios del ER por salida pasiva de Ca^{2+} a favor de gradiente. También se utilizan ionóforos de Ca^{2+}, como la ionomicina, que pueden producir vaciamiento de reservorios o entrada no capacitativa al crear un entorno lipídico que permite el paso al ion en las membranas celulares.

Existen otros mecanismos de elevación de $[Ca^{2+}]i$ que han sido descritos en células eléctricamente excitables como fibras musculares y neuronas, algunos de los cuales también pueden ser importantes en células no excitables. Uno de estos mecanismos en la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VOC, de Voltage Operated Channels), que se abren en respuesta a una despolarización de la membrana, como la que ocurre cuando se transmite un impulso nervioso, por la apertura de canales de Na^+. Aunque se sabe que estos canales VOC son molecularmente distintos a los canales SOC de células no excitables, algunas de éstas últimas células, dentro de las que se incluyen los linfocitos B y T, expresan canales iónicos que presentan cierta similitud farmacológica y funcional con los VOCs (3, 61, 74, 141).

Existen también canales de Ca^{2+} intracelulares, muy similares a los IP_3R; los receptores de rianodina (RyRs) descritos por primera vez en el retículo sarcoplasmático del músculo esquelético. Pueden ser activados en respuesta a una despolarización de la membrana

plasmática, o a través de un nuevo segundo mensajero, la ADP-ribosa cíclica (ADPRc) (79). Se ha detectado la existencia de RyRs en células T humanas derivadas de una línea tumoral (células Jurkat). También se ha comprobado que la ADPRc puede producir liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares, y que la activación del TCR puede generar un aumento de los niveles citosólicos de ADPRc en éstas células (99, 100). Los mismos autores han sugerido que la señal de Ca^{2+} generada por el segundo mensajero ADPRc puede también estar constituida por un componente dependiente de la entrada de Ca^{2+} extracelular, análogo a la entrada capacitativa, pero a través de canales diferentes (98). En la figura 1.12 se presenta un esquema de los dos mecanismos, antes descritos, que pueden estar involucrados en la elevación del $[Ca^{2+}]i$ que ocurre en linfocitos, en respuesta a un estímulo externo: vaciamiento de reservorios sensibles a IP_3 y entrada capacitativa; y aumento de Ca^{2+} mediado por ADPRc.

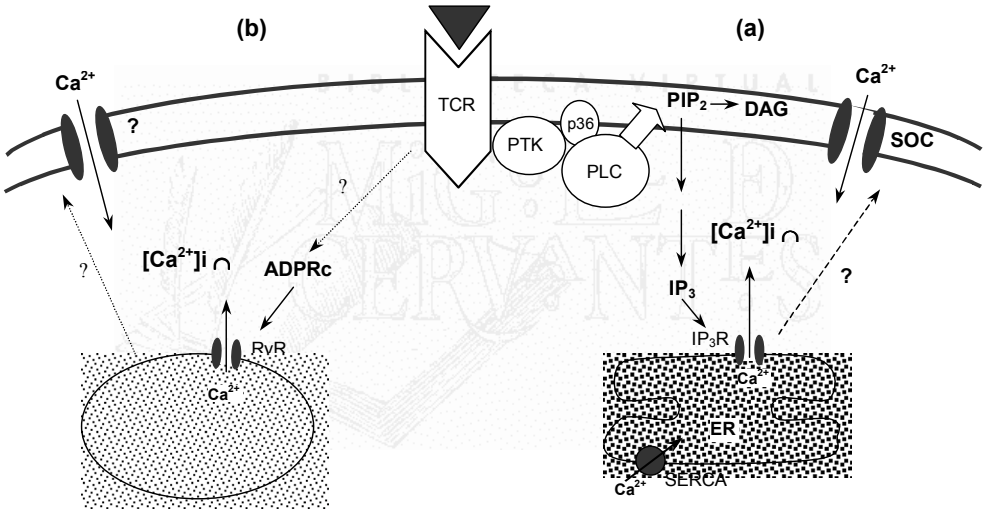


Figura 1.12. Mecanismos propuestos para explicar la elevación de $[Ca^{2+}]i$ producida en linfocitos T, en respuesta a la activación del TCR. **(a)** Vaciamiento de reservorios sensibles a IP_3 y entrada capacitaitva. **(b)** Aumento de $[Ca^{2+}]i$ dependiente de ADP-ribosa cíclica.

Otra característica de los RyRs es que, al igual que los IP_3Rs pueden ser activados por el Ca^{2+} liberado desde canales cercanos, a este proceso se le denomina CICR (de Calcium Induced-Calcium Release, es decir, liberación de calcio inducida por calcio) (23).

Por último, dependiendo de la intensidad del estímulo empleado para producir una elevación de $[Ca^{2+}]i$, ésta puede ocurrir en forma de oscilaciones. Una respuesta oscilatoria es común en células excitables, donde las oscilaciones están generadas por fluctuaciones rápidas del potencial de membrana. Sin embargo, en células no excitables los mecanismos que las producen aún no han sido bien caracterizados. Se ha propuesto que, al menos en ciertos modelos celulares, las oscilaciones de Ca^{2+} de células no excitables pueden ser producidas por entrada no capacitativa, dependiente de otro segundo mensajero, el ácido araquidónico (210, 211). La existencia de oscilaciones plantea la posibilidad de que algunas

respuestas a la señal de Ca^{2+} puedan ser dependientes de la frecuencia, y no sólo de la amplitud de la elevación (74). En linfocitos T se ha observado un comportamiento oscilatorio de la señal de Ca^{2+} en respuesta a la activación del TCR; y estas oscilaciones dependen de la entrada de Ca^{2+} extracelular (98).

1.3.2.2 AMP cíclico

Como ya se mencionó antes, la activación de proteínas G puede estimular (Gαs) o inhibir (Gαi) la actividad de la adenilato ciclasa (AC). Esta enzima sintetiza AMP cíclico (AMPc) a partir de ATP. El AMPc como mensajero intracelular, activa la cinasa de proteína dependiente de AMPc (PKA) la cual media casi todos los efectos de un aumento de los niveles citosólicos de AMPc ([AMPc]i), aunque se han descrito canales iónicos que pueden ser activados directamente por la unión de este segundo mensajero (62). El [AMPc]i se reduce gracias a la acción de las fosfodiesterasas (PDEs), una familia de enzimas que hidrolizan el AMPc transformándolo en 5'-AMP. Una representación esquemática de la ruta de síntesis y degradación de AMPc se muestra en la figura 1.13.

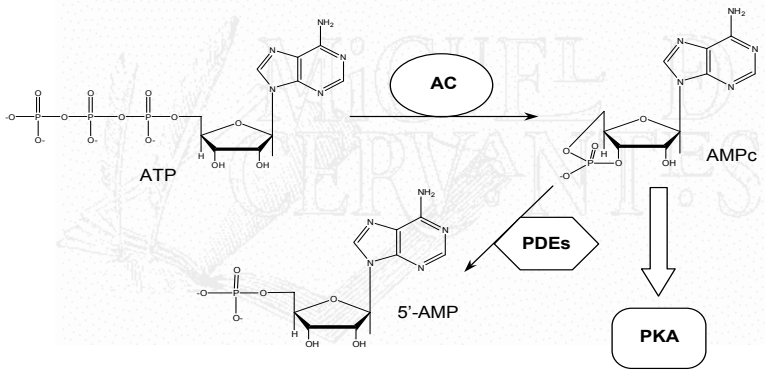


Figura 1.13. Síntesis y degradación del AMPc y activación de la cinasa de proteína dependiente de AMPc.

En linfocitos humanos el [AMPc]i se eleva en respuesta a ciertos agonistas no antigénicos, por ejemplo el isoproterenol, que se une a los receptores beta adrenérgicos (221), o la prostaglandina E2 (46). El aumento de AMPc generalmente produce una inhibición de la función y proliferación linfocitaria, a través de mecanismos que pueden involucrar interferencia con la señal de Ca^{2+} (118). Existen multitud de herramientas farmacológicas que se utilizan para modular los niveles citosólicos de AMPc. Los estimuladores de la AC, como la forskolina (FSK), e inhibidores de PDEs como IBMX, rolipram, milrinona o econazol, aumentan al [AMPc]i por mecanismos encontrados: aumento de su síntesis o disminución de su degradación. La inhibición de la AC con SQ22,526, por ejemplo, disminuye los niveles de AMPc. Existen también análogos del AMPc capaces de atravesar las membranas celulares. Por último, se puede modificar la actividad de la PKA, como se describirá más adelante.

1.3.3 Cinasas y fosfatasas de proteína

La modificación covalente de las enzimas, mediante la adición de un grupo fosfato a un residuo determinado de serina, treonina o tirosina puede alterar la conformación de la proteína, aumentando o inhibiendo su actividad; estos procesos de fosforilación son catalizados por enzimas denominadas cinasas de proteína. La eliminación posterior del grupo fosfato revierte eficientemente el efecto de la fosforilación y se consigue mediante una segunda enzima denominada fosfatasa de proteína. No es de extrañar, por tanto, que los procesos de fosforilación-desfosforilación estén involucrados en la regulación de casi todas las funciones celulares, y que todas las rutas de transducción de señales incidan en al menos una cinasa o fosfatasa de proteína (87).

1.3.3.1 Cinasas de tirosina

Aunque la mayoría de las fosforilaciones de proteínas ocurre sobre residuos de los aminoácidos serina o treonina, la fosforilación sobre residuos de tirosina es especialmente importante en la transducción de señales relacionadas con la proliferación celular. La mayoría de las proteínas con actividad tirosina-cinasa (PTKs) se encuentran asociadas a receptores de membrana que se activan por factores de crecimiento, es decir, señales que inducen la proliferación celular. Además existen algunas cinasas de tirosina que se localizan en el núcleo celular, donde desempeñan diversas funciones biológicas, como participación en los procesos de activación de la transcripción genética (253).

Las tirosina-cinasas asociadas a receptores de membrana a su vez se pueden dividir en dos grupos: las que forman parte integral del receptor, es decir, el dominio intracelular del receptor tiene actividad tirosina-cinasa; y las cinasas citoplasmáticas que se asocian de manera no covalente al receptor cuando este es activado (145). Los receptores para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o para la insulina son algunos ejemplos del primer grupo de tirosina-cinasas. Las tirosina-cinasas asociadas no covalentemente a receptores de membrana pertenecen a diversas familias de proteínas codificadas por oncogenes (Src, Syk, JAK/Tyk) (253). Las tirosina-cinasas $p59^{fyn}$, $p56^{lck}$ (de la familia Src) y ZAP-70 (de la familia Syk) están implicadas en la activación linfocitaria en respuesta a mitógenos. La unión del ligando al receptor TCR produce una activación de las cinasas Src que fosforilan al TCR, éste se une a la proteína ZAP-70 que también es fosforilada (42). Más recientemente se ha descrito una nueva familia de PTKs, las cinasas Tec, que son esenciales en los procesos de activación de linfocitos T y B (120, 129).

Las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina se unen fácilmente y activan a otras proteínas citoplasmáticas con funciones muy diversas (figura 1.14), por ejemplo la PLC, de la que hemos hablado anteriormente, la fosfatidil inositol 3-cinasa (PI-3K), que se describirá más adelante o las proteínas activadoras de la GTPasa $p21^{ras}$ (Grb2 y Sos) (39, 87, 145).

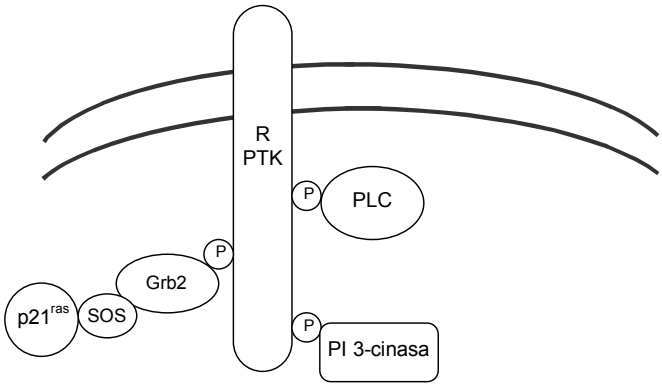


Figura 1.14. Activación de diversas enzimas implicadas en la transducción de señales intracelulares, mediante su interacción con un receptor de membrana con actividad tirosina-cinasa.

Los fármacos utilizados para inhibir tirosina-cinasas, como genisteína o lavendustina A tienen un efecto inespecífico sobre todas las PTKs.

1.3.3.2 Cinasas de serina/treonina

Hay un gran número de proteínas con actividad cinasa en residuos de serina/treonina y a su vez, este tipo de fosforilaciones afectan numerosas funciones celulares que van desde la proliferación y diferenciación celular hasta la muerte celular programada (apoptosis) (87). Las serina/treonina-cinasas son activadas por señales intracelulares diversas, como segundos mensajeros (Ca^{2+}, DAG, AMPc, GMPc) o fosforilaciones en residuos serina/treonina y tirosina. En este apartado describiremos unas cuantas cinasas que han sido mencionadas previamente y que están involucradas en múltiples rutas celulares de transducción.

A) PKC

Se ha descrito ya que la producción de DAG por la PLC activa la cinasa de proteína C (PKC), la cual puede ser también activada por un aumento de Ca^{2+} citosólico. Aunque originalmente se pensaba que esta enzima era siempre activada por Ca^{2+}, en la actualidad se sabe que hay al menos 9 isoformas de PKC, de las cuales sólo 3 son dependientes de este ion, mientras que otras 2 tampoco son activadas por DAG. Las isoformas α, β, γ δ, ε, η y σ son dependientes de DAG y también pueden ser activadas por los ésteres de forbol, de éstas, las tres primeras también son dependientes de Ca^{2+}. Las isoformas atípicas ζ y λ son insensibles al DAG. La mayoría de las células expresan varias isoformas de PKC y cada una de ellas puede fosforilar substratos muy diversos, probablemente dependiendo de su localización en compartimentos intracelulares (114). En linfocitos, las PKC dependientes de Ca^{2+} y DAG están involucradas en la trasducción de señales a través del TCR. Debido a que la mayoría de las isoformas de la PKC se activan con ésteres de forbol, como el

acetato de forbol-miristato (PMA o TPA), para distinguir la función de cada isoenzima es necesaria la utilización de inhibidores específicos para una u otra isoforma.

B) PKA

La cinasa activada por AMP cíclico (PKA) es un tetrámero compuesto por dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras, cada una de las cuales se liga a dos moléculas de nucleótido. Cuando esto ocurre, la holoenzima se disocia, dando lugar a la actividad cinasa de las dos subunidades catalíticas. Existen al menos dos isoformas de subunidad reguladora (RI y RII) y tres isoformas de subunidad catalítica (Cα, Cβ y Cγ) (75). Igual que la PKC, la PKA fosforila multitud de substratos. Como se mencionó antes, en linfocitos la PKA está relacionada con la inhibición de la respuesta celular a mitógenos; la isoenzima más importante en estas células es la PKARI (213, 233). Existen diversos fármacos que inhiben a la PKA mediante la interacción con cualquiera de sus subunidades, también se han sintetizado análogos del AMPc que activan específicamente a alguna isoforma de la PKA.

C) Cinasas dependientes de Ca^{2+}/Calmodulina (CaM cinasas)

Como se mencionó antes, el ion Ca^{2+} generalmente participa en los mecanismos de transducción de señales que regulan las funciones celulares, mediante la activación de diversas cinasas. Esta activación se lleva a cabo mediante la unión no covalente de iones Ca^{2+} a una proteína citoplasmática llamada calmodulina, el complejo formado por la unión de Ca^{2+}-calmodulina (CaM) se une a diversas cinasas (o fosfatasas) activándolas. Algunas CaM cinasas tienen una actividad muy específica como la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) que se expresa exclusivamente en el músculo liso. Otras CaM cinasas, sin embargo, están presentes en numerosos tipos celulares y, como las cinasas PKA y PKC, participan en múltiples procesos; estas cinasas son CaM cinasas Ia, Ib, II y IV (201). En células T, la CaM cinasa IV se activa en respuesta al aumento de $[Ca^{2+}]i$ producido por la unión de un ligando al TCR; esta cinasa fosforila una proteína nuclear, contribuyendo a la transcripción del gen de la IL-2 (18).

1.3.3.3 Fosfatasas de proteína

El estado de fosforilación de las proteínas citosólicas esta regulado por la actividad tanto de las cinasas como de las fosfatasas, por lo que muchas rutas de transducción pueden ser dependientes de estas últimas. Existen fosfatasas que actúan sobre residuos de tirosina, fosfatasas que actúan sobre residuos serina o treonina y también fosfatasas que pueden desfosforilar ambos substratos (252).

A) Fosfatasas de tirosina

El estudio de las fosfatasas de tirosina es un área relativamente nueva, ya que la identidad molecular de la primera enzima perteneciente a esta familia no se identificó sino hasta 1988. Existen dos clases de tirosina-fosfatasas (PTPasas): las citoplasmáticas y las que están asociadas a receptores de membrana (252). Una de estas últimas PTPasas, la

proteína de membrana CD45, es muy importante en la activación de linfocitos T. La fosfatasa CD45 desfosforila a las tirosina-cinasas Lyn y Lck (ver sección 1.3.3.1), en un residuo de tirosina que, cuando está fosforilado, puede inhibir la actividad cinasa de ambas proteínas (42). De esta forma, la PTPasa CD45 tiene un efecto estimulante sobre la proliferación celular y función efectora de las células T. Existen muchas otras PTPasas importantes en la transducción de señales en linfocitos, por ejemplo, la fosfatasa citoplasmática SHP-1 de linfocitos B, que se asocia a los receptores inhibitorios de estas células (222).

B) Fosfatasas de serina/treonina

Existen 4 enzimas que se cree catalizan la mayoría de las reacciones de desfosforilación de proteínas en residuos serina/treonina, aunque recientemente se han caracterizado nuevas ser/tre-fosfatas cuya importancia en los procesos de señalización intracelular aún no se ha estudiado. Las 4 principales ser/tre-fosfatasas están codificadas por 2 familias de genes. PP1, PP2A y PP2B (o calcineurina) pertenecen a la familia PPP, son multiméricas y es posible que las proteínas accesorias sean las que confieren la especificidad por ciertos substratos a las subunidades catalíticas. La PP2C es un monómero de la familia PPM y su actividad es dependiente de Mg^{2+} (106). La toxina marina ácido ocadaico (AO), que será estudiada en esta tesis, es un potente inhibidor de fosfatasas de la familia PPP especialmente de la PP2A y en menor medida de la PP1. La PP2B puede ser inhibida por concentraciones mucho mayores de AO (25).

La fosfatasa PP2A está implicada en la regulación de la mayoría de las rutas metabólicas celulares, así como en los mecanismos de transcripción genética y control del ciclo celular, de la mayoría de las células eucariotas; y puede funcionar como promotora o supresora tumoral, dependiendo del modelo celular (248). Por lo tanto, el AO puede modificar procesos celulares muy diversos, y como ya se ha dicho antes, además de producir diarrea y alteraciones gastrointestinales, es un potente promotor de tumores e inhibidor de la apoptosis en diversos modelos celulares, incluyendo linfocitos T (77, 215, 258) mientras que, en otras células puede actuar como estimulador de este proceso de muerte celular (137, 153, 162).

En linfocitos, la fosfatasa PP2B, dependiente de CaM es una enzima clave en la transducción de señales desde el TCR hasta el núcleo celular, a través de su participación en la inducción de factores que regulan la transcripción genética (39). La PP2A también participa en los procesos de proliferación y maduración celular de linfocitos humanos (151, 186) aunque los mecanismos por los que lo hace aún no se conocen por completo. Recientemente se ha descrito la existencia de un complejo enzimático formado por la CaM cinasa IV y la PP2A en el cual, la fosfatasa es responsable de regular la actividad de la cinasa (259). Como se ha indicado antes, la CaM cinasa IV juega un papel importante en los mecanismos de activación linfocitaria a través del TCR.

1.3.4 Fosfatidil inositol 3-cinasa (PI 3-cinasa, PI 3-K)

Esta enzima fosforila el carbono 3 del anillo del fosfatidil inositol. Dos de los cuatro productos de la PI 3-cinasa que han sido detectados *in vivo*, poseen actividad como segundos mensajeros en diversos modelos celulares, incluyendo linfocitos. Estos dos productos son el fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3) y el fosfatidil inositol 3,4-bifosfato ($PI3,4P_2$), generados a partir del fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP_2, el mismo sustrato sobre el que actúa la PLC), y del fosfatidil inositol 4-fosfato (PI4P), respectivamente. En la figura 1.15 se muestra una representación esquemática de la generación de ambos productos. Alguna PI3-cinasas también poseen actividad como cinasas de proteína (218).

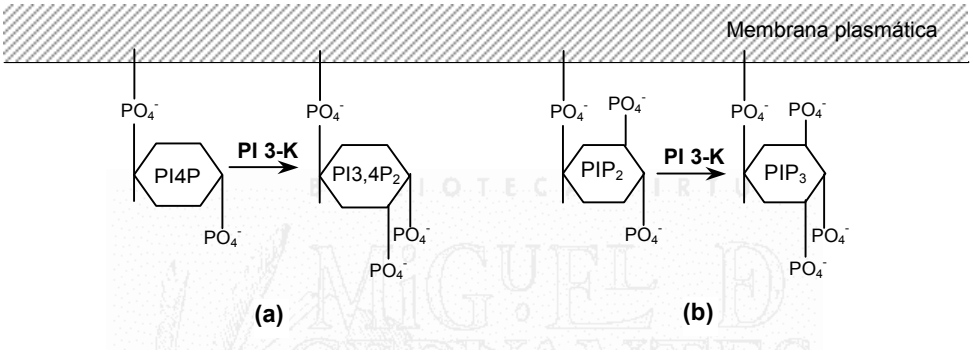


Figura 1.15 Reacciones catalizadas por la fosfatidil inositol 3-cinasa (IP 3-K), con relevancia para los mecanismos de transducción de señales. **(a)** Fosforilación del fosfatidil inositol 4-fosfato para generar PI 3,4-bifosfato. **(b)** Fosforilación del fosfatidil inositol 4,5-bifosfato, para generar PI 3,4,5-trifosfato

La PI 3-cinasa se activa, generalmente, a través de receptores asociados a tirosina-cinasas, ya sea por asociación directa de la PI3-K con el receptor (figura 1.14), o con la PTK asociada a receptor; o bien, a través de la GTPasa ras ($p21^{ras}$) (145). En linfocitos T, la PI3-K puede ser activada a través del TCR o de la proteína de membrana conocida como CD28 (39). Asimismo, en células B, esta cinasa es activada a través del receptor antigénico y constituye un mecanismo importante dentro de la transducción de señales de activación (12, 35, 245). Los productos de la PI 3-cinasa pueden actuar sobre algunas cinasas intracelulares (PK1, PK2, PKB, o Bruton's kinase en linfocitos B) que a su vez modifican procesos como la proliferación celular, transporte de glucosa o exocitosis, aunque aún faltan por conocer muchos detalles sobre las rutas de transducción que dan lugar a estos procesos (87, 145). Los fármacos wortmanina y LY2940002 se utilizan para inhibir a la PI 3-cinasa de manera específica.

1.4 Transporte de iones a través de las membranas celulares: Mecanismos reguladores del pH citosólico.

Hasta ahora hemos descrito algunos de los mecanismos mediante los cuales las células reciben y transmiten señales que las hacen modificar su actividad y llevar a cabo diversas funciones. Como hemos visto, muchas de estas señales de transducción tienen como

objetivo modificar la actividad de diversos canales iónicos. También se ha mencionado la existencia e importancia de canales permeables a iones Na^+ y Ca^{2+}, que participan en los procesos de transducción de señales. Sin embargo, la composición iónica del citosol y del entorno celular es mucho más compleja y la mayoría los iones presentes en ambos entornos pueden llegar a ser importantes para el funcionamiento de la célula. Por ejemplo, la concentración de iones H^+ en el citosol es determinante para casi todas las funciones celulares, pues influye en la actividad de numerosas enzimas y canales iónicos así como en los procesos de síntesis de ADN y ARN (144). Por otro lado, los iones K^+, Na^+ y Cl^- determinan los movimientos de agua a través de las membranas plasmáticas, por lo que son indispensables para la regulación del volumen celular, y para el funcionamiento de células y tejidos especializados (219). La diferente distribución de estos iones a ambos lados de las membranas celulares es también la responsable de la generación, mantenimiento y modificación del potencial de membrana.

Como los iones no son capaces de atravesar por sí mismos las membranas celulares, las células poseen diversas proteínas de membrana encargadas de llevar a cabo este proceso. A continuación se describen brevemente algunos de los mecanismos que utilizan las células para transportar iones a través de sus membranas, centrándonos en los mecanismos involucrados en la regulación del pH intracelular (pHi).

Las células mantienen una concentración intracelular de iones H^+ menor a la esperada según el equilibrio electroquímico de dicho ion a ambos lados de la membrana plasmática; además las células deben contrarrestar el efecto acidificante del metabolismo (190). Esto lo consiguen mediante el funcionamiento de diversos transportadores iónicos que movilizan iones H^+ o HCO_3^- en contra de su gradiente electroquímico, alcalinizando el citosol; además, como se describirá más adelante existen también transportadores iónicos cuya función es acidificar el citosol celular.

1.4.1 Intercambiador Na^+/H^+

Este es el mecanismo de regulación del pHi más estudiado, y se sabe que la proteína intercambiadora se expresa en la gran mayoría de las células eucariotas (159). El intercambiador Na^+/H^+ (NHE, de Na^+/H^+ Exchanger) utiliza el gradiente electroquímico del ion Na^+, generado por la bomba ATPasa de Na^+/K^+, para extraer H^+ del citosol celular, por lo que alcaliniza éste último (figura 1.16). Como intercambia 1 Na^+ extracelular por 1 H^+ intracelular, el NHE es electroneutro, es decir, no modifica el potencial eléctrico de la membrana plasmática (237).

En células de mamíferos, existen al menos 5 isoformas de NHEs, algunas de estas isoformas (NHE2-4) se expresan solamente en células de epiteliales de riñón, intestino o estómago, donde participan activamente en la absorción de iones. El NHE1, en cambio, se expresa en la mayoría de las células y es el principal responsable de la regulación del pH y volumen intracelulares (159). El diurético amilorida y sus análogos se utilizan para inhibir los NHEs, siendo la isoforma NHE1 la más sensible a este fármaco.

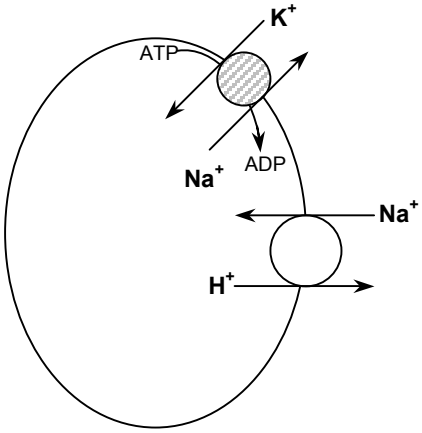


Figura 1.16 Funcionamiento del intercambiador Na^+/H^+ y mantenimiento del gradiente electroquímico de Na^+ gracias a la acción de la ATPasa de Na^+/K^+.

En linfocitos humanos se ha detectado la existencia del NHE1 (212). El intercambiador Na^+/H^+ de células linfoides se activa en respuesta a mitógenos y activadores de la PKC, sin embargo, esta activación no parece ser necesaria para la continuidad de la respuesta celular (92).

La actividad de todos los intercambiadores Na^+/H^+ es dependiente de la concentración intracelular de H^+ (se activan cuando desciende el pHi) y se modifica en respuesta a diversos estímulos extracelulares; sin embargo, las rutas de transducción que modulan la actividad de los NHEs son diferentes para cada isoforma. El NHE1 se activa en respuesta a diversos factores de crecimiento y esta activación puede estar mediada por fosforilación del intercambiador y de una proteína accesoria, así como por interacción del intercambiador con el complejo Ca^{2+}-calmodulina (CaM). La interacción del NHE1 con proteínas estructurales, relacionadas con el citoesqueleto, también modifica su actividad (159). Asimismo, la PI 3-cinasa también puede estar implicada en la activación del NHE1 por factores de crecimiento (143). Por último, fármacos que activan a la cinasa de proteína C y A o que inhiben fosfatasas de serina/treonina, estimulan la actividad del intercambiador NHE1 (14, 26, 90, 119, 166, 197).

1.4.2 Transportadores de HCO_3^-

El sistema CO_2/HCO_3^- representa el principal mecanismo tampón de los fluidos biológicos, a través de las siguientes reacciones:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+ \qquad \text{Ecuación 1.1}$$

Por lo tanto, la modificación de la concentración intracelular del ion HCO_3^-, que puede ser activamente transportado, da como resultado la modificación del pHi. La familia de transportadores de HCO_3^- incluye a los intercambiadores Cl^-/HCO_3^- dependientes e independientes de Na^+ y a los cotransportadores Na^+-HCO_3^-. A pesar de que el transporte

de HCO_3^- es, como el intercambio Na^+/H^+, un fenómeno común a la mayoría de las células eucariotas; la naturaleza de los transportadores de membrana que llevan a cabo este proceso varía en los diferentes tipos celulares.

1.4.2.1 Intercambiadores Cl^-/HCO_3^-

Existen dos tipos de intercambiadores Cl^-/HCO_3^-, el intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+, o intercambiador aniónico (AE, de Anion Exchanger), identificado y clonado por primera vez en eritrocitos, donde juega un papel importante en el transporte de CO_2; y el intercambiador Cl^-/HCO_3^- dependiente de Na+, cuya identidad molecular ha sido recientemente caracterizada (189). Ambos tipos de intercambio Cl^-/HCO_3^- han sido descritos en gran número de células animales, en las que participan en los mecanismos de mantenimiento del pH, volumen y concentración de Cl^- intracelulares (6).

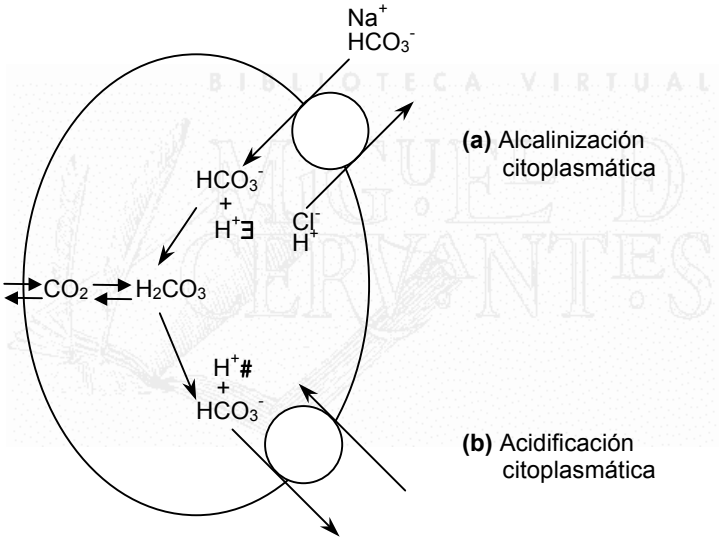


Figura 1.17 Funcionamiento de los intercambiadores Cl^-/HCO_3^- **(a)** El intercambiador Cl^-/HCO_3^- dependiente de Na^+ introduce HCO_3^- al citosol celular, este ion, al combinarse con iones H^+ intracelulares alcaliniza el pHi. **(b)** El intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+ extrae HCO_3^- del citosol, con lo cual libera iones H^+, acidificando el interior celular.

Existen al menos tres isoformas de intercambiadores aniónicos (AE1-3), éstos utilizan el gradiente de Cl^- hacia el interior celular para extraer HCO_3^-; por lo tanto, son los principales encargados de acidificar el citosol. En cambio el intercambiador Cl^-/HCO_3^- dependiente de Na^+ utiliza el gradiente de este último ion para introducir HCO_3^- y extraer Cl^-, por lo que, al igual que los NHEs, alcaliniza el citosol celular. En la figura 1.17 se presenta un esquema que ilustra el funcionamiento del intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente (AE) y dependiente de Na^+. Ambos tipos de intercambiadores son electroneutros e inhibidos por los estilbenos DIDS y SITS (6).

La actividad de estos intercambiadores, es dependiente de la concentración de iones H^+; como en el caso del intercambiador Na^+/H^+, el intercambiador Cl^-/HCO_3^- dependiente de Na^+ se activa cuando el pHi disminuye, mientras que el intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+ es más activo a pHi alcalino. Por tal motivo, se ha sugerido que el funcionamiento coordinado de ambos intercambiadores Cl^-/HCO_3^- puede constituir el principal mecanismo, mediante el cual las células regulan su pHi basal (127, 232), sin embargo, no todas las células estudiadas hasta la fecha han demostrado poseer actividad de ambos sistemas transportadores (24, 130, 134, 250). La actividad de los intercambiadores Cl^-/HCO_3^- también puede ser modulada por diversas señales extracelulares, sin embargo, los mecanismos de transducción que pueden estar implicados en esta modulación han sido poco estudiados (6, 8).

1.4.2.2 Cotransportadores Na^+-HCO_3^-

El primero de esta familia de transportadores de HCO_3^- fue descrito en células renales del túbulo proximal (29). A diferencia de los intercambiadores Cl^-/HCO_3^- los cotransportadores Na^+-HCO_3^- son electrogénicos e independientes de Cl^-; sin embargo, al igual que los primeros, son inhibibles por DIDS y SITS (188).

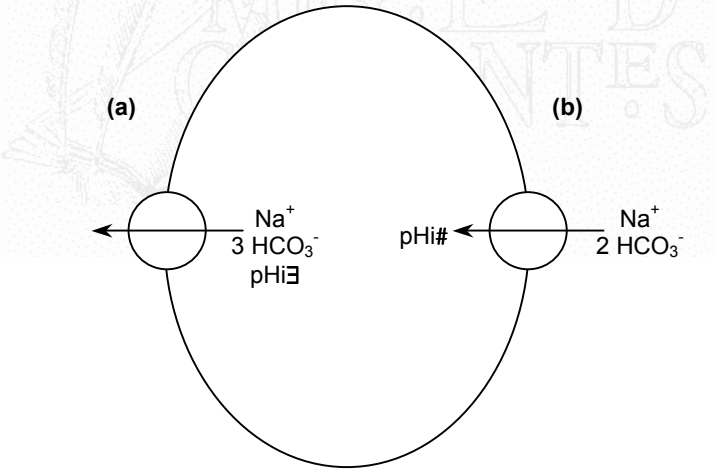


Figura 1.18 Mecanismos de cotransporte de Na^+-HCO_3^-. **(a)** El cotransportador con estequiometría 1:3, generalmente extrae ambos iones del citosol, por lo que provoca una acidificación celular. **(b)** El cotransportador 1:2 funciona alcalinizando el citosol celular mediante la introducción de HCO_3^-.

El cotransportador Na^+-HCO_3^- de células renales tiene una estequiometría de 1:3 (Na^+:HCO_3^-); es el principal mecanismo responsable de la reabsorción de iones Na^+ y HCO_3^-, ya que transporta ambos iones desde interior de las células renales, hacia la sangre, por lo tanto acidifica el citosol celular aunque no sea esa su función esencial (30). Por otro lado, cotransportadores Na^+-HCO_3^- que alcalinizan el citosol celular y probablemente tienen una estequiometría 1:2 se han descrito en células de diversos tejidos

(24, 84, 130, 150, 188). También se han descrito cotransportadores Na^+-HCO_3^-, con estequiometría 1:3, que alcalinizan el interior celular (34, 188). La figura 1.18 muestra un esquema de los mecanismos de cotransporte de Na^+ y HCO_3^-.

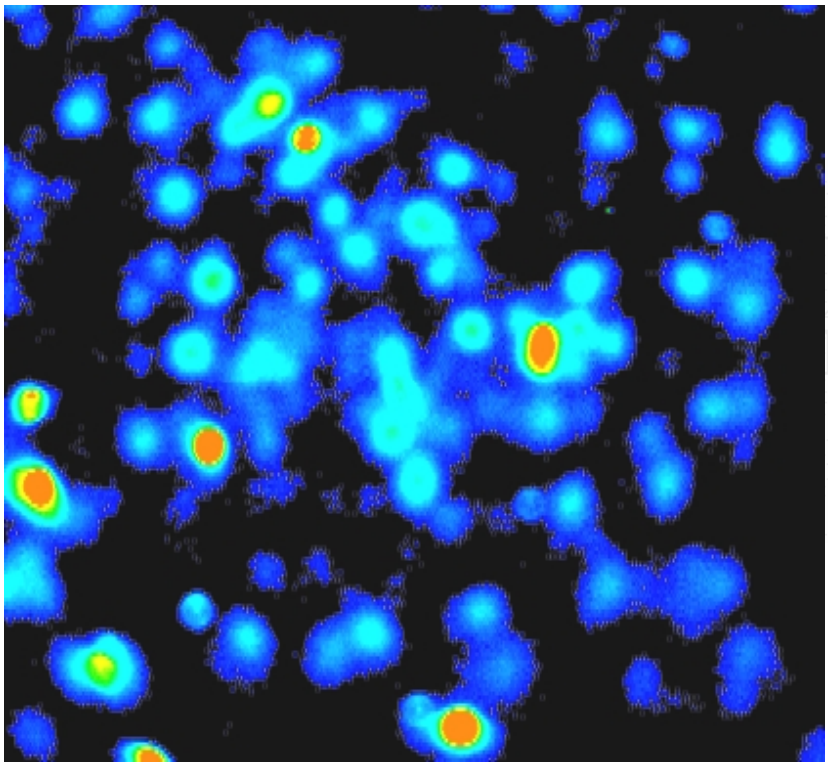
Recientemente se han clonado varias proteínas cotransportadoras de Na^+ y HCO_3^- de diversos tejidos humanos y animales (30, 36, 188), sin embargo, la caracterización funcional de dichas proteínas aún es incompleta. Del mismo modo, los mecanismos reguladores del cotransporte Na^+-HCO_3^- son poco conocidos; sin embargo, se sabe que las proteínas transportadoras pueden ser fosforiladas por PKA y PKC (188); y su actividad modulada por factores extracelulares que podrían actuar a través de cualquiera de estas rutas de transducción (7, 192, 193) así como de las PTKs (194).

En linfocitos de rata se ha descrito un intercambiador Cl^-/HCO_3^- que participa en los procesos de regulación del volumen celular (93). Sin embargo, hasta hace relativamente poco tiempo, los estudios realizados sobre regulación del pHi en linfocitos humanos sólo habían tenido en cuenta al intercambiador Na^+/H^+, por lo que se llevaban a cabo en medios que no contenían el ion HCO_3^-. Más recientemente, se ha observado que los transportadores de HCO_3^- de células linfoides pueden estar implicados en algunas alteraciones patológicas y procesos celulares fisiológicos, como la apoptosis (184, 226, 235).

1.4.3 ATPasas de H^+

Utilizan la hidrólisis del ATP para transportar iones H^+, en contra de su gradiente electroquímico, hacia el exterior celular, o hacia el interior de organelos celulares, por lo que alcalinizan el citosol. Como son electrogénicas, suelen estar acopladas en paralelo a canales aniónicos o en antiparalelo a canales de K^+, para evitar una hiperpolarización intracelular (107, 144). Participan en los procesos de secreción de ácido, así como en la regulación del pHi en algunos tipos de células (71, 144).

Objetivo



Linfocitos cargados con Fura2
λ_{exc} 380 nm; λ_{em} 520 nm
Línea basal exp. con AZ

Uno de los mayores problemas que plantean en la actualidad las ficotoxinas marinas de tipo diarreico, es que su mecanismo de toxicidad se desconoce, aunque en algunos casos, como es el del ácido ocadaico, se conocen bien las características de su interacción bioquímica. En otros casos, como la yessotoxina, la maitotoxina o el azaspirácido, incluso la diana bioquímica se desconoce. La consecuencia de este vacío de conocimiento es que no hay criterios científicos para establecer límites de toxicidad, o de tiempo de observación, para los bioensayos, y que no hay técnicas alternativas al bioensayo que valoren la actividad de las toxinas.

En la presente tesis se estudiarán los mecanismos de acción, en células humanas, de ficotoxinas marinas del grupo DSP y asociadas. Los beneficios de este estudio so dos: conocer la acción de las toxinas, y disponer de criterios funcionales para desarrollar nuevas técnicas de detección in vitro que se basen en su mecanismo de acción. Para tal propósito, se utilizará como modelo celular linfocitos humanos obtenidos de donantes sanos. Este modelo tiene la ventaja de que elimina la extrapolación de información obtenida a partir de un animal a humanos.

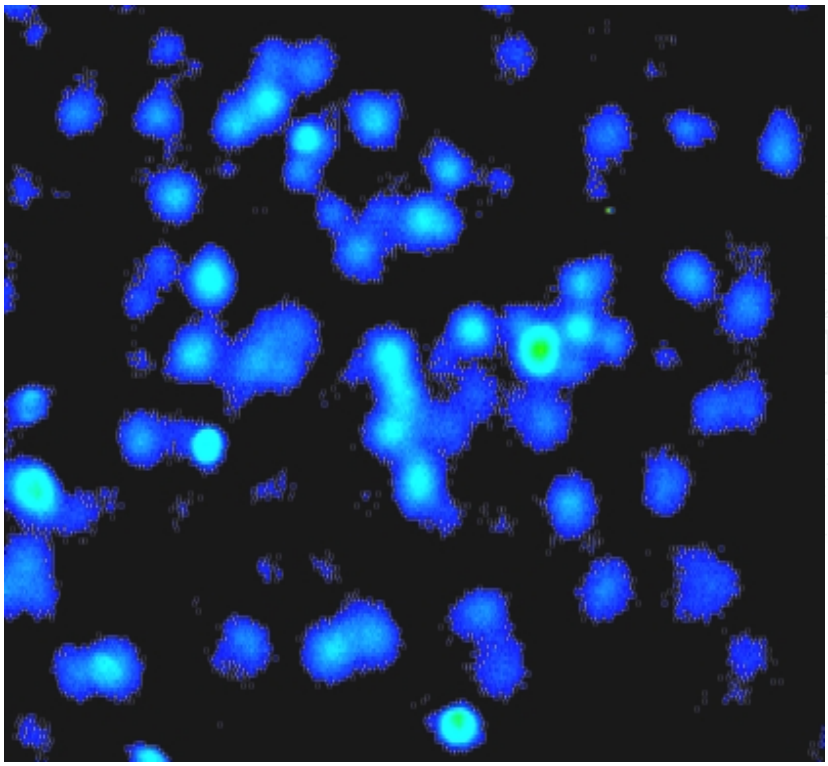
En primer lugar se estudiará el efecto de la toxina ácido ocadaico, sobre la actividad de transportadores iónicos de la membrana plasmática, involucrados en la regulación del pHi de linfocitos humanos; ya que estos mismos transportadores regulan el movimiento de iones que pueden estar implicados en las alteraciones diarreicas. La actividad de los transportadores será determinada a partir de mediciones del pH intracelular, mediante el uso de técnicas de fluorescencia.

Asimismo, se llevaran a cabo estudios básicos sobre los mecanismos de acción de una toxina asociada a DSP, no productora de diarrea, y cuyo efecto en células humanas es completamente desconocido. Estos estudios emplearán el mismo modelo celular y las mismas técnicas que los anteriores, la toxina estudiada será la yessotoxina y se analizarán, por técnicas de fluorescencia, tanto la señal intracelular de Ca^{2+},como la regulación del pHi.

También se realizarán algunos estudios sobre la acción de la maitotoxina, toxina asociada a la ciguatera, que produce entrada de Ca^{2+} a través de mecanismos aún desconocidos. Finalmente se desarrollarán estudios preliminares sobre el mecanismo de acción de otro tipo de toxinas que fueron aisladas en asociación con DSP, pero que ya han sido catalogadas como un nuevo grupo: azaspirácido y derivados (toxinas AZP).

Los estudios con maitotoxina se encaminarán hacia el análisis de la modulación de señal de Ca^{2+}, mientras que en el caso del azaspirácido se estudiará tanto el Ca^{2+} como el pH intracelulares.

Material y métodos



Linfocitos cargados con Fura2
λ_{exc} 340 nm; λ_{em} 520 nm
AZ sin Calcio

3.1 Reactivos y medios

A) Reactivos.

Para la purificación de linfocitos se utilizaron Percoll® y Ficoll-Hypaque® de Pharmacia (España).

Para la determinación de la concentración intracelular de iones H^+ y Ca^{2+}, así como del potencial de membrana se utilizaron los indicadores fluorescentes: BCECF-AM [2',7'-bis(carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceína éster acetoximetilo], Fura2-AM y bis-oxonol [bis-(1,3-ácidodietiltiobarbitúrico)trimetina oxonol], respectivamente. Todos ellos fueron comprados a Molecular Probes (Holanda).

Las ficotoxinas marinas utilizadas a lo largo de este trabajo fueron: ácido ocadaico (ácido libre), de LC Laboratories/Alexis (Suiza); yessotoxina, de ESR (Institute of Environmental Science and Research Limited, Nueva Zelanda); maitotoxina, donada por el profesor T. Yasumoto de Japan Food Research Laboratories (Japón) y azaspirácido, donado por el profesor K. J. James de Cork Institute of Technology (Irlanda).

Los fármacos utilizados para manipular las señales intracelulares de transducción fueron:

Amilorida, dibutiril AMP cíclico, DIDS (4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-ácidodisulfónico), colchicina, gramicidina, nigericina, nifedipina nitrendipina, toxina colérica, TPA (forbol 12-miristato 13-acetato), veratridina y wortmanina de Sigma (USA). Cloruro de cheleritrina, genisteína, GF109203X (bisindolilmaleimida I), forskolina, H89 (N-[2-(p-bromocinamilamino)etil]-5-isoquinolinosulfonamida.2HCl), ionomicina, SKF 96365 (1-[β-[3-(4-metoxifenil)propoxil]-4-metoxifenil]-1H-imidazol.HCl), SQ22,536 (9-(tetrahidro-2-furanil)-9-H-purina-6-amina) y tapsigargina de Alexis (Suiza).

Los fármacos y toxinas hidrosolubles se disolvieron en H_2O destilada, el resto se disolvió en DMSO o etanol (nigericina y gramicidina), de manera que la concentración de disolvente, en contacto con las células, no superara nunca el 0,01%. El ácido ocadaico se disolvió en DMSO:H_2O 80:20.

Las sales y reactivos utilizados para la preparación de los medios se compraron a diversas casas comerciales, siendo todos ellos de la mayor pureza existente.

B) Composición iónica de los medios

Para la purificación de linfocitos se utilizaron dos tipos de medios:

Medio de purificación 1: NaCl 125 mM; KCl 0,5 mM; $MgCl_2$ 0,1 mM; glucosa 0,5 mM y TRIZMA base 14.5 mM; heparina **4** unidades/ml. El pH ajustado a 7,6 con HCl 1N. PBS + EDTA: NaCl 137 mM; Na_2HPO_4 8.2 mM; KH_2PO_4 1.5 mM; KCl 3.2 mM y EDTA 2 mM. El pH ajustado a 7.4 con NaOH 1N.

Para los experimentos de regulación del pHi se utilizaron medios con una composición iónica modificada a partir de un medio base:

Medio base tamponado con HEPES (sin HCO_3^-): NaCl 140 mM; KCl 14 mM; $MgCl_2$ 1 mM; $CaCl_2$ 1 mM; HEPES 10 mM y glucosa 10 mM. Medio sin Na^+: el NaCl se reemplaza por cloruro de colina. Medio con HCO_3^-: NaCl 118 mM; $NaHCO_3^-$ 22 mM; los demás componentes mantienen su concentración. Medio sin Na^+, con HCO_3^-: el NaCl se sustituye con cloruro de colina y el $NaHCO_3$ por $KHCO_3$. Medio sin Cl^- (Gluconato): Todos los cloruros se reemplazan por sales del ácido glucónico, excepto el $MgCl_2$, que es reemplazado por $MgSO_4$. Medio sin Cl^- y sin Na^+ (Manitol): El NaCl es sustituido por manitol (el doble de concentrado), el resto de los iones se conservan igual que en el medio con gluconato. Estos dos últimos medios pueden contener o no HCO_3^-. Medio rico en K^+ (utilizado para la calibración): KCl 141 mM; $MgCl_2$ 1 mM; $CaCl_2$ 1 mM; HEPES 20 mM; y glucosa 10 mM.

Los experimentos de modulación de la señal de Ca^{2+} se realizaron en una disolución salina fisiológica (medio Umbreit), excepto cuando se especifique lo contrario. El medio Umbreit contiene los siguientes iones: Na^+ 142,3 mM; K^+ 5,94 mM; Ca^{2+} 1 mM; Mg^{2+} 1,2 mM; Cl^- 126,1 mM; HCO_3^- 22,85 mM; $PO_4H_2^-$ 1,2 mM y SO_4^- 1,2 mM; también se le agregó glucosa 1mg/ml y, cuando se especifica, albúmina bovina (BSA), a la misma concentración.

Todos los medios poseen una presión osmótica de 290 ± 10 mOsm. El pH se ajustó a 7,4 o 7,2, dependiendo del experimento, con los ácidos o bases concentrados correspondientes para no modificar la composición iónica del medio; los medios que contenían HCO_3^- se ajustaron mediante burbujeo de CO_2 al 5 ó 20%.

Los experimentos con células de neuroblastoma se realizaron en el siguiente medio: Medio con Na^+ para neuroblastoma: NaCl 137 mM; KCl 5 mM; $CaCl_2$ 1 mM; $MgCl_2$ 1,2 mM; KH_2PO_4 0,88 mM; $NaHCO_3$ 16,8 mM y glucosa 10 mM.

3.2 Células

3.2.1 Obtención y purificación de linfocitos humanos

Los linfocitos fueron obtenidos de sangre de donantes sanos, proporcionada por el Banco de Sangre de Galicia, a través del Servicio de Hematología del Hospital General de Lugo.

A) Purificación a partir de bolsas de concentrado de células sanguíneas

Durante la primera parte de este trabajo, los linfocitos se purificaron a partir de bolsas de concentrado de células sanguíneas (en inglés “buffy coats”). La purificación se llevó a cabo mediante la técnica de centrifugación a través de un gradiente de densidades. Se utilizaron dos reactivos con este fin, el Ficoll-Hypaque® diseñado especialmente para la purificación de linfocitos y el Percoll® que es utilizado para separar, por este método, diversos tipos de células, como mastocitos (38).

Protocolo de purificación con Ficoll-Hypaque®: 1) Diluir el concentrado celular en medio de purificación 1 (dilución 1:2). 2) Desfibrinar mediante agitación con bolas de vidrio (1 bola

por ml de dilución, 30 minutos). 3) Eliminar el exceso de plaquetas del concentrado celular, mediante 3 lavados sucesivos, rediluyendo con medio de purificación (llevar 16 ml de sangre diluida hasta 25) y centrifugando a baja velocidad (700 r.p.m., 20 minutos). 4) Colocar cuidadosamente 4 ml de sangre (dilución original 1:2) sobre 2,5 o 3 ml de Ficoll comercial. 5) Centrifugar a temperatura ambiente, 40 minutos a 2300 r.p.m. (100 g). 6) Retirar y desechar el sobrenadante, que contiene plasma y plaquetas. Conservar la capa de células que se ha depositado sobre el reactivo de separación, ya que ésta contiene los linfocitos purificados. Desechar el pellet, que contiene eritrocitos y granulocitos, que lograron atravesar la capa de Ficoll. 7) Lavar los linfocitos 2 veces, con medio de purificación con heparina, centrifugando a 1500 r.p.m., 8 minutos. Protocolo de purificación con Percoll® : En este caso primero fue necesario ajustar la densidad del Percoll® , para que fuera similar a la del Ficoll® y, por lo tanto, a la de los linfocitos. Esto se logró mediante una dilución de percoll isotónico en medio de purificación (57,5% percoll). El percoll isotónico se prepara mediante una mezcla 9:1 de Percoll® comercial y medio Umbreit 10X (sin Ca^{2+} ni glucosa). El protocolo de purificación de linfocitos es igual al descrito para el Ficoll®, excepto que no es necesario desfibrinar la sangre y el medio de purificación debe contener siempre anticoagulante (heparina). Una vez purificados, los linfocitos se pueden conservar hasta 24 horas, a 4°C, resuspendidos en medio Umbreit con BSA.

Las células purificadas se contaron mediante un contador de células sanguíneas modelo System 9000 Coulter Counter (Menarini Diagnóstico Spain). Mediante ambos protocolos, la pureza media de los linfocitos fue siempre superior al 70%.

B) Purificación de sangre recién extraída

Debido a que la purificación de bolsas de concentrado presentaba en ocasiones dificultades debido a que eran células inestables, se decidió utilizar sangre recién extraída. En este caso, el protocolo de purificación se simplificó, puesto que no fue necesario eliminar las plaquetas, además, todas las purificaciones se llevaron a cabo con Percoll® y la pureza de los linfocitos fue siempre superior al 80%.

Protocolo de purificación de sangre recién extraída: 1) Diluir la sangre en PBS con EDTA (1:1). 2) Colocar cuidadosamente 4 ml de dilución sobre 3 ml de percoll 57,5%. 3) Centrifugar a temperatura ambiente 25 minutos a 2500 r.p.m. 4) Retirar el sobrenadante y conservar la capa de linfocitos, depositada sobre el Percoll®. 5) Lavar 2 veces con PBS con EDTA, centrifugando a 1500 r.p.m., 8 minutos. Los linfocitos así purificados también se pueden conservar hasta 24 horas en Umbreit con BSA a 4°C, aunque la mayoría de los experimentos con estas células se realizaron 2-3 horas después de la purificación.

3.2.2 Células de neuroblastoma humano

Se utilizó la línea celular BE(2)-M17, aislada a partir de SK-N-BE(2) (ECACCC No. 95011815). Las células fueron mantenidas en 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con glutamina 200 mM, $NaHCO_3$ 7,5%, penicilina/estreptomicina 5000UIml^{-1} / 5000 μgml^{-1} y suero fetal bovino (FBS) 10%; en una incubadora NuAire (USA) modelo

NU4500 a 37°C y una atmósfera controlada con CO_2 al 5%. El medio de cultivo era renovado cada 48 horas y las células rediluídas (1:5) y resembradas, separándolas del fondo de la caja de cultivo con tripsina-EDTA, cada semana. Para los experimentos, las células de 1 semana eran desprendidas del fondo mediante una espátula, centrifugadas y resuspendidas en medio con Na^+ para neuroblastoma, justo antes de comenzar el experimento.

3.3 Determinación de la concentración intracelular de iones y del potencial de membrana, mediante el uso de indicadores fluorescentes

A) Determinación de pH intracelular (pHi)

El pH citosólico se determinó mediante el uso del indicador, permeable a la membrana celular, BCECF-AM. Una vez dentro de la célula, el BCECF-AM es hidrolizado por las esterasas citosólicas, generando BCECF libre, cuya fluorescencia es sensible a la concentración de H^+ a una longitud de onda de excitación de 490 nm, y de emisión de 530 nm (la intensidad aumenta al aumentar el pH, es decir, al disminuir la concentración de H^+). Para determinar el pHi sin interferencia del número de células, pérdida o diferencia de carga del indicador, es importante el uso de un cociente de intensidades de fluorescencia, en lugar de una única intensidad. Por lo tanto también se midió la fluorescencia del BCECF a una longitud de onda de excitación de 440 nm y de emisión a 530 nm, la cual es insensible a la variación del pH (punto isosbéstico). El pHi se calculó a partir del cociente de intensidades de emisión a 530 nm, a las longitudes de onda de excitación: 490/440, mediante una recta de calibrado generada cada día de experimento.

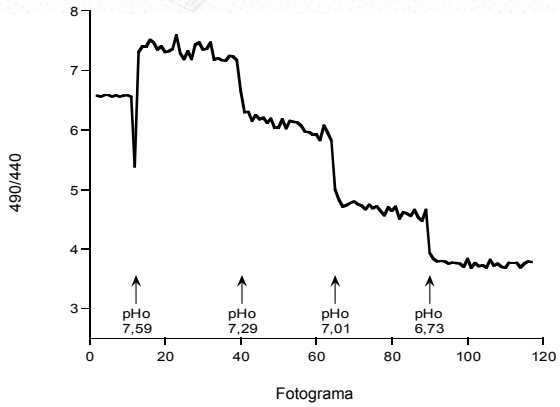


Figura 3.1. Calibración del indicador BCECF, realizada en el microscopio digitalizado de fluorescencia. Las flechas indican la sustitución del medio extracelular por un medio rico en K^+ con nigericina 5 μM, ajustado a los pH señalados.

Para cargar el indicador, las células fueron incubadas de 10 a 20 minutos, a 37°C con 0,2 o 1 µM de BCECF-AM (las condiciones de carga dependen del instrumento de medición de fluorescencia). A continuación fueron lavadas dos veces con medio frío y centrifugadas a 2300 r.p.m. durante 3 minutos a 5°C. La calibración se realizó mediante la exposición de las células cargadas, en un medio rico en K^+, con nigericina 5 o 50 µM y ajustado a diferentes valores de pH extracelular (pHo) (230), como se muestra en la figura 3.1.

Para cada valor de pHo se obtuvo un valor del cociente 490/440 y, mediante un ajuste lineal se genera una recta de calibrado, considerando que, por efecto de la nigericina, pHo=pHi.

B) Determinación de la concentración citosólica de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]i$)

Se utilizó el indicador Fura2-AM que, al igual que el BCECF-AM, es permeable a la membrana celular y permite utilizar un cociente de intensidades de fluorescencia, con dos longitudes de onda de excitación y una de emisión, para el cálculo de la concentración de Ca^{2+} citosólico. El Fura2 se excita a 340 y 380 nm y emite a 490 nm. A la primera longitud de onda de excitación, la intensidad de fluorescencia aumenta al aumentar la concentración de Ca^{2+}, por el contrario, cuando se excita a 380 nm, la intensidad de fluorescencia disminuye al aumentar el calcio.

La $[Ca^{2+}]i$ se calcula a partir del cociente de intensidades a longitud de onda de excitación 340/380, de acuerdo al método propuesto por Grynkiewicz (96):

$$[Ca^{2+}]i = K_D \times \beta \times \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R_{min}} \qquad \text{Ecuación 3.1}$$

donde K_D es la constante de disociación del Fura2, que a 37°C es de 224 nM (96); β es la relación entre la intensidad máxima y mínima de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 380 nm; R es el cociente 340/380 medido; R_{min} es el cociente 340/380 cuando la concentración de Ca^{2+} es igual a 0; y R_{max} es el cociente máximo en condiciones de saturación, por calcio, del indicador.

La carga del indicador se realizó mediante la incubación de células durante 10 ó 15 minutos, a 37°C con 2-3 µM de Fura2-AM; a continuación se realizaron dos lavados. Para realizar la calibración, fue necesario obtener los parámetros de la ecuación de Grynkiewicz, como se muestra en la figura 3.2. R_{max} se obtuvo mediante la adición de ionomicina 10 µM a células en un medio con calcio, a continuación se agregó el quelante EGTA (en una disolución en H_2O de una mezcla EGTA:TRIS 1:3) hasta que la relación 340/380 llegó al mínimo (R_{min}). El parámetro β también se calculó en cada experimento de calibración y presentó valores de entre 4 y 5.

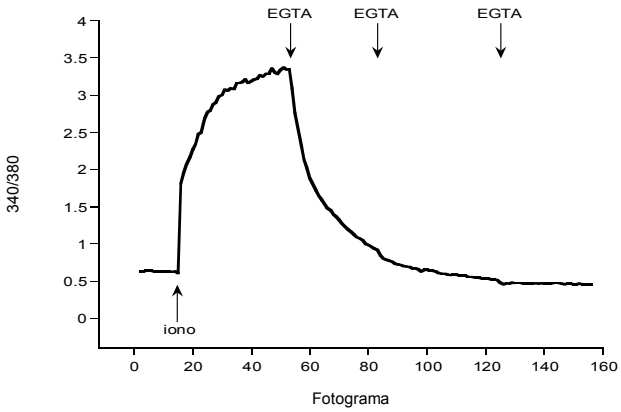


Figura 3.2. Calibración del indicador Fura-2, realizada en el microscopio digitalizado de fluorescencia en un medio con Ca^{2+} 1mM. Las flechas indican adición de ionomicina 10 μM y de EGTA/Tris 1 y 3 mM, respectivamente.

C) Determinación de cambios en el potencial de membrana

Se utilizó el indicador con carga negativa, bis-oxonol, el cual a diferencia de los anteriormente descritos, no permite el uso de un cociente de intensidades de fluorescencia. Por tal motivo, en estos experimentos no se realizó ningún tipo de calibración o cuantificación de los valores reales de potencial de membrana, sino que en su lugar, solamente se determinaron cambios inmediatos de potencial, producidos por determinado fármaco. El bis-oxonol se estabiliza rápidamente a ambos lados de la membrana plasmática, por lo que tampoco es necesario realizar una incubación previa al experimento.

Todos los experimentos de potencial de membrana se realizaron con células en suspensión, en cubeta de fluorímetro, de acuerdo al siguiente protocolo: se colocan aproximadamente 0,5 x 10^6 células en 1 ml de medio, en una cubeta de cuarzo y se agregan 5 μl de una solución de bis-oxonol, para dar una concentración final de 100 nM; se mide la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 540 nm y de emisión de 560 nm; cuando la fluorescencia está estable (aproximadamente 10 minutos) se agregan los fármacos o sustancias que se supone pueden producir cambios de potencial; al final de cada experimento se adiciona gramicidina 2 μg/ml para provocar una despolarización total de la membrana plasmática y comprobar la sensibilidad del indicador.

3.4 Medición de fluorescencia

Se utilizaron dos instrumentos de medición de fluorescencia: un espectrofluorímetro para mediciones de una suspensión celular y un microscopio, acoplado a una cámara y con un programa de digitalización de imágenes, para determinar la fluorescencia de células individuales adheridas a un cubreobjetos.

A) Espectrofluorímetro Shimadzu RF-5000

En este aparato se realizaron todos los experimentos de potencial de membrana y algunos experimentos de pHi. Para estos últimos, las condiciones de carga del indicador fueron de 20 minutos con 1 μM BCECF-AM y para la calibración, se utilizó nigericina 50 μM y el pHo se modificó mediante adiciones de 10 μl HCl 0,1N. Para ambos tipos de experimento, se colocó una suspensión celular en un volumen final de 1 ml, en una microcubeta de cuarzo de 1,5 ml de capacidad. Para los experimentos de BCECF se utilizaron 1-2 x 10^6 células, mientras que para los experimentos de bis-oxonol solamente fueron necesarias 0,5 x 10^6 células. La adición de los fármacos se realizó con pipeta, a través de un orificio colocado directamente sobre la cubeta. Para los experimentos realizados en un medio con HCO_3^-, se inyectó CO_2 al 5% al interior de la cámara de medición.

El fluorímetro utiliza como fuente de luz una lámpara de xenón de 150 W y monocromadores para fijar las longitudes de onda de excitación y emisión. La medición de la fluorescencia del BCECF se realizó a longitudes de onda de 490 y 440 nm de excitación y 530 nm de emisión con ancho de banda de 5 nm, en un modo de doble excitación en el que se registran ambas fluorescencias por canales separados y el aparato calcula automáticamente el cociente como una relación de canales. Los experimentos con bis-oxonol se realizaron en modo de excitación y emisión únicas a una longitud de onda de excitación de 540 nm y de emisión de 560 nm, con un ancho de banda de 3 nm. Todos los experimentos fueron realizados a una temperatura de 37°C mediante un sistema de circulación de agua.

En la siguiente tabla se resumen las condiciones de carga y detección utilizadas en el espectrofluorímetro para los indicadores BCECF y bis-oxonol.

TABLA 3.1 Condiciones experimentales utilizadas en los ensayos de pH y potencial de membrana, realizados en el espectrofluorímetro Shimadzu.

BCECF	**Bis-oxonol**
1-2 x 10^6 células	0,5 x 10^6 células
1 μM, 20 minutos a 37°C	100 nm en cubeta (sin incubación previa)
Excitación: 490 (canal1) 440 (canal2)	Excitación: 540 nm
RC = 490/440	ancho de banda 3 nm
ancho de banda 5 nm	
Emisión 530 nm	Emisión 560 nm
ancho de banda 5 nm	ancho de banda 3 nm
Calibración: nigericina 50 μM	Sin calibración

B) Microscopio digitalizado de fluorescencia

En este aparato se realizaron todos los experimentos de medición de $[Ca^{2+}]i$ y algunos de medición de pHi. A diferencia del fluorímetro, que mide la fluorescencia de una suspensión celular, en el microscopio se puede registrar la fluorescencia de células

individuales, que deberán estar adheridas a una superficie para poder monitorizarlas a través del tiempo. Esta metodología también tiene la ventaja de que permite realizar cambios del medio que baña a las células.

El sistema de medición de fluorescencia consiste en un microscopio invertido Nikon Diaphot 200, equipado con un objetivo de inmersión 40X para fluorescencia. Como fuente de luz utiliza una lámpara de xenón de 100 W conectada a una rueda de filtros de excitación Rainbow de 8 posiciones (Life Science Resources, Reino Unido). La luz llega al microscopio a través de fibra óptica y mediante un filtro dicroico es desviada al objetivo, desde donde, mediante otro filtro dicroico, es enviada hacia la rueda de filtros de emisión Lambda10-2 (Shutter Instrument Co., USA) y, finalmente, al fotomultiplicador y cámara digital (modelos I187 y 4912-5010, respectivamente), ambas de Life Science Resources. Las imágenes recogidas son tratadas mediante los programas MiraCal PRO o Merlin, también de Life Sciences (figura 3.3). El sistema posee 4 canales de detección (A, B, C y D), en los que se puede variar la longitud de onda de excitación, de emisión o ambas, por lo que es posible trabajar, al mismo tiempo, con dos indicadores que utilicen cociente de fluorescencias diferentes. El programa calcula automáticamente la relación de canales A/B, pero conserva los datos de todos los canales con los que se ha trabajado.

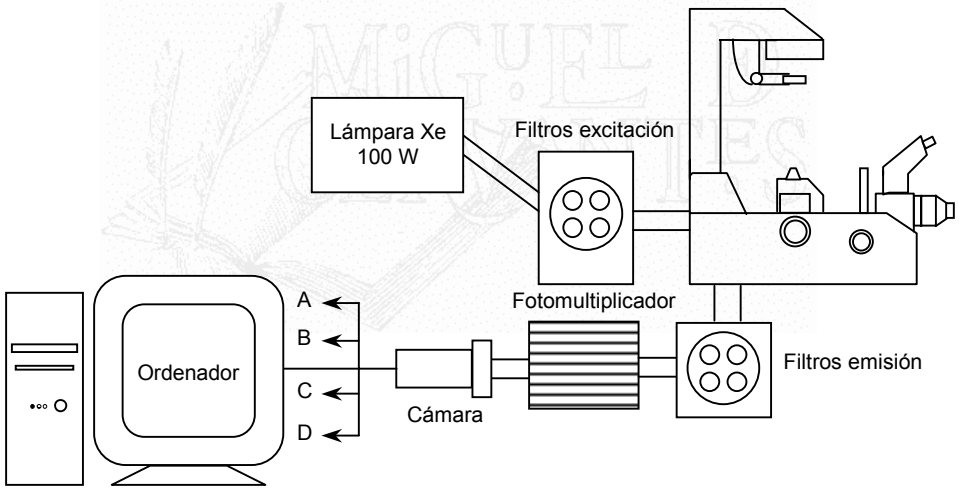


Figura 3.3. Representación esquemática del sistema del microscopio digitalizado de fluorescencia.

Los experimentos se realizaron con células adheridas a un portaobjetos, previamente tratado con polilisina al 0,001%, montado en un soporte que sirve para contener un volumen de hasta 1 ml de medio, aunque el volumen utilizado en estos experimentos fue de 500 µl. A su vez, el soporte es colocado dentro de una cámara que mantiene la temperatura a 37^{o}C. Las células, cargadas con indicador, se adhieren al portaobjetos mediante sedimentación de un pequeño volumen (20-40 µl) de una suspensión celular, durante 10 minutos, a continuación se lavan dos veces, retirando el medio gracias a un sistema de

vacío. La carga de las células con indicador se realizó en un volumen de 1 ml, el número total de células no es tan importante como en los experimentos de fluorímetro, aunque generalmente se trabajó con cerca de $1x10^6$ células/ml. Con cada millón de células cargadas se realizaron aproximadamente 6 experimentos. Las condiciones de carga y los filtros de excitación y emisión utilizados para los experimentos de calcio y pH se resumen en la tabla 3.2. En algunas ocasiones se utilizaron los dos indicadores a la vez.

TABLA 3.2 Condiciones experimentales utilizadas en los ensayos de pH y calcio, realizados en el microscopio de fluorescencia.

BCECF	Fura2
0,1 μM, 10 o 15 minutos a 37°C Filtros de excitación: 440 y 490 nm Filtro de emisión: 535 nm Calibración: nigericina 5 μM	2-3 μM, 10 o 15 minutos a 37°C Filtros de excitación: 340 y 380 Filtro de emisión: 520 nm Calibración: ionomicina 10 μM, EGTA/TRIS

3.5 Técnicas de acidificación y alcalinización intracelular

La mayoría de los experimentos de regulación del pHi se llevaron a cabo en condiciones en las cuales los mecanismos reguladores fueron activados de manera artificial. Esto se consiguió de dos maneras: 1) mediante la manipulación del pHi; y 2) mediante la modificación de la composición iónica del medio extracelular. A continuación describiremos las técnicas empleadas para manipular el pHi en este trabajo de investigación.

A) Alcalinización y acidificación con NH_4^+

Las sales amónicas en disolución dan lugar a NH_3, que es altamente permeable a la membrana celular, por lo que la atraviesa, hasta alcanzar el equilibrio; y actúa como una base débil, alcalinizando el citosol al combinarse con los iones H^+ libres. El ion NH_4^+ es mucho menos permeable, sin embargo, logra atravesar la membrana celular con mayor lentitud. De esta manera, la adición de una sal amónica, como NH_4Cl o $(NH_4)_2SO_4$, al medio extracelular produce una rápida alcalinización citoplasmática, seguida de una lenta recuperación dada por la entrada de iones NH_4^+ pero también, probablemente, por la acción de algún mecanismo regulador del pHi. Por otro lado, cuando el NH_4^+ es retirado del medio extracelular, el NH_3 intracelular saldrá rápidamente de la célula, liberando protones que sumados a los que produjo la entrada de NH_4^+ y a la recuperación activa del pHi, producen una acidificación citoplasmática. En la figura 3.4 se ilustran ambos procesos.

En los experimentos de regulación del pHi realizados en fluorímetro, se utilizó la técnica de acidificación por preincubación con NH_4Cl 50 mM. La preincubación con dicha sal se realizó al mismo tiempo que la carga del indicador, de modo que al comenzar el registro de fluorescencia, el NH_4^+ había sido retirado del medio extracelular, por lo que las células presentaron un pHi inferior al basal (55).

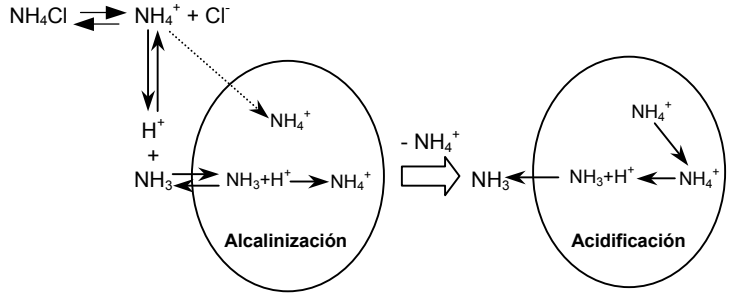


Figura 3.4. Mecanismos de alcalinización y acidificación intracelular inducidas por NH_4^+. La adición de una sal de NH_4^+ al medio extracelular provoca una alcalinización citosólica, mientras que la eliminación del ion NH_4^+ del medio externo produce una acidificación del interior celular.

La adición de NH_4Cl al medio extracelular también se utilizó para estudiar la recuperación del pHi después de una alcalinización citosólica.

B) Acidificación con CO_2

La exposición de células a un medio recién equilibrado con CO_2 gaseoso, produce una acidificación intracelular debida a la rápida difusión de esta molécula que, en el interior celular se hidroliza dando lugar a HCO_3^- y H^+, como se indica en la ecuación 1.1. En los experimentos de pH realizados en el microscopio, se utilizó esta técnica de acidificación, al tener la posibilidad de cambiar rápidamente el medio que baña a las células, ya que además presenta la ventaja de que el medio contiene HCO_3^- y está ajustado al mismo pH que el medio sin HCO_3^- que baña a las células, por lo que es un método muy adecuado para observar la actividad de los mecanismos transportadores de este ion.

3.6 Determinación de la capacidad tampón del citosol de linfocitos humanos, y cálculo del flujo de H^+

La medida del flujo de protones es una manera de expresar la actividad de una proteína transportadora de iones, cuyo funcionamiento modifica el pHi. La tasa de flujo de protones se calcula como el producto de la velocidad de recuperación del pHi ($\Delta pHi/\Delta t$), multiplicada por la capacidad tampón total del citosol (βt):

$$\text{Flujo de } H^+ \text{ (mM/min)} = \Delta pHi/\Delta t(\text{min}) \times \beta t \qquad \text{Ecuación 3.2}$$

La capacidad tampón del citosol celular está determinada por la presencia de moléculas que pueden actuar como tampones fisicoquímicos (proteínas, fosfatos y bicarbonato); y se puede definir como el cambio en pHi provocado por una carga alcalina (o ácida) de magnitud conocida (190):

$$\beta i = dB/dpHi \qquad \text{Ecuación 3.3}$$

Se han desarrollado diversas técnicas experimentales con el propósito de cuantificar la capacidad tampón celular, la que aquí se describe consiste en la exposición de una suspensión celular a una disolución con NH_4^+ en un medio sin CO_2/HCO_3^- (28, 91).

Como se ha descrito anteriormente la adición de sales amónicas al medio extracelular, provoca una alcalinización citosólica debida a la rápida entrada de NH_3 que se combina con H^+ para formar NH_4^+. Como cada NH_4^+ formado corresponde a un H^+ consumido, la capacidad tampón será:

$$\beta i = \Delta[NH_4^+]i/\Delta pHi \qquad \text{Ecuación 3.4}$$

donde βi es la capacidad tampón promedio de todos sistemas de tamponamiento intracelulares, menos NH_3-NH_4^+, en un medio sin CO_2/HCO_3^-; ΔpHi es el incremento instantáneo de pHi registrado (que supondremos será debido solamente a la entrada rápida de NH_3, y no está enmascarado por la entrada lenta de NH_4^+) y $\Delta[NH_4^+]i$ se calcula a partir de $[NH_3]i$ (de nuevo suponiendo que todo el NH_4^+ intracelular es debido a la rápida entrada y disociación de NH_3), asumiendo que el NH_3 está en equilibrio a ambos lados de la membrana plasmática y considerando que su pKa es de 9,21:

$$[NH_4^+]i = [NH_3]i \times 10^{pKa-pHi} \qquad \text{Ecuación 3.5}$$

$[NH_3]i = [NH_3]o$ se calcula a partir de $[NH_4^+]o$ la cual es igual a la concentración inicial de NH_4^+ agregado al medio en forma de sal, menos $[NH_3]o$ y de la ecuación 3.5 se deduce:

$$[NH_3]i = [NH_3]o = \frac{[NH_4Cl]o}{10^{pKa-pHo} + 1} \qquad \text{Ecuación 3.6}$$

que, para las condiciones de pHo y $[NH_4Cl]o$ utilizadas se podría simplificar (55):

$$[NH_3]i = [NH_4Cl]o \times 10^{pHo-pKa} \qquad \text{Ecuación 3.7}$$

En un medio con HCO_3^-, la capacidad tampón total del citosol (βt) es igual a la suma de βi y la capacidad tampón dada por el sistema CO_2/HCO_3^-:

$$\beta t = \beta i + \beta CO_2 \qquad \text{Ecuación 3.8}$$

que puede ser calculada a partir de la concentración intracelular de HCO_3^-:

$$\beta CO_2 = 2.3 \times [HCO_3^-]i \qquad \text{Ecuación 3.9}$$

donde $[HCO_3^-]i$ se calcula a partir de los valores de pHo, pHi y $[HCO_3^-]o$:

$$[HCO_3^-]i = [HCO_3^-]o \times 10^{pHi-pHo} \qquad \text{Ecuación 3.10}$$

En un medio sin HCO_3^- la capacidad tampón de linfocitos humanos se determinó de acuerdo al siguiente protocolo:

1) Preincubar las células en varios medios sin HCO_3^-, ajustados a diferentes valores de pHo. Esto es con el propósito de modificar el pHi, ya que la capacidad tampón de muchos tipos de células está estrechamente relacionada con el pH citosólico (190). En el inserto de la figura 3.5 se puede observar como la modificación del pHo hace variar el pHi de los linfocitos.

2) Cargar las células con indicador, lavar y colocar en la cubeta del espectrofluorímetro; conservando siempre el pHo utilizado en la preincubación (todos estos experimentos se realizaron en dicho aparato).

3) Registrar el pHi basal y agregar NH_4Cl 5 mM. Para cada valor de pHi basal se obtiene un incremento de pHi (ΔpHi) y se calcula un valor de βi, de acuerdo a las ecuaciones antes descritas.

En la figura 3.5 se muestra el gráfico de los valores obtenidos de βi para intervalos de pHi de 0,2 unidades. Los valores obtenidos en los intervalos de pHi desde 6,8 hasta 7,4 no presentan diferencia estadísticamente significativa entre sí (P>0,05). Por lo tanto, para los cálculos de flujo de H^+ en un medio sin HCO_3^-, se utilizó el promedio de los tres intervalos señalados que dio como resultado un valor de βi de 36 mM/unidad pH.

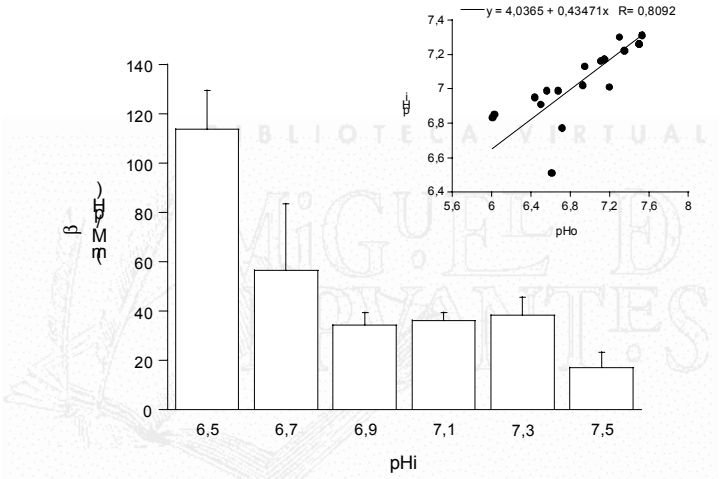


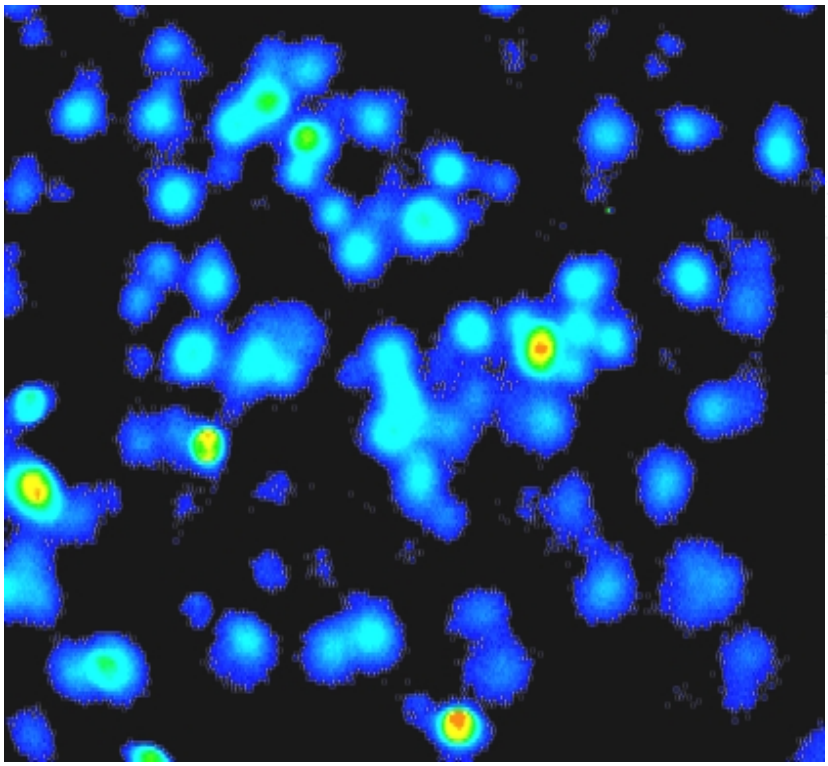
Figura 3.5. Capacidad tampón de linfocitos humanos, para un intervalo de pHi desde 6,4 hasta 7,6. El inserto muestra el efecto de la preincubación a diferentes valores de pHo, sobre el pHi.

Para los experimentos realizados en presencia de CO_2/HCO_3^-, $[HCO_3^-]$i y βCO_2 fueron determinadas para cada valor de pHi registrado a lo largo del experimento. El flujo de H^+ se calculó como el producto de ΔpHi/Δt y βt, esta última calculada como la suma de βi (36 mM/unidad de pH) y βCO_2.

3.7 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces por duplicado. Los resultados están expresados como media ± SEM. Cuando se indica, los resultados fueron analizados mediante una prueba T de student para datos dependientes, tomando como significativo un valor de P< 0,05.

Resultados y Discusión



Linfocitos cargados con Fura2
λ_{exc} 380 nm; λ_{em} 520 nm
AZ sin Calcio

4.1 Estudio de los mecanismos de acción del ácido ocadaico

Las intoxicaciones ocurren cuando las toxinas-ligandos se unen con receptores específicos que desencadena diversos eventos intracelulares. Para algunas intoxicaciones el receptor ha sido localizado y la molécula tóxica actúa como un agonista o antagonista, en ocasiones compitiendo con el ligando fisiológico (15). Este es el caso del ácido ocadaico (AO), cuyo receptor más específico en la fosfatasa de proteína 2A, localizada en el citosol celular. La unión de la toxina con la subunidad catalítica de la proteína, inhibe su actividad fosfatasa. El AO también puede inhibir la actividad de otras fosfatasas de residuos serina/treonina (PP1, PP3, PP4 y PP5) (248). Sin embargo, tal como se indicó antes, se desconoce el mecanismo por el cual la inhibición de la PP2A (u otras fosfatasas) por el AO genera los síntomas del síndrome DSP.

En este trabajo hemos decidido estudiar el efecto de la inhibición de fosfatasas con AO, sobre la actividad de proteínas de la membrana citoplasmática que intervienen en la regulación del pH citosólico (pHi) de linfocitos humanos. Estas proteínas transportadoras son también importantes en la regulación de la concentración y movimiento de iones Na^+ y Cl^- , implicados en la regulación osmótica y movimiento de fluidos a través de las membranas celulares y a través de tejidos (11). Por lo tanto, estos transportadores pueden considerarse como probables dianas de la acción de las toxinas productoras de diarrea.

Como la caracterización de los mecanismos reguladores del pHi en linfocitos humanos está aun incompleta, comenzaremos describiendo los resultados encaminados a esclarecer la existencia e importancia de algunos de estos mecanismos, que han sido previamente descritos en otros modelos celulares.

4.1.1 Caracterización de los mecanismos reguladores del pHi en linfocitos humanos

En primer lugar, se estudió la recuperación del pHi después de una acidificación, en ausencia de HCO_3^- extracelular. En esta situación, el mecanismo regulador del pHi más importante en la mayoría de las células eucariotas es el intercambiador Na^+/H^+ (NHE) (159, 236). En la figura 4.1 se presenta la evolución en el tiempo del pHi de linfocitos sometidos a una acidificación intracelular mediante la técnica de preincubación con NH_4Cl y resuspendidos en un medio libre de NH_4^+ y HCO_3^- (tamponado con HEPES). El pHi se determinó gracias al uso del indicador fluorescente BCECF, como se indica en la sección de Material y métodos.

Se observa que el pHi se incrementa desde un valor inicial de aproximadamente 6,85 hasta 7,1 en alrededor de 10 minutos. Esta alcalinización intracelular es totalmente bloqueada por la presencia en el medio del diurético amilorida, un inhibidor potente y específico del intercambiador Na^+/H^+, a una concentración relativamente baja (100 μM), o por la eliminación del ion Na^+ del medio extracelular. Ambas observaciones indican que, en linfocitos humanos, la recuperación de una acidificación intracelular en un medio sin HCO_3^-,

es dependiente de la actividad del intercambiador Na^+/H^+, como sucede en muchos modelos celulares (76, 174).

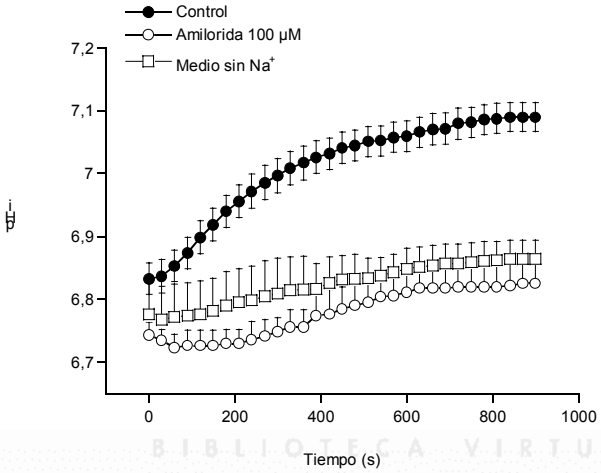


Figura 4.1. Recuperación del pHi después de una acidificación intracelular, en linfocitos humanos resuspendidos en un medio sin HCO_3^-. Y efecto de la amilorida 100 µM o ausencia de Na^+ extracelular. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

Este transportador ha sido muy estudiado en linfocitos de timo de rata (90, 91) así como en linfocitos humanos (180, 185). En estos últimos, se ha determinado que la isoforma NHE1 se expresa de manera normal en su membrana plasmática (212). La observación de que una concentración baja de amilorida es capaz de inhibir completamente la actividad del Na^+/H^+ de linfocitos humanos, concuerda con la información anterior, ya que la isoforma NHE1 es la más sensible a este fármaco.

A continuación, se estudió el papel del ion HCO_3^- en la regulación del pHi. En la figura 4.2 se observa que la adición de $NaHCO_3$ a una suspensión de células que se recuperan de una acidificación, produce un claro aumento de la velocidad de alcalinización, así como del pHi final, alcanzado al término de la medida. De manera similar, una adición de $NaHCO_3$ a una suspensión de linfocitos sin acidificar (figura 4.3), produce una alcalinización intracelular que es significativamente inhibida por DIDS, un inhibidor de intercambiadores aniónicos.

Estos resultados indican, que los linfocitos poseen un mecanismo, sensible al DIDS, capaz de alcalinizar el citosol, mediante la introducción de iones HCO_3^- (ya que se activa cuando este ion se agrega al medio extracelular). Como se ha descrito anteriormente, existen diversos transportadores que cumplen estos requisitos: los intercambiadores Cl^-/HCO_3^- dependientes de Na^+ y en algunos casos los cotransportadores Na^+-HCO_3^-, pueden estar implicados en la elevación del pHi dependiente de HCO_3^- (6, 144, 188). Ambos mecanismos se caracterizan por depender del gradiente de Na^+ para su funcionamiento.

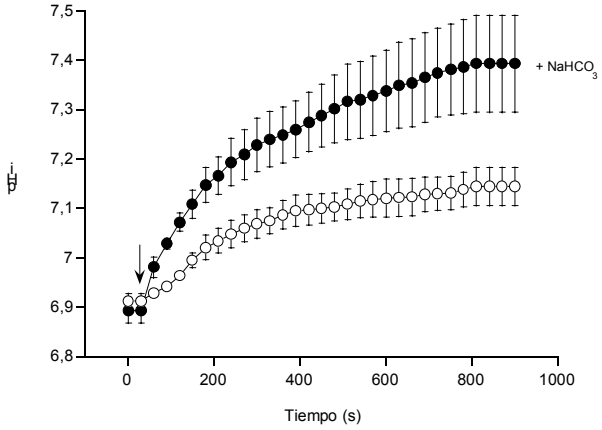


Figura 4.2. Efecto de la adición de HCO_3^- a células que se recuperan de una acidificación. La flecha indica el momento de adición de 22 mM $NaHCO_3$. Los círculos blancos representan el control de recuperación del pHi en un medio sin este ion. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

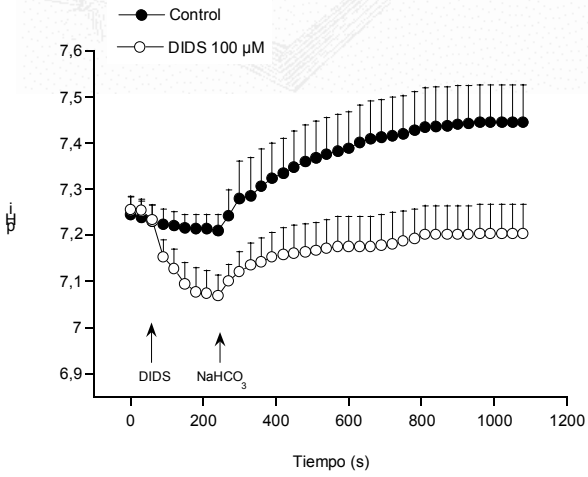


Figura 4.3. Adición de HCO_3^- a células sin acidificar y efecto del inhibidor DIDS. Promedio ±SEM de 3 experimentos.

Los valores de pHi basal (en células no expuestas a NH_4^+) se muestran en la figura 4.4. En ella se observa que el pHi de linfocitos suspendidos en un medio con HCO_3^- es siempre

mayor que el de células mantenidas en un medio carente de este ion (puntos negros en a y b); sin embargo, esta diferencia disminuye cuando aumenta el pH extracelular (pHo). También se observa que el pHi de células mantenidas en un medio con HCO_3^-, aumenta a lo largo del tiempo, mientras que al preincubar con DIDS en un medio con HCO_3^-; el pHi disminuye alrededor de 0,1 unidad y se evita su elevación. Estos resultados parecen confirmar una vez más, la actividad de un mecanismo sensible al DIDS que introduce HCO_3^- al citosol celular.

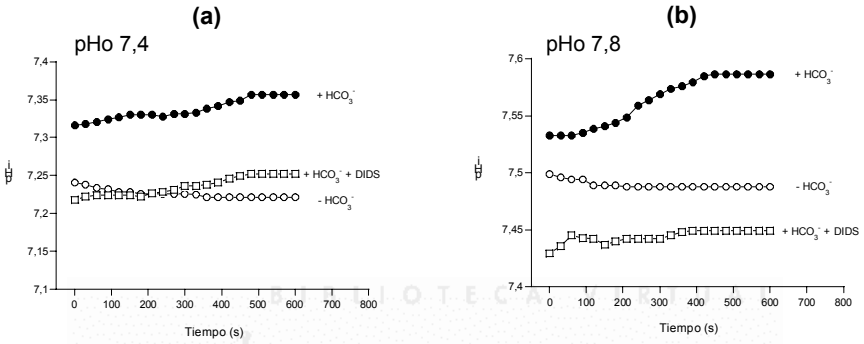


Figura 4.4. Modificación del pHi basal, a lo largo del tiempo, de linfocitos incubados y resuspendidos en medios con o sin HCO_3^- y DIDS, ajustados a diferentes pHo. **(a)** 7,4 y **(b)** 7,8. Promedio de 3 experimentos.

Hasta el momento, nuestros resultados sugieren que los linfocitos poseen al menos un mecanismo transportador de HCO_3^- que, por sus características de aumentar el pHi basal y participar en la recuperación después de una carga ácida, podría ser alguno de los mecanismos dependientes de Na^+ antes mencionados. Diversos autores han confirmado que el pHi basal de muchos modelos celulares que expresan intercambiadores Cl^-/HCO_3^- dependientes de Na^+, es superior en un medio que contiene HCO_3^-, que en un medio libre de este ion (127, 134), mientras que aquellas células que expresan intercambiadores dependientes e independientes de Na^+, generalmente presentan un pHi similar en ambos medios (232). Por lo tanto, es probable que los linfocitos humanos posean un importante intercambiador Cl^-/HCO_3^- dependiente de Na^+; aunque no se elimina la posibilidad de que también presenten un intercambiador aniónico (Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+), similar al que ha sido descrito en timocitos de rata (147).

Para comprobar la participación de este sistema en la recuperación del pHi después de una acidificación, la cual, en un medio sin HCO_3^- es completamente dependiente del intercambiador Na^+/H^+ (figura 4.1), se utilizaron los inhibidores específicos amilorida y DIDS, como se muestra en la figura 4.5.

La recuperación del pHi después de una acidificación, en células a las que se les agregó $NaHCO_3$, no es completamente inhibida (4.5a) por la misma concentración de amilorida capaz de impedir totalmente la recuperación en un medio libre de HCO_3^-; el inhibidor DIDS (4.5b) reduce sensiblemente la alcalinización, demostrando la participación de un

transportador de HCO_3^-. Se observa igualmente, que ambos fármacos tienen un efecto aditivo en la inhibición de la recuperación, ya que la utilización de ambos al mismo tiempo bloquea completamente la elevación del pHi (4.5c), indicando que la recuperación del pHi de linfocitos acidificados, resuspendidos en un medio con HCO_3^+, está determinada por la actividad de dos mecanismos: un intercambiador Na^+/H^+ (sensible a amilorida) y un transportador de HCO_3^- (sensible a DIDS).

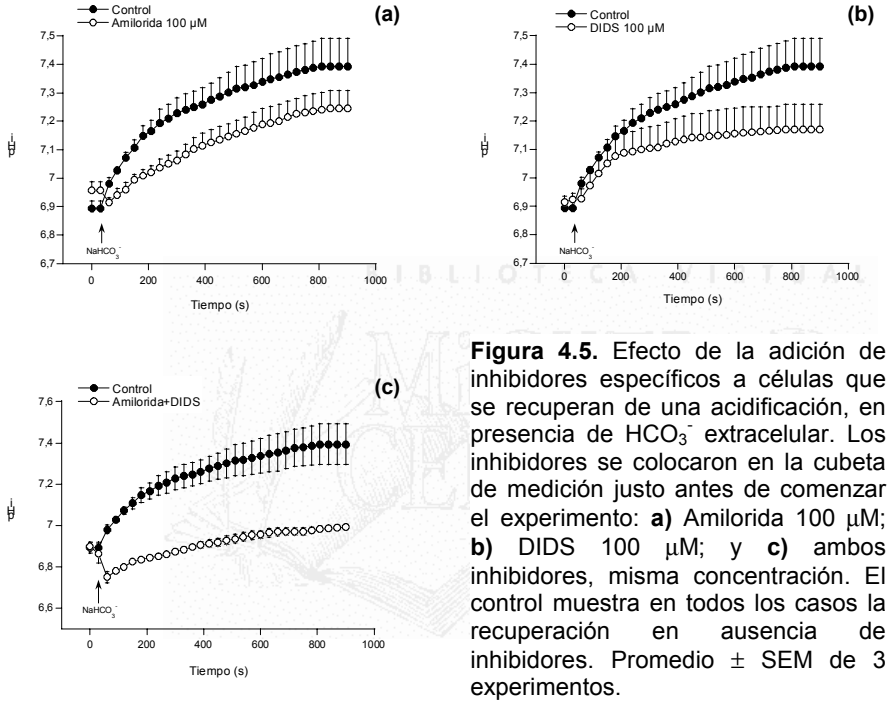


Figura 4.5. Efecto de la adición de inhibidores específicos a células que se recuperan de una acidificación, en presencia de HCO_3^- extracelular. Los inhibidores se colocaron en la cubeta de medición justo antes de comenzar el experimento: **a)** Amilorida 100 µM; **b)** DIDS 100 µM; y **c)** ambos inhibidores, misma concentración. El control muestra en todos los casos la recuperación en ausencia de inhibidores. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

Como se ha mencionado anteriormente, los transportadores de HCO_3^- involucrados en la alcalinización del citosol, generalmente dependen del Na^+ extracelular para su funcionamiento (34, 127, 232). En la figura 4.6 se observa que, en un medio sin Na^+ y con HCO_3^-, la recuperación de una acidificación se ve sensiblemente disminuida, como consecuencia de la inactivación del intercambiador Na^+/H^+ así como del transporte de HCO_3^- dependiente de Na^+; sin embargo, se observa también que el DIDS aún es capaz de provocar una inhibición de la alcalinización en un medio sin Na^+, indicando la posible existencia de un transportador de HCO_3^- independiente de Na^+ que, en menor medida, podría participar en un proceso de alcalinización intracelular.

Es posible que un intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+ actúe en el sentido de introducir HCO_3^- (en consecuencia, alcalinizando el medio intracelular en lugar de acidificarlo, como hace de manera normal), si el gradiente $[HCO_3^-]o/[HCO_3^-]i$ supera al gradiente $[Cl^-]o/[Cl^-]i$, lo que puede ocurrir si el pHi disminuye drásticamente o el Cl^- es retirado del medio extracelular (144). Esto podría explicar la ligera recuperación del pHi

observada en el medio sin Na^+; asimismo, se ha descrito en neuronas de rata un intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+, que participa activamente en la recuperación del pHi después de una carga ácida (31).

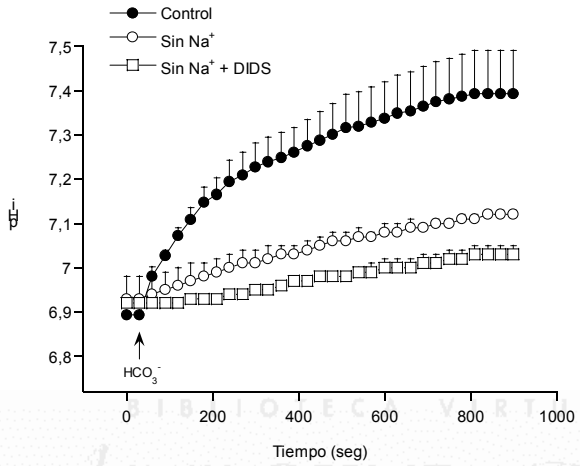


Figura 4.6. Importancia del Na^+ extracelular en la recuperación del pHi, en un medio con HCO_3^-. Donde indica la flecha, se agregó al medio 22 mM $NaHCO_3$ (control) o $KHCO_3$ (sin Na^+). Promedio ± SEM de 3 experimentos.

Un método de caracterización de los transportadores implicados en la regulación del pHi es a través de la determinación del flujo de protones (H^+) que originan, lo cual es una medida de su actividad (34, 136, 190). El flujo de H^+ es igual al producto de la velocidad de recuperación del pHi, ($\Delta pHi/\Delta t$) multiplicada por la capacidad tampón del citosol (β), calculada como se detalla en la sección de Material y métodos.

A partir de los experimentos mostrados en las figuras 4.2 y 4.5 se calcularon los valores de flujo de H^+ que se muestran en las figuras 4.7 y 4.8, respectivamente, donde se han graficado contra los valores de pHi. En la figura 4.7 se presenta el flujo de H^+ en un medio con y sin bicarbonato. En el primer caso, los valores de flujo de H^+ son mucho mayores, observándose además un desplazamiento hacia valores de pHi más alcalinos. Esto se explica, teniendo en cuenta la contribución del transportador de HCO_3^- al movimiento de H^+ dado por el intercambiador Na^+/H^+, en un medio sin HCO_3^-.

En la figura 4.8 se compara el flujo de H^+ observado en un medio con HCO_3^- (control) con el determinado en células tratadas con los inhibidores específicos amilorida y DIDS. En presencia de amilorida (4.8a), la salida de H^+ es sensiblemente menor que en el control, a valores de pHi ácidos; por el contrario, en presencia de DIDS (4.8b) el flujo de protones a pH ácido esta muy poco inhibido, mientras que a un pHi más alcalino (superior a 7,15) el movimiento de H^+ cesa. Por último, la combinación de ambos inhibidores (4.8c) anula por completo el flujo de protones por encima de un valor de pHi de 6,9.

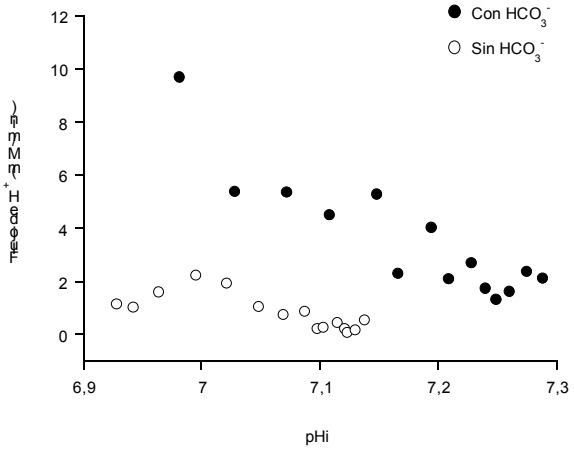


Figura 4.7 Flujo de H^+ en linfocitos acidificados por preincubación con NH_4^+ y resuspendidos en medio con y sin HCO_3^-. Valores calculados a partir de los experimentos mostrados en la figura 4.2.

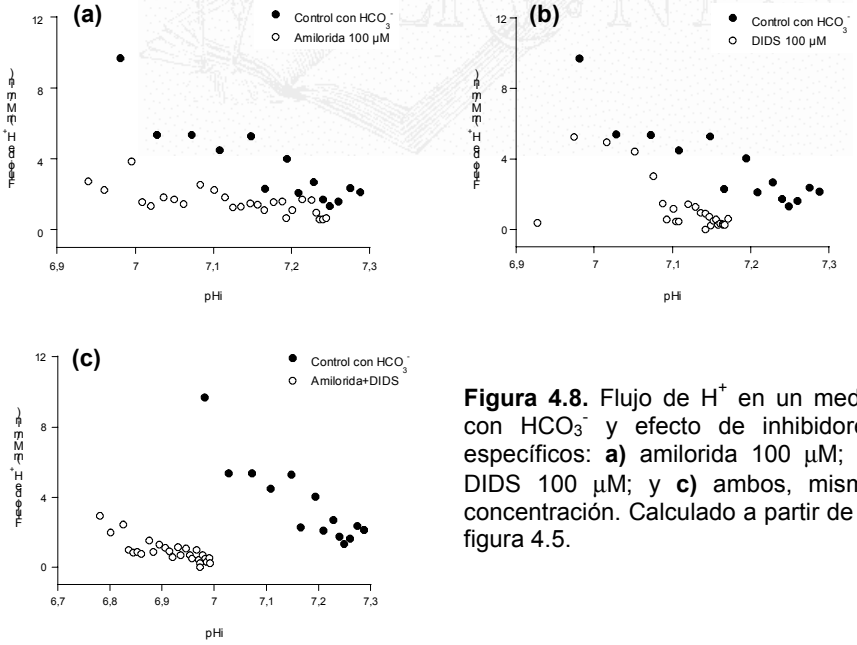


Figura 4.8. Flujo de H^+ en un medio con HCO_3^- y efecto de inhibidores específicos: **a)** amilorida 100 µM; **b)** DIDS 100 µM; y **c)** ambos, misma concentración. Calculado a partir de la figura 4.5.

Estos resultados nos pueden aportar valiosa información sobre la contribución relativa del intercambiador Na^+/H^+ y el transportador de HCO_3^- dependiente de Na^+ en la

recuperación del pHi de linfocitos humanos, después de una acidificación intracelular (a pesar de que hemos observado, en la figura 4.6, que un intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+ está también implicado en este proceso, consideraremos que su aportación es mínima, por lo que el flujo de protones calculado en presencia de amilorida será atribuido únicamente al transportador de HCO_3^- dependiente de Na^+).

La actividad del intercambiador Na^+/H^+ (flujo de H^+ en presencia de DIDS) es más importante a valores bajos de pHi, como denota la figura 4.8b: por debajo de 7,1, este intercambiador lleva a cabo aproximadamente el 70% de la recuperación del pHi. En cambio cuando el pHi se eleva por encima de 7,1, la salida de H^+ dependiente del transportador de HCO_3^- (en presencia de amilorida) es la que representa el 70% del total (figura 4.8a). En consecuencia, podemos afirmar que, en linfocitos humanos, el intercambiador Na^+/H^+ es el mecanismo más importante mediante el cual estas células responden a una acidificación citoplasmática aguda, mientras que el transportador de HCO_3^- dependiente de Na^+ es más importante para la regulación del pHi cercano a los valores fisiológicos. Esta misma relación entre ambos mecanismos reguladores del pHi ha sido encontrada en diversos modelos celulares (34, 136, 190).

Hasta ahora, nos hemos estado refiriendo constantemente a un transportador de HCO_3^-, dependiente de Na^+, que participa activamente en la recuperación del pHi, tras una acidificación citosólica; sin embargo, no hemos especificado si se trata de un cotransportador Na^+-HCO_3^-, o de un intercambiador Cl^-/HCO_3^- dependiente de Na^+, porque, de momento, nuestros resultados no permiten distinguir entre uno y otro. En principio, la segunda opción resulta más probable, ya que los cotransportadores Na^+-HCO_3^- parecen tener una distribución más restringida a células de tejidos epiteliales y algunas células excitables (24, 30, 130).

El cotransportador Na^+-HCO_3^- se puede distinguir del intercambiador Cl^-/HCO_3^- por su electrogenicidad e independencia del Cl^- intracelular. Por lo tanto, la primera aproximación que utilizamos para tratar de determinar la identidad del transportador de HCO_3^-, fue la realización de un experimento en el que se registraron los cambios en el potencial de membrana, provocados por la adición de HCO_3^- a células que se recuperaban de una acidificación. Nuestros anteriores resultados nos habían demostrado que en estas condiciones, el transportador de HCO_3^- se activaba de una manera satisfactoria, además, debido a que el intercambiador Na^+/H^+ es electroneutro, no existe la posibilidad de tener interferencias por su actividad.

El potencial de membrana se determinó con el indicador bis-oxonol, como se describe en la sección de Material y métodos. En la figura 4.9 se puede observar que la adición de HCO_3^- a células que se recuperan de una acidificación, provoca una ligera hiperpolarización bloqueada por DIDS, lo que sugiere que puede ser causada por la actividad del transportador de HCO_3^-. Por lo tanto, esta modificación del potencial de membrana puede ser atribuida a la acción de un cotransportador Na^+-HCO_3^- con una estequiometría 1:2 o 1:3, que introduce más cargas negativas que positivas al interior de la célula, generando por tanto la hiperpolarización observada. Así, estos resultados sugieren la existencia de un

cotransportador Na^+-HCO_3^- en linfocitos humanos, implicado en la regulación del pHi de estas células.

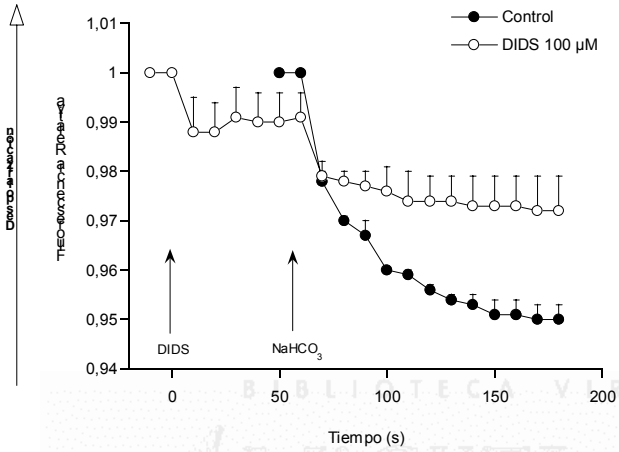


Figura 4.9. Cambios en el potencial de membrana generados por la adición de HCO_3^- a células que se recuperan de una acidificación y efecto del inhibidor DIDS. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

Sin embargo, la observación de una hiperpolarización causada por HCO_3^- no es una prueba concluyente de la existencia del cotransportador Na^+-HCO_3^-, ya que la adición de CO_2/HCO_3^- puede provocar cambios de potencial de manera inespecífica (30). Por lo que es necesario comprobar la importancia del Cl^- intracelular en la actividad del transportador de HCO_3^-.

Con dicho objetivo, se determinó, en primer lugar, el pHi basal de linfocitos incubados y resuspendidos en medios con diferente composición iónica: un medio normal conteniendo HCO_3^- y Cl^-, un medio sin HCO_3^- tamponado con HEPES y un medio con HCO_3^- pero sin Cl^- (cloruros reemplazados por gluconatos). En la figura 4.10 se comparan los pHi basales registrados en los tres medios. Se observa que, como habíamos descrito anteriormente (figura 4.4), el pHi es superior en células suspendidas en un medio que contenga HCO_3^- que en uno sin ese ion. Con respecto al papel del Cl^-, podemos observar que las células incubadas en ausencia de éste, presentaron un pHi también inferior al control con Cl^- y HCO_3^-. Sin embargo, es importante recalcar que las diferencias en los valores de pHi no fueron estadísticamente significativas. El efecto de la ausencia de Cl^- sobre el pHi no parece apoyar la existencia de un intercambiador Cl^-/HCO_3^- ya que, de estar presente este mecanismo, la eliminación de Cl^- del medio extracelular provocaría una alcalinización citoplasmática, debido a la inversión del funcionamiento del intercambiador, que daría lugar a una entrada de iones HCO_3^- hacia el interior de la célula (144).

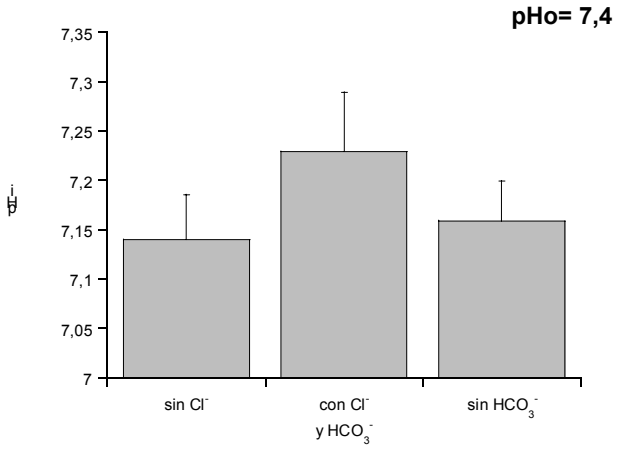


Figura 4.10. pHi basal de linfocitos incubados en medios con composición iónica diferente. Determinaciones realizadas en el espectrofluorímetro. Los medios que contenían HCO_3^- fueron equilibrados con CO_2, a un pH de 7,4. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

Estas determinaciones fueron repetidas utilizando el microscopio digitalizado de fluorescencia como instrumento de medición. En este tipo de ensayos, el pHo se redujo de 7,4 a 7,2 ya que el medio que baña a las células está más en contacto con el aire que en el caso del fluorímetro (donde la cubeta de medición, con la suspensión celular, se mantiene dentro de una cámara cerrada, equilibrada con CO_2 gaseoso al 5%), por lo que a un pH de 7,4 los medios con HCO_3^- se alcalinizan muy pronto por pérdida de CO_2.

En la figura 4.11 se muestran los valores de pHi basal medidos en el microscopio. Una vez más las diferencias no fueron estadísticamente significativas, sin embargo, es destacable el hecho de que, al contrario de lo observado con células en suspensión (figura 4.10), el pHi de células incubadas con Cl^- y HCO_3^- es el menor de todos. Es posible que el CO_2 utilizado para ajustar el pH de los medios con HCO_3^- acidifique ligeramente el pHi de estas células, sin embargo no está claro el motivo por el cual equilibrar el medio con CO_2 no disminuye en pHi de células en suspensión. Por otro lado, se observa una cierta elevación del pHi basal en células incubadas en ausencia de Cl^-, que podría estar provocada por la actividad de un intercambiador Cl^-/HCO_3^-; este mismo mecanismo podría ser el responsable de disminuir el pHi basal en un medio con HCO_3^-.

Las figuras 4.10 y 4.11 resultan, en apariencia, bastante contradictorias; sin embargo las discrepancias se podrían explicar de dos maneras: 1) En realidad no existe diferencia significativa entre los valores de pHi en ninguna de las dos figuras, esto indicaría que los linfocitos tienen un complejo sistema de mecanismos reguladores del pHi, lo que les permite ajustar este parámetro dentro de unos márgenes más o menos estrechos, e pesar de ser sometidos a modificaciones en la composición iónica extracelular. 2) Por algún motivo, el intercambiador Cl^-/HCO_3^- no era funcional en las células utilizadas para

determinar los pHi basales en el espectrofluorímetro; esto explicaría tanto el mayor pHi en un medio con HCO_3^- como la ausencia de una alcalinización intracelular en un medio sin Cl^-. El motivo por el cual el intercambiador Cl^-/HCO_3^- no se activó en su modo normal (acidificando) en presencia de HCO_3^-, o en su modo inverso (alcalinizando) por la eliminación del Cl^- extracelular, no podemos explicarlo de momento.

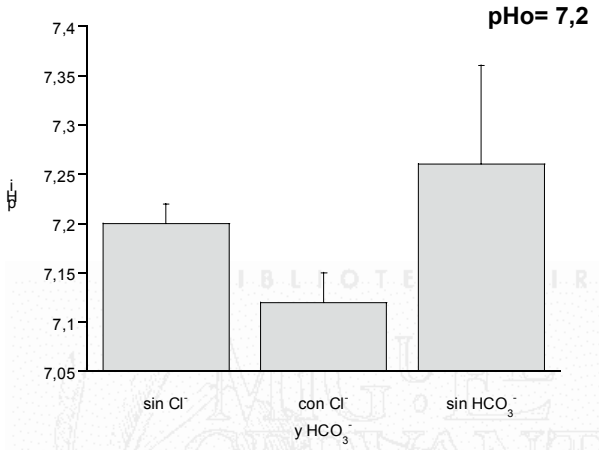


Figura 4.11. pHi basal de linfocitos incubados en medios con composición iónica diferente. Determinaciones realizadas en el microscopio de fluorescencia. Los medios que contenían HCO_3^- fueron equilibrados con CO_2, a un pH de 7,2. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

En función de estos resultados se decidió continuar con el estudio del papel del Cl^- en la regulación del pHi. A partir de este punto todos los experimentos presentados en esta sección fueron realizados en el microscopio digitalizado de fluorescencia, con linfocitos purificados de sangre recién extraída. En primer lugar se comprobó la dependencia de los mecanismos implicados en la recuperación del pHi después de una acidificación citosólica, de la presencia de Na^+ extracelular; así como la importancia del ion Cl^- en la actividad de estos transportadores (figura 4.12).

En estos experimentos la técnica de acidificación por preincubación con NH_4Cl fue sustituida por la de acidificación con CO_2. Las células denominadas como sin Cl^-, fueron vaciadas de Cl^- citosólico mediante preincubación durante 30 minutos a 37ºC en un medio sin Cl^- (gluconato) pero con HCO_3^-. A continuación fueron lavadas y resuspendidas en medio sin Cl^- y sin HCO_3^- y cargadas con BCECF. Por tanto, al inicio del experimento todas las células estaban bañadas por un medio sin HCO_3^-. La sustitución de este medio por la solución conteniendo CO_2/HCO_3^- produce una acidificación intracelular que activará los mismos mecanismos que una acidificación con NH_4Cl.

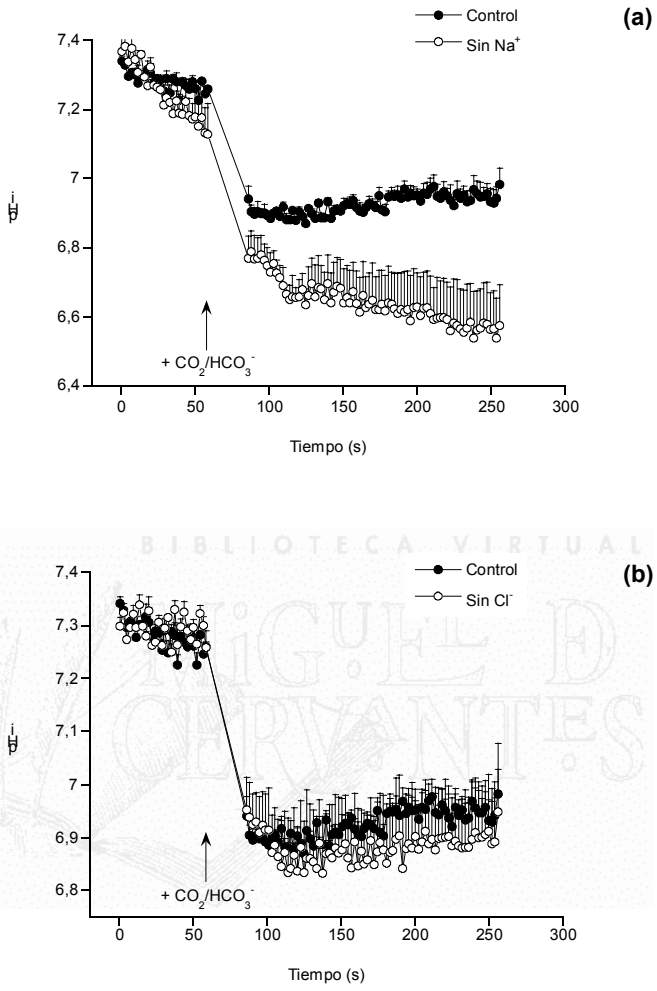


Figura 4.12. Efecto de la eliminación de **a)** Na^+ extracelular y **b)** Cl^- intracelular en la recuperación del pHi de linfocitos acidificados por adición de CO_2. Las células fueron incubadas en medios sin HCO_3^- y bañadas por este mismo medio, que fue sustituido por un medio con CO_2/HCO_3^-, donde indica la flecha. La eliminación del Cl^- intracelular se describe en el texto. La eliminación del Na^+ extracelular se llevó a cabo al mismo tiempo que la adición de CO_2/HCO_3^-. Promedio ± SEM de 4 experimentos.

En la figura 4.12 se observa que los linfocitos se recuperan lentamente de una acidificación con CO_2 y esta recuperación es completamente dependiente de la presencia de Na^+ extracelular (4.12a), sin embargo la eliminación del Cl^- intracelular no tiene ningún efecto sobre la misma (4.12b). Esto indica que los mecanismos encargados de recuperar a la célula de una acidificación citosólica son dependientes de Na^+ e independientes de Cl^-, lo cual apoya una vez más la existencia de un cotransporte Na^+-HCO_3^- que, junto con el intercambiador Na^+/H^+ es responsable de alcalinizar el citosol de linfocitos.

A continuación quisimos comprobar que la recuperación de una acidificación con CO_2 involucra a los mismos transportadores iónicos que la recuperación de una acidificación con NH_4^+: el intercambiador Na^+/H^+ y el transportador de HCO_3^-. Ya que es posible que la primera (que se muestra en la figura 4.12) se deba solamente a la actividad del intercambiador Na^+/H^+, lo cual explicaría fácilmente su dependencia de Na^+ e independencia de Cl^-. En la figura 4.13 se observa el efecto de los inhibidores amilorida y DIDS, a la misma concentración utilizada en los experimentos de acidificación con NH_4, sobre la recuperación del pHi tras una acidificación con CO_2. Ambos fármacos tuvieron un marcado efecto inhibitorio en la primera parte de la recuperación, sin embargo, al cabo de aproximadamente 5 minutos, las células tratadas con amilorida se recuperaron, para alcanzar un pHi final similar al del control; mientras que en las células tratadas con DIDS la alcalinización se mantuvo parcialmente inhibida.

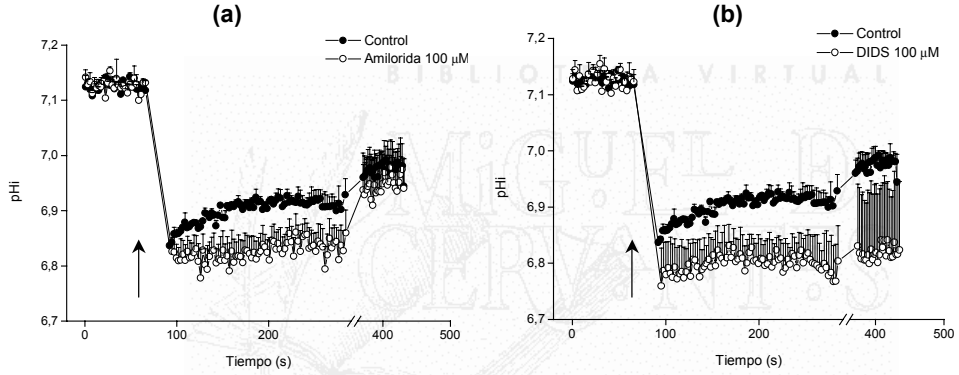


Figura 4.13. Efecto de amilorida y DIDS sobre la recuperación del pHi después de una acidificación intracelular con CO_2. La flecha indica la sustitución del medio sin HCO_3^- por medio conteniendo CO_2/HCO_3^-, como en la figura 4.12. La medición del pHi se llevó a cabo de manera continua durante cerca de 5 minutos, luego se interrumpió, para registrar el pHi final, al cabo de aproximadamente 2 minutos. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

En esta figura se puede apreciar claramente que los SEM de las células tratadas con DIDS son muy grandes; reflejo de la gran variabilidad que mostraron los linfocitos en la respuesta a la acidificación citosólica. La inhibición parcial ejercida por ambos inhibidores, en especial el DIDS, pone de manifiesto la participación de al menos un transportador de HCO_3^-, sensible a este fármaco, en la recuperación del pHi registrada en linfocitos acidificados con CO_2. Como habíamos observado antes, esta elevación del pHi no es inhibida por una larga preincubación en un medio sin Cl^-; por lo que nuestro siguiente objetivo fue comprobar que, en estas condiciones (células vacías de Cl^-), el transportador de HCO_3^- sensible a DIDS seguía funcionando. Esto nos aportaría una nueva evidencia de que se trata de un cotransportador Na^+-HCO_3^-.

La figura 4.14 muestra que la recuperación del pHi en células vacías de Cl^- es inhibida, parcialmente, por la presencia de DIDS (4.14b). Sin embargo también se puede observar

que la amilorida (4.14a) tuvo un efecto inhibitorio más marcado en estas células que en las células con una concentración fisiológica de Cl^- intracelular (4.13a).

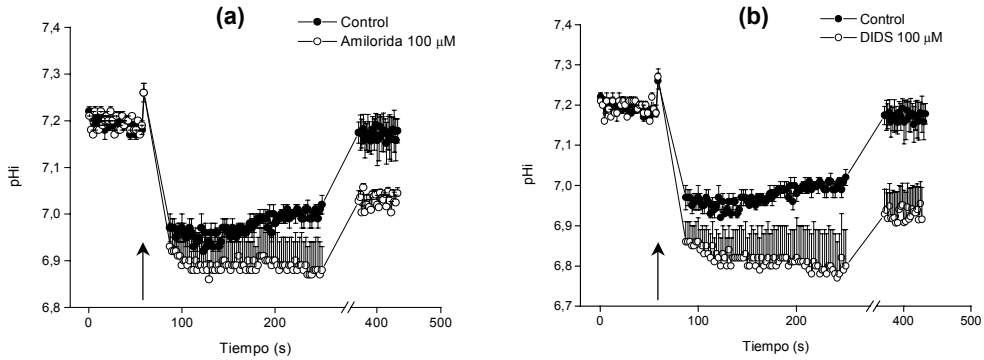


Figura 4.14. Efecto de **a)** amilorida y **b)** DIDS sobre la recuperación del pHi después de una acidificación intracelular con CO_2, en células vacías de Cl^-. La flecha indica la sustitución del medio sin HCO_3^- por medio conteniendo CO_2/HCO_3^-. Promedio ± SEM de 5 experimentos.

Es importante aclarar que, con el fin de asegurar un vaciamiento completo, en estos experimentos el tiempo de preincubación utilizado para la eliminación de Cl^- intracelular fue incrementado de 30 a cerca de 180 minutos, a 37ºC. Sin embargo en ningún caso comprobamos la concentración real de Cl^- intracelular ($[Cl^-]i$) en nuestras células. Por tal motivo, a pesar de que todos nuestros resultados apuntan hacia la existencia de un cotransportador Na^+-HCO_3^- implicado en la regulación del pHi de linfocitos, se puede argumentar que las células no estaban totalmente vacías de Cl^- y, por lo tanto, un intercambiador Cl^-/HCO_3^- podría aún mantenerse activo. A este respecto, muchos autores han intentado distinguir entre ambos tipos de transportadores de HCO_3^-, mediante una maniobra de eliminación del Cl^- intracelular, para lo que han utilizado diversos tiempos de incubación en medios libres de este ion.

En astrocitos de rata, fue suficiente una incubación de 11 minutos para extraer el Cl^- citosólico, sin embargo, en este estudio se utilizó una técnica colorimétrica para determinar la $[Cl^-]i$ real (24). En la línea celular Vero (células renales de mono), la actividad del intercambiador Cl^-/HCO_3^- dependiente de Na^+ se vio totalmente impedida por una preincubación de 30 minutos en medio sin Cl^- (231); mientras que, en células cardíacas, 20 minutos en un medio sin Cl^- fueron suficientes para eliminar el Cl^- citosólico (130). Además, en linfocitos de rata, se ha demostrado la existencia de un intercambiador Cl^-/HCO_3^- a través del cual ocurre un rápido intercambio Cl^-/Cl^- (81), por lo que en estas células, las incubaciones cortas en un medio sin Cl^- darían lugar a una considerable disminución de $[Cl^-]i$. Sin embargo, en otro modelo de células nerviosas, una incubación de 4 horas en medio sin Cl^- no fue suficiente para inhibir el intercambiador Cl^-/HCO_3^- dependiente de Na^+ (203). En consecuencia, no podemos asegurar que el mecanismo implicado en la introducción de HCO_3^- al citosol de linfocitos humanos sea un cotransportador Na^+-HCO_3^- electrogénico, semejante a aquel descrito en hepatocitos (84) o células nerviosas (24, 34).

Por otro lado el efecto inhibitorio de amilorida y DIDS sobre la recuperación del pHi, más marcado en células preincubadas en un medio sin Cl^- nos hace pensar en la participación de un componente dependiente de la $[Cl^-]i$ en los mecanismos responsables de la alcalinización intracelular. Debido a la absoluta dependencia que la elevación del pHi tiene de la presencia de Na^+ extracelular (figura 4.12a), lo más probable es que este mecanismo sea un intercambiador Cl^-/HCO_3^- dependiente de Na^+, relativamente resistente al DIDS; ya que en presencia de 100 μM DIDS y en células con una $[Cl^-]i$ normal (figura 4.13b) parece representar una contribución importante a la alcalinización intracelular dependiente del intercambiador Na^+/H^+, contribución que no es observada en células preincubadas y bañadas por un medio sin Cl^- (4.14b). De hecho, algunos autores han utilizado una concentración de DIDS mucho mayor (500 μM) que la utilizada en el presente trabajo, para inhibir el intercambio Cl^-/HCO_3^- en linfocitos humanos (226). Otra alternativa para explicar este mecanismo alcalinizador dependiente de Cl^- intracelular sería la presencia de ATPasas de H^+ dependientes de Cl^- como las que han sido descritas en algunos tipos de células (107, 251); sin embargo, este mecanismo no podría explicar la necesidad de Na^+ extracelular.

Hasta el momento nuestros resultados parecen indicar la existencia de un complejo sistema de transportadores iónicos implicados en la recuperación del pHi de linfocitos humanos después de una carga ácida: un intercambiador Na^+/H^+ y al menos un transportador de HCO_3^-, dependiente de Na^+, que podría ser un cotransportador Na^+-HCO_3^-, sin descartar la existencia de un intercambiador Cl^-/HCO_3^- dependiente de Na^+. Existen pocos trabajos relacionados con la caracterización de la actividad de transportadores de HCO_3^- en linfocitos humanos. Uno de ellos (226) describe la existencia de los dos intercambiadores Cl^-/HCO_3^- (dependiente e independiente de Na^+), que se activan en respuesta a cambios de la concentración de Cl^- extracelular, en células suspendidas, con un pHi basal de 7,2. Por otro lado, otros autores (235) han sugerido la existencia de un cotransportador Na^+-HCO_3^- basándose en la utilización de inhibidores que, sin embargo, no son verdaderamente específicos para uno u otro tipo de transportador de HCO_3^-. Hasta la fecha no se tienen noticias de que hayan sido localizadas proteínas cotransportadoras, o genes que las codifiquen, en células sanguíneas (188).

En vista de estas discrepancias se decidió continuar con el estudio del papel del Cl^- en la regulación del pHi de linfocitos, mediante la modificación de la concentración extracelular de Cl^-. En la figura 4.15 se ilustra el efecto que la eliminación del Cl^- extracelular tiene sobre el pHi basal de linfocitos, así como la importancia del Na^+ en este efecto. Se observa que la sustitución de un medio normal, con Cl^-, Na^+ y HCO_3^-, por un medio libre de Cl^- produce una alcalinización intracelular, de magnitud similar a la observada en células que se recuperan de una acidificación con CO_2. Esta alcalinización se produce también cuando el medio normal es reemplazado por un medio libre de Cl^- y de Na^+ (NaCl sustituido por manitol), sin embargo, cuando el ion Na^+ es el único eliminado del medio extracelular (sustituido por colina) se produce una marcada acidificación citosólica.

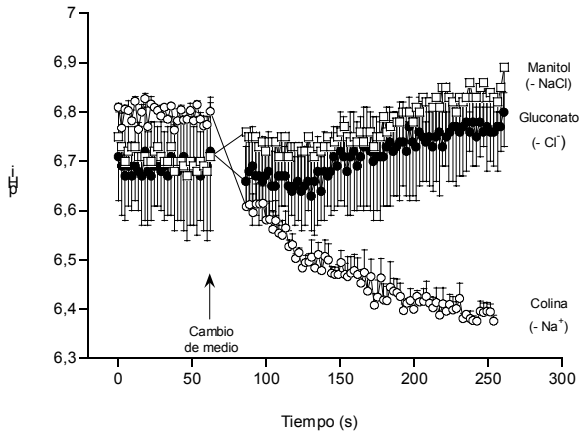


Figura 4.15. Efecto de la eliminación de iones Na^+ y Cl^- del medio extracelular, sobre el pHi de linfocitos humanos, en un medio con HCO_3^-. La flecha indica la sustitución del medio normal (con Na^+, Cl^- y HCO_3^-) por los medios de composición iónica modificada que se especifican a la derecha. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

Estos resultados pueden ser explicados por la activación de un intercambiador Cl^-/HCO_3^- que produce una entrada de HCO_3^- al citosol acoplada a una salida de Cl^-, a favor de gradiente, cuando el medio que baña a las células es sustituido por un medio libre de este último ion (gluconato o manitol). Asimismo, este intercambiador no necesita de la presencia de Na^+ en el medio externo, lo que sugiere que se trata de un intercambiador aniónico independiente de Na^+. Por último, el efecto de la eliminación del Na^+ extracelular representaría la activación, en sentido inverso, de los mecanismos dependientes de Na^+, generalmente implicados en los procesos de alcalinización citoplasmática.

Nuevamente, estos resultados contradicen lo descrito por Tepel *et al.*, quienes afirman que la supresión de Cl^- extracelular activa al intercambiador Cl^-/HCO_3^- dependiente de Na^+ en linfocitos humanos (226). Es probable que la activación, en modo inverso, de los mecanismos dependientes de Na^+ (como se observa en la figura 4.15, en las células bañadas por un medio sin Na^+) enmascare la acción de un intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+ en linfocitos resuspendidos en un medio sin Cl^- y sin Na^+, lo que explicaría la aparente dependencia del Na^+ extracelular, de la alcalinización citosólica producida por la eliminación de Cl^- observada por estos autores. En otro trabajo (184), se ha llegado a la conclusión de que, en linfocitos de rata, la eliminación de Cl^- del medio extracelular activa a los dos tipos de intercambiador Cl^-/HCO_3^-: dependiente e independiente de Na^+.

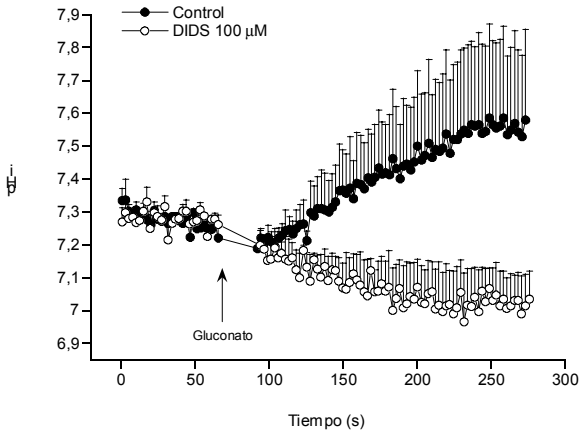


Figura 4.16. Efecto del DIDS sobre la alcalinización intracelular inducida por eliminación de Cl^-. El inhibidor DIDS fue añadido al medio libre de Cl^- (gluconato) al mismo tiempo que éste se agregó a los linfocitos. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

Para intentar comprobar la implicación de un intercambiador Cl^-/HCO_3^- en la alcalinización citosólica producida por la supresión de Cl^- extracelular, se utilizó el inhibidor DIDS, como se muestra en la figura 4.16. En esta figura se observa que, a una concentración de 100 μM el DIDS bloquea completamente la alcalinización inducida por la eliminación de Cl^- extracelular, lo que indica que dicha alcalinización es dependiente del funcionamiento de un intercambiador Cl^-/HCO_3^- sensible al DIDS. Esta observación no apoya la existencia del intercambiador Cl^-/HCO_3^- dependiente de Na^+ e insensible al DIDS, que habíamos sugerido anteriormente.

Otra confirmación de la existencia de un intercambiador Cl^-/HCO_3^-, viene dada por el efecto de la adición de Cl^- extracelular a células vacías de este ion. En esta situación, el Cl^- entrará rápidamente a la célula, provocando la salida de HCO_3^- y, por tanto, una acidificación citoplasmática. Además, si el mecanismo que utiliza el Cl^- para penetrar en la célula es dependiente de Na^+, es decir, un intercambiador Cl^-/HCO_3- dependiente de Na^+, la adición de Cl^- en un medio sin Na^+ no debería provocar una acidificación citosólica.

La figura 4.17 muestra que la adición de Cl^- a células preincubadas en ausencia de este ion durante 40 minutos, tuvo un efecto acidificante sobre el pHi; sin embargo la adición de Cl^- combinada con eliminación de Na^+ (círculos blancos) produce una acidificación aún mayor, indicando que la ruta de entrada de Cl^- es independiente del Na^+ extracelular; es decir, estos resultados apoyan una vez más la existencia de un intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+, pero no de uno dependiente del mismo.

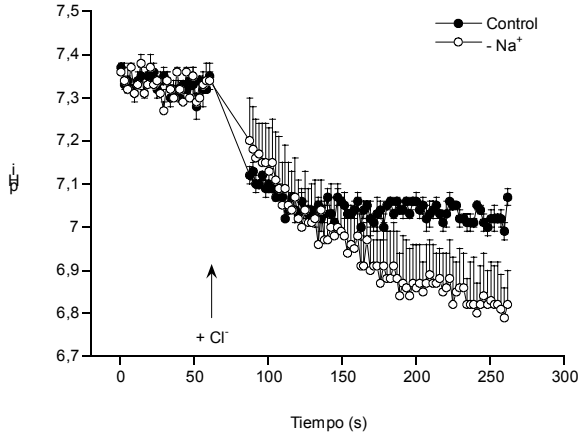


Figura 4.17. Efecto de la adición de Cl^- a células incubadas sin dicho ion durante 40 minutos; e importancia del Na^+ extracelular. Las células fueron bañadas por un medio sin Cl^-, con Na^+ y HCO_3^-; donde indica la flecha el medio se sustituyó por uno conteniendo ambos iones, y Na^+ (control) o con Cl^-, y HCO_3^- pero sin Na^+. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

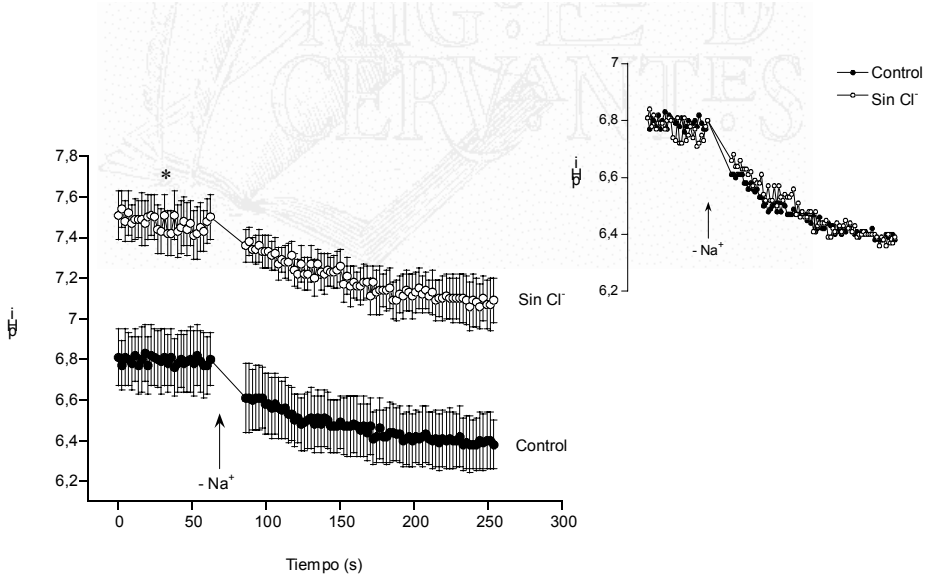


Figura 4.18. Efecto del Cl^- sobre la acidificación citosólica inducida por eliminación del Na^+ extracelular en linfocitos humanos bañados por un medio con HCO_3^-. En el inserto se compara la acidificación en un medio con y sin Cl^- extracelular, normalizados ambos trazos a un mismo pHi basal. Promedio ± SEM de 3 experimentos. * Diferencia significativa de pHi con respecto al control.

Asimismo, la comparación de la acidificación citosólica producto de la eliminación del

Na^+ extracelular en células normales y en células vacías de Cl^- (figura 4.18) confirma esta suposición. En esta figura se puede apreciar que la eliminación del ion Na^+ del medio que baña a las células produce una acidificación citosólica de la misma magnitud en células con y sin Cl^- intracelular, tal como se puede comprobar en el inserto donde se ilustran ambos trazos, normalizados a un mismo pHi basal. En esta figura también se observa que el pHi basal de células preincubadas sin Cl^- es significativamente superior al de las células control. Esta diferencia, con respecto a la figura 4.11 (en que la diferencia entre ambos valores de pHi basal no era significativa) puede ser debida a un mayor tiempo de incubación en el medio carente de Cl^-.

Considerando todos los resultados expuestos hasta ahora podemos confirmar la existencia de al menos tres transportadores iónicos implicados en la regulación del pHi de linfocitos humanos: a) un intercambiador Na^+/H^+; b) un transportador de HCO_3^- dependiente de Na^+ y poco o nada sensible al Cl^-; y, c) un intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+. Mientras que la identidad del primero y tercero parece muy clara y concuerda con lo descrito en bibliografía sobre linfocitos y otras células similares (147, 184, 226, 250); la posibilidad de que exista un cotransportador Na^+-HCO_3^- en la membrana plasmática de linfocitos humanos es más remota; sin embargo, nuestros resultados así lo sugieren.

Por último, nuestros resultados han demostrado también la importancia de los dos primeros mecanismos (dependientes de Na^+) en la recuperación del pHi después de una acidificación citosólica, por el contrario no se ha podido observar una participación activa del intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+ en respuesta a una modificación del pHi.

Debido a que los intercambiadores aniónicos funcionan generalmente como mecanismos exportadores de OH^-, es decir, en el sentido de acidificar el citosol después de una carga alcalina, se decidió utilizar la técnica de alcalinización citosólica con NH_4^+ para investigar si el intercambiador Cl^-/HCO_3^- que hemos caracterizado funcionalmente, mediante modificaciones de la concentración de Cl^- extracelular, podía ser activado en respuesta a una elevación del pHi.

La figura 4.19 ilustra la recuperación de una alcalinización citosólica en células normales y en células vacías de Cl^- y bañadas por un medio libre de este ion . En ella se puede observar, en primer lugar, que el pHi basal de células sin Cl^- es superior; en segundo lugar, que la magnitud de la alcalinización inducida por NH_4^+, es menor en éstas que en el control; por último, que la recuperación del pHi, tras la alcalinización es sensiblemente mayor en el control que en las células sin Cl^-.

Estos resultados ponen de manifiesto una vez más, la actividad de un vigoroso intercambiador Cl^-/HCO_3^- a través del cual se produce una alcalinización citosólica por incubación en medio libre de Cl^-; este mecanismo también puede explicar convenientemente la diferencia en la elevación total de pHi inducida por NH_4^+ en células con y sin cloro. En estas últimas la $[HCO_3^-]i$ es superior, por efecto del funcionamiento invertido del intercambiador, lo que implica una elevación de la capacidad tampón total del citosol (como se ha demostrado en la sección de material y métodos, la capacidad tampón

en un medio sin HCO_3^- es la misma para un pHi desde 6,8 hasta 7,4, sin embargo, en un medio con HCO_3^- la capacidad tampón total depende de la $[HCO_3^-]i$) el aumento de la capacidad tampón es la causa de que una misma concentración de NH_4^+ produzca un menor aumento del pHi.

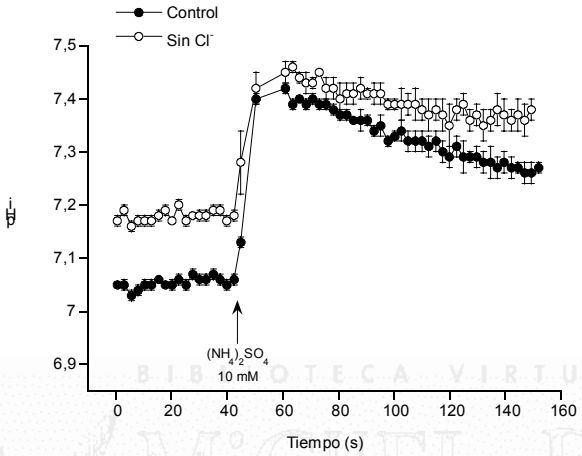


Figura 4.19. Recuperación del pHi después de una alcalinización intracelular provocada por adición de NH_4^+ en un medio con HCO_3^-. Las células sin Cl^- fueron incubadas 40 minutos en ausencia de este ion. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

Por último, la recuperación del pHi, tras la alcalinización por NH_4^+ (en realidad efecto de la rápida entrada de NH_3) viene dada tanto por la lenta entrada de la especie cargada NH_4^+ como por la activación de algún mecanismo regulador del pHi. Basándose en el efecto que la eliminación del Cl^- tiene sobre la recuperación del pHi, es posible sugerir que el transportador involucrado en ésta es un intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+ funcionando en su modo normal: introducir Cl^- externo a la vez que extraer HCO_3^-. En un medio sin Cl^-, este transportador estará inactivo, por lo que la mínima recuperación del pHi registrada, puede ser atribuida exclusivamente a la entrada de NH_4^+. Por lo tanto, hemos podido comprobar que el intercambiador Cl^-/HCO_3^- de linfocitos humanos puede ser el principal mecanismo que estas células poseen para contrarrestar una alcalinización citoplasmática, que podría ser causada por la actividad de los transportadores dependientes de Na^+, en concordancia con lo descrito por otros autores para linfocitos y otros modelos celulares (165, 184), quienes también han demostrado que la actividad del intercambiador Cl^-/HCO_3^- es dependiente del pHi: mayor actividad a pHi más alcalino. Por otro lado, este mecanismo también puede ser de importancia fisiológica en la regulación del volumen celular, como ha sido descrito en linfocitos de rata, donde la actividad de los intercambiadores Na^+/H^+ y Cl^-/HCO_3^- se acopla, gracias a su diferente sensibilidad al pHi, para producir un aumento del volumen celular dependiente de la ganancia neta de NaCl producto del funcionamiento conjunto de ambos intercambiadores (147).

4.1.2. Regulación de la actividad de los transportadores de membrana implicados en la alcalinización citosólica, por diferentes rutas de transducción

Una vez caracterizados los principales elementos responsables del mantenimiento y regulación del pHi en linfocitos humanos, que a su vez están implicados en el transporte de iones osmóticamente activos, como Cl^- y Na^+; se decidió estudiar la modulación de su actividad por diversas señales intracelulares en las que podría llegar a incidir, de algún modo, la ruta de acción del ácido ocadaico. Los resultados que a continuación se describen fueron obtenidos, utilizando el espectrofluorímetro como instrumento de medición.

4.1.2.1. Regulación por cinasas

Es conocida la importancia de los procesos de fosforilación en la modulación de la actividad de transportadores y canales iónicos (106, 159). Como el ácido ocadaico es un potente inhibidor de una de las fosfatasas de proteína más importantes en el citosol celular (PP2A), es de esperar que esta toxina produzca una hiperfosforilación generalizada, capaz de modificar numerosos procesos celulares, incluyendo el funcionamiento de los transportadores iónicos estudiados en el presente trabajo. En este apartado se describirán los estudios realizados sobre el efecto de la activación e inhibición específica de PKC y PKA, dos de las cinasas de residuos serina/treonina, más importantes del citosol; así como, de las cinasas de residuos tirosina (PTKs) y de la cinasa del fosfatidil inositol, PI 3-cinasa. A pesar de que los substratos de estas dos últimas cinasas no sean dianas directas de la PP2A (que desfosforila proteínas en residuos ser/tre), las PTKs y la IP 3-cinasa tienen una importancia mayúscula en los procesos de transducción de señales de linfocitos (120, 129) y es muy posible que estén involucradas en la regulación de la actividad de los transportadores iónicos responsables del mantenimiento del pHi en estas células.

De acuerdo a los resultados descritos en el apartado anterior, los linfocitos poseen dos transportadores implicados en la recuperación del pHi después de una acidificación: un intercambiador Na^+/H^+ que, en un medio sin HCO_3^- es el único mecanismo alcalinizador; y un transportador de HCO_3^- dependiente de Na^+ que podría ser un cotransportador electrogénico Na^+-HCO_3^-, pero que, por no poder comprobar su identidad denominaremos simplemente transportador de HCO_3^-. En presencia de HCO_3^- extracelular, ambos mecanismos contribuyen de manera equivalente a la recuperación del pHi después de una acidificación citosólica; sin embargo, la utilización del inhibidor amilorida, específico para el intercambiador Na^+/H^+, permite registrar la alcalinización intracelular dada, exclusivamente, por la actividad del transportador de HCO_3^-.

Considerando lo anterior, en la figura 4.20 se muestra el efecto de la estimulación e inhibición de la PKC sobre la recuperación del pHi de células acidificadas mediante la técnica de preincubación con NH_4^+. En la figura 4.20a, se observa la recuperación dependiente de la actividad del intercambiador Na^+/H^+ (en un medio sin HCO_3^-) y en la figura 4.20b, la dependiente del transportador de HCO_3^- (en un medio con HCO_3^- y amilorida). La estimulación de la PKC se consiguió mediante la adición del éster de forbol TPA (100 ng/ml) a la cubeta de medición justo antes de comenzar el experimento. Por su

parte, el cloruro de cheleritrina (ChC 1 μM) se utilizó para inhibir a la cinasa para lo cual fue necesario una preincubación de 10 minutos, al mismo tiempo que se realizaba la carga del indicador fluorescente.

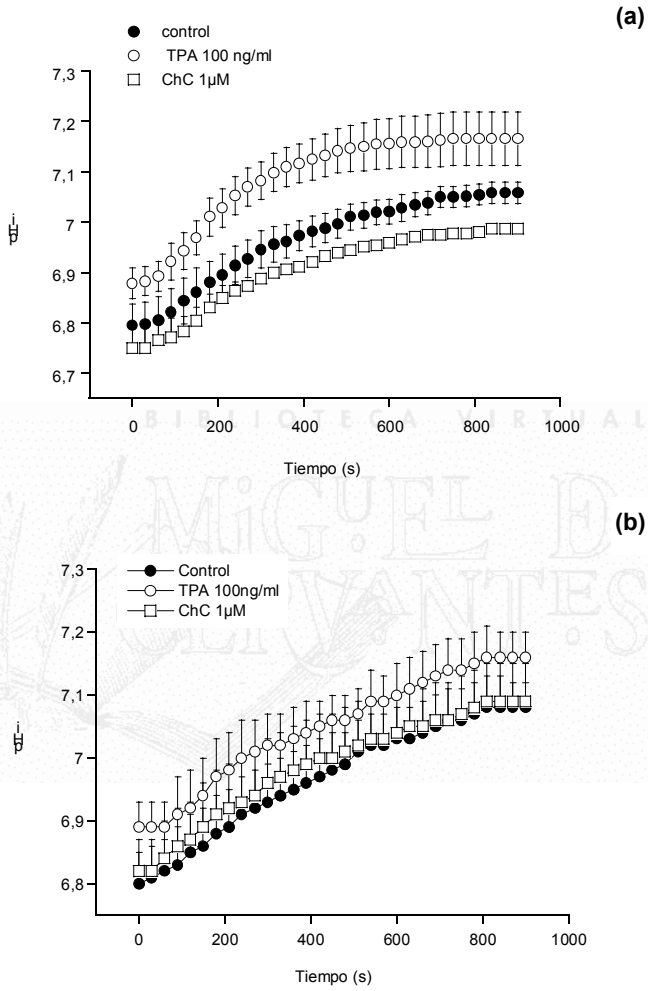


Figura 4.20. Efecto de la activación e inhibición de la PKC sobre la recuperación del pHi después de una acidificación citosólica en linfocitos humanos. **a)** En un medio sin HCO_3^- **b)** En un medio con CO_2/HCO_3^- y amilorida 200 μM. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

En esta figura se puede observar que la actividad de la PKC es importante para determinar la actividad del intercambiador Na^+/H^+, pero no del transportador de HCO_3^- (gráficas a y b, respectivamente). La estimulación de la PKC estimula a su vez la actividad del intercambiador Na^+/H^+, mientras que su inhibición reduce ligeramente la actividad del mismo, indicando que, cierto nivel basal de actividad de la PKC podría ser necesario para garantizar una estimulación máxima del intercambiador Na^+/H^+ en respuesta a una

acidificación intracelular. Esta observación tiene sentido, ya que la proteína responsable del intercambio Na^+/H^+ está fosforilada en su estado basal, en sitios susceptibles de ser diana de la PKC.

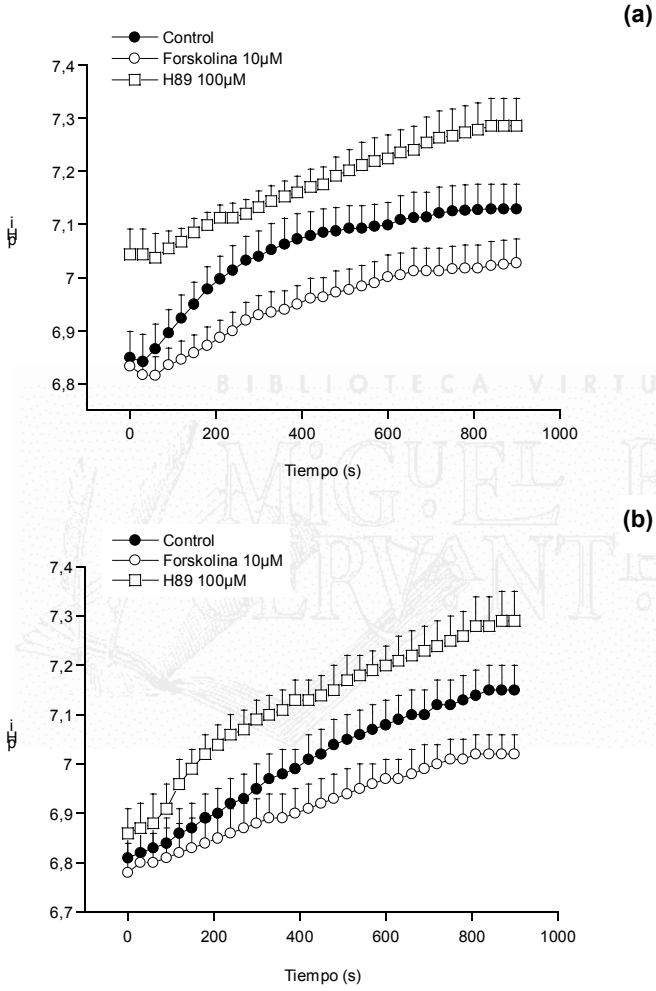


Figura 4.21. Efecto de la activación e inhibición de la PKA sobre la recuperación del pHi depués de una acidificación citosólica en linfocitos humanos. **a)** En un medio sin HCO_3^- **b)** En un medio con CO_2/HCO_3^- y amilorida 200 µM. Promedio ± SEM de 4 experimentos.

En la figura 4.21, se muestra el mismo tipo de experimento, para analizar el efecto de la PKA. Los fármacos forskolina y H-89 se utilizaron para estimular e inhibir, respectivamente, a la cinasa (10 minutos de preincubación a 37ºC). En esta figura se observa que, a diferencia de la PKC, la PKA modula la actividad de ambos transportadores. Otra diferencia importante entre ambas cinasas es que, mientras que la estimulación de la PKC tiene un efecto positivo sobre la actividad del intercambiador Na^+/H^+, la estimulación de la PKA

inhibe la actividad de ambos transportadores involucrados en la alcalinización citosólica. Asimismo, la inhbición de la actividad basal de la PKA con H-89 estimula la recuperación del pHi, después de una acidificación, dada por el intercambiador Na^+/H^+ y por el transportador de HCO_3^-.

La regulación de la actividad del intercambiador Na^+/H^+ por PKC y PKA es un tema que ha sido bastante estudiado. Se sabe que la PKC estimula la actividad del intercambiador en numerosos modelos celulares (5, 94, 166), mediante un incremento de la afinidad del mismo, por los H^+ intracelulares (90, 168), que produce una activación del intercambiador a valores de pHi a los que normalmete estaría en reposo. Por tanto, la estimulación de la PKC puede activar al intercambiador Na^+/H^+ a un valor de pHi basal. El mecanismo por el cual la PKC modifica la afinidad del intercambiador Na^+/H^+ por los iones H^+ puede ser a través de fosforilación directa de la proteína intercambiadora (95). Otros autores observaron que no todas las isoformas del intercambiador Na^+/H^+ pueden ser activadas por PKC, solamente los NHE 1 y 2 tienen esta propiedad, mientras que el NHE3 es inhibido por la PKC (119).

De manera similar, los mismos autores encontraron que la estimulación de la PKA tiene un efecto positivo sobre la actividad de las isoformas NHE1 y NHE2 y un efecto negativo sobre la actividad del NHE3 (119). Por su parte, Azarani, *et al.* (14) observaron que el NHE1 nativo de osteoblastos de la línea celular UMR-106 se activa en respuesta a estímulos externos, a través de la ruta del AMPc/PKA. Sin embargo, otros estudios han observado un efecto inhibitorio o una falta de efecto de la PKA sobre la actividad del NHE1 (88, 138, 202). Además, la isoforma NHE1 del intercambiador Na^+/H^+ no posee sitios que puedan ser fosforilados por PKA (159), por lo que el mecanismo mediante el cual esta cinasa interactúa con el transportador tiene que ser indirecto.

Nuestros resultados indican un efecto positivo de la PKC y negativo de la PKA sobre la actividad del intercambiador Na^+/H^+ de linfocitos humanos (seguramente la isoforma NHE1). Queda pues confirmada, una vez más, la estrecha relación que existe entre el intercambiador Na^+/H^+ y la PKC, así como la falta de uniformidad en el efecto de la PKA. De hecho, se considera que la regulación del NHE1 por PKA es totalmente dependiente del modelo celular estudiado (159) e incluso, en algunos casos, de la técnica de estudio empleada (células en suspensión vs células adeheridas) (14).

Por otro lado, nuestros resultados también indican que el transportador de HCO_3^- es independiente de la actividad de la PKC, e inhibido, al igual que el intercambiador Na^+/H^+ por la PKA. Como hemos dicho antes existen pocos estudios relacionados con la modulación de la actividad de los diversos representantes de la familia de transportadores de HCO_3^-, por cinasas de proteína u otras rutas de transducción. Algunos estudios han demostrado una estimulación de la actividad del intercambiador Cl^-/HCO_3^- dependiente de Na^+ por factores de crecimiento (80, 121), aunque se desconocen las rutas de transducción que puedan estar implicadas.

También se ha descrito que la actividad del cotransportador Na^+-HCO_3^- puede ser modulada por la ruta del AMPc/PKA (188). Este transportador puede ser estimulado por una elevación del AMPc en células de hígado y páncreas (7, 112) mientras que, en células renales, la PKA inhibe el cotransporte Na^+-HCO_3^- (22, 192); finalmente, la activación de la PKC es necesaria para la estimulación del cotransportador a través de receptores muscarínicos (193). En células de epitelio biliar, la PKA, pero no la PKC, está involucrada en la ruta de transducción que produce activación del intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+ en respuesta a un estímulo secretor (8). Por lo tanto, nuestros resultados representan una importante aportación al conocimiento sobre la regulación de los transportadores de HCO_3^-, al describir la existencia de un transportador de HCO_3^-, presente en la membrana de linfocitos humanos que es inhibible por PKA e insensible a PKC.

El efecto negativo de la activación de la PKA sobre la actividad de ambos mecanismos responsables de la recuperación del pHi después de una acidificación es también congruente con el efecto inhibitorio que esta cinasa tiene sobre diversos procesos celulares como la proliferación celular, señal intracelular de Ca^{2+} o polimerización de actina en linfocitos humanos (205, 244). Sin embargo, nuestros resultados no permiten describir adecuadamente los mecanismos o la importancia fisiológica de la inhibición, por parte de la PKA , de los transportadores reguladores del pHi.

Otras cinasas clave en los mecanismos reguladores y señalizadores de linfocitos humanos, son las cinasas de tirosina (PTKs) y la PI 3-cinasa. En las figuras 4.22 y 4.23, que se muestran a continuación, se puede observar el efecto que la inhibición de PTKs, con genisteína, y de PI 3-cinasa, con wortmanina (30 minutos de preincubación), tiene sobre la recuperación del pHi dependiente de la actividad del intercambiador Na^+/H^+ y del transportador de HCO_3^- dependiente de Na^+.

En ambas figuras se observa que la inhibición de estas cinasas produce a su vez una inhibición de la recuperación del pHi tanto en un medio sin HCO_3^- como en uno con HCO_3^- y amilorida. Esto indica que alguna PTK, así como la PI 3-cinasa son de algún modo necesarias para la activación, por medio de una acidificación citosólica, de los transportadores iónicos involucrados en la alcalinización celular. Es poco probable que cualquiera de los dos transportadores iónicos sea diana de PTKs o PI 3-cinasa, aunque el cotransportador Na^+-HCO_3^- podría poseer uno o dos sitios susceptibles de fosforilación por PTKs (188). Por otro lado, la PI 3-cinasa presenta actividad cinasa sobre proteínas, sin embargo, ésta parece estar restringida a un proceso de autorregulación de la propia enzima (207). Por tanto, el efecto de PTKs e IP 3-cinasa sobre la actividad de los transportadores iónicos debe ser indirecto.

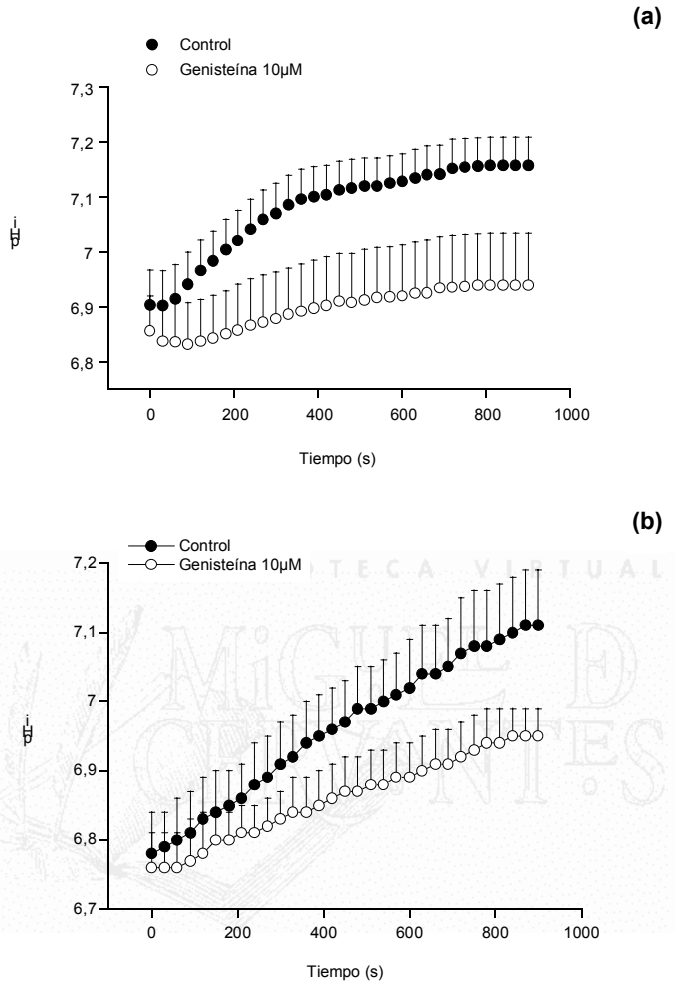


Figura 4.22. Efecto de la inhibición de cinasas de tirosina sobre la recuperación del pHi después de una acidificación citosólica en linfocitos humanos. **a)** En un medio sin HCO_3^- **b)** En un medio con CO_2/HCO_3^- y amilorida 200 μM. Promedio ± SEM de 4 experimentos.

Algunos estudios han demostrado que PI 3-cinasa (143, 199) y PTKs (20, 78, 125) están involucradas en la activación del intercambiador NHE1 por diversos estímulos extracelulares, así como por choque osmótico (89). Sin embargo, en nuestros resultados hemos observado que estas cinasas también pueden modificar la actividad del intercambiador, cuando este es activado por acidificación intracelular; además, su efecto no es específico sobre el intercambiador Na^+/H^+, sino que inhiben por igual al transportador de HCO_3^-.

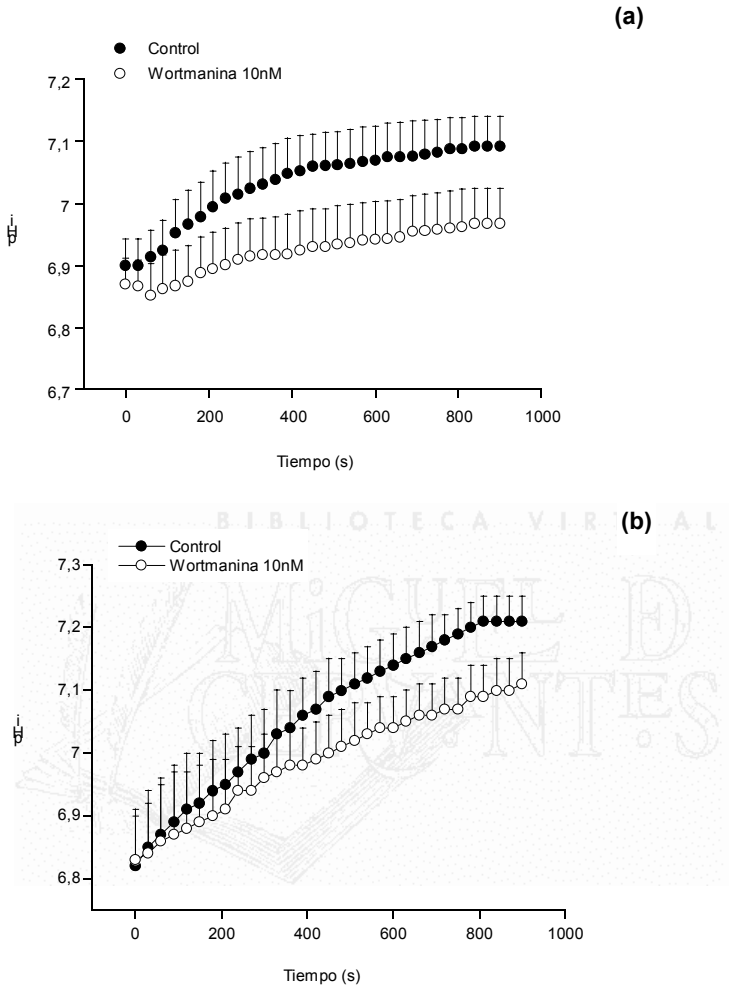


Figura 4.23. Efecto de la inhibición de la PI 3-cinasa sobre la recuperación del pHi después de una acidificación citosólica en linfocitos humanos. **a)** En un medio sin HCO_3^- **b)** En un medio con CO_2/HCO_3^- y amilorida 200 μM. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

Un mecanismo por el cual la inhibción de la PI 3-cinasa puede reducir la actividad de la isoforma NHE3 del intercambiador Na^+/H^+, independientemente de estímulos extracelulares, es mediante la inhibición de la exocitosis de las proteínas intercambiadoras, que normalmente son endocitadas y luego recicladas a la membrana plasmática (128). Este mecanismo bien podría explicar los resultados aquí descritos, ya que se sabe que la PI 3-cinasa está estrechamente relacionada con las PTKs, de hecho, se ha propuesto que la isoforma β del intercambiador Na^+/H^+, nativa de eritrocitos de trucha (97), así como la isoforma 1 de la línea celular epitelial Caco-2 (255) pueden ser regulados mediante un proceso de reciclado entre la membrana plasmática y vesículas endocíticas, similar al descrito para el NHE3. Por lo tanto, es posible que la interacción de PI 3-cinasa y PTKs con

elementos del citoesqueleto (responsable de los procesos de tráfico vescicular), que a su vez interaccionen con los transportadores iónicos, sea la causa del efecto inhibitorio aquí observado.

4.1.2.2. Implicación del citoesqueleto.

Teniendo en cuenta los resultados expuestos anteriormente, se decidió estudiar el papel del citoesqueleto en la actividad del intercambiador Na^+/H^+ y del transportador de HCO_3^- dependiente de Na^+. El citoesqueleto es una red de filamentos proteicos que se extienden a través del citoplasma. Está constituido por 3 tipos de filamentos, cada uno formado por subunidades proteicas químicamente distintas: a) los filamentos de F-actina, formados por la polimerización de la proteína actina; b) los microtúbulos, formados por la proteína tubulina; y c) los filamentos intermedios, formados por diversas clases de proteínas (116).

El citoesqueleto regula los procesos celulares mecánicos, como la locomoción o contracción, así como el transporte intracelular de vesículas u organelos. Sin embargo, también puede modificar la actividad de canales y transportadores iónicos y participar en los mecanismos de transducción de señales, al funcionar como una superficie sobre la que se anclan moléculas señalizadoras, como cinasas o GTPasas, además de poseer la capacidad de compartimentalizar el interior celular con lo cual puede estar implicado en la especificidad de ciertas señales (116). En linfocitos T, los microtúbulos son esenciales para los procesos de polarización y migración de estas células hacia los tejidos (183).

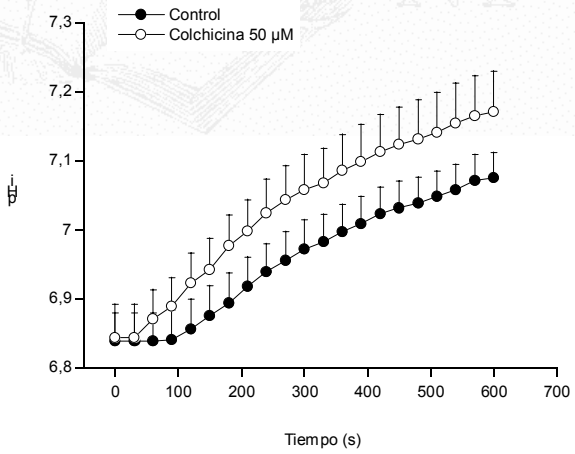


Figura 4.24. Efecto de la despolimerización de microtúbulos sobre la recuperación del pHi, después de una acidificación intracelular, en un medio con HCO_3^-. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

En este trabajo hemos decidido estudiar la importancia de la red de microtúbulos para la activación de los transportadores iónicos responsables de la alcalinización citosólica, en

respuesta a una carga ácida, por preincubación con NH_4^+. Para ello hemos utilizado el fármaco colchicina que se une a las unidades de tubulina libres e impide su polimerización, por lo que una preincubación con esta sustancia produce la ruptura de la red de microtúbulos. En la figura 4.24 se muestra el efecto de una preincubación de 1 hora con colchicina 50 μM sobre la recuperación del pHi en un medio con HCO_3^-.

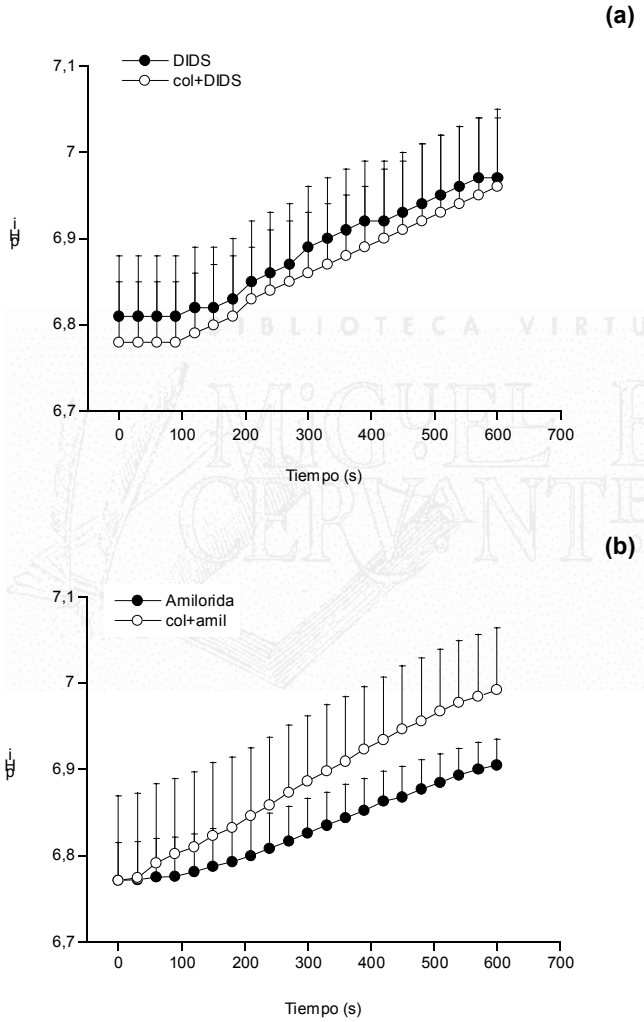


Figura 4.25. Efecto de la despolimerización de microtúbulos sobre la recuperación del pHi, después de una acidificación intracelular, en un medio con HCO_3^-. **a)** Con DIDS 100 μM, alcalinización dependiente del intercambiador Na^+/H^+ **b)** Con amilorida 100 μM, dependiente del transportador de HCO_3^-, Promedio ± SEM de 4 experimentos.

Se observa que la ruptura de la red de microtúbulos estimula la recuperación del pHi. Como ésta es debida a la acción de dos intercambiadores, en la figura 4.25 se muestra el

efecto de la colchicina sobre la recuperación del pHi dependiente del intercambiador Na^+/H^+ (en un medio conteniendo DIDS 100 μM) y del transportador de HCO_3^- (medio con amilorida 100 μM), por separado. En esta figura se puede apreciar que la despolimerización de microtúbulos no tiene ningún efecto sobre la actividad del intercambiador Na^+/H^+ (figura 4.25a) mientras que estimula la alcalinización intracelular producida por el transportador de HCO_3^- (4.25b). Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que la ruptura del citoesqueleto de tubulina aumenta la actividad del transportador de HCO_3^- que participa en la alcalinización celular en linfocitos humanos.

Como hemos dicho anteriormente, la regulación de la actividad del intercambiador Na^+/H^+ por elementos del citoesqueleto ha sido estudiada por Watson *et al.* (255). Estos autores encontraron que la actividad de este intercambiador es dependiente de la integridad de los microfilamentos de actina, pero no de los microtúbulos, lo que concuerda con nuestros resultados. Por otro lado, la red de microtúbulos está implicada en el transporte de vesículas secretoras y de exocitosis en diversas líneas celulares epiteliales (54, 167), sin embargo, en estos estudios se ha observado que la despolimerización de microtúbulos altera los movimientos de proteínas secretoras, pero no de proteínas constitutivas de la membrana plasmática, como serían los transportadores iónicos aquí estudiados.

El efecto de la colchicina sobre la actividad de transportadores y canales iónicos también ha sido estudiado. En la línea celular PC12 este fármaco no altera el movimiento de iones Na^+, K^+ o Cl^-, en respuesta a un choque osmótico (52). Sin embargo, en otros estudios se ha demostrado que la desestabilización de la red de microtúbulos puede inhibir o aumentar el transporte de Cl^- a través de canales (105, 154), así como activar canales de Ca^{2+} (229) y estimular el transporte de aminoácidos impulsado por Na^+ (44). Por último, en células hepáticas, la colchicina inhibe tanto la actividad basal como la dependiente de un estímulo extracelular, del intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+; probablemente mediante la inhibición del transporte de vesículas que contienen la proteína intercambiadora (8).

Por lo tanto, es posible que la ruptura del citoesqueleto de tubulina aumente la actividad del transportador de HCO_3^- dependiente de Na^+ implicado en la alcalinización celular, aunque nuestros resultados no nos permiten determinar el mecanismo. Sin embargo, la mayor recuperación del pHi en un medio con HCO_3^- también podría deberse a la inhibición de la actividad de un intercambiador Cl^-/HCO_3^-, de un modo similar al propuesto por los autores antes mencionados (8), este intercambiador, normalmente, estaría encargado de expulsar el HCO_3^- introducido por el funcionamiento del transportador de HCO_3^- dependiente de Na^+, manteniendo el pHi ligeramente más ácido.

En resumen, el intercambiador Na^+/H^+ y el transportador de HCO_3^- de linfocitos humanos son sensibles a PKA, PTKs y PI 3-cinasa, teniendo la primera un papel negativo y las dos últimas un papel positivo en la modulación actividad de los transportadores, en respuesta a una acidificación intracelular. Además el intercambiador Na^+/H^+ es estimulado por la PKC e insensible a la ruptura de la red de microtúbulos. Por el contrario, el transportador de HCO_3^- es insensible a la actividad de la PKC y es estimulado por la ruptura

de los microtúbulos. Otra posibilidad es que la desestabilización del citoesqueleto de tubulina inhiba la actividad de un intercambiador Cl^-/HCO_3^-.

4.1.3. Efecto del ácido ocadaico sobre la actividad de los mecanismos reguladores del pHi en linfocitos humanos

Una vez conocida la importancia de ciertas señales de transducción sobre la actividad de los mecanismos reguladores del pHi (en especial sobre los dos mecanismos alcalinizadores), se decidió llevar a cabo algunos experimentos encaminados a la caracterización del efecto del ácido ocadaico sobre la actividad de dichos transportadores.

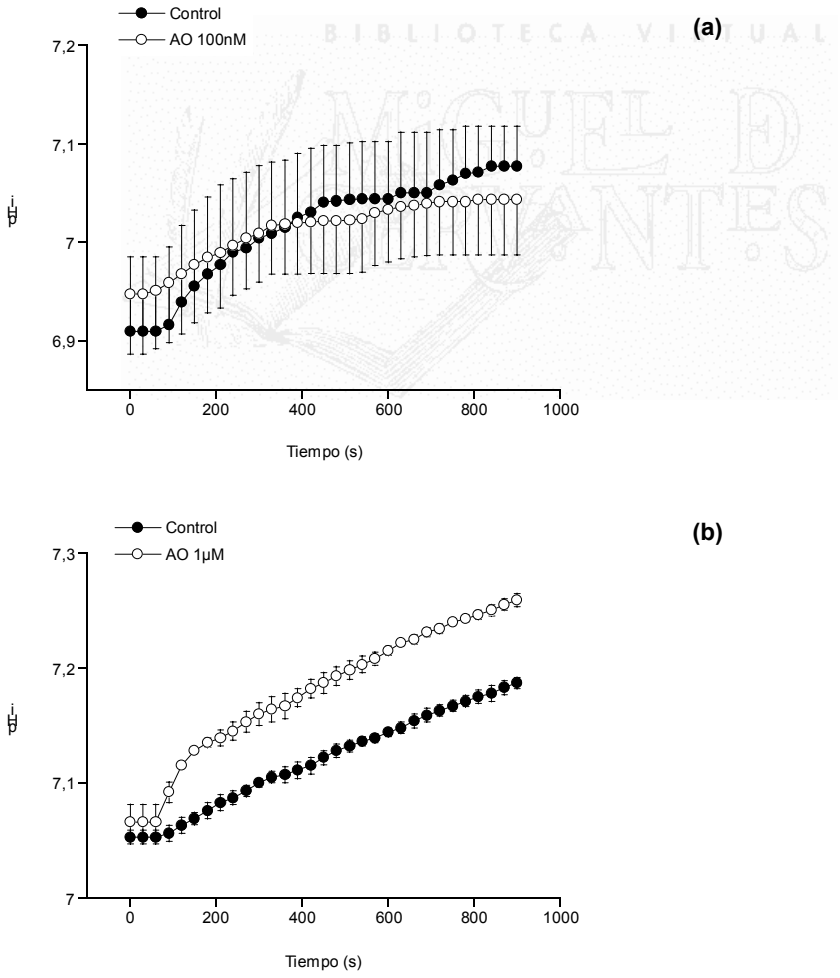


Figura 4.26. Efecto de la inhibición de fosfatasas, producida por preincubación (10 minutos) con distintas concentraciones de ácido ocadaico, sobre la recuperación del pHi en un medio sin HCO_3^-. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

En la figura 4.26 se observa el efecto que la preincubación (10 minutos, 37ºC) con dos concentraciones de ácido ocadaico (AO), tiene sobre la recuperación del pHi de linfocitos acidificados por la técnica del NH_4Cl y resuspendidos en un medio sin HCO_3^-. Se observa que a la concentración menor (100 nM) el AO no tiene ningún efecto sobre la alcalinización citoplasmática; mientras que a una concentración de 1 μM, esta toxina estimula la actividad del intercambiador Na^+/H^+, que es el encargado de la recuperación del pHi en un medio sin HCO_3^-.

Estos resultados concuerdan con lo descrito en bibliografía por varios autores que han observado que el AO tiene un efecto similar al de los ésteres de forbol y otros activadores de la PKC, sobre la actividad del NHE1 (26, 197) así, se ha observado que ambos tipos de compuestos aumentan la fosforilación del intercambiador de manera equivalente.

A continuación se estudió el efecto del AO sobre la actividad del transportador de HCO_3^- implicado en la alcalinización celular, resultados que se muestran en la figura 4.27. En ella se puede apreciar que la toxina inhibe ligeramente la recuperación del pHi en un medio con HCO_3^- y amilorida. Esto podría ser indicativo de una inhibición de la actividad del transportador de HCO_3^- dependiente de Na^+, pero también de una estimulación de la actividad del intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+, capaz de acidificar el citosol celular. En un estudio sobre regulación del intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+, se encontró que la actividad basal de este transportador no es afectada por el AO en células del epitelio biliar (8).

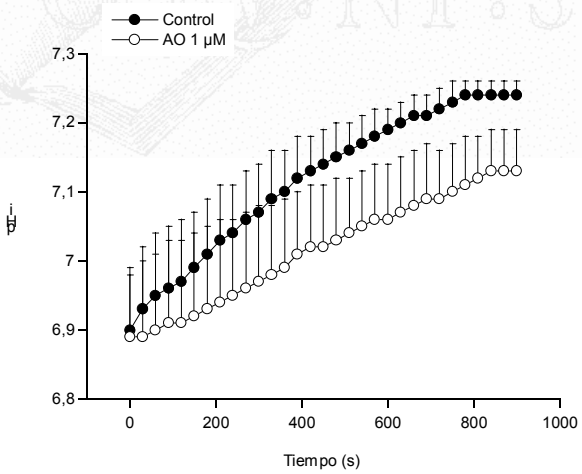


Figura 4.27. Efecto de la preincubación con ácido ocadaico sobre la recuperación del pHi en un medio con HCO_3^- y amilorida. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

Por otro lado, si, el AO inhibe la actividad del transportador de HCO_3^- dependiente de Na^+, esta efecto podría estar relacionado con la hiperfosforilación de proteínas dependiente de la PKA, ya que, como se observa en la figura 4.21, la activación de esta cinasa inhibe la

actividad del transportador de HCO_3^- de manera similar al AO. Por otro lado, el efecto del AO sobre el intercambiador Na^+/H^+ es semejante al efecto de la estimulación de la PKC, como se observa en la figura 4.20a y opuesto al de la estimulación de PKA (figura 4.21a). Esto sugiere que el efecto del AO sobre el NHE es dependiente de PKC e independiente de PKA, lo cual concuerda con la bibliografía (26).

El AO, al igual que los ésteres de forbol, puede producir estimulación del intercambiador Na^+/H^+ en ausencia de una acidificación intracelular, al modificar su sensibilidad por los H^+ intracelulares (26, 197). Por tanto, los siguientes experimentos se encaminaron a investigar el efecto del ácido ocadaico sobre el pHi basal de linfocitos; asimismo, se decidió estudiar, de manera paralela, el efecto del AO sobre la $[Ca^{2+}]i$, utilizando para ello células cargadas con dos indicadores fluorescentes, BCECF y Fura-2, sensibles a pH y Ca^{2+} respectivamente, estudiadas mediante la técnica de microscopía digitalizada de fluorescencia.

En la figura 4.28 se muestra el efecto de la adición de AO 1 µM sobre el pHi y $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos bañados por un medio sin HCO_3^- que posteriormente fue sustituido por un medio con CO_2/HCO_3^-. Se observa que la toxina no tuvo ningún efecto sobre los niveles basales de pHi o $[Ca^{2+}]$; además, la recuperación del pHi después de la acidificación provocada por la adición de CO_2, no se vio significativamente modificada por la preincubación con AO durante algo más de 6 minutos. Por otro lado la sustitución del medio sin HCO_3^- por uno conteniendo este ion provocó una ligera disminución del $[Ca^{2+}]i$ que en el caso de las células preincubadas con AO fue más marcada; a continuación, los niveles de $[Ca^{2+}]i$ basales se recuperan rápidamente, sin embargo, en las células tratadas con AO el nivel final de $[Ca^{2+}]i$ es ligeramente inferior al de las células control.

Estas variaciones en la $[Ca^{2+}]i$ se pueden deber a la modificación de la actividad de mecanismos transportadores de Ca^{2+} modulados por cambios del pHi, como las bombas ATPasas de la membrana o reservorios intracelulares (271) o canales permeables al Ca^{2+} (124). La disminución del pHi, la provocada por la entrada e hidrólisis de CO_2, produciría a su vez una disminución de la $[Ca^{2+}]i$, que se recuperaría de manera paralela a la recuperación del pHi. En las células preincubadas con AO la sensibilidad de los mecanismos transportadores de Ca^{2+} podría estar alterada, de manera similar a como se altera la sensibilidad del intercambiador Na^+/H^+ por los H^+ intracelulares, lo que podría explicar la mayor reducción del $[Ca^{2+}]i$ en respuesta a la acidificación, y los niveles finales de $[Ca^{2+}]i$ inferiores en células tratadas con esta toxina.

Por su parte, los resultados de pHi indican que, en linfocitos humanos, el AO no tiene un efecto inmediato sobre la actividad del intercambiador Na^+/H^+, al contrario de lo observado en otros modelos celulares, como timocitos de rata (26); asimismo, al contrario de lo observado anteriormente en un medio sin HCO_3^- (figura 4.26), la recuperación del pHi en un medio con HCO_3^- no se ve significativamente afectada por el AO. Esto podría deberse al poco tiempo de preincubación con la toxina (menos de 10 minutos) pero también a la actividad combinada de varios transportadores iónicos que fueran modulados de manera diferente por la toxina. Por ejemplo, si el AO estimula al intercambiador Na^+/H^+ al mismo

tiempo que inhibe al transportador de HCO_3^+ (como sugieren las figuras 4.26 y 4.27) la recuperación del pHi total, dependiente de ambos transportadores, podría no verse afectada por la preincubación con AO.

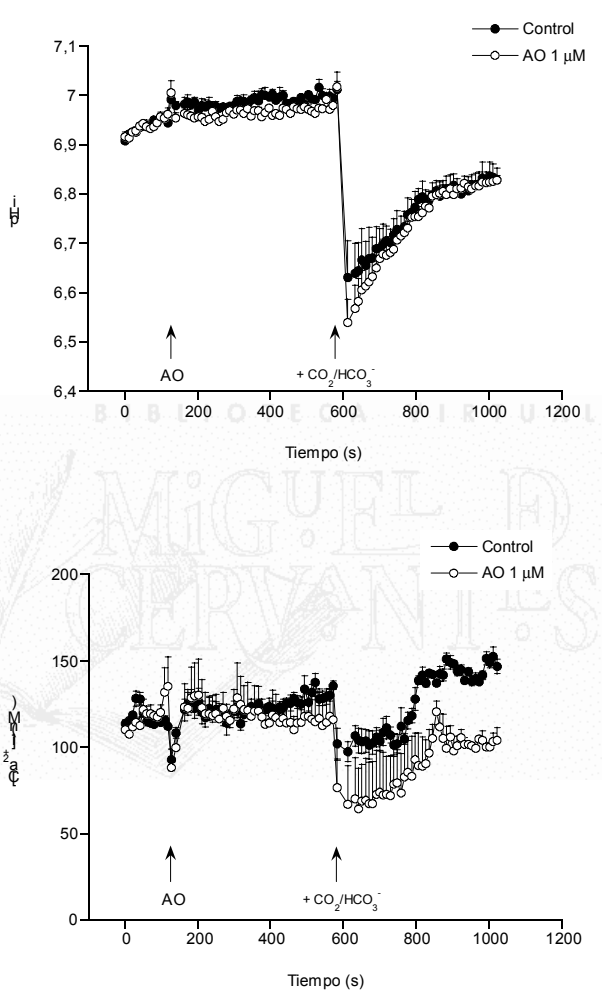


Figura 4.28. Efecto del AO sobre los niveles basales de **a)** pHi y **b)** $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos humanos bañados por un medio sin HCO_3^-, sustituido, cuando así se indica, por un medio con dicho ion. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

Considerando esta última posibilidad, se decidió estudiar el efecto del AO sobre la recuperación del pHi en un medio con HCO_3^- y con inhibidores específicos para el intercambiador Na^+/H^+ (amilorida) o el transportador de HCO_3^- (DIDS); con el fin de conocer el efecto de una preincubación corta de la toxina sobre la actividad individual de cada uno

de los transportadores iónicos. Ambos inhibidores se utilizaron a una concentración de 200 μM con el fin de asegurar un bloqueo completo del transportador correspondiente.

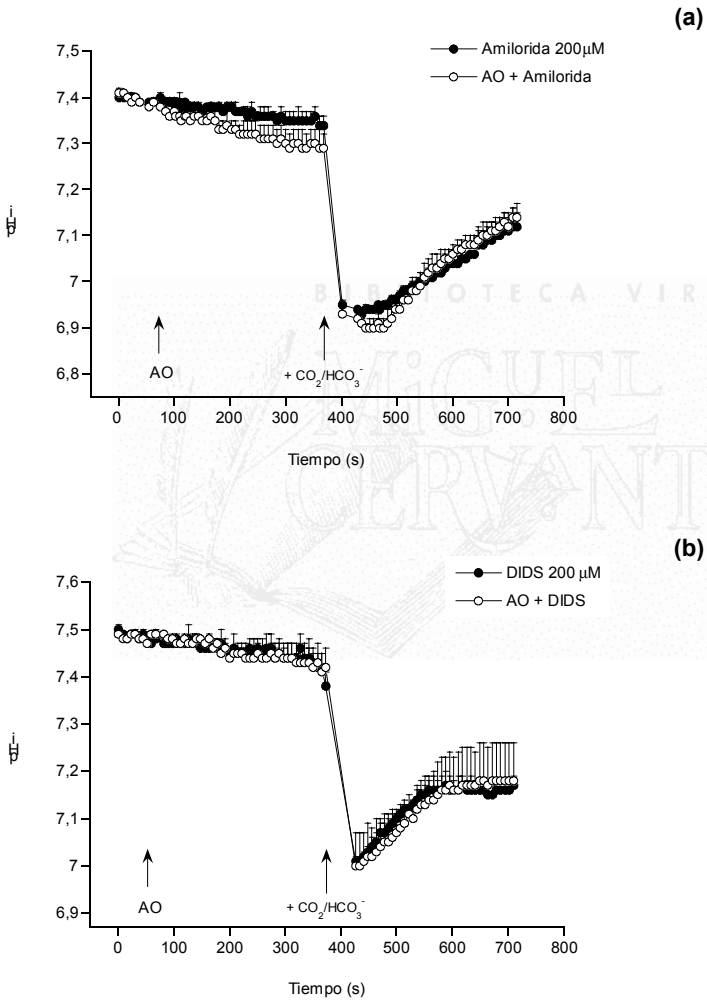


Figura 4.29. Efecto del AO sobre la recuperación del pHi basal de linfocitos bañados por un medio sin HCO_3^- y sobre la recuperación del pHi tras una acidificación con CO_2, en un medio conteniendo HCO_3^- y **a)** Amilorida o **b)** DIDS. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

En la figura 4.29 se observa, una vez más, que el AO no produce un aumento del pHi basal de linfocitos humanos bañados por medio sin HCO_3^-, de hecho en la gráfica (a) se observa una pequeña disminución del pHi basal en las células tratadas con esta toxina. Igualmente, la recuperación del pHi después de una acidificación por CO_2 es insensible al AO, aún en presencia de amilorida o DIDS.

En esta situación, de acuerdo a lo observado en los experimentos mostrados en las figuras 4.26 y 4.27, sería de esperar que, en presencia de DIDS, el AO estimulara la recuperación dependiente del intercambiador Na^+/H^+, mientras que, en presencia de amilorida, el AO inhibiera la recuperación del pHi, dependiente del transportador de HCO_3^-. Sin embargo, estos nuevos resultados parecen indicar que una incubación corta con AO no es suficiente para activar de manera significativa ninguno de los transportadores involucrados en la alcalinización citosólica en linfocitos humanos, lo que estaría de acuerdo con la incapacidad de dicha toxina para activar de manera rápida o inmediata, al intercambiador Na^+/H^+ en ausencia de una acidificación citosólica.

Para comparar cuantitativamente la recuperación del pHi en presencia y ausencia de AO, se realizó una regresión lineal por mínimos cuadrados de la sección de la curva de recuperación del pHi que presentaba un comportamiento lineal, para cada uno de los experimentos registrados. La pendiente de esta regresión se utilizó para describir la velocidad de recuperación en cada condición experimental. En la tabla 4.1 se presentan los promedios de las velocidades de recuperación calculadas a partir de los experimentos representados en las figuras 4.28 y 4.29.

TABLA 4.1. Velocidad de recuperación del pHi calculada como la pendiente de la recta de regresión para la sección lineal de las curvas obtenidas experimentalmente. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

	Velocidad de recuperación del pHi ($x10^{-4}$ unidades pH/s)
Control	7,5 ± 2,1
AO 1 μM	9,8 ± 2,1
Amilorida	7,0 ± 1,5
AO + Amilorida	9,0 ± 0,7
DIDS	14,7 ± 3,4
AO + DIDS	9,2 ± 2,8

A partir del análisis de estos valores, se puede comprobar que la preincubación con AO no modificó de manera significativa la velocidad de recuperación del pHi en ninguna de las condiciones experimentales analizadas. Se observa también que la velocidad de recuperación del pHi en presencia de inhibidores no fue significativamente diferente de la velocidad de recuperación del control. Sin embargo a pesar de que las velocidades sean iguales, es evidente que en presencia de DIDS y amilorida los perfiles de recuperación son muy diferentes entre sí: mientras que las células tratadas con DIDS se recuperan rápidamente en un primer momento, cuando alcanzan un pHi de cerca de 7,2, la alcalinización prácticamente se detiene. Por el contrario, las células tratadas con amilorida recuperan de manera mucho más constante a lo largo de todo el intervalo de pHi estudiado. A la vista de estos resultados decidimos comprobar si una preincubación más larga con AO (10 minutos) es capaz de producir una estimulación de la actividad del intercambiador Na^+/H^+.

En la figura 4.30 se muestra el efecto de 10 minutos de preincubación con AO 1 μM sobre la recuperación del pHi después de una acidificación con CO_2, en un medio con HCO_3^- (4.30a) y conteniendo este ion más amilorida (4.30b) o DIDS (4.30c) 200 μM. Asimismo, en la tabla 4.2 se recogen los promedios de las velocidades de recuperación del pHi, calculadas a partir de los experimentos mostrados en la misma figura, como se describió anteriormente.

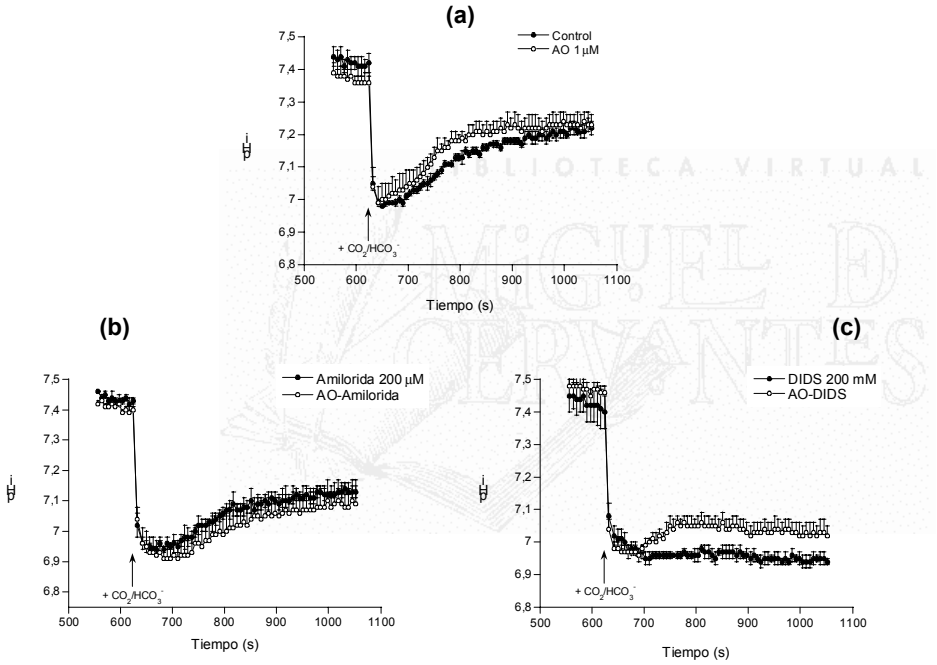


Figura 4.30. Efecto de 10 minutos de preincubación con AO sobre la recuperación del pHi, después de una acidificación con CO_2, en un medio conteniendo HCO_3^-, con o sin inhibidores específicos de transportadores iónicos. **a)** Control sin inhibidores **b)** Con amilorida **c)** Con DIDS. Promedio ± SEM de 4 experimentos.

En ambos casos se puede comprobar que el AO solamente tiene un efecto significativo sobre la recuperación del pHi en presencia de DIDS, es decir, sobre la recuperación del pHi dependiente del intercambiador Na^+/H^+. Aunque la toxina parece estimular ligeramente la recuperación total (4.30a), este efecto no es estadísticamente significativo para un N=4. También se observa que en estos experimentos la presencia de DIDS, pero no de amilorida, en el medio tuvo un efecto significativo sobre la recuperación del pHi, con respecto al control, indicando que la actividad del transportador de HCO_3^- fue en estos ensayos mucho más importante que la del intercambiador Na^+/H^+, lo cual explicaría también el hecho de que el efecto del ácido ocadaico sobre la recuperación total del pHi no sea significativo.

TABLA 4.2. Velocidad de recuperación del pHi calculada a partir de los experimentos representados en la figura 4.30. * P<0,05 con respecto al control ## P<0,05 con respecto a DIDS sin AO. Promedio ± SEM de 4 experimentos.

	Velocidad de recuperación del pHi ($x10^{-4}$ unidades pH/s)
Control	9,1 ± 1,0
AO 1 μM	12,3 ± 4,7
Amilorida	9,5 ± 3,7
AO + Amilorida	7,1 ± 0,9
DIDS	0,3 ± 1,5 *
AO + DIDS	10,8 ± 3,1 ##

No podemos explicar el motivo por el cual la inhibición por parte del DIDS fue tan marcada en estos experimentos y no en los mostrados en la figura 4.29, donde las células se recuperan bastante bien en presencia de este fármaco, ya que los pHi basales y los pHi alcanzados tras la acidificación son muy similares en ambos grupos de experimentos. Parecería que, en los últimos experimentos la sensibilidad del Na^+/H^+ por los H^+ intracelulares estuviera reducida y por efecto del AO ésta se incrementara lo suficiente como para permitir la activación del intercambiador en respuesta a la acidificación citosólica producida por CO_2. De cualquier manera, la sensibilidad del Na^+/H^+ no llega a ser la misma que en los experimentos de la figura 4.29, donde este transportador se mantiene activado hasta que las células alcanzan un pHi cercano a 7,2.

En la figura 4.31 se ha representado el perfil de la recuperación del pHi en presencia y ausencia de inhibidores específicos, calculado como el promedio de todos los experimentos mostrados en las figuras 4.28 a 4.30; con el propósito de estimar la importancia relativa de los dos mecanismos implicados en este proceso. Parece evidente que la actividad del transportador de HCO_3^- es más importante que la del intercambiador Na^+/H^+ ya que en presencia de amilorida la recuperación, en el mismo tiempo es casi completa, mientras que en presencia de DIDS las células se recuperan hasta un pHi final muy inferior. Estos últimos resultados están totalmente en concordancia con los descritos en la primera parte de este trabajo (Sección 4.1.1).

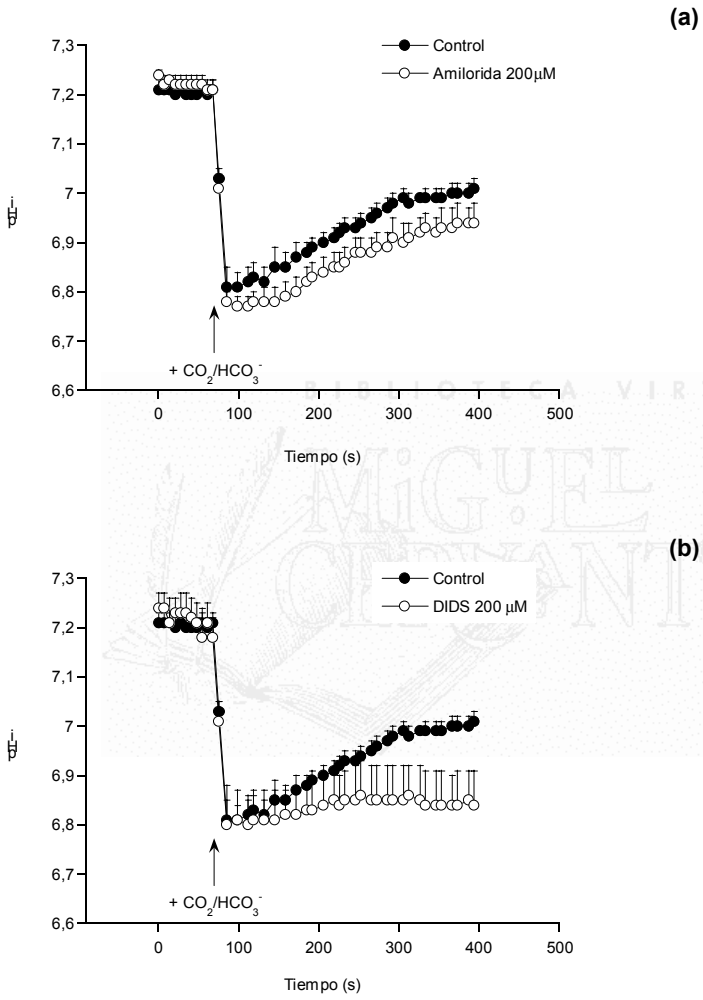


Figura 4.31. Efecto de los inhibidores específicos **a)** Amilorida y **b)** DIDS sobre la recuperación del pHi, tras una acidificación con CO_2, de linfocitos humanos adheridos a un portaobjetos y bañados por un medio con HCO_3^-. Promedio ± SEM de 7 experimentos.

Por último se decidió estudiar el efecto del AO sobre la actividad de un tercer transportador iónico de membrana implicado en la regulación del pHi: el intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+ que se activa en respuesta a la eliminación del Cl^- extracelular y es totalmente inhibido por DIDS 100 μM (ver sección 4.1.1, figuras 4.15 y 4.16). Este transportador podría estar implicado en la recuperación del pHi después de una carga alcalina, pero también podría ser muy importante en la regulación del Cl^- y volumen celulares (81, 147).

En la figura 4.32 se ilustra el efecto del AO sobre el pHi basal de linfocitos bañados por un medio con HCO_3^- y sobre la alcalinización intracelular provocada por la sustitución del medio extracelular, con una composición iónica normal, por un medio a base de gluconato, libre de iones Cl^-.

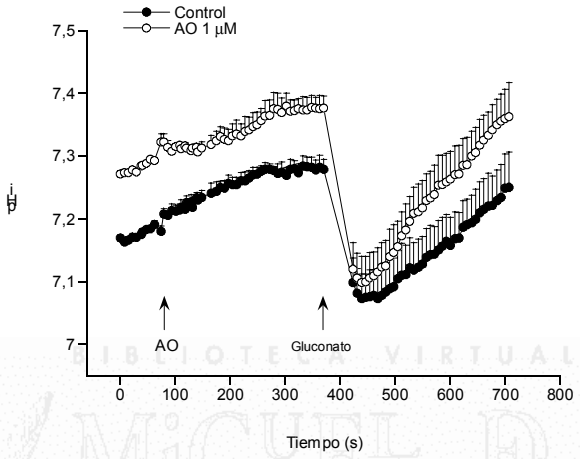


Figura 4.32. Efecto del AO sobre el pHi basal en un medio con HCO_3^- y sobre la alcalinización citosólica producida por la eliminación del Cl^- extracelular (sustitución del medio externo por uno a base de gluconato). Promedio ± SEM de 4 experimentos.

En esta figura se observa que, en un medio con HCO_3^- el pHi se eleva lenta y constantemente debido, muy probablemente, a la pérdida de CO_2 y alcalinización del medio extracelular. La adición de AO no tiene un efecto claro sobre esta ligera alcalinización. A continuación, la eliminación del Cl^- extracelular provoca una pequeña acidificación instantánea, debida a la utilización de un medio fresco cuyo pH había sido ajustado con CO_2; sin embargo creemos que esta acidificación es lo bastante pequeña como para no activar de manera importante ninguno de los transportadores alcalinizadores, dependientes de Na^+ que hemos descrito y estudiado anteriormente. De cualquier modo, aunque alguno de estos mecanismos pueda ser activado, la mayoría de la alcalinización citosólica registrada tras la eliminación del Cl^- extracelular debería ser producida por el intercambiador Cl^-/HCO_3^- funcionando en modo inverso. Finalmente, en esta figura también se observa que una preincubación corta con AO estimula de manera importante la alcalinización intracelular dependiente de la actividad del intercambiador Cl^-/HCO_3^-. Esto contrasta con el efecto mucho más lento del AO sobre el intercambiador Na^+/H^+.

En la tabla 4.3 se presentan los valores de velocidad de alcalinización calculados a partir de la figura 4.32, como se describió anteriormente. En ella se comprueba que una preincubación corta con AO incrementó la velocidad de alcalinización de células expuestas a un medio libre de Cl^-; proceso dependiente de la actividad de un intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+.

TABLA 4.3. Velocidad de alcalinización intracelular inducida por la eliminación del Cl^- extracelular en linfocitos humanos bañados en por un medio con HCO_3^-. * P<0,05 con respecto al control. Promedio ± SEM de 4 experimentos.

	Velocidad de alcalinización ($x10^{-4}$ unidades pH/s)
Control	6,5 ± 0,9
AO 1 μM	11,2 ± 0,3 *

En resumen, nuestros resultados indican que el AO estimula la actividad de los intercambiadores Na^+/H^+ y Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+, activados el primero por acidificación intracelular y el segundo por eliminación del Cl^- extracelular. Por el contrario, estos resultados no han podido demostrar convincentemente que el AO modifique la actividad del transportador de HCO_3^- dependiente de Na^+. La importancia de estos resultados radica en que demuestran que la estimulación del intercambiador Cl^-/HCO_3^- por inhibición de fosfatasas de proteína sensibles al AO (PP1 y PP2A básicamente), lo cual representa una nueva aportación al conocimiento de los mecanismos celulares de regulación de la actividad de los intercambiadores aniónicos. Otros autores han encontrado que los intercambiadores aniónicos también pueden ser regulador por cinasas de tirosina de la familia Src (177).

Por otro lado, la importancia de estos mecanismos de transducción de señales en la modulación de la actividad el intercambiador Na^+/H^+ es bastante conocida (174). Sin embargo, el hecho de que las fosfatasas de proteína estén implicadas en la regulación de ambos intercambiadores iónicos al mismo tiempo (en realidad el Cl^-/HCO_3^- se activa antes, en respuesta a la inhibición de fosfatasas) sugiere que estos mecanismos podrían tener una importancia especial en la regulación y mantenimiento del volumen celular de linfocitos. Mason, *et al.*, han demostrado, en timocitos de rata, que el funcionamiento acoplado de ambos intercambiadores puede provocar, en las condiciones adecuadas, una acumulación de NaCl y en consecuencia, una entrada de agua arrastrada osmóticamente (147). Por tanto el AO podría provocar ganancia de NaCl y agua, y aumento del volumen celular en linfocitos humanos; aunque este movimiento de iones y agua parecería contrario al que se puede producir en un evento de diarrea en células de epitelio intestinal.

La verdadera importancia de estos mecanismos de transporte iónico en la generación de la diarrea producida por AO no puede ser conocida a través de nuestros resultados. Sin embargo algunos estudios han sugerido que en realidad esta toxina no actúa como un secretagogo, al contrario de otras toxinas de origen bacteriano (toxina colérica) que producen secreción de Cl^- y en consecuencia, fluidos por células del epitelio intestinal, a través de un mecanismo que aun no esta del todo claro (60). Por otro lado, el AO no solo no produce secreción de Cl^- intestinal sino que además inhibe la secreción provocada por secretagogos (234). Estos mismos autores proponen que la diarrea ocasionada por AO podría ser más bien resultado de la elevación de la permeabilidad paracelular inducida por dicha toxina, a una conclusión similar han llegado otros autores (109) quienes además

describen la formación de microtrombos como el primer efecto del AO sobre el colon de rata. Los mecanismos que regulan la permeabilidad paracelular no están completamente definidos, aunque pueden estar relacionados con el citoesqueleto. Por último, existe la posibilidad de que el AO actúe, al menos en parte, a través del sistema nervioso (60). En este contexto nuestros resultados tampoco sugieren que el AO produzca secreción de Cl^-, sino más bien lo contrario (absorción), sin embargo es muy importante señalar que los transportadores iónicos de células linfoides pueden diferir en gran medida de los transportadores de células epiteliales intestinales; a pesar de ello, el efecto del AO sobre células diferentes a las del epitelio intestinal (incluyendo células de la sangre) podría ser importante en los efectos tóxicos de esta sustancia, como lo demostraría la formación de microtrombos (109).

4.2 Estudio de los mecanismos de acción de la yessotoxina

Otra de las toxinas marinas importantes dentro del grupo de las DSP, es la yessotoxina (YTX). Ésta, a pesar de estar clasificada como una toxina DSP, y ser detectada en el mismo bioensayo, no produce diarrea en el ser humano o animales de experimentación, ni inhibición de fosfatasas de proteína. A pesar de que no se conoce ningún caso de intoxicación humana por ingestión de esta toxina, por vía intraperitoneal es una de las ficotoxinas más potentes que existen (267).

4.2.1 Efecto de la YTX sobre los niveles de $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos humanos

Debido a que no se ha realizado ningún estudio previo, encaminado a la caracterización del efecto de la YTX en células animales; en este trabajo se decidió comenzar con el estudio del efecto de esta toxina sobre la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos humanos, en un medio con HCO_3^- y Ca^{2+}. Además, se decidió comparar el efecto de la YTX con el del AO, debido a la posible combinación de ambas toxinas en el medio natural. Todos los experimentos con YTX se realizaron en el microscopio digitalizado de fluorescencia con linfocitos cargados con el indicador Fura-2 y bañados por un medio Umbreit. La YTX se disolvió en DMSO a una concentración 1 mM se repartió en alícuotas y se conservó a –80ºC, hasta su uso.

En la figura 4.33 se muestra el efecto de la adición de 1 μM de YTX o AO (4.33a) y de ambas a la vez (4.33b) sobre la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos humanos. Se observa que la YTX provocó una elevación inmediato de la $[Ca^{2+}]i$; después de 10 minutos, el nivel de $[Ca^{2+}]i$ aumentó aún más. Por el contrario el AO no presentó ningún efecto rápido sobre la concentración intracelular de este ion, aunque después de 10 minutos de incubación, la $[Ca^{2+}]i$ se elevó ligeramente. También se observa que la adición de ambas toxinas a la vez modificó muy poco el efecto de la YTX sola (4.33b). Por último, en la gráfica 4.33c se observa que la adición de YTX a células preincubadas con AO durante algo más de 10 minutos produjo un aumento de $[Ca^{2+}]i$, mientras que la adición de AO a células preincubadas con YTX no modificó la $[Ca^{2+}]i$. En esta gráfica también se observa que los niveles finales de $[Ca^{2+}]i$ fueron iguales en ambos experimentos, es decir, la adición de YTX elevó la $[Ca^{2+}]i$ independientemente de la presencia de AO.

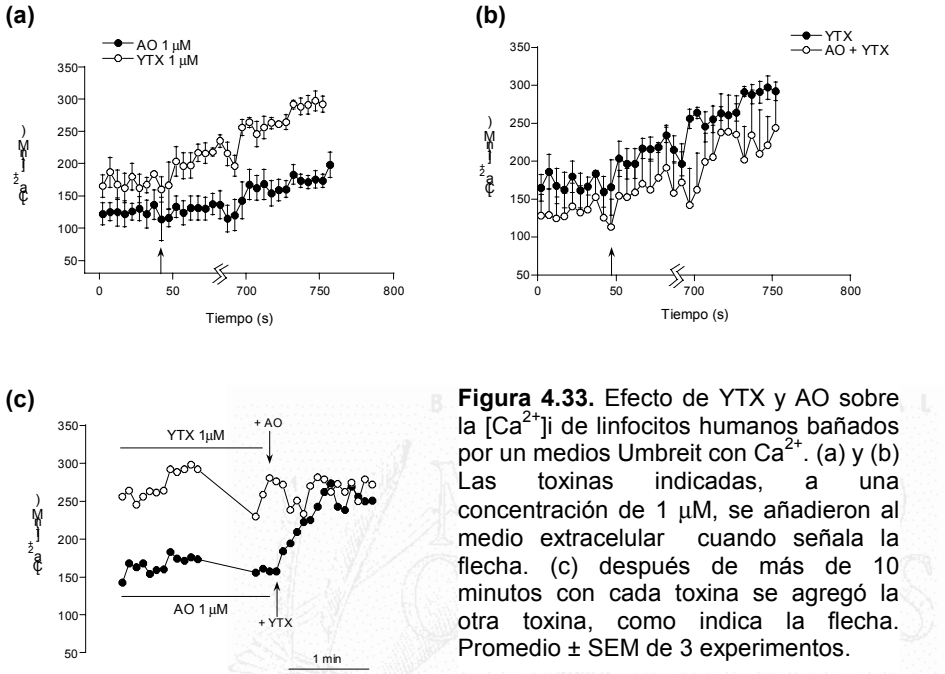


Figura 4.33. Efecto de YTX y AO sobre la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos humanos bañados por un medios Umbreit con Ca^{2+}. (a) y (b) Las toxinas indicadas, a una concentración de 1 µM, se añadieron al medio extracelular cuando señala la flecha. (c) después de más de 10 minutos con cada toxina se agregó la otra toxina, como indica la flecha. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

En vista de estos resultados se decidió seguir estudiando el efecto de la YTX sobre la $[Ca^{2+}]i$. Un aumento de $[Ca^{2+}]i$ puede ser debido a un vaciamiento de reservorios intracelulares, a una entrada de Ca^{2+} desde el exterior, o incluso a una salida de Ca^{2+} o una combinación de estos tres mecanismos; por lo tanto, se estudió el efecto de la YTX en un medio con y sin Ca^{2+}.

En la figura 4.34 se observa que el efecto de la YTX es dependiente de la presencia de Ca^{2+} extracelular, ya que en un medio sin este ion (4.34b), la YTX no produce un aumento de $[Ca^{2+}]i$ cuantificable, de hecho la YTX inhibe ligeramente el incremento de $[Ca^{2+}]i$ producido por la adición de Ca^{2+} 1 mM al medio que baña a las células, como se puede observar en la misma gráfica. Estos resultados sugieren que la YTX produce una entrada de Ca^{2+} desde el exterior, sin modificar sensiblemente el estado de los reservorios intracelulares de Ca^{2+}, lo que indica que la YTX produce una entrada de Ca^{2+} no capacitativa.

Como hemos descrito anteriormente la entrada capacitativa (178) es considerada como el mecanismo de entrada de Ca^{2+} más importante en la mayoría de las células no excitables, incluyendo linfocitos humanos (141), donde se supone que es indispensable para el correcto desarrollo de los procesos de activación celular (169, 175, 273). Sin embargo, este tipo de entrada es totalmente dependiente del vaciamiento de reservorios intracelulares, que, por un mecanismo aún desconocido, provoca la apertura de canales de la membrana plasmática permeables al Ca^{2+}. Por lo tanto, como la YTX no produce

vaciamiento de reservorios, el aumento de $[Ca^{2+}]i$ que genera no puede ser debido a la entrada capacitativa; sin embargo, no se puede descartar que la toxina active los mismos canales de Ca^{2+} (CRAC o SOC), a través de un mecanismo diferente.

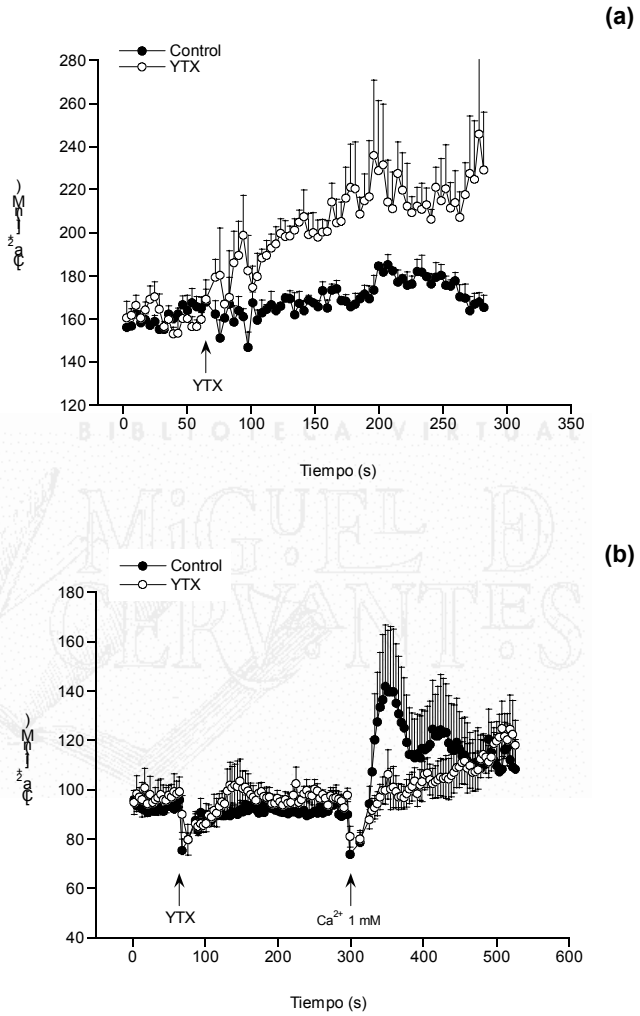


Figura 4.34. Efecto de la adición de 1 μM YTX sobre la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos humanos bañados por un medio **(a)** con Ca^{2+} extracelular y **(b)** sin Ca^{2+} y al que, donde indica la flecha, se le agregó este ion. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

El siguiente paso fue comparar la acción de la YTX con la de la tapsigargina (Tg), que es un fármaco que produce una entrada capacitativa de Ca^{2+} en múltiples modelos celulares, incluyendo linfocitos humanos (176), al producir un vaciamiento de reservorios mediante la inhibición de las ATPasas de Ca^{2+} del retículo sarco-endoplasmático (228). En la figura 4.35 se observa que el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por la YTX en un medio con

Ca^{2+} es mucho menor que el producido por la misma concentración de Tg, también se observa que la combinación de ambos compuestos no modifica significativamente el efecto dado por la Tg sola. Estos resultados indican que la YTX es un estímulo menos eficaz que la Tg, para producir aumento de $[Ca^{2+}]i$ en linfocitos humanos.

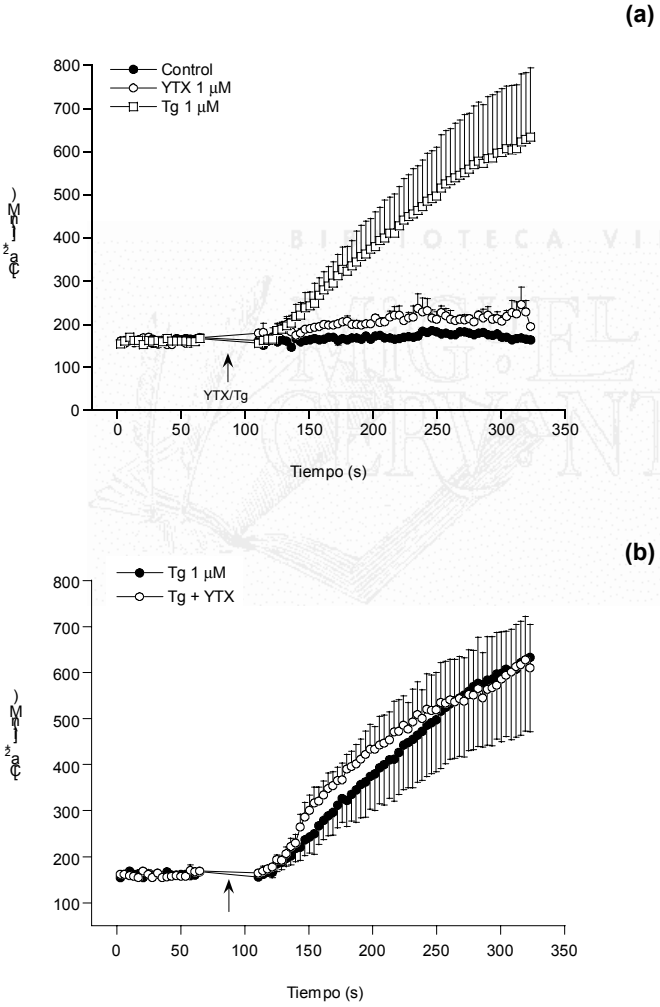


Figura 4.35. Efecto de la adición de 1 µM YTX, Tg y ambas a la vez sobre la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos humanos bañados por un medio con Ca^{2+} extracelular. **(a)** Ambas sustancias fueron añadidas por separado según se indica **(b)** Efecto de Tg y de la combinación Tg-YTX añadidas donde indica la flecha. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

A continuación, se analizó el efecto de la YTX sobre el pHi y $[Ca^{2+}]i$ en un medio sin HCO_3^- y sobre la recuperación del pHi tras una acidificación con CO_2/HCO_3^-, como en los experimentos realizados anteriormente (sección 4.1). En la figura 4.36 se ilustra el efecto de

la adición de YTX a células cargadas con dos indicadores fluorescentes, sensibles a Ca^{2+} y pH.

Se observa, en primer lugar, que la adición de YTX produce un rápido aumento de la $[Ca^{2+}]i$ que se recupera rápidamente a valores cercanos al nivel basal; a continuación, la sustitución del medio extracelular por uno con CO_2/HCO_3^-, produce una reducción de $[Ca^{2+}]i$ con una recuperación posterior que alcanza valores por encima del nivel basal (figura 4.36a). Por otro lado, la YTX no tiene un efecto claro sobre el pHi basal ni sobre la recuperación del pHi, después de una acidificación con CO_2 (figura 4.36b).

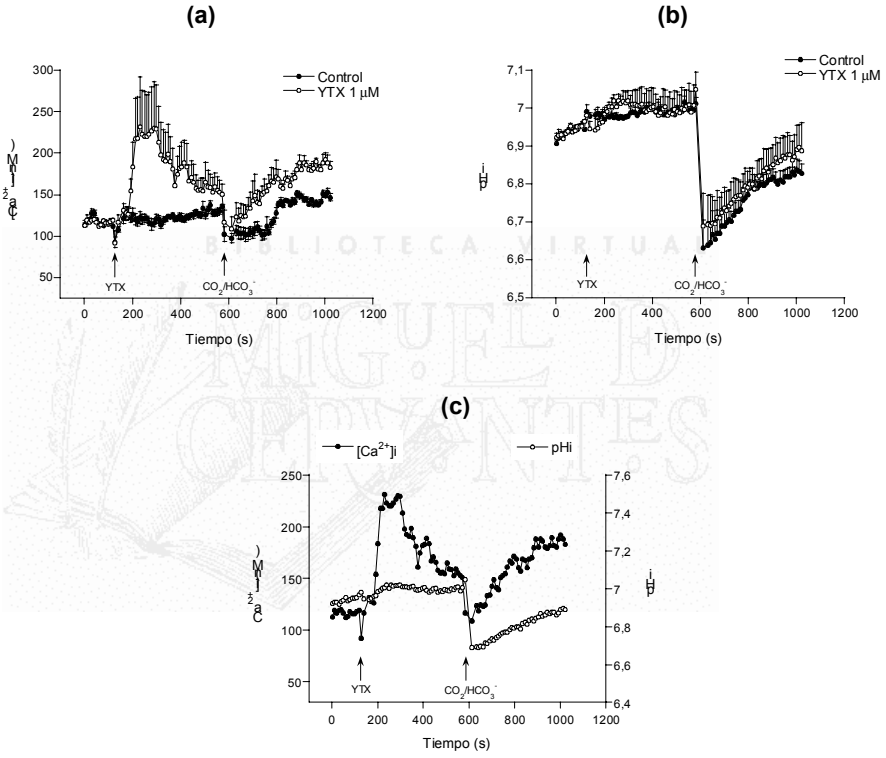


Figura 4.36. Efecto de la YTX sobre los niveles basales de **a)** pHi y **b)** $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos humanos bañados por un medio sin HCO_3^-, sustituido, cuando así se indica, por un medio con dicho ion. **c)** Comparación del efecto de la YTX en [Ca2+]i y pHi. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

Hasta este punto, todos los experimentos mostrados indican que la YTX produce un aumento de $[Ca^{2+}]i$ en linfocitos humanos bañados por un medio con Ca^{2+}. Este aumento ocurre en un medio con y sin HCO_3^-, aunque en el segundo caso se observa una clara tendencia a la recuperación de la $[Ca^{2+}]i$ basal. Sin embargo, este aumento es muy pequeño, en comparación con el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por Tg y es dependiente de la presencia de Ca^{2+} extracelular, por lo que debe ser provocado por una entrada de Ca^{2+} desde el medio exterior y no por un vaciamiento de reservorios. Por lo tanto, dicho

mecanismo tendría que describirse como una entrada de Ca^{2+} no capacitativa, siendo esta última el mecanismo de entrada de Ca^{2+} más conocido y mejor caracterizado en células no excitables.

Para tratar de comprobar una vez más estas observaciones, se repitieron los experimentos de adición de YTX 1 μM a linfocitos bañados por un medio con y sin Ca^{2+}. En estos ensayos se utilizó como control una adición de DMSO al 0,1%, por ser esta la concentración de disolvente que entra en contacto con las células tratadas con YTX (que fue disuelta en DMSO).

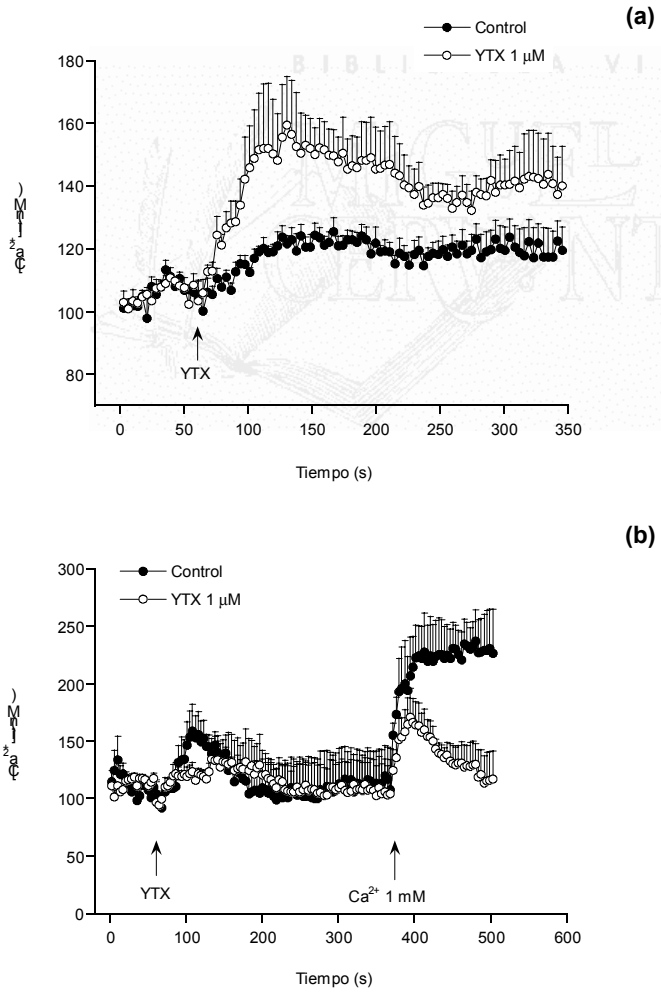


Figura 4.37. Efecto de la YTX sobre los niveles basales $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos humanos bañados por un medio **a)** con y **b)** sin Ca^{2+}, sustituido, cuando así se indica, por un medio con dicho ion. Promedio ± SEM de 4 experimentos.

En la figura 4.37 se observa una vez más que la YTX produce un ligero aumento de $[Ca^{2+}]i$ en linfocitos bañados por un medio con este ion; mientras que, en un medio sin Ca^{2+}, la YTX disminuye la entrada de Ca^{2+} producida por la subsecuente adición de Ca^{2+} extracelular. Estos resultados son muy similares a los ilustrados en la figura 4.34. A partir de los experimentos mostrados en las figuras 4.34 y 4.37, el aumento máximo de $[Ca^{2+}]i$ inducido por YTX en un medio conteniendo este ion (en aproximadamente 5 minutos) es de 81 ± 18 nM (N=7). Sin embargo una característica interesante de este aumento es que no es constante en el tiempo, ya que los máximos de cada experimento no siempre se obtienen al final de los 5 minutos; el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por YTX tampoco es homogéneo ni se puede observar en todas las células analizadas.

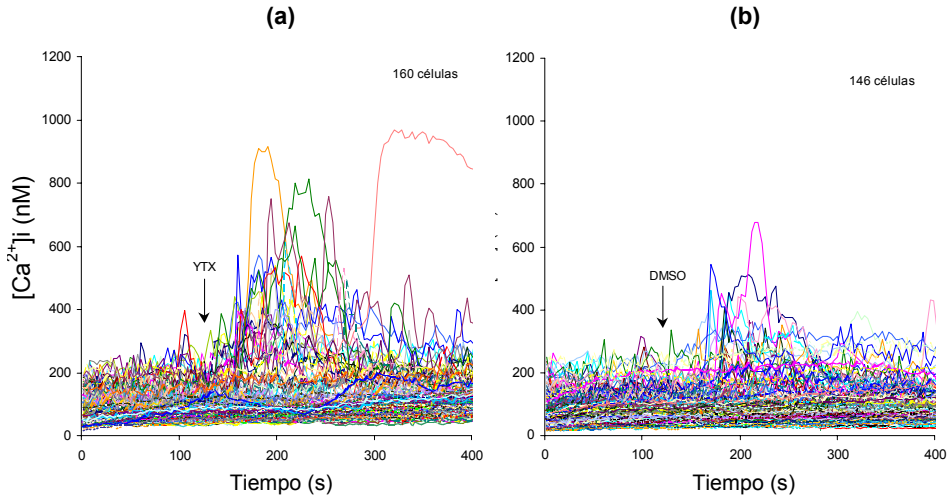


Figura 4.38. Efecto de **a)** YTX y **b)** DMSO sobre la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos bañados por un medio con Ca^{2+}. Se muestran las gráficas de $[Ca^{2+}]i$ vs tiempo de medición obtenidas para cada una de las células analizadas en los experimentos mostrados, como promedio, en la figura 4.37. Se indica el número total de células analizadas con YTX y con DMSO.

Con el fin de ilustrar esto, en la figura 4.38 se presentan los trazos individuales de $[Ca^{2+}]i$ obtenidos de todas las células analizadas en la figura 4.37a. Se observa que la adición de YTX produjo un aumento de $[Ca^{2+}]i$ en forma de picos u oscilaciones no periódicas después de un pico inicial, en la mayoría de células, mientras que en otras el aumento de $[Ca^{2+}]i$ es lento y sostenido, por último hay células que no presentaron ningún tipo de respuesta hacia la YTX. En las células que oscilan, la magnitud de las oscilaciones tiende a disminuir con el tiempo, lo que explicaría la recuperación en los niveles de $[Ca^{2+}]i$, sin embargo, esta recuperación no es total debido sobre todo a las células que responden en forma de una elevación más lenta de $[Ca^{2+}]i$, por lo que el nivel basal de $[Ca^{2+}]i$ no llega a recuperarse del todo. En la figura 4.37b se observa que la adición de DMSO produjo también una respuesta, en forma de oscilaciones, en algunas células; aunque esta respuesta fue de mucha menor magnitud que en el caso de las células tratadas con YTX.

Por otro lado, como hemos mencionado anteriormente, la YTX tiene un segundo efecto sobre la regulación del $[Ca^{2+}]i$: inhibe la entrada de Ca^{2+} provocada por adición de Ca^{2+} extracelular a células mantenidas durante unos minutos en un medio libre de este ion (gráfica b de las figuras 4.34 y 4.37).

Considerando todos los resultados expuestos hasta ahora, uno de los efectos de la YTX, a nivel celular, consiste en la alteración de la homeostasis de $[Ca^{2+}]i$ de dos maneras diferentes: a) una elevación del $[Ca^{2+}]i$, en forma de oscilaciones, en un medio con este ion; y b) una inhibición de la entrada de Ca^{2+} ocurrida de manera normal cuando se adiciona Ca^{2+} a un medio libre de éste. Sin embargo, aún no es posible describir con claridad el mecanismo que produciría todos los cambios de $[Ca^{2+}]i$ inducidos por YTX.

Las oscilaciones de $[Ca^{2+}]i$ se han descrito en linfocitos T y B, en respuesta a concentraciones bajas de mitógenos, que actúan a través del complejo de receptores TCR/CD3 y antígenos, que actúan a través de los receptores de inmunoglobulinas (140, 260). En células individuales, estas oscilaciones pueden presentar patrones muy variados (98), similares a las oscilaciones observadas por nosotros en respuesta a la YTX. Sin embargo, es un hecho comúnmente aceptado que la respuesta de $[Ca^{2+}]i$ a sustancias mitogénicas, antígenos y otros estímulos fisiológicos ocurre de acuerdo con el modelo capacitativo de Putney (descrito previamente). Por tanto, se considera que el primer efecto de cualquier mitógeno sobre la $[Ca^{2+}]i$, consiste en la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares del retículo endoplasmático, sensibles a IP_3 (117). A continuación, el vaciamiento de reservorios activa la entrada de Ca^{2+} del exterior celular; a pesar de que no se conoce el mecanismo exacto que acopla estos dos procesos, se ha aislado una sustancia soluble (CIF de Calcium Influx Factor, muy cuestionada por muchos investigadores) que se libera en linfocitos Jurkat, en respuesta a un estímulo antigénico y que produce entrada de Ca^{2+} en diversos modelos celulares, por lo que se cree que esta podría ser la conexión entre el vaciamiento de reservorios y la entrada capacitativa (182).

En consecuencia, las oscilaciones de Ca^{2+} de linfocitos y otras células no excitables son dependientes de la generación de IP_3 y vaciamiento de reservorios, antes que de la entrada de Ca^{2+} (23, 74). Sin embargo, existen otros modelos para tratar de explicar las respuestas oscilatorias de $[Ca^{2+}]i$ en células no excitables, por ejemplo, fluctuaciones en el potencial de membrana que podrían hasta cierto punto modificar la entrada de Ca^{2+}, afectando a su vez la generación o el mantenimiento de las oscilaciones de $[Ca^{2+}]i$ (74). Asimismo, Shuttleworth *et al.* han propuesto recientemente que las oscilaciones de $[Ca^{2+}]i$ en células no excitables podrían ser dependientes principalmente de una entrada de Ca^{2+} no capacitativa (es decir, independiente del vaciamiento de reservorios), activada por la acción de segundos mensajeros distintos al IP_3, como el ácido araquidónico (210, 211).

Nuestros resultados sugieren que la YTX produce un aumento de $[Ca^{2+}]i$, en linfocitos humanos, con un tipo de respuesta en forma de oscilaciones, a través de una entrada no capacitativa de Ca^{2+}. En tal caso, la YTX podría interaccionar con un receptor de la membrana celular, que diera lugar a los eventos intracelulares necesarios para provocar la entrada no capacitativa de Ca^{2+}. Sin embargo, dada la similitud de su estructura química

con la de las brevetoxinas y ciguatoxinas, es probable que la YTX actúe de manera similar a las anteriores, uniéndose directamente a canales iónicos. Por lo tanto, el sitio de acción de la YTX podría ser directamente el canal permeable a Ca^{2+}, cuyas propiedades se verían modificadas por la unión de la toxina. También ésta podría unirse a canales de Na^{+} y producir fluctuaciones en el potencial de membrana que pudieran dar lugar a los movimientos de Ca^{2+} observados; ya que, a pesar de que los linfocitos son células no excitables, se ha descrito que poseen canales de Na^{+} (1) y canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje (61). Por último, la gran hidrofobicidad de la YTX sugiere que podría ser muy afín a la membrana celular con lo cual, podría integrarse a la misma y producir diversos efectos no específicos.

Además, un análisis detallado del efecto de la YTX en un medio sin Ca^{2+}, como se muestra en la figura 4.39 indica que la adición de YTX en un medio sin Ca^{2+} induce la respuesta, en forma de un pico de $[Ca^{2+}]i$, de unas cuantas células. Este resultado no nos permite descartar por completo la posibilidad de que esta toxina produzca un vaciamiento de reservorios, que no puede ser detectado en todas las células y, por tanto, no aumenta significativamente la $[Ca^{2+}]i$. De esta manera, se mantiene la posibilidad de que las oscilaciones, en células bañadas por un medio con Ca^{2+}, sean producidas por un vaciamiento de reservorios acoplado a una entrada capacitativa, ya que no estamos seguros que la concentración utilizada de YTX sea la óptima.

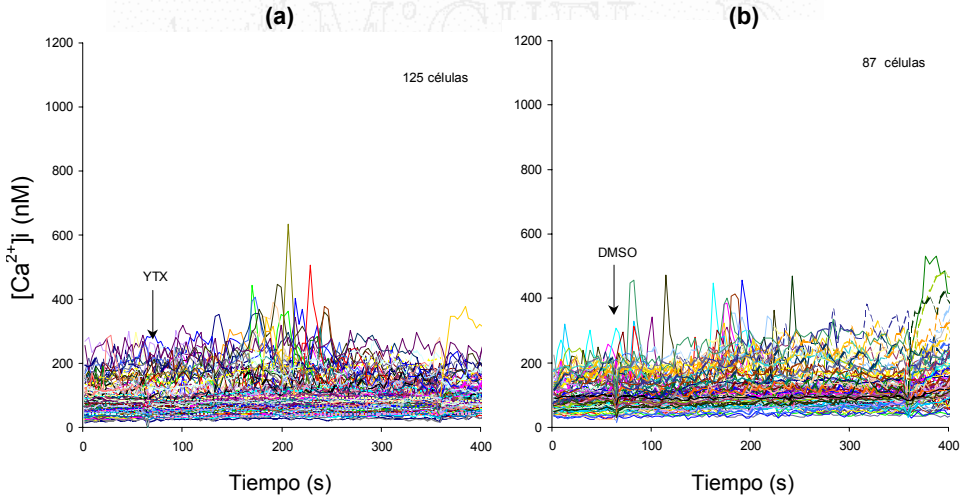


Figura 4.39. Efecto de **a)** YTX y **b)** DMSO sobre la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos bañados por un medio sin Ca^{2+}. Gráficas de $[Ca^{2+}]i$ obtenidas para cada una de las células analizadas en los experimentos mostrados en la figura 4.37. Se indica el número total de células analizadas con YTX y con DMSO.

El efecto inhibitorio de la YTX sobre la entrada de Ca^{2+}, que se contradice claramente con la generación de oscilaciones de $[Ca^{2+}]i$, podría ser debido tanto a la activación de otros segundos mensajeros, como a algún tipo interacción de la toxina con el canal de entrada de

Ca^{2+}. Debido a la aparente importancia de los canales de Ca^{2+} en el efecto de la YTX, se realizaron los siguientes experimentos, en los que se utilizaron fármacos que bloquean distintos tipos de canales o rutas de entrada de Ca^{2+}.

Los fármacos utilizados fueron $LaCl_3$, SKF 96365 y nifedipina. El primero y segundo se emplean comúnmente para inhibir la entrada capacitativa (146, 242), es decir, bloquean los canales de Ca^{2+} dependientes de reservorios, sin embargo no son totalmente específicos para estos canales. La nifedipina pertenece a las dihidropiridinas, antagonistas de canales de Ca^{2+} tipo L (dependientes de voltaje) pero que, al igual que los otros dos fármacos, pueden inhibir otro tipo de canales (225).

En la figura 4.40 se observa que una preincubación de 10 minutos con $LaCl_3$ 5 μM no tuvo ningún efecto sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por YTX en un medio con Ca^{2+}. Esto puede ser debido a la concentración relativamente baja que se usó del inhibidor.

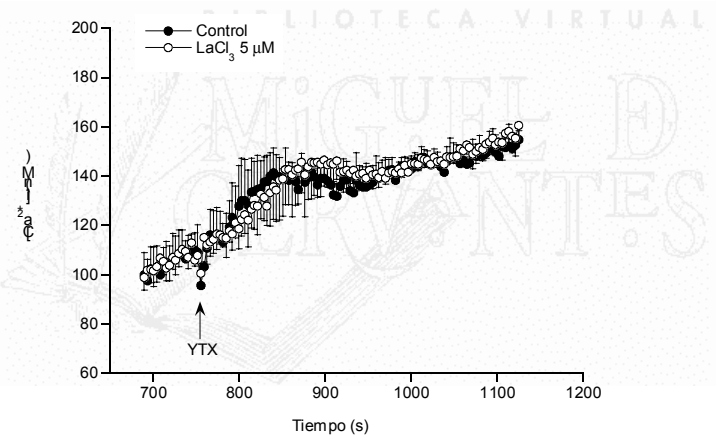


Figura 4.40. Efecto de la preincubación con $LaCl_3$ sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por YTX 1 μM en un medio con Ca^{2+}. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

Por el contrario, en la figura 4.41 se observa que tanto la preincubación con el antagonista SKF 96365, 30 μM, produjo una marcada elevación de $[Ca^{2+}]i$, como que la adición de YTX a estas células produjo un incremento del $[Ca^{2+}]i$ significativamente menor que el control ($P<0,005$ $N=6$). Por tanto, se confirma que al menos parte del efecto de la YTX sobre la $[Ca^{2+}]i$ es dependiente de la entrada de Ca^{2+} a través de canales sensibles al SKF 96365, que, en linfocitos, podrían ser canales dependientes de reservorios (146).

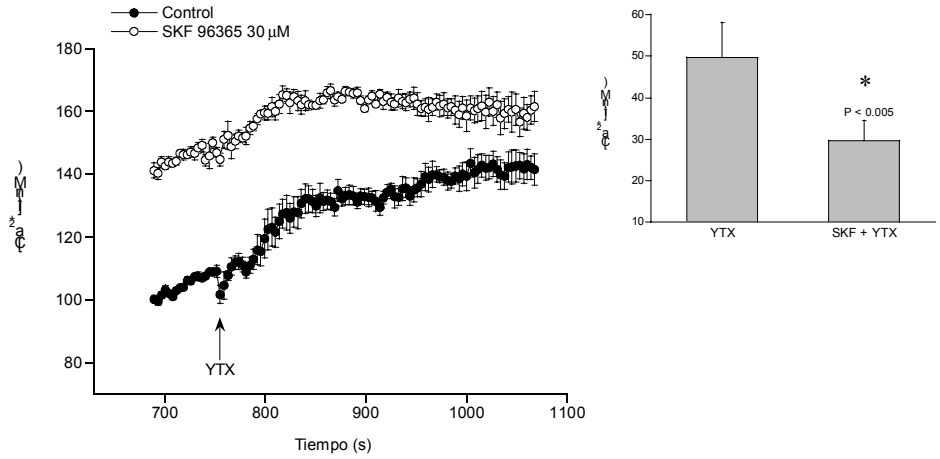


Figura 4.41. Efecto de la preincubación con SKF 96365 sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por YTX 1 µM en un medio con Ca^{2+}. Inserto: Aumento de $[Ca^{2+}]i$ producido por YTX en células con y sin SKF 96365 * P< 0,005. Promedio ± SEM de 6 experimentos

Por último la preincubación con nifedipina 1 µM también provocó una inhibición significativa de la elevación de $[Ca^{2+}]i$ producida por adición de YTX, como se puede observar en la figura 4.42.

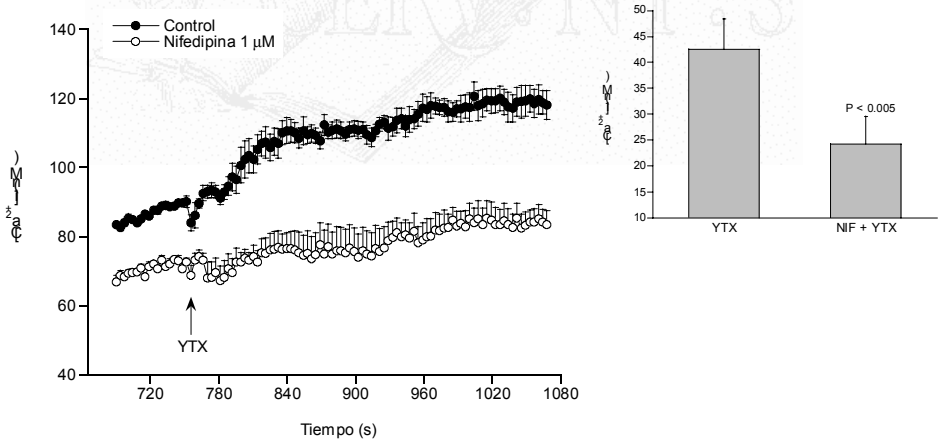


Figura 4.42. Efecto de la preincubación con nifedipina sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por YTX 1 µM en un medio con Ca^{2+}. Inserto: Aumento de $[Ca^{2+}]i$ producido por YTX en células con y sin nifedipina * P< 0,005. Promedio ± SEM de 6 experimentos

Por lo tanto la YTX también produce una entrada de Ca^{2+} a través de canales sensibles a dihidropiridinas, esto es, canales dependientes de voltaje. A pesar de que los linfocitos son células no excitables, diversos autores han descrito la existencia de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, u operados por voltaje (61, 204) e independientes del estado de los reservorios intracelulares, que podrían estar implicados en la activación de linfocitos T de la línea Jurkat; sin embargo, su importancia fisiológica en este proceso no ha sido del todo aceptada y es probable que sean insensibles a las dihidropiridinas (204). Por otro lado, la nifedipina y otras dihidropiridinas inhiben la entrada de Ca^{2+} en linfocitos de trucha (73), en células T y B de ratón y rata (3, 21); así como la activación, dependiente de Ca^{2+}, de células T humanas (66, 122). Por lo tanto, es factible suponer que los linfocitos humanos posean canales de Ca^{2+} sensibles a nifedipina, así como canales sensibles a SKF 96365, y que ambos tipos de canales puedan ser activados por la YTX.

También es posible que ambos fármacos actúen sobre los mismos canales, y por eso ambos sean capaces de inhibir la entrada de Ca^{2+} inducida por YTX, de manera similar. Por tal motivo decidimos investigar si la concentración de nifedipina utilizada para inhibir el efecto de la YTX, podía inhibir hasta cierto punto la entrada de Ca^{2+} capacitativa, a través de canales operados por reservorios (SOC). Para ello, se utilizó el fármaco Tg.

En la figura 4.43 se observa que una preincubación de 10 minutos con nifedipina 1 μM no tuvo ningún efecto sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por Tg en un medio con Ca^{2+}. Esto indica que esta concentración de nifedipina no tiene ningún efecto sobre los canales operados por reservorios, es decir que los linfocitos poseen canales de Ca^{2+} sensibles a nifedipina, que son diferentes a los más conocidos canales dependientes de reservorios, lo que concuerda con lo observado por otros autores (176).

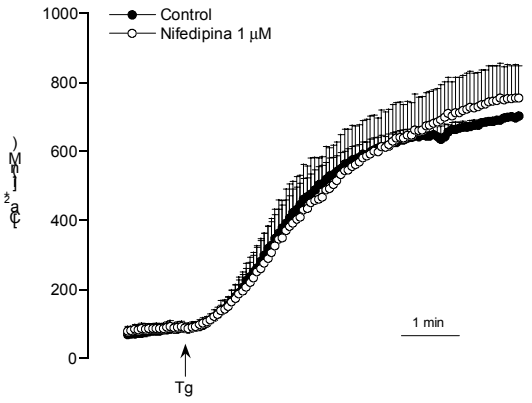


Figura 4.43. Efecto de la preincubación con nifedipina sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por Tg 0,5 μM en un medio con Ca^{2+}. Promedio ± SEM de 3 experimentos

Una vez comprobado que, al menos parte del efecto de la YTX sobre la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos humanos, consiste en la activación de la entrada de Ca^{2+} a través de canales sensibles a SKF 96365 y nifedipina, decidimos estudiar la implicación de algunas rutas de transducción de señales en la modulación de esta entrada de Ca^{2+}. En primer lugar se estudió la ruta de la PKC.

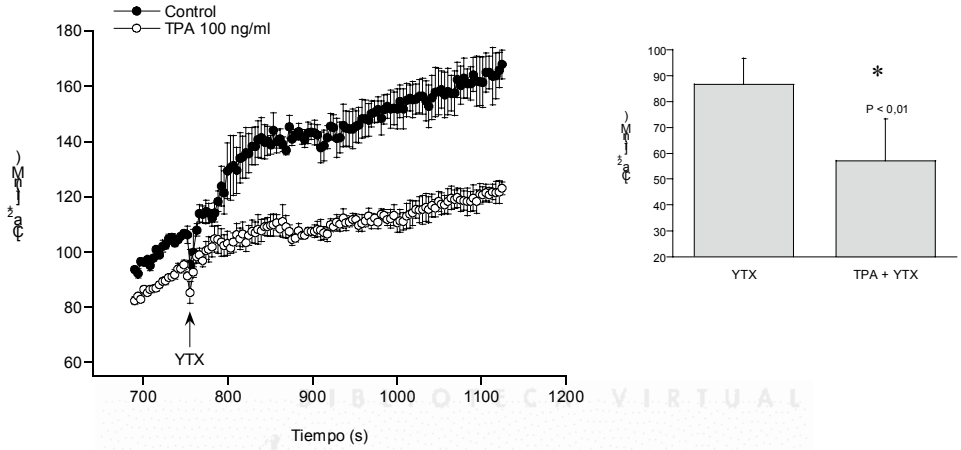


Figura 4.44. Efecto de la activación de la PKC, con TPA sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por YTX 1 μM en un medio con Ca^{2+}. Inserto: Aumento de $[Ca^{2+}]i$ producido por YTX en células con y sin TPA * P< 0,01. Promedio ± SEM de 5 experimentos

En la figura 4.44 se observa que una preincubación de 10 minutos con TPA, para activar a la PKC, inhibe la entrada de Ca^{2+} producida por YTX. Se ha descrito un efecto negativo de la PKC sobre la entrada de Ca^{2+} en linfocitos humanos (58, 160, 204) y en otros modelos celulares (171, 196, 216). En estos trabajos, la PKC inhibe tanto la entrada puramente capacitativa, producida por Tg, como la entrada dependiente de la activación de un receptor. Se han propuesto diversas hipótesis para explicar el mecanismo inhibitorio de la PKC: a) estimulación de la captación de Ca^{2+} por los reservorios intracelulares (58); b) inhibición de los canales de entrada de Ca^{2+} (activados por receptor) (209); y c) activación de la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (16). Nuestros resultados indican que la PKC también puede inhibir la entrada de Ca^{2+} inducida por YTX en linfocitos humanos. A pesar de que no conocemos el mecanismo exacto por el cual la esta toxina produce entrada de Ca^{2+}, cualquiera de las hipótesis antes mencionadas podría explicar nuestra observación. Esto confirma que la entrada de Ca^{2+} activada por YTX puede ser modulada y por tanto, estar relacionada con otras señales celulares.

Otra ruta de transducción que se decidió estudiar fue la del AMP cíclico. Creemos que esta señal intracelular es de gran importancia en el efecto de la YTX, ya que, estudios realizados en nuestro laboratorio, de manera paralela al desarrollo de esta tesis, demostraron que la YTX produce una notable reducción de los niveles basales de AMPc en

linfocitos humanos, probablemente a través de la activación de las fosfodiesterasas, que son la encargadas de hidrolizar el AMPc; además, este efecto es dependiente del Ca^{2+} extracelular. Considerando que la YTX ejerce un efecto sobre ambos sistemas de transducción, es muy probable que la manipulación de la [AMPc]i mediante el uso de fármacos que modulan la actividad de la adenilato ciclasa, enzima productora de AMPc, module el efecto de la YTX sobre la $[Ca^{2+}]$i. Asimismo, es probable que la alteración de los niveles de [AMPc]i de por sí module la $[Ca^{2+}]$i.

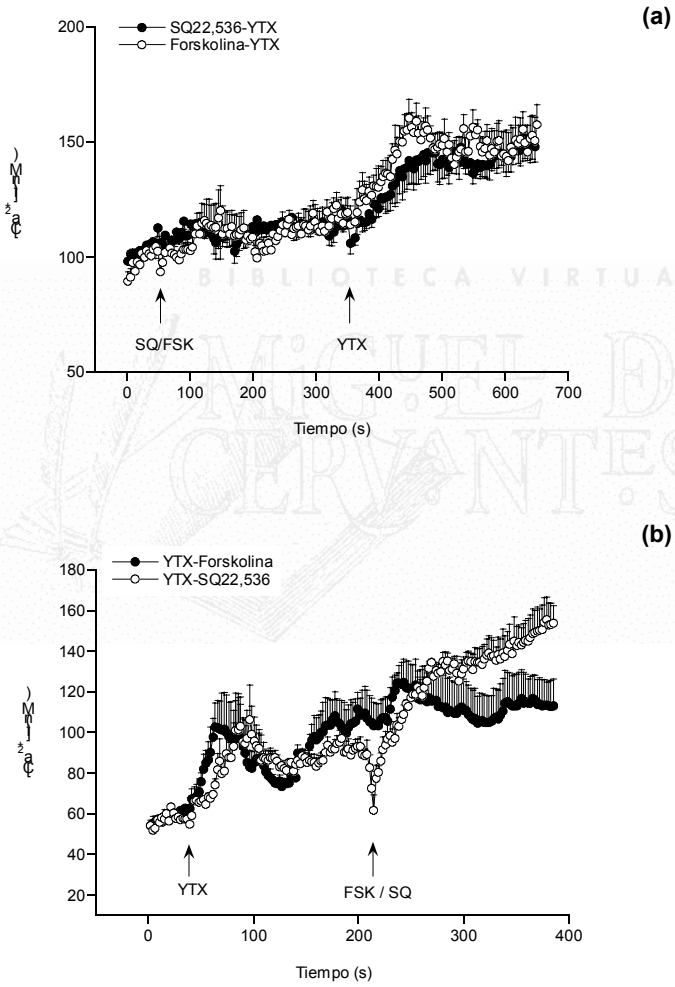


Figura 4.45. Efecto de la inhibición y activación de la adenilato ciclasa con 1 μM SQ22,536 y 10 μM Forskolina, respectivamente, sobre la $[Ca^{2+}]$i y sobre el aumento de $[Ca^{2+}]$i inducido por YTX en linfocitos humanos bañados por un medio conCa^{2+}, **a)** Los moduladores de adenilato ciclasa fueron añadidos antes que la YTX **b)** Fármacos añadidos después de la toxina. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

En la figura 4.45 se muestra el efecto de la adición de un inhibidor (SQ22,536 1 μM) y un activador (forskolina 10 μM) de la adenilato ciclasa, antes y después de la adición de YTX 1 μM, sobre la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos humanos, en un medio con Ca^{2+}. Se observa que ninguno de los dos fármacos tuvo un efecto inmediato sobre los niveles basales de $[Ca^{2+}]i$ (4.45a), sin embargo, cuando se añadieron después de unos minutos de preincubación con YTX (4.45b), el inhibidor SQ22,536 provocó una elevación de la $[Ca^{2+}]i$ por encima de los niveles en los que se mantenía estable tras la adición de YTX.

Esto sugiere que la inhibición de la adenilato ciclasa puede aumentar la $[Ca^{2+}]i$ en células tratadas con YTX, pero no en células normales, lo cual puede deberse a la acción combinada de YTX (estimulación de fosfodiesterasas) y SQ22,536 (inhibición de adenilato ciclasa), puesto que ambos compuestos reducen los niveles de [AMPc]i. Esto implicaría que una reducción importante del [AMPc]i produce un aumento del $[Ca^{2+}]i$.

La integración de estas dos rutas de transducción en la modulación de diversos procesos celulares ha sido muy estudiada (51, 152). En muchos casos ambas rutas desencadenan efectos opuestos o se inhiben una a otra. Por ejemplo en una línea de células no excitables, la entrada capacitativa de Ca^{2+} puede inhibir la síntesis de AMPc (45); mientras que, en diversos modelos celulares, incluyendo los linfocitos humanos, el incremento de los niveles de [AMPc]i inhibe la respuesta celular a agonistas que actúan a través de una elevación de $[Ca^{2+}]i$ (108, 244).

Sin embargo, en nuestros resultados, la elevación de $[Ca^{2+}]i$ inducida por SQ22,536 en células tratadas con YTX podría no ser significativa si tomamos en cuenta que en células tratadas con YTX y forskolina, los niveles de $[Ca^{2+}]i$ se mantienen bastante elevados hasta el final del experimento y que esta elevación parece ser dependiente sólo de la YTX, ya que no se aprecia ningún cambio claro al agregar forskolina (figura 4.45 b) por lo que no es posible confirmar un efecto aditivo de ambas sustancias sobre la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos; además, la YTX no produce una mayor aumento de $[Ca^{2+}]i$ en células preincubadas con SQ22,536. De cualquier manera, consideramos que la YTX puede ser una importante herramienta para el estudio de la interacción Ca^{2+}/AMPc en diversos modelos celulares, dada su característica de reducir la [AMPc]i.

Por otro lado, si se compara el efecto de la YTX sobre la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos normales y linfocitos tratados con forskolina y SQ22,536, no se observa una diferencia significativa en el incremento de $[Ca^{2+}]i$ provocado por la toxina en presencia y ausencia de estos fármacos (figuras 4.45 y 4.46). Por lo que debemos concluir que, si bien el efecto de la YTX sobre la [AMPc]i es muy sensible al Ca^{2+} el efecto de la YTX sobre la $[Ca^{2+}]i$ es poco sensible a las variaciones de [AMPc]i. Sin embargo es posible que los cortos tiempos de incubación con ambos fármacos explique en parte esta insensibilidad.

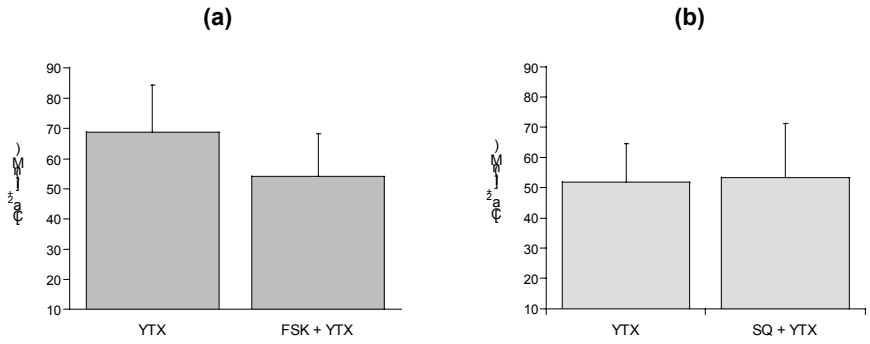


Figura 4.46. Incremento de [Ca^{2+}] inducido por YTX en linfocitos bañados por un medio con Ca^{2+} en presencia y ausencia de a) 10 μM forskolina y b) 1 μM SQ22,536. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

La toxina colérica es otro fármaco muy utilizado para incidir en la ruta del AMPc, ya que se une y ribosila a la subunidad α de la proteína Gs, la cual, a su vez estimula la actividad de la adenilato ciclasa. La unión de la toxina colérica inhibe la actividad GTPasa de la subunidad αs, lo que provoca una activación constante de la adenilato ciclasa que genera un gran aumento de [AMPc]i en múltiples modelos celulares (148).

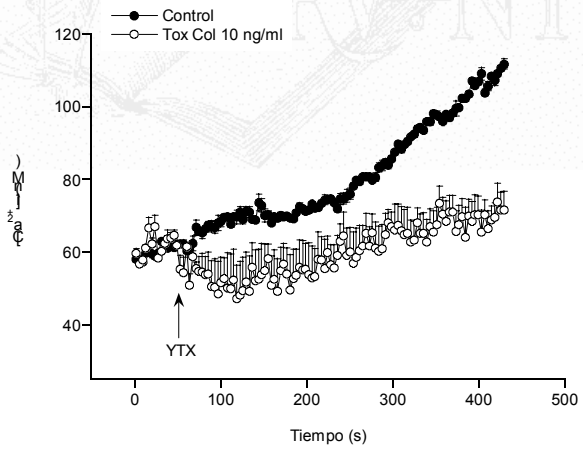


Figura 4.47. Efecto de 90 minutos de preincubación con toxina colérica sobre el aumento de [Ca^{2+}]i inducido por YTX 1 μM en un medio con Ca^{2+}. Promedio ± SEM de 3 experimentos

En la figura 4.47 se observa que la preincubación con toxina colérica (90 minutos, 37ºC) inhibe marcadamente el efecto de la YTX sobre la [Ca^{2+}]i. Esto podría ser debido directamente al efecto de un aumento de AMPc, por lo que es posible que una incubación más larga con forskolina, tuviera un efecto similar sobre el aumento de [Ca^{2+}]i inducido por

YTX. Sin embargo, también es posible que la proteína Gs u otra proteína G sensible a toxina colérica, o bien, un receptor asociado a proteínas G, esté involucrado en la transducción de señales generadas por YTX. Diversos estudios han demostrado que los efectos de la toxina colérica son en muchos casos independientes del AMPc (86, 149, 239). De cualquier forma, es poco probable que la YTX actúe a través de un receptor asociado a proteína Gs, ya que en tal caso ésta debería producir un aumento de AMPc.

Por último, en la figura 4.48 se observa el efecto de una preincubación de aproximadamente 7 minutos con AO sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por YTX. Como habíamos mencionado antes, esta toxina DSP inhibidora de fosfatasas no tiene ningún efecto sobre la acción de la YTX. Esta es una observación muy importante ya que ambas toxinas aparecen juntas en muchos episodios de moluscos contaminados con toxinas diarreicas (50, 63). Asimismo, este resultado sugiere que los canales de Ca^{2+} activados por YTX son relativamente insensibles a los procesos de fosforilación-desfosforilación, al menos son insensibles a las fosfatasas PP1 y/o PP2A. Por el contrario, los canales dependientes de voltaje de numerosos modelos celulares excitables son muy sensibles a la actividad intrínseca de esta fosfatasas, aunque tanto cualitativa como cuantitativamente los efectos de los inhibidores de fosfatasas varían mucho en función del tipo de célula estudiada (106). En esta figura también se observa que la preincubación con AO puede aumentar muy ligeramente la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos.

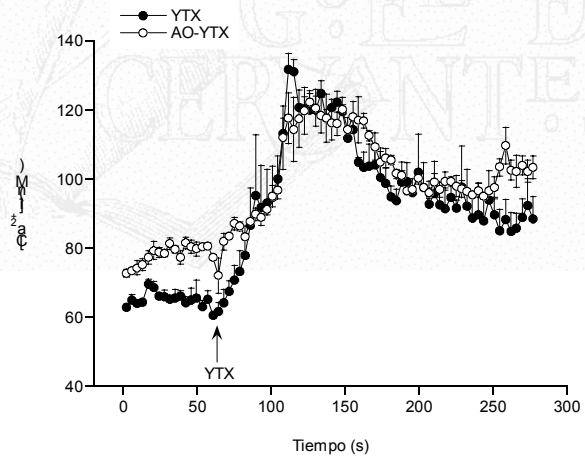


Figura 4.48. Efecto del ácido ocadaico (AO) sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por YTX 1 μM en un medio con Ca^{2+}. Promedio ± SEM de 3 experimentos

Hasta el momento, nuestros resultados indican que la YTX produce en linfocitos humanos una ligera entrada de Ca^{2+}, en forma de oscilaciones y, aparentemente, no capacitativa, a través de canales sensibles a dihidropiridinas y a un antagonista de canales dependientes de reservorios. A pesar de que estos últimos canales no son bloqueables por

dihidropiridinas, como demuestran nuestros resultados y los de otros autores (176, 204), no podemos descartar que los canales sensibles a nifedipina puedan ser bloqueados por el antagonista de canales dependientes de reservorios. Además, la entrada de Ca^{2+} inducida por YTX es inhibida por TPA (estimulación de la PKC) y por toxina colérica, esta última probablemente a través de un mecanismo independiente del AMPc, ya que la forskolina, un activador de la adenilato ciclasa, no tiene ningún efecto. El AO, toxina marina ecológicamente asociada a la YTX y la inhibición de la adenilato ciclasa, tampoco tienen ningún efecto sobre el incremento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por yessotoxina.

Por último, la YTX tiene un segundo efecto sobre la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos humanos, esto es, inhibe la entrada de Ca^{2+} producida por la adición de Ca^{2+} extracelular a células preincubadas unos minutos en ausencia de dicho ion. Para tratar de entender mejor esta última observación se estudió el efecto de la YTX sobre la entrada capacitativa de Ca^{2+}, inducida por Tg.

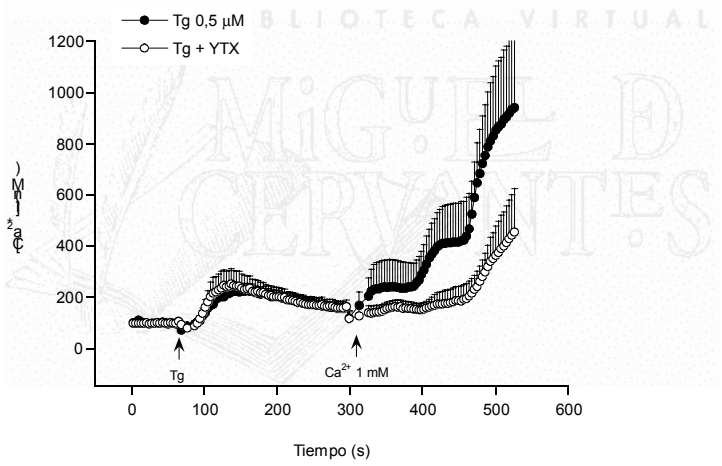
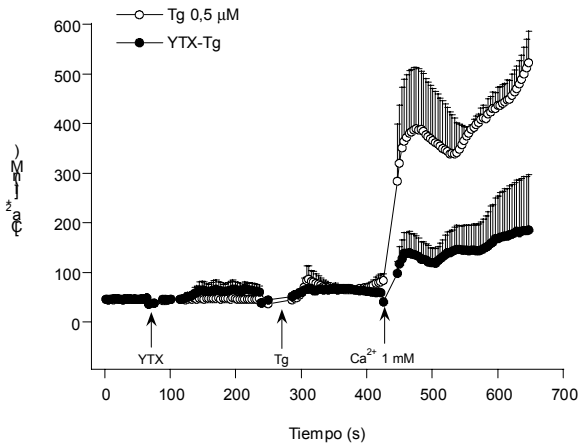


Figura 4.49. Efecto de Tg y de la combinación Tg-YTX sobre la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos humanos bañados por un medio sin Ca^{2+} que, donde indica la flecha, fue sustituido por un medio con dicho ion. Promedio ± SEM de 4 experimentos.

En la figura 4.49 se observa que la adición de Tg (0,5 μM) a linfocitos bañados por un medio sin Ca^{2+} produce un aumento de $[Ca^{2+}]i$ de aproximadamente 200 nM, debido al vaciamiento de reservorios en presencia y ausencia de YTX. A continuación, la adición de Ca^{2+} al medio extracelular, produce una gran entrada de Ca^{2+} que es sensiblemente más lenta en células tratadas con Tg y YTX que en células tratadas únicamente con Tg.

Asimismo, en la figura 4.50 se observa que la adición de YTX inhibe la entrada de Ca^{2+} a células tratadas con Tg en un medio carente de este ion, solamente cuando la toxina fue añadida antes que la Tg (4.50a). Por el contrario, si se agrega YTX a células previamente tratadas con Tg, la entrada de Ca^{2+} es más rápida (4.50b).

(a)



(b)

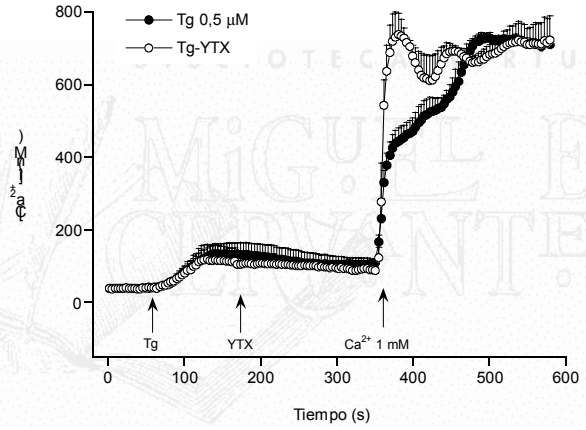


Figura 4.50. Efecto de la YTX sobre la entrada capacitativa de Ca^{2+} inducida por Tg en linfocitos humanos. **a)** La toxina se agregó al medio antes que la Tg. **b)** La toxina fue añadida después que la Tg . Promedio ± SEM de 4 experimentos.

Estos resultados indican que la YTX interfiere de un modo complejo en los mecanismos de activación e inactivación de canales de Ca^{2+}, ya que el efecto observado en células tratadas con Tg antes que con YTX podría significar que el vaciamiento de reservorios producido por la Tg modifica de alguna manera el mecanismo de interacción de la toxina (sea este una interacción directa o a través de otras señales) con los el/los canales de entrada de Ca^{2+}. Asimismo el hecho de que la YTX sea capaz tanto de activar como de inhibir rutas de entrada de Ca^{2+} es de por sí una observación interesante.

Con el fin de comprobar estos resultados se examinó el efecto de la YTX sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ producido por Tg en un medio con Ca^{2+}. En la figura 4.51 se observa,

una vez más, que la YTX provocó efectos diferentes dependiendo del momento de adición, así, en células preincubadas durante 5 minutos en presencia de YTX, la adición de Tg produjo un aumento de $[Ca^{2+}]i$ menor que el control (4.51a), sin embargo la adición de ambas sustancias de manera simultánea (4.51b) provocó una potenciación del efecto de la Tg; por último, la adición de YTX a células previamente tratadas con Tg no produjo ningún cambio sobre la $[Ca^{2+}]i$ (4.51c).

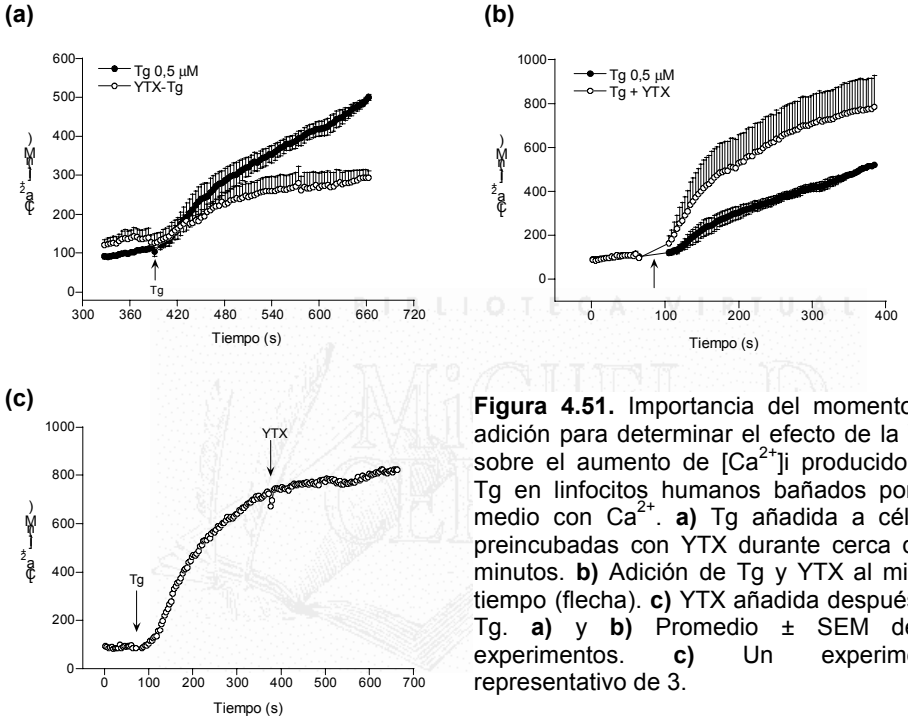


Figura 4.51. Importancia del momento de adición para determinar el efecto de la YTX sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ producido por Tg en linfocitos humanos bañados por un medio con Ca^{2+}. **a)** Tg añadida a células preincubadas con YTX durante cerca de 5 minutos. **b)** Adición de Tg y YTX al mismo tiempo (flecha). **c)** YTX añadida después de Tg. **a)** y **b)** Promedio ± SEM de 4 experimentos. **c)** Un experimento representativo de 3.

En general, los resultados anteriores ponen de manifiesto que se requiere un cierto tiempo de preincubación para que la YTX produzca una inhibición de la entrada Ca^{2+}. Esto es cierto para células tratadas con Tg y también para células simplemente mantenidas unos minutos en un medio sin Ca^{2+}. Por otro lado, la YTX también es capaz de producir una entrada de Ca^{2+}, aditiva a la producida por Tg, en células bañadas por un medio con Ca^{2+} figura 4.51b) y en células a las que se les agregaron Tg y YTX (en ese orden) en un medio sin Ca^{2+}, para luego agregar Ca^{2+} extracelular (figura 4.50b); sin embargo si la YTX es añadida después de la Tg, en un medio con Ca^{2+}, no produce una nueva entrada de Ca^{2+} (figura 4.51c).

Por lo tanto, es probable que la inhibición de la entrada de Ca^{2+} sea dependiente de señales intracelulares secundarias (por ejemplo la disminución de la [AMPc]i), mientras que, por el contrario, la entrada de Ca^{2+} inducida por YTX parece ser un efecto inmediato de esta toxina. De cualquier forma también es posible que el vaciamiento de reservorios

intracelulares de Ca^{2+} (con Tg) interfiera de alguna forma con la interacción de la YTX y su diana celular.

Estos resultados también parecen confirmar que la YTX puede producir entrada de Ca^{2+} a través de canales insensibles al vaciamiento de reservorios, que serían los canales sensibles a nifedipina. Sin embargo, esta entrada está enmascarada de algún modo en células previamente tratadas por Tg en un medio con Ca^{2+}. Por otro lado, tampoco es posible asegurar que la YTX active específicamente los canales de Ca^{2+} sensibles a dihidropiridinas.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la YTX interacciona con canales de Ca^{2+} y tiene capacidad tanto de activarlos como de inhibirlos. Si bien, no se conoce con seguridad que tipo de canales poseen los linfocitos, diversos autores han sugerido que estas células poseen más de un tipo de canales permeables al Ca^{2+} (3, 48, 61, 204). Por lo que sería posible que la YTX activara un tipo de canal e inhibiera otro, o que pudiera activar y a continuación inhibir varios tipos de canales de Ca^{2+}.

Como hemos mencionado anteriormente, la estructura química de la YTX sugiere que puede interaccionar directamente con canales iónicos, de forma análoga a las brevetoxinas y ciguatoxinas; aunque la diana celular de estos dos tipos de ficotoxinas son los canales de Na^{+} dependientes de voltaje (41, 57, 111). Sin embargo, no se puede descartar que la YTX también tenga cierta afinidad por canales de Ca^{2+}, de hecho, se ha observado que las brevetoxinas pueden interaccionar con el receptor de la MTX (126), una toxina, que produce una importante entrada de Ca^{2+} en diversos tipos de células (155, 220, 265). A pesar de que no se conoce con seguridad la identidad del receptor de la MTX, varios trabajos indican que podría tratarse de un canal catiónico no selectivo, permeable a Ca^{2+} (27, 200). Además, se ha descrito que las brevetoxinas pueden unirse a células no excitables del sistema inmune de mamíferos (32).

Por último, tampoco se puede descartar que la YTX se una a un receptor celular que no sea en sí un canal permeable a iones Na^{+} o Ca^{2+}. Por ejemplo, los receptores de opiáceos se expresan de manera normal en la membrana de algunos linfocitos; la activación de estos receptores, transfectados en la línea celular Jurkat, produce un aumento de $[Ca^{2+}]i$ por vaciamiento de reservorios acoplado a entrada capacitativa, acompañado de una disminución de los niveles de [AMPc]i (206).

4.2.2 Efecto de la YTX sobre el potencial de membrana de linfocitos y células de neuroblastoma humanos

Hemos mencionado continuamente la posibilidad de que la YTX se una a canales de Na^{+} e interfiera con sus propiedades de activación o inactivación. Para tratar de estudiar esta posibilidad, decidimos examinar el efecto de la YTX sobre el potencial de membrana de linfocitos humanos, que podría estar influido por la actividad de este u otro tipo de canales catiónicos. En la figura 4.52 se ilustra el efecto de la adición de YTX y Tg (2 y 0,5 μM, respectivamente) a una suspensión de linfocitos humanos cargados con el indicador

bis-oxonol y resuspendidos en un medio con Ca^{2+} (estos experimentos se realizaron en el espectrofluorímetro y como control se adicionó DMSO).

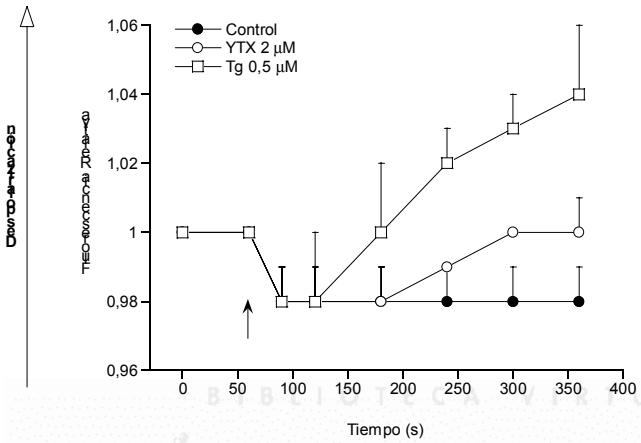


Figura 4.52. Cambios de potencial de membrana inducidos por YTX y Tg en linfocitos humanos resuspendidos en un medio con Ca^{2+}. Ambas sustancias fueron agregadas a la suspensión celular en donde indica la flecha. El control es el efecto de la adición de 2 μl de DMSO . Promedio ± SEM de 3 experimentos.

Se observa que la adición de YTX y Tg produce una despolarización, siendo ésta mayor en el caso de la Tg. Estos resultados son inesperados, ya que está descrito que la Tg produce hiperpolarización en linfocitos humanos (37) y de rata (261). Esta hiperpolarización es debida a la activación de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+}, como el flujo de K^+ es hacia el exterior, la pérdida de cationes produce una hiperpolarización de la membrana celular. Sin embargo, la entrada de iones Ca^{2+} en sí produciría una despolarización de la membrana; debido a la gran conductividad de los canales de K^+, este efecto solo pudo ser observado en células cargadas con el quelante intracelular de Ca^{2+} BAPTA (261). Por otro lado, en linfocitos humanos, una adición de ionomicina, que produce una gran entrada de Ca^{2+}, produjo asimismo una despolarización debida a la entrada de este ion (37).

Por lo tanto la despolarización inducida por Tg observada en la figura 4.52 podría deberse a una gran entrada de Ca^{2+}, sin embargo no podemos explicar el motivo por el cual la conductividad de K^+ no parece activarse. La despolarización causada por YTX podría también estar debida a una entrada de Ca^{2+}, ya que la entrada de Ca^{2+} inducida por YTX es significativamente menor que la producida por Tg, aunque como hemos mencionado antes, en estos experimentos utilizamos una concentración de toxina mayor (2 μM) que en los experimentos de medición de $[Ca^{2+}]i$ realizados en el microscopio de fluorescencia. Sin embargo también es posible que la despolarización causada por YTX sea debida a la activación de canales de Na^+, como los que se han descrito recientemente en una línea de

linfocitos T (133). Tampoco se descarta que la Tg active otro tipo de conductividad iónica, que a su vez produzca la despolarización observada.

Como los canales de Na^+ son más importantes y están mucho mejor caracterizados en células eléctricamente excitables, se decidió estudiar el efecto de la YTX sobre el potencial de membrana de células de una línea de neuroblastoma humano (BE(2)-M17). En la figura 4.53 se observa que la YTX (2 μM) no produjo ningún efecto sobre el potencial de membrana basal de estas células.

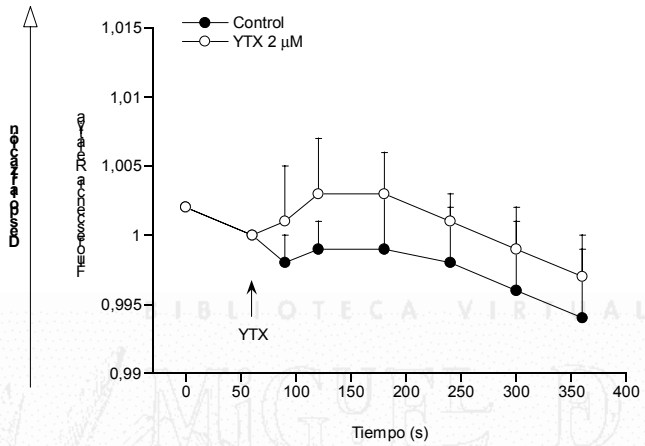


Figura 4.53. Cambios de potencial de membrana inducidos por YTX en células de neuroblastoma humano resuspendidas en un medio con Ca^{2+}. La YTX fue añadida al medio donde lo indica la flecha. El control es el efecto de la adición de 2 μl de DMSO. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

Esto indica que la YTX no es un activador potente de canales catiónicos, sin embargo, como se observa en la figura 4.54, la YTX es capaz de producir una ligera despolarización cuando se agrega a células previamente tratadas con veratridina, un fármaco que abre canales de Na^+ dependientes de voltaje e inhibe su inactivación (240), lo que explica la gran despolarización que provoca, y que además no se observa recuperación hacia el potencial de membrana basal.

La adición de YTX produce una despolarización añadida a la de la veratridina, que sin embargo no se observa en células no tratadas con este último fármaco (figura 4.53). Esto podría ser debido a que la YTX se une al canal de Na^+ ya activado y contribuye a aumentar su conductividad. De hecho el sitio de unión de las brevetoxinas y de la veratridina es distinto (sitio 5 para las primeras (15) y 2 para la segunda (240)) por lo que, si la YTX se une al mismo sitio que las brevetoxinas, podría actuar sobre canales previamente activados por veratridina. Por último también es posible que la YTX sea capaz de activar también otros canales catiónicos dependientes de voltaje, que no hayan sido activados por la concentración de veratridina aquí empleada.

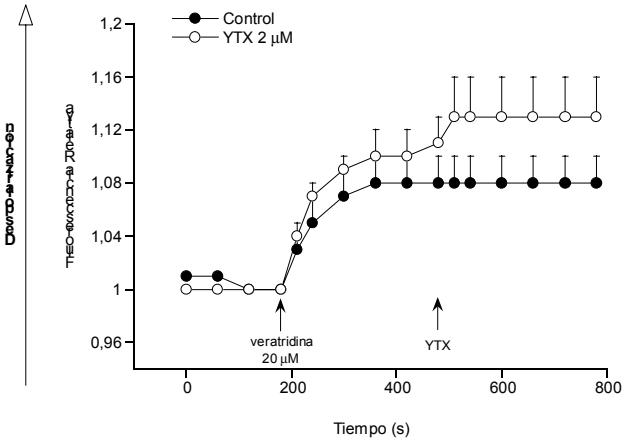


Figura 4.54. Cambios de potencial de membrana inducidos por YTX en células de neuroblastoma humano tratadas con veratridina, un agonista de canales de Na^+. El control representa la adición de DMSO a células pretratadas con veratridina. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

A pesar de estos prometedores resultados, no se continuó con esta línea de experimentos debido sobre todo a la poca disponibilidad de toxina, ya que en estos experimentos además de requerirse una mayor concentración, el volumen de trabajo es también mucho mayor que en los experimentos realizados en el microscopio de fluorescencia. Por tal motivo, se decidió continuar con los estudios de $[Ca^{2+}]i$, específicamente enfocándonos en la interacción Ca^{2+} AMPc en linfocitos humanos, dada la probable implicación de la YTX en ambos sistemas de transducción.

2.2.3 Interacción Ca^{2+}- AMPc en linfocitos humanos

El Ca^{2+} y el AMP cíclico son segundos mensajeros que regulan un gran número de procesos celulares. Existen numerosos estudios que han descrito una clara interacción entre estos dos sistemas de transducción de señales intracelulares, en muy diversos tipos de células (33, 223, 266), incluyendo linfocitos humanos (118, 191). En este apartado se estudió la manera en que los niveles de [AMPc]i pueden regular a la señal intracelular de Ca^{2+}. Debido a que esta modulación depende en gran medida del estímulo empleado para movilizar Ca^{2+} (33, 244), en los presente estudios se utilizó como estímulo a la Tg, por tratarse de un fármaco que actúa directamente sobre los mecanismos de regulación de la $[Ca^{2+}]i$, sin involucrar ningún otro sistema de transducción.

En la figura 4.55 se observa el efecto de fármacos que modifican la actividad de la adenilato ciclasa (AC), y por tanto, los niveles de [AMPc]i, sobre los cambios de $[Ca^{2+}]i$ originados Tg. En un medio sin Ca^{2+}, la Tg produce un vaciamiento de reservorios que, al añadir Ca^{2+} al medio extracelular, provoca una gran entrada capacitativa; la preincubación con forskolina (FSK) 30 μM produjo una inhibición tanto del vaciamiento de reservorios,

como de la entrada capacitativa. Por el contrario, el inhibidor de la AC SQ22,536, no tuvo ningún efecto sobre ninguna de las dos fases de la señal de Ca^{2+}.

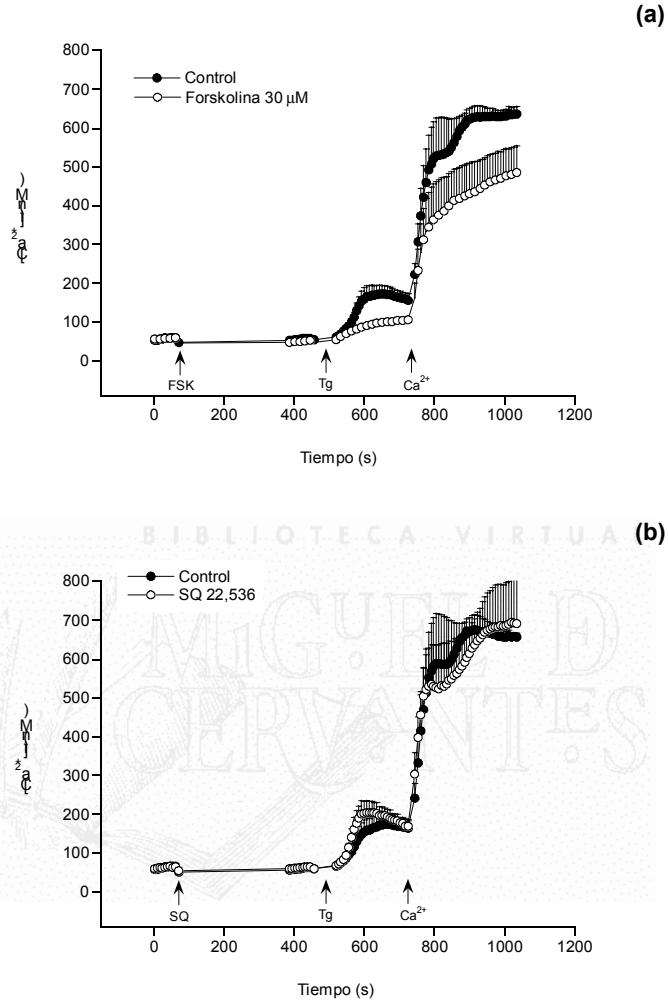


Figura 4.55. Efecto de la modulación de la actividad de la adenilato ciclasa (AC) sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por Tpg en linfocitos humanos. Los fármacos moduladores de la adenilato ciclasa a) forskolina y b) SQ22,536, se añadieron a linfocitos bañados por un medio sin Ca^{2+}; después de 5 minutos se agregó Tg 0,5 μM y por último $CaCl_2$ 1 mM. El control, en ambos casos, muestra el efecto de la Tpg. Promedio ± SEM de 4 experimentos.

En la figura 4.56 se ilustra el efecto de la inhibición de la PKA, el siguiente paso en el sistema de transducción de señales dependientes del AMPc, sobre la señal de Ca^{2+} generada por Tg. En ella se observa que la inhibición de la PKA con H-89 produjo a su vez, una inhibición de la entrada de Ca^{2+} inducida por Tg (4.56 a y b). Además, una alta concentración de H-89 (100 μM) provocó un vaciamiento de reservorios de Ca^{2+} (4.56a).

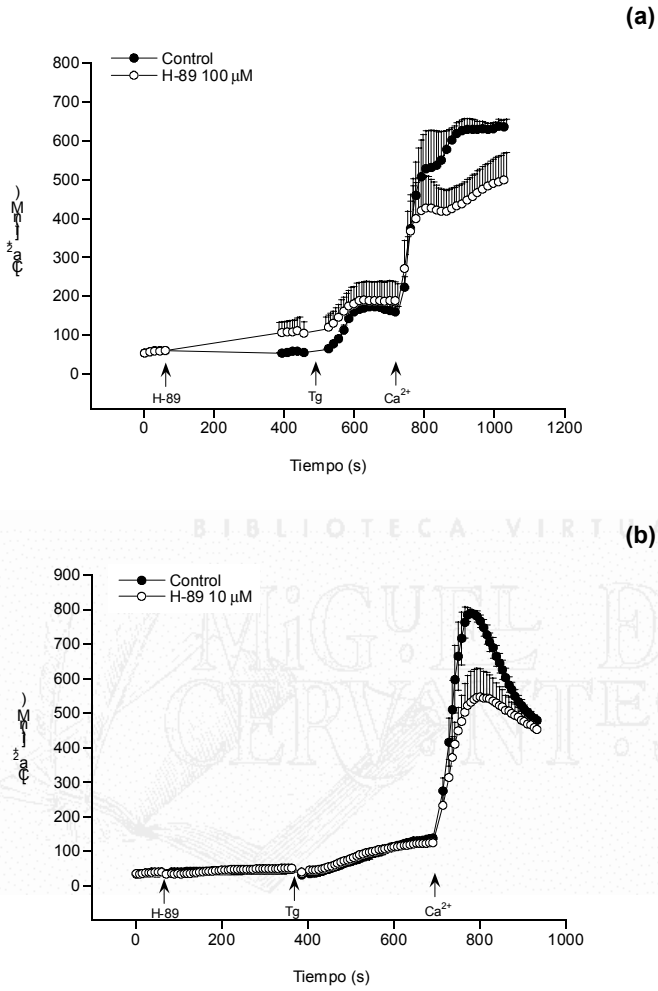


Figura 4.56. Efecto de la inhibición de PKA sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por Tpg en linfocitos humanos. El inhibidor de la PKA, H-89 a) 100 μM y b) 10 μM, se añadió a linfocitos bañados por un medio sin Ca^{2+}; después de 5 minutos se agregó Tg 0,5 μM y por último $CaCl_2$ 1 mM. El control muestra el efecto de la Tpg. Promedio ± SEM de 4 experimentos.

Estos resultados indican que tanto la activación (forskolina) como la inhibición (H-89) de la PKA reducen la entrada de Ca^{2+} producida por Tg en linfocitos humanos sugiriendo que esta cinasa juega un papel importante en la modulación de la entrada capacitativa de Ca^{2+}. Sin embargo, este no puede ser el único mecanismo que acopla los reservorios intracelulares con los canales de entrada de Ca^{2+}, ya que en ningún caso la inhibición de la entrada de Ca^{2+} es completa, por lo que la PKA solo actuaría como un mecanismo regulador.

Además, debemos tomar en cuenta que la activación de la PKA, con forskolina, produce no solo una inhibición de la entrada capacitativa, sino que también inhibe el vaciamiento de reservorios, por lo tanto, es posible que la entrada de Ca^{2+} sea menor a causa del menor vaciamiento de reservorios. Para comprobarlo, se utilizaron los mismo fármacos: forskolina, SQ22,536 y H-89 para manipular la ruta del AMPc/PKA, después de vaciar los reservorios de Ca^{2+} con Tg en un medio sin este ion; de este modo se asegura que el vaciamiento de reservorios es el mismo en todas las condiciones experimentales y por lo tanto se puede estudiar el efecto de la actividad de la PKA exclusivamente sobre la entrada capacitativa de Ca^{2+}.

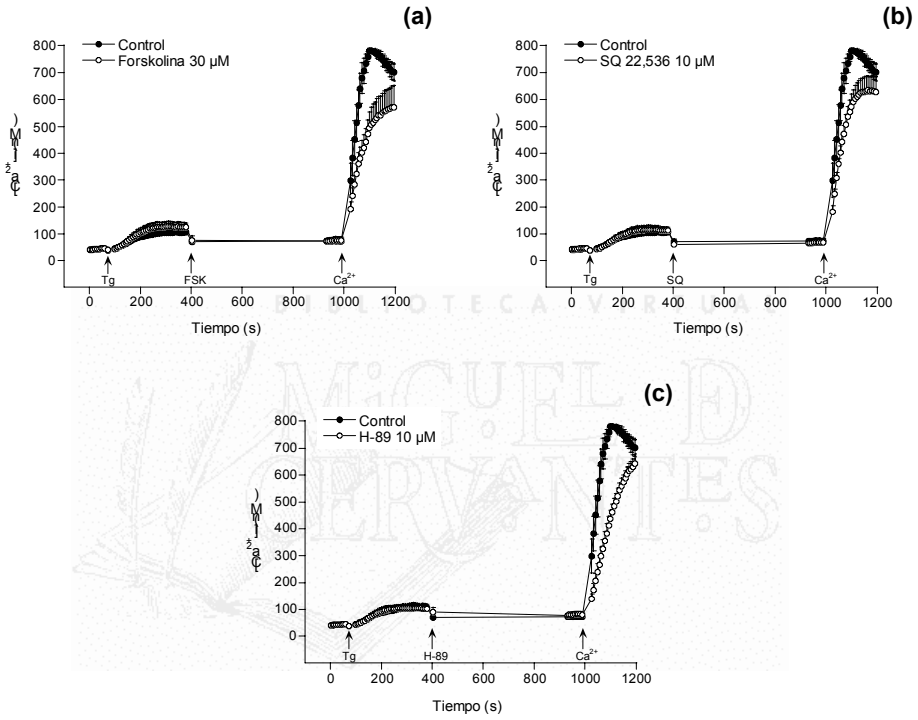


Figura 4.57. Efecto de la modificación de la [AMPc]i y de la actividad de la PKA, sobre la entrada de Ca^{2+} en linfocitos humanos tratados con Tg 0,5 µM. Se añadió Tg a linfocitos bañados por un medio sin Ca^{2+}, a continuación se agregaron los fármacos **a)** forskolina **b)** SQ22,536 y **c)** H-89; tras 10 minutos de incubación en el medio sin Ca^{2+} este fue sustituido por un medio con dicho ion. El control es siempre la entrada de Ca^{2+} inducida por Tpg en ausencia de otros fármacos. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

En la figura 4.57 se observa, una vez más, que tanto la inhibición (4.57b y c) como la estimulación (4.57a) de la PKA disminuyó la entrada de Ca^{2+} producida por Tg. En estos experimentos se utilizó una concentración más elevada de SQ22,536, ya que la falta de efecto de este fármaco observada en la figura 4.55 podría ser debida a la baja concentración empleada; de hecho diversos autores han utilizado concentraciones de 10 µM o superiores de este fármaco (161, 266). Como se observa en la figura 4.57b, esta

concentración de SQ22,536 inhibió la entrada de Ca^{2+} producida por Tg, probablemente a través de la inhibición de la actividad basal de la PKA.

Por lo tanto estos resultados confirman que cualquier desviación del nivel basal de actividad de la PKA inhibe la entrada capacitativa de Ca^{2+} en linfocitos humanos. Esto puede significar que se requiere un margen bastante estrecho de actividad de esta cinasa para asegurar una activación óptima de entrada de Ca^{2+} en respuesta al vaciamiento de reservorios. En células excitables se ha descrito una situación similar a ésta, en la que una activación o inhibición de la PKA disminuye la entrada de Ca^{2+} inducida por el neurotransmisor GABA (163).

Muchos otros autores han descrito efectos más o menos contradictorios de la PKA sobre la entrada capacitativa de Ca^{2+}, en diversos modelos celulares. La estimulación de la PKA inhibe la entrada de Ca^{2+} en células de músculo liso traqueal (108, 266), mientras que en músculo liso arterial, la inhibición de PKA con H-89 inhibió a su vez, parcialmente, la entrada capacitativa de Ca^{2+} (242). En basófilos y en linfocitos humanos, la activación de la PKA inhibe la entrada de Ca^{2+} inducida por ciertos estímulos extracelulares, mientras que otros estímulos son insensibles a esta ruta de transducción (33, 179, 191, 244). Por último, la activación de la PKA estimula la entrada de Ca^{2+} inducida por Tg en la línea celular HL-60 (216).

Un estudio interesante es el descrito por Fernando *et al.* (72) quienes encontraron que la PKA estimula la captación de Ca^{2+} por las mitocondrias, con lo cual, la estimulación de esta cinasa disminuye la $[Ca^{2+}]i$ total a pesar de potenciar también la entrada de Ca^{2+} inducida por Tg. Si bien nuestros resultados no nos permiten describir detalladamente el mecanismo mediante el cual la PKA ejerce su efecto sobre la entrada de Ca^{2+}, la captación de Ca^{2+} por las mitocondrias podría ser considerada, ya que recientemente se ha descrito que este es un mecanismo importante en la regulación de la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos (110).

Otro efecto observado en este trabajo es el vaciamiento de reservorios intracelulares de Ca^{2+} inducido por H-89 100 μM; y la inhibición, causada por forskolina, del vaciamiento de reservorios inducido por Tg. En la figura 4.58 se confirma que en un medio sin Ca^{2+}, la forskolina inhibe el aumento de $[Ca^{2+}]i$ producido por Tg, que es debido exclusivamente al vaciamiento de reservorios. Por otro lado, la adición de forskolina a células tratadas con Tg, siempre en ausencia de Ca^{2+} extracelular, produce una ligera caída inmediata de la $[Ca^{2+}]i$, aunque los niveles finales de $[Ca^{2+}]i$ son iguales a los del control (células tratadas únicamente con Tg).

Esto sugiere que la forskolina puede movilizar Ca^{2+} desde el citosol, hacia reservorios insensibles a la Tg (probablemente mitocondrias) aunque esta movilización no es muy eficaz para retirar todo el Ca^{2+} citosólico liberado de los reservorios sensibles a Tg. Diversos autores coinciden en que parte de la especificidad de los mecanismos de señalización intracelular depende de la compartimentalización del citosol (23, 69); por lo tanto cabe esperar que no todo el Ca^{2+} liberado al citosol pueda ser recaptado por los reservorios intracelulares activados por forskolina.

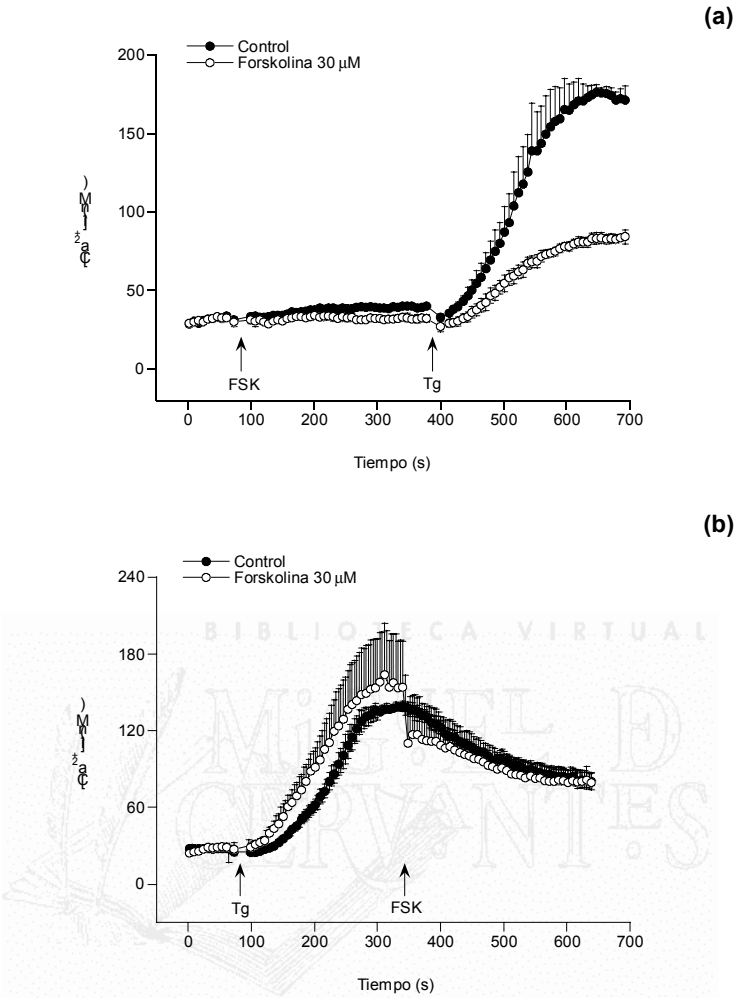


Figura 4.58. Efecto de la forskolina sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por Tg en un medio sin Ca^{2+}. **a)** La forskolina fue añadida al medio aproximadamente 5 minutos antes que la Tg. **b)** La forskolina fue añadida después de la Tg. El control en ambos casos muestra el efecto de la Tg en células no tratadas con forskolina. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

Asimismo, la figura 4.59 confirma que una concentración de 100 μM H-89 produce un importante aumento de $[Ca^{2+}]i$ en linfocitos bañados por un medio sin Ca^{2+}, es decir que este fármaco libera Ca^{2+} de los reservorios intracelulares. Además este efecto también se puede observar en células tratadas con Tg (4.59c), lo que sugiere que el H-89 vacía reservorios independientes de Tg. En la línea celular Jurkat se han descrito reservorios de Ca^{2+} insensibles a la Tg y sensibles a la cafeína (101), sin embargo, en nuestro trabajo no se comprobó que la concentración 0,5 μM de Tg vaciara completamente los reservorios del

retículo endoplasmático, por lo que también es posible que el H-89 actúe sobre estos mismos reservorios.

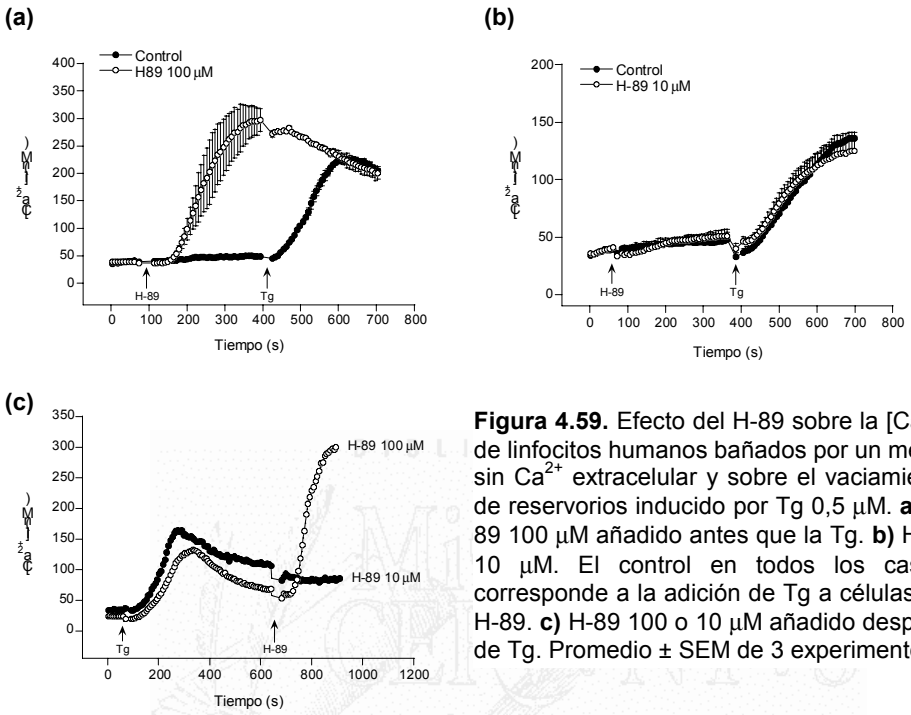


Figura 4.59. Efecto del H-89 sobre la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos humanos bañados por un medio sin Ca^{2+} extracelular y sobre el vaciamiento de reservorios inducido por Tg 0,5 µM. **a)** H-89 100 µM añadido antes que la Tg. **b)** H-89 10 µM. El control en todos los casos, corresponde a la adición de Tg a células sin H-89. **c)** H-89 100 o 10 µM añadido después de Tg. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

Por otro lado una concentración menor de H-89 (10 µM) no tuvo ningún efecto sobre la $[Ca^{2+}]i$ ni sobre el vaciamiento de reservorios inducido por Tg (4.59b y c). Es probable que el mecanismo por el cual el H-89 produce liberación de Ca^{2+} en los reservorios intracelulares sea independiente de la inhibición de la PKA, ya que este fármaco puede inhibir directamente a las ATPasas de Ca^{2+} del retículo endoplasmático del músculo esquelético y cardíaco (SERCA 2a y 1, respectivamente) (132). En dicho trabajo se encontró que la concentración media inhibitoria para las SERCAs era de 7-8 µM H-89, sin embargo, nuestros resultados ponen de manifiesto que una concentración 10 µM de H-89 no tiene ningún efecto sobre la actividad de la ATPasa del ER de linfocitos humanos (SERCA 2b, (135)), lo que indica que esta isoenzima es menos sensible, más no totalmente insensible, a la acción del fármaco. Por lo tanto, y ya que otros autores han utilizado esta misma concentración de H-89 específicamente para inhibir a la PKA (264, 266), consideramos que los efectos observados por nosotros con H-89 10 µM son en realidad dependientes de la inhibición de dicha cinasa.

Por último, se decidió comprobar que el efecto de forskolina sobre el vaciamiento de reservorios de Ca^{2+} inducido por Tg fuera en realidad dependiente de la elevación del [AMPc]i y por consiguiente de la activación de la PKA; ya que se han descrito efectos inespecíficos de este fármaco en linfocitos (47, 204). En la figura 4.60 se muestra el efecto

de la adición de Tg sobre la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos preincubados en presencia o ausencia de forskolina (4.60a), H-89 y forskolina (4.60b) o SQ22,536 y forskolina (4.60c). Las concentraciones usadas para cada fármaco fueron: forskolina 30μM, H-89 y SQ 10 μM.

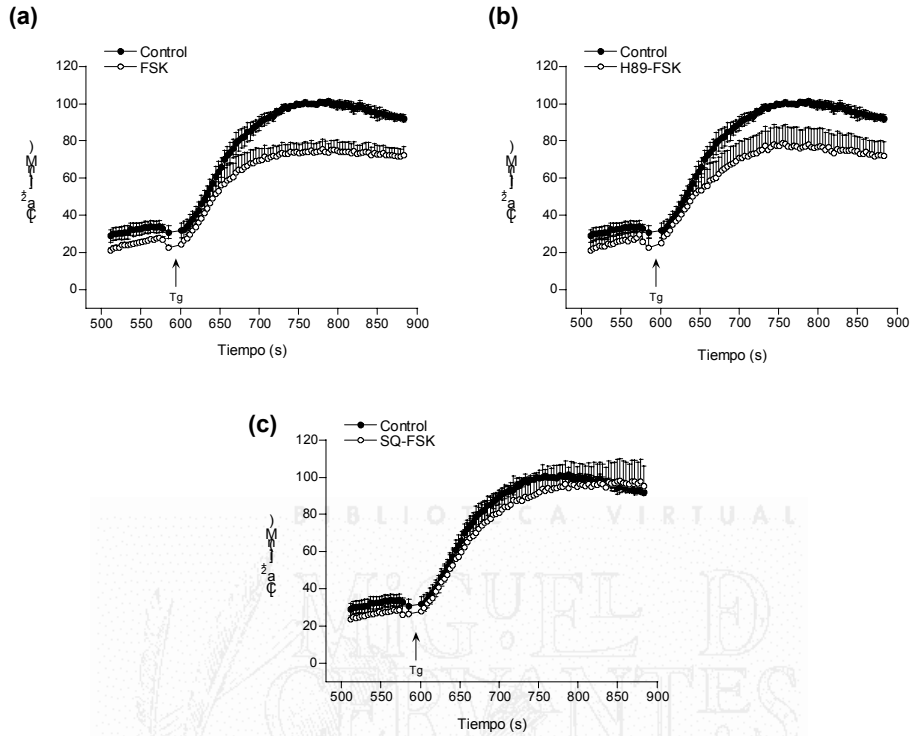


Figura 4.60. Efecto de la preincubación con H-89 o SQ22,536 (10 μM) sobre la inhibición por forskolina, del vaciamiento de reservorios inducido por Tg en un medio sin Ca^{2+}. **a)** Células preincubadas con forskolina 30 30 μM **b)** Células preincubadas con H-89 y forskolina. **c)** Células preincubadas con SQ22,536 y forskolina. El control, en todos los casos, corresponde a la adición de Tg a células preincubadas en ausencia de otros fármacos. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

En esta figura se observa que la combinación SQ22,536-forskolina bloqueó el efecto de la forskolina sobre el vaciamiento de reservorios inducido por Tg (4.60c); por el contrario, la utilización de H-89 no inhibe el efecto de la forskolina (4.60b). Estos resultados son inesperados ya que sugieren que el efecto de la forskolina es dependiente de la activación de AC, y por lo tanto de una elevación de la [AMPc]i pero independiente de la activación de PKA.

Con el fin de confirmar la importancia del AMPc e independencia de la PKA en el efecto de la forskolina, se utilizó el dibutiril AMP cíclico (dbAMPc), un análogo del AMPc capaz de atravesar la membrana plasmática. En la figura 4.61, se puede observar, una vez más, que el aumento de los niveles de [AMPc]i reduce significativamente el vaciamiento de reservorios de Ca^{2+} producido por Tg; y que este efecto no es bloqueado por la inhibición

de la PKA con H-89. Este resultado confirma que el AMPc inhibe el vaciamiento de reservorios de Ca^{2+} dependientes de Tg, a través de un mecanismo independiente de la activación de la PKA.

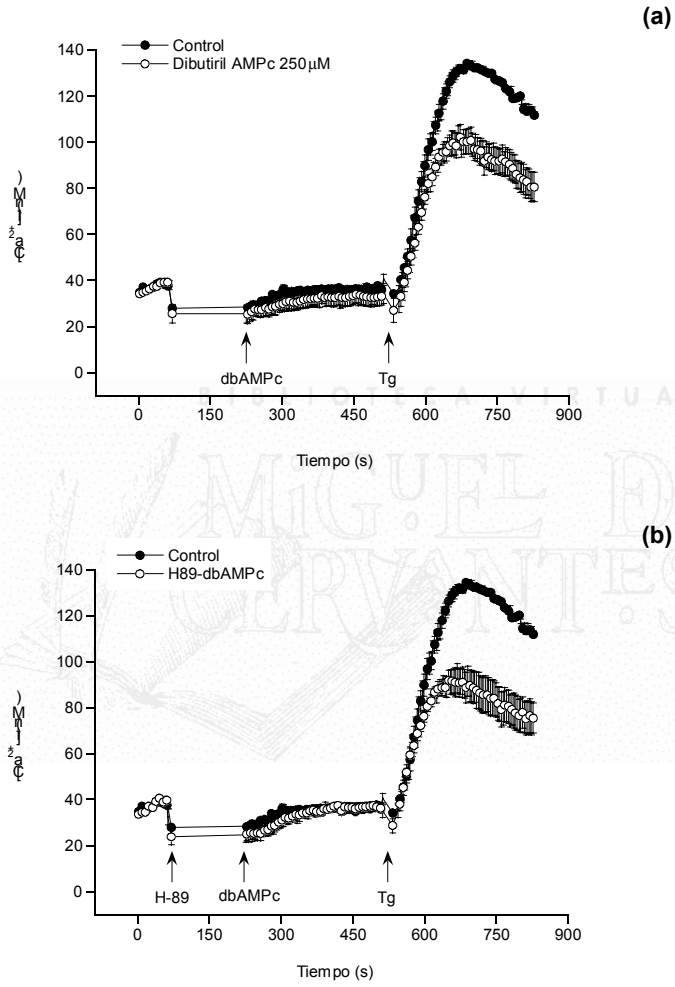


Figura 4.61. a) Efecto del dibutiril AMP cíclico sobre la elevación de $[Ca^{2+}]i$ inducida por Tg en linfocitos humanos bañados por un medio sin Ca^{2+}. **b)** Efecto de la preincubación con H-89 10 µM sobre la inhibición por dbAMPc, del vaciamiento de reservorios de Ca^{2+} inducido por Tg. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

Otros autores han encontrado efectos del AMPc, independientes de la activación de PKA sobre la entrada capacitativa de Ca^{2+} en células nerviosas (264) y sobre la respuesta celular a la oxitocina en células de músculo liso (4); sin embargo en ninguno de estos trabajos se ha podido describir el mecanismo de acción del AMPc. Como habíamos mencionado antes, es posible que la forskolina, mediante un incremento de la [AMPc]i,

movilice Ca^{2+} hacia reservorios insensibles a Tg, desde reservorios sensibles a la misma. También es posible que el AMPc inhiba el mecanismo o canal de salida de Ca^{2+} de los reservorios sensibles a Tg; este es un efecto que ha sido descrito en numerosos modelos celulares, sin embargo, la inhibición por AMPc del vaciamiento de reservorios de Ca^{2+} generalmente ocurre a través de la fosforilación del receptor de IP_3, por la PKA (104, 223, 266) por lo que este mecanismo no podría explicar los resultados aquí obtenidos. Por otra parte, existen canales iónicos directamente regulados por AMPc (62, 156).

Más recientemente, se ha descrito una familia de proteínas GEFs (de Guanine-nucleotide Exchange Factors, es decir proteínas que contribuyen al intercambio de nucleótidos de guanina, GTP-GDP, como la proteína Sos mencionada en la sección de Introducción). Estas GEFs se unen al AMPc, activándose con lo que, a su vez, se unen y activan proteínas GTPasas como la Ras (172) o Rap1 (56, 123). Esta ruta de transducción puede revestir una gran importancia, ya que la GTPasas son mecanismos claves de la regulación de los procesos de proliferación celular en muchos modelos celulares, incluyendo linfocitos B y T (82).

Por último, con respecto a la posible implicación de la ruta del AMPc en los efectos de la toxina YTX sobre la $[Ca^{2+}]i$, es muy probable que en un medio con Ca^{2+} la YTX inhiba la entrada capacitativa a través de una inhibición de la actividad basal de la PKA. Sin embargo en un medio sin Ca^{2+} la YTX no disminuye los niveles de [AMPc]i de manera significativa, por lo que es posible que exista un mecanismo adicional de inhibición de la entrada capacitativa de Ca^{2+} por YTX.

4.3 Estudio de los mecanismos de acción de la maitotoxina

La maitotoxina (MTX) es una toxina relacionada con la ciguatera que, sin embargo, no se considera directamente implicada en la generación de los síntomas propios de esta enfermedad (67). No se conoce el sitio específico de acción de esta toxina, sin embargo se sabe que produce entrada de Ca^{2+} en muy diversos modelos celulares, y que puede activar canales de Ca^{2+} dependientes e independientes de voltaje (254, 265). Dadas estas características se decidió realizar una serie de estudios sobre el efecto de la MTX en la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos humanos, ya que, además no se tiene conocimiento de que existan estudios llevados a cabo en este modelo celular. Asimismo se decidió comparar el efecto de la MTX, una conocida activadora de canales de Ca^{2+}, con el de la YTX, puesto que en esta tesis proponemos que podría tener un mecanismo de acción similar. La MTX fue proporcionada por el Dr. T. Yasumoto, de Japan Food Research Laboratories. Se disolvió en agua destilada a una concentración 10 μM y se mantuvo a –80ºC hasta su uso, momento en el cual se diluyó en agua destilada hasta 1 μM.

En la figura 4.62 se observa que la adición de MTX a linfocitos bañados por un medio con Ca^{2+} produjo un aumento de $[Ca^{2+}]i$ cuya magnitud depende de la dosis de MTX utilizada. A partir de estos datos, se decidió utilizar una dosis de 5 nM MTX para continuar con los estudios. De acuerdo con esta figura, la concentración de MTX necesaria para

producir un aumento significativo de $[Ca^{2+}]i$ en linfocitos es considerablemente mayor que las concentraciones utilizadas en otros modelos celulares (40, 200, 256).

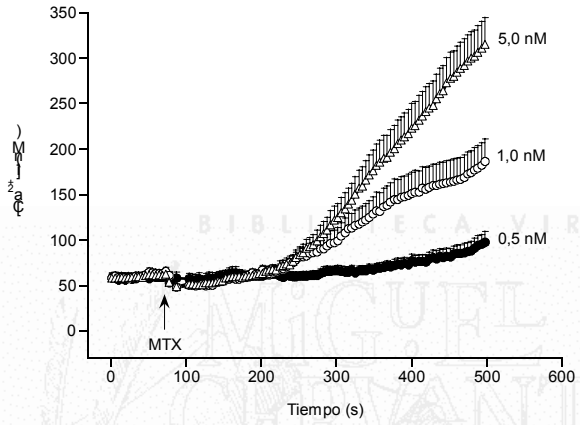


Figura 4.62. Efecto de la MTX sobre la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos humanos bañados por un medio con Ca^{2+}. Donde indica la flecha, se añadió la toxina a las concentraciones especificadas. Promedio ± SEM de todas las células analizadas en 2 experimentos, por duplicado (como mínimo 50 células).

En uno de estos trabajos (40), se ha sugerido que, concentraciones bajas de MTX activan preferentemente canales dependientes de voltaje, mientras que concentraciones más elevadas pueden ser requeridas para activar otro tipo de canales de Ca^{2+}. Por lo tanto es probable que, en linfocitos humanos, la MTX active canales permeables al Ca^{2+} independientes de voltaje. Otra característica del aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por MTX es que no es inmediato, por el contrario, presenta un periodo de latencia de más de 3 minutos, lo que podría sugerir la existencia de señales de transducción que acoplen la unión de la MTX a su receptor celular con la entrada de Ca^{2+} observada.

Estos resultados no sugieren, en principio, una gran similitud entre los mecanismos de acción de la MTX y la YTX, por lo que decidimos comparar su efecto. En la figura 4.63 se muestra el efecto de la adición de YTX 1 μM seguida de MTX 5 nM, en comparación con el efecto de la adición de MTX sola (control). Se observa, en primer lugar, que el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por MTX es mucho mayor que el inducido por YTX; además la combinación de ambas toxinas estimula la entrada de Ca^{2+} producida por MTX, al aumentar su velocidad y disminuir ligeramente el periodo de latencia (círculos blancos). Esta observación es un tanto inesperada ya que, como habíamos mencionado antes, las brevetoxinas bloquean el efecto de la MTX en células nerviosas (126) por lo que, debido a su gran semejanza estructural, se podría esperar un efecto similar de la YTX.

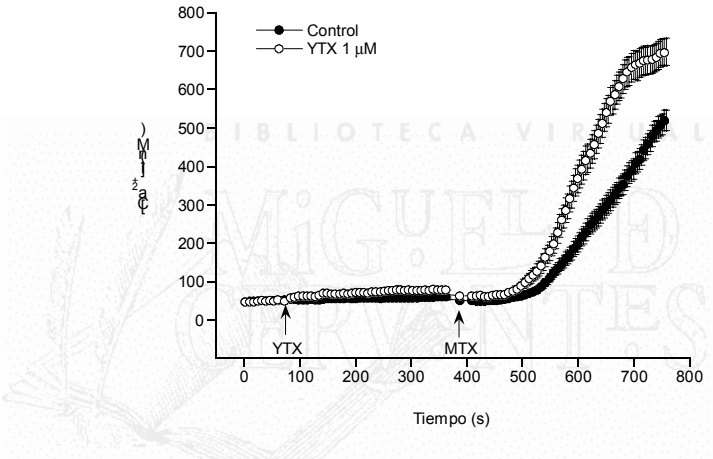


Figura 4.63. Efecto de la YTX sobre la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos humanos y sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por MTX 5 nM. Las toxinas se añadieron según indican las flechas. Promedio ± SEM de todas las células analizadas en 3 experimentos, por duplicado (como mínimo 75 células).

Por otro lado estos resultados tampoco sugieren que YTX y MTX compartan exactamente el mismo sitio o mecanismo de acción; sin embargo, esta claro que la YTX puede interaccionar de algún modo con la ruta de entrada de Ca^{2+} activada por MTX y esta interacción no es la misma que con la entrada capacitativa de Ca^{2+} inducida por Tg (figura 4.51).

En la figura 4.64 se compara nuevamente el efecto de MTX y YTX sobre la $[Ca^{2+}]i$; en ella se ilustran los trazos individuales de todas las células analizadas en la figura 4.63, además de los trazos individuales de células tratadas con DMSO y YTX. Una vez más se observa claras diferencias entre las acciones de ambas toxinas, ya que mientras que la YTX, sola o añadida después del DMSO, produce oscilaciones de $[Ca^{2+}]i$ en algunas células, la MTX produce un aumento continuo de $[Ca^{2+}]i$ en casi todas las células analizadas; además el retraso entre la adición de la MTX y el inicio del aumento de $[Ca^{2+}]i$ se ve claramente reducido en células tratadas con YTX.

Por tanto, aunque el mecanismo mediante el cual ambas toxinas ejercen su acción sobre la $[Ca^{2+}]i$ parece ser diferente, no se puede descartar la posible coincidencia de receptor o sitio de unión. En este contexto parece importante mencionar que YTX y MTX comparten la característica de poseer dos grupos sulfato en su estructura. No se conoce la importancia de estos grupos sobre el efecto de la MTX, sin embargo en el caso de la YTX, un derivado desulfatado de la misma tiene un efecto patológico completamente distinto al de la YTX sulfatada, ambas inyectadas a ratones por vía intraperitoneal (227).

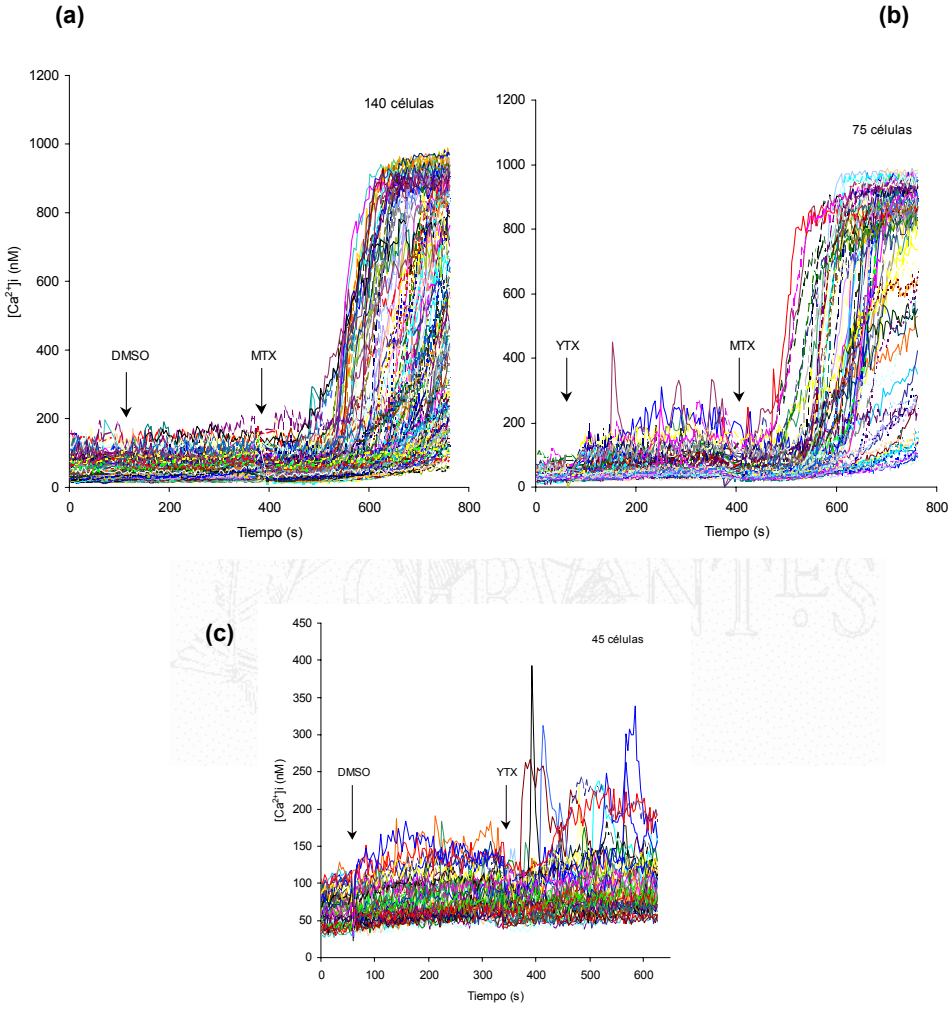


Figura 4.64. Efecto de YTX y MTX sobre la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos humanos bañados por un medio con Ca^{2+}. **a)** y **b)** Se presentan los trazos individuales de todas las células representadas como promedio en la figura anterior. **c)** Trazos individuales de células tratadas con DMSO y YTX.

Como siguiente paso para la caracterización del mecanismo de entrada de Ca^{2+} inducida por MTX se estudió el efecto de los antagonistas de canales de Ca^{2+} utilizados antes para caracterizar el efecto de la YTX. En primer lugar, en la figura 4.65 se observa que el inhibidor de canales dependientes de reservorios, SKF96365 bloquea casi totalmente el efecto de la MTX, lo que concuerda con lo observado por otros autores (53, 214). También se observa claramente que este fármaco aumenta por si mismo la $[Ca^{2+}]i$. Esta acción se debe probablemente a la inhibición de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplasmático (225).

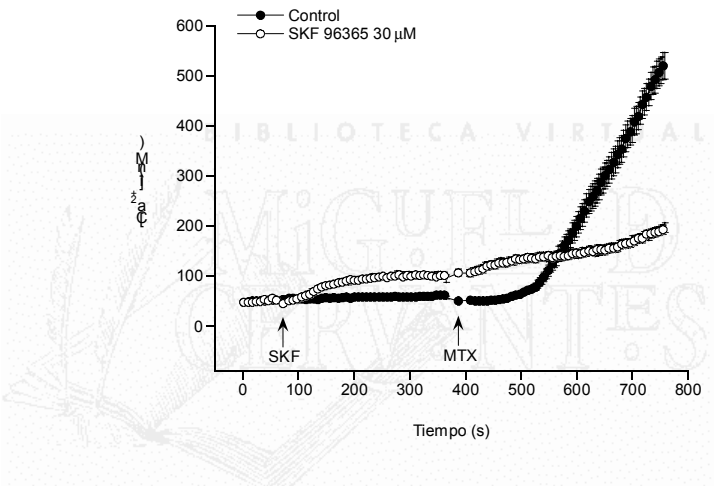


Figura 4.65. Efecto del SKF 96365 sobre la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos humanos y sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por MTX 5 nM. Los fármacos se añadieron según indican las flechas. Promedio ± SEM de todas las células analizadas en 3 experimentos, por duplicado (62 células con SKF, 140células control).

Por el contrario, en la figura 4.66 se observa que las dihidropiridinas nifedipina (4.66a) y nitrendipina (4.66b), ambos inhibidores de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (225) no tuvieron ningún efecto sobre la entrada de Ca^{2+} inducida por MTX. Lo que confirma, tanto que esta toxina activa canales independientes de voltaje, como que la ruta de entrada de Ca^{2+} activada por YTX y MTX es diferente. En consecuencia, es probable que la MTX sea un agonista de canales de Ca^{2+} operados por reservorios, como ha sido propuesto por algunos autores (214, 262), aunque podría no ser ésta su diana celular.

El SKF 96365 también puede inhibir los canales de Ca^{2+} activados por receptor e independientes del estado de los reservorios intracelulares (49), que han sido descritos en linfocitos T por varios autores (48, 61). Otros autores, por su parte, han observado que este tipo de canales son sensibles a nitrendipina (98, 181), lo que sugiere que no sean éstos los canales diana de la MTX, aunque podrían serlo de la YTX.

Existen muchas contradicciones con respecto a la identidad e importancia de los canales permeables al Ca^{2+} de células no excitables, y no se conocen fármacos verdaderamente específicos contra los diversos tipos de canal de Ca^{2+} que estas células puedan poseer, lo que complica enormemente la interpretación de cualquier resultado.

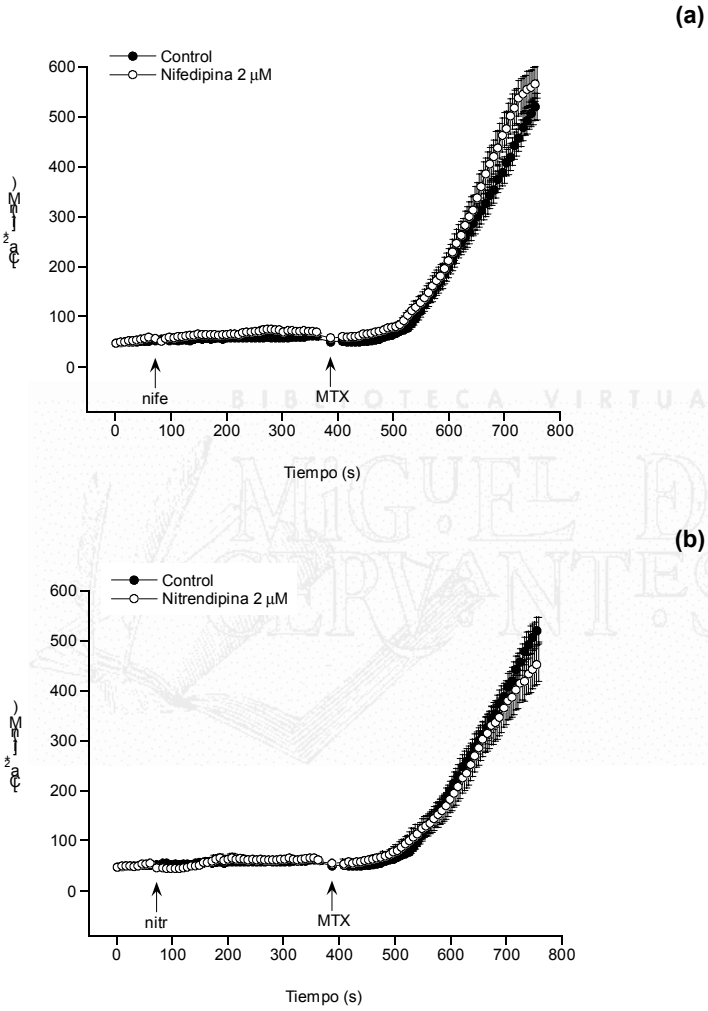


Figura 4.66. Efecto de **a)** nifedipina y **b)** nitrendipina, sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por MTX 5 nM en un medio con Ca^{2+}. Promedio ± SEM de todas las células analizadas en 3 experimentos, por duplicado (mínimo 64 células).

A continuación se estudió el efecto del Ni^{2+} sobre la entrada de Ca^{2+} activada por MTX. A concentraciones elevadas (< 1 mM), este catión divalente bloquea diversos canales de Ca^{2+} de linfocitos y otras células no excitables (21, 61, 225). En este trabajo se utilizó una concentración mucho más baja (15 μM), la cual tiene un efecto estimulante sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por MTX, como se puede apreciar en la figura 4.67. En ella se observa que la adición de $NiCl_2$ no tiene ningún efecto sobre la $[Ca^{2+}]i$ basal sin embargo acelera notablemente la fase inicial de la respuesta a la MTX.

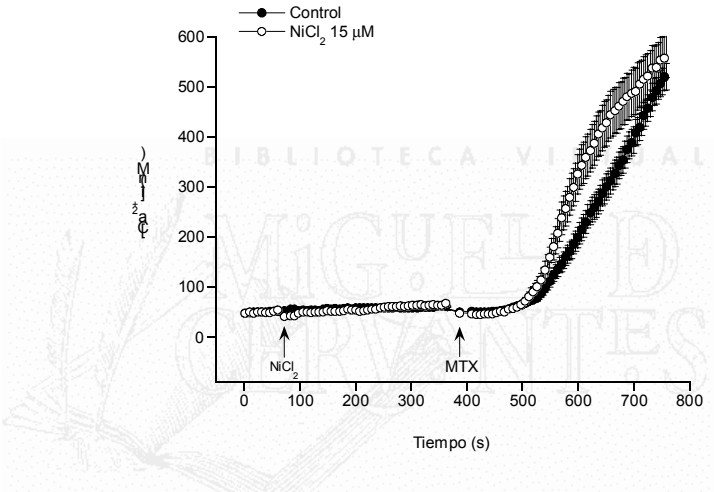


Figura 4.67. Efecto del Ni^{2+} sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por MTX 5 nM en un medio con Ca^{2+}. Promedio ± SEM de todas las células analizadas en 3 experimentos, por duplicado (64 células con $NiCl_2$, 140células control).

Este efecto sugiere que los cationes divalentes juegan un papel importante en la modulación del canal de entrada de Ca^{2+} o el sitio de unión de la MTX, lo que se corresponde a su vez con la dependencia casi absoluta de los diversos efectos de esta toxina a la presencia de Ca^{2+} extracelular (155, 256, 265). En este contexto, se ha descrito que el Ni^{2+} puede estimular una corriente dependiente de Ca^{2+}, a través de canales CRAC (dependientes de reservorios) en células Jurkat (272); asimismo este catión puede estimular el receptor de Ca^{2+} en una línea de células óseas, que a su vez activa una entrada de Ca^{2+} (19). Este receptor se expresa en la membrana de linfocitos B, aunque su importancia fisiológica es desconocida (43).

Por último, se estudió la importancia de los procesos de fosforilación-desfosforilación en la acción de la MTX. Para ello se preincubaron las células durante 10 minutos en presencia o ausencia de los siguientes inhibidores de cinasas o fosfatasas: AO, inhibidor de PP2A y PP1; GF 109203X, inhibidor de PKC; H-89, inhibidor de PKA; genisteína, inhibidor de PTKs y wortmanina, inhibidor de PI 3-cinasa. A continuación se agregó MTX 5 nM, siempre en un medio con Ca^{2+}.

En la figura 4.68 se observa que la preincubación con AO no ejerció ningún efecto sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por MTX. Este resultado concuerda con la ausencia de efecto del AO sobre la entrada de Ca^{2+} inducida por YTX, e indica una vez más que las rutas de entrada de Ca^{2+} en linfocitos humanos son poco sensibles a la actividad de las fosfatasas de proteína PP1 y 2A.

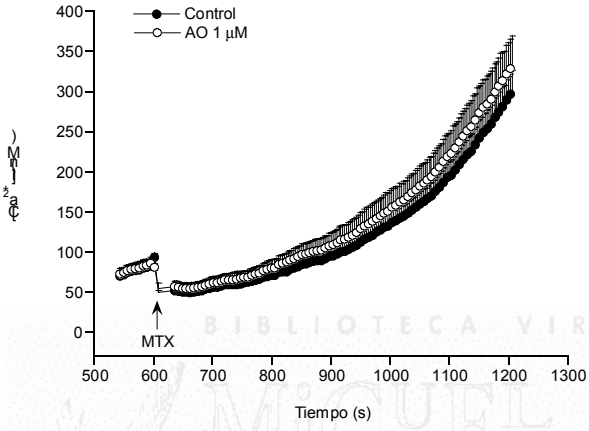


Figura 4.68. Efecto de la preincubación con AO sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por MTX 5 nM en un medio con Ca^{2+}. Promedio ± SEM de todas las células analizadas en 3 experimentos, por duplicado (como mínimo 81 células).

Los efectos de la inhibición de cinasas de serina/treonina se ilustran en la figura 4.69. En ella se observa que la inhibición de la PKC (4.69a) tuvo el efecto más marcado sobre la entrada de Ca^{2+} producida por MTX, reduciendo el período de latencia entre la adición de toxina y el inicio de la elevación de $[Ca^{2+}]i$. Por otro lado la inhibición de PKA (4.69b) retrasa muy ligeramente la elevación de $[Ca^{2+}]i$, sin embargo este efecto llega a ser significativo. Estos resultados indican que la entrada de Ca^{2+} inducida por MTX no es dependiente de la activación de PKC y PKA. Por el contrario, la PKC ejerce un efecto negativo sobre la entrada de Ca^{2+} dependiente de MTX, de manera análoga al efecto que ejerce sobre la entrada capacitativa o dependiente del TCR, en linfocitos humanos normales y linfocitos Jurkat, respectivamente (160, 204). Este resultado apoya nuevamente la hipótesis de que la MTX puede activar canales de Ca^{2+} dependientes de reservorios. La activación de PKC inhibe la entrada de Ca^{2+} también en otros modelos celulares (216, 249); asimismo, en el presente trabajo hemos observado que esta cinasa inhibe la ruta de entrada de Ca^{2+} activada por YTX (figura 4.42).

El hecho de que la inhibición de PKA no tenga prácticamente ningún efecto sobre la entrada de Ca^{2+} inducida por MTX es también interesante. Habíamos mencionado que la YTX estimula la entrada de Ca^{2+} inducida por MTX y también reduce los niveles de [AMPc]i (lo que a su vez podría dar lugar a una inhibición de la actividad basal de la PKA); considerando lo observado en la figura 4.69b, es poco probable que el primer efecto sea dependiente del segundo, al contrario de lo que ocurría en el caso de la inhibición de la entrada capacitativa inducida por Tg, la cual es inhibida tanto por YTX como por inhibición de la PKA. Por otro lado este resultado no necesariamente contradice la posible implicación de canales dependientes de reservorios en la entrada de Ca^{2+} generada por MTX, ya que el

mecanismo de activación de dichos canales por MTX y por Tg puede ser totalmente distinto, siendo el mecanismo de la entrada capacitativa mucho más sensible a la PKA que el mecanismo de la entrada inducida por MTX (sin importar que, en ambos casos, la entrada ocurra a través de los mismos canales).

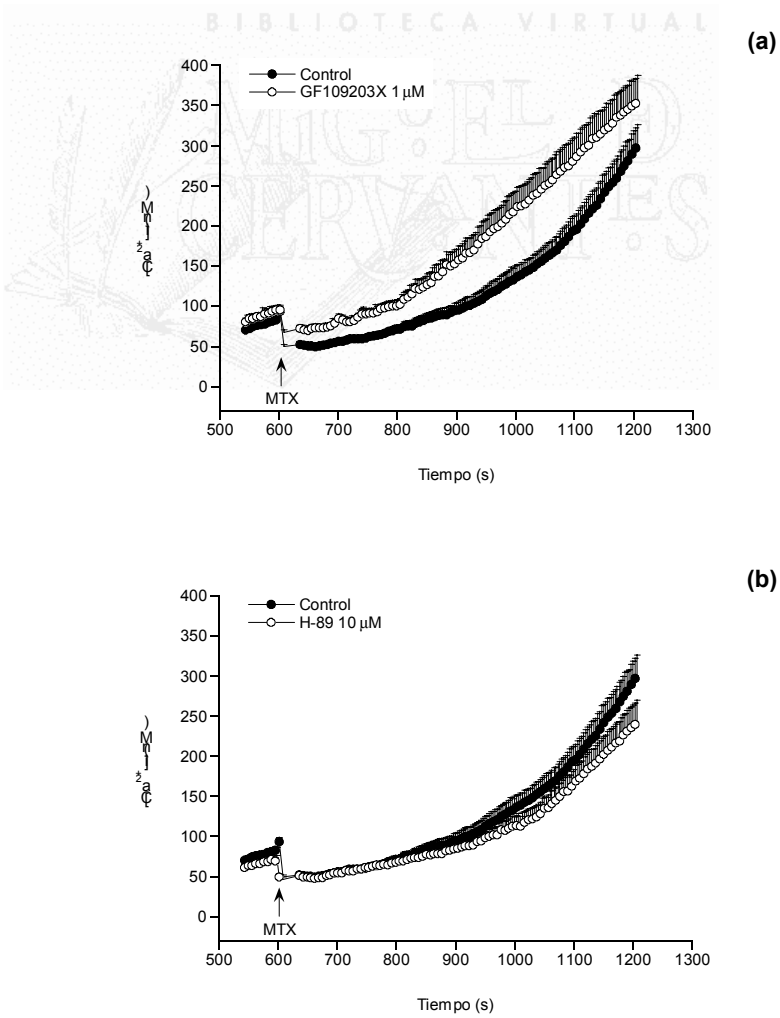


Figura 4.69. Efecto de la inhibición de **a)** PKC y **b)** PKA sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por MTX 5 nM en un medio con Ca^{2+}. Promedio ± SEM de todas las células analizadas en 3 experimentos, por duplicado (como mínimo 81 células).

En este punto también debemos considerar la probable implicación de más de una ruta de entrada de Ca^{2+}, en la elevación de $[Ca^{2+}]i$ inducida por MTX, como ha sido descrito por diversos autores (40, 200), pudiendo ser una de ellas un canal catiónico no selectivo (27, 200) y otra, canales dependientes de reservorios.

Por último, en la figura 4.70 se muestra el efecto de la inhibición de PTKs y PI 3-cinasa sobre la entrada de Ca^{2+} producida por MTX. La inhibición de PTKs (4.70a) tuvo un efecto similar al de la inhibición de PKA, es decir un ligero retraso del aumento de $[Ca^{2+}]i$, por su parte (4.70b), la inhibición de PI 3-cinasa provocó una inhibición marcada de la acción de la MTX.

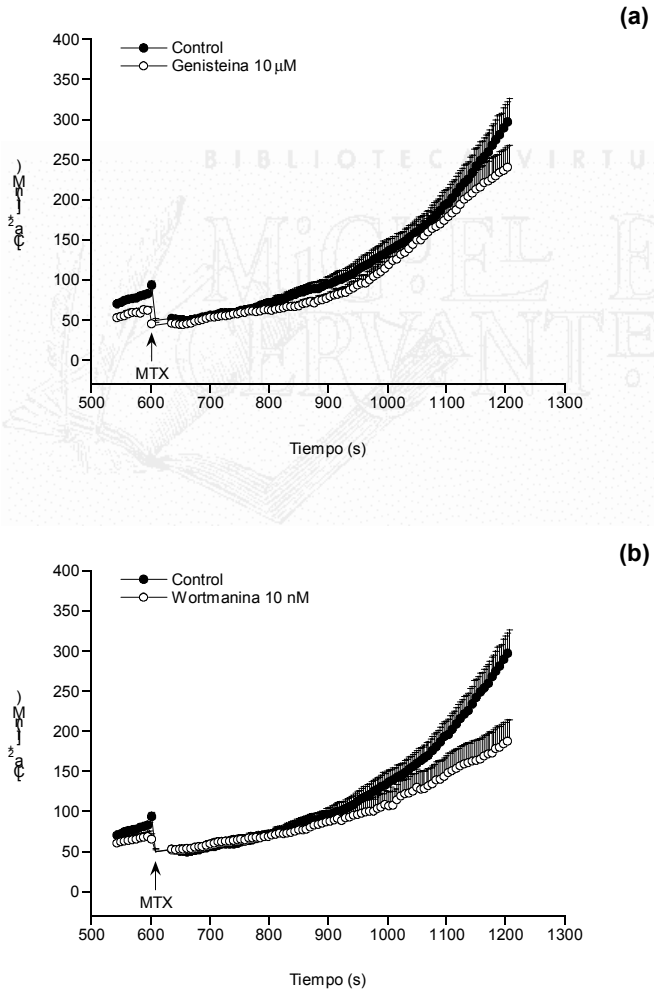


Figura 4.70. Efecto de la inhibición de **a)** PTKs y **b)** PI 3-cinasa sobre el aumento de $[Ca^{2+}]i$ inducido por MTX 5 nM en un medio con Ca^{2+}. Promedio ± SEM de todas las células analizadas en 3 experimentos, por duplicado (como mínimo 81 células).

Esto resulta muy interesante ya que sugiere que al menos parte del efecto de la MTX sobre la $[Ca^{2+}]i$ es dependiente de la activación de la PI 3-cinasa, es decir que la MTX puede producir entrada de Ca^{2+} a través de una cascada de eventos intracelulares y no sólo

a través de la interacción directa con el canal de entrada de Ca^{2+}. De hecho, se sabe que la MTX puede estimular a la PLC y por tanto la síntesis de IP_3 (102, 155), con la consiguiente generación de entrada capacitativa de Ca^{2+}, por lo que esta ruta bien podría ser la responsable de la supuesta activación de canales dependientes de reservorios que proponemos en el presente trabajo. De cualquier forma podría ser también interesante estudiar el efecto de la MTX sobre la generación de IP_3 en linfocitos humanos.

La ruta de las PTKs también ha sido involucrada en las acciones de la MTX (159), específicamente sobre la estimulación de la síntesis de IP_3. Sin embargo, nuestros resultados ponen de manifiesto por primera vez la implicación de la ruta de la PI 3-cinasa. Recientemente se ha encontrado que esta cinasa, a través de la síntesis de $PI(3,4,5)P_3$, produce entrada de Ca^{2+} en células Jurkat, por canales independientes de reservorios (155). En otros modelos celulares, como mastocitos, la activación de la PI 3-cinasa a través de estímulos extracelulares también produce entrada de Ca^{2+}, independientemente del vaciamiento de reservorios intracelulares (17).

En conclusión, nuestros resultados demuestran que la MTX produce entrada de Ca^{2+} en linfocitos humanos, a través de una ruta sensible a SKF 96365 e insensible a dihidropiridinas. Esta ruta no es la misma que la activada por YTX sin embargo ambas convergen ya que la combinación de YTX y MTX acelera el aumento de $[Ca^{2+}]i$. La entrada de Ca^{2+} inducida por MTX es estimulada por una baja concentración de Ni^{2+} y por la inhibición de PKC y es parcialmente dependiente de la activación de PI 3-cinasa.

4.4 Estudio de los mecanismos de acción del azaspirácido

La última ficotoxina estudiada en esta tesis fue el azaspirácido (AZ). Se sabe muy poco sobre este producto, ya que se desconoce su origen y su estructura química fue determinada muy recientemente (198). Sin embargo se ha visto involucrado en casos de intoxicación humana ocurridos en Holanda e Irlanda en 1995 y 1997, respectivamente.

A partir de los mejillones que originaron este último episodio de toxicidad, se aislaron y caracterizaron otros dos nuevos derivados del AZ: AZ-2 y AZ-3; que corresponden a los derivados 8-metilazaspirácido y 22-desmetilazaspirácido, respectivamente (164). La dosis letal en ratones, por vía intraperitoneal fue (en mg/kg): AZ-1, 0,20; AZ-2, 0,11; AZ-3, 0,14 (164).

La intoxicación producida por AZ (AZP de Azaspiracid Poisoning), es similar al síndrome DSP, producido por al AO y derivados; sin embargo, administrado oralmente a ratones, el AZ produjo lesiones muy diferentes de las originadas por AO. Los principales tejidos afectados por AZ fueron el intestino delgado, tejido linfoide (timo, bazo, placas de Peyer) e hígado (113).

En este trabajo, hemos utilizado muestras de AZ, proporcionadas por el Dr. Kevin James del Cork Institute of Technology, Irlanda. La primera (AZs) corresponde a un extracto de moluscos contaminados en el área de Donegal, Irlanda y contiene una mezcla de AZ-1, 2 y 3. La segunda (AZ1) contiene únicamente AZ-1 (estándar RMN). Ambos extractos se

disolvieron en DMSO a una concentración de 114 μM AZs (calculada a partir de la suma del peso total de AZ-1 2 y 3, como AZ-1) y 40 μM AZ1. En la tabla 4.4 se recogen los datos de las muestras de AZ utilizadas. Todos los experimentos con esta toxina se llevaron a cabo en el microscopio digitalizado de fluorescencia.

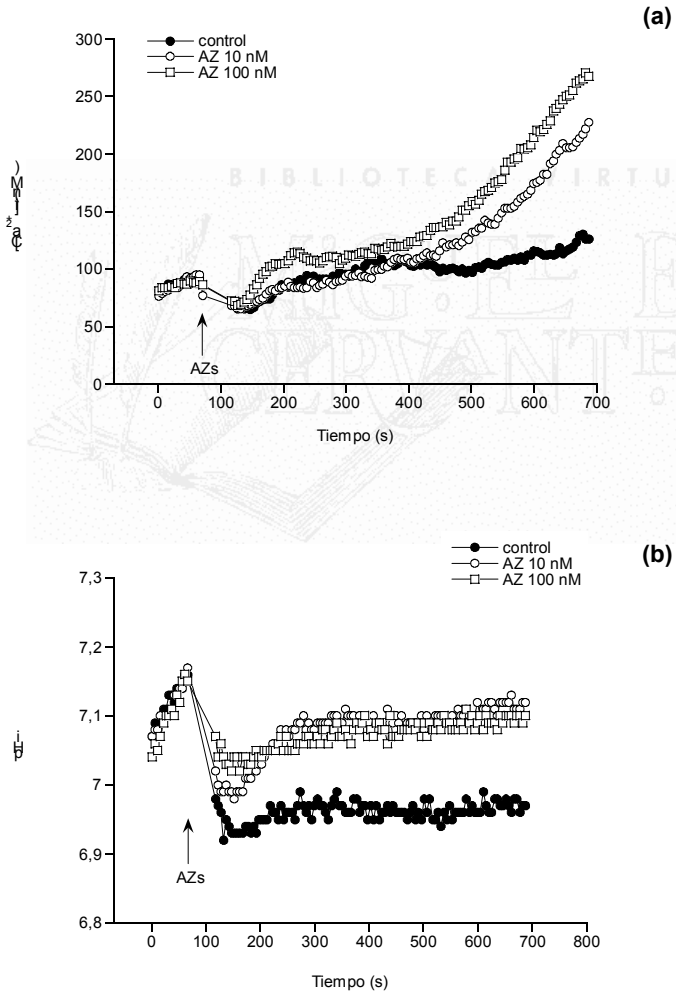


Figura 4.71. Efecto de la adición del extracto AZs (10 y 100 nM), con una mezcla de AZ-1, 2 y 3, sobre **a)** $[Ca^{2+}]i$ y **b)** pHi de linfocitos humanos bañados por un medio con Ca^{2+} y HCO_3^-. Donde indica la flecha, se agregó la concentración especificada de extracto disuelto en DMSO, o bien DMSO al 0,1 % como control. Promedio de 2 experimentos.

TABLA 4.4. Muestras de AZ analizadas en este trabajo.

Nombre de la muestra	Peso AZ	Concentración de la solución patrón	Nombre utilizado
Standard 1 AZ-1 NMR standard	AZ-1* 1,70 μg	40 μM	AZ1
Standard 3 Donegal A Crude Shellfish 8 g Diol SPE clean-up	AZ-1 0,41 μg/g AZ-2 0,12 μg/g AZ-3 0,07 μg/g Total: 4,8 μg AZs	114 μM	AZs

*Peso molecular de los derivados AZ: **AZ-1**=841,5; **AZ-2**=855,5; **AZ-3**= 827,5

En la figura 4.71 se ilustra el efecto de la adición de dos concentraciones del extracto AZs (10 y 100 nM) sobre los niveles basales de $[Ca^{2+}]i$ y pHi de linfocitos humanos bañados por un medio con Ca^{2+} y HCO_3^-. En ella se observa que estas toxinas produjeron un importante aumento de $[Ca^{2+}]i$, cuya magnitud depende de la dosis de AZs utilizada (4.71a). En el pHi, la adición del AZs, mediante cambio del medio extracelular, produjo una ligera acidificación debida a la utilización de medio fresco; en las células tratadas con AZs la acidificación fue menor y el pHi se recuperó mucho más rápidamente, con respecto a las células control. Este efecto fue el mismo para ambas concentraciones de AZs (4.71b).

En la figura 4.72 se presenta el efecto de la adición de AZs 10 y 100 nM a linfocitos bañados por un medio sin Ca^{2+}, sustituido a continuación por un medio con este ion. El AZs produjo aumento de $[Ca^{2+}]i$, dependiente de la dosis, en un medio sin Ca^{2+} (4.72a) lo cual indica que esta toxina libera Ca^{2+} de reservorios intracelulares. Sin embargo, este efecto es relativamente lento. La adición de Ca^{2+} al medio extracelular (por cambio de medio) genera una importante entrada de Ca^{2+} también dependiente de la dosis de AZs.

Por otro lado, el extracto AZs tiene sobre el pHi un efecto opuesto al observado en un medio con Ca^{2+} (4.72b). En esta figura se observa que el pHi se incrementa en las células control, debido seguramente a la alcalinización del medio por pérdida de CO_2 y a la correspondiente pérdida de CO_2 intracelular. En células tratadas con AZs la alcalinización citosólica se reduce, además este efecto es dependiente de la concentración de AZs.

Este resultado sugiere que el AZ modula la actividad de un transportador iónico involucrado en la regulación del pHi y aparentemente dependiente de Ca^{2+} extracelular. En este trabajo habíamos descrito la existencia de un intercambiador Na^+/H^+ y un transportador de HCO_3^- involucrados en la alcalinización intracelular, así como de un intercambiador Cl^-/HCO_3^- involucrado en la acidificación citosólica (ver sección 4.1.1). Sin embargo, no comprobamos la importancia que el Ca^{2+} extra o intracelular pudiera tener sobre la actividad de estos transportadores. La figura 4.72b sugiere que en un medio sin Ca^{2+} el AZ podría inhibir la actividad de cualquiera de los intercambiadores alcalinizadores o bien, estimular la actividad del intercambiador aniónico acidificador. Sin embargo es posible que la modificación de otros transportadores iónicos como podrían ser canales permeables al HCO_3^- fuese responsable del efecto del AZ sobre el pHi. Otra posibilidad es la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática que extrae Ca^{2+} del citosol e introduce H^+ (271); así, el

Ca^{2+} liberado de reservorios podría activar esta enzima, que a su vez produciría una ligera acidificación celular; sin embargo, desconocemos el motivo por el cual este efecto solo sería aparente en un medio sin Ca^{2+} extracelular.

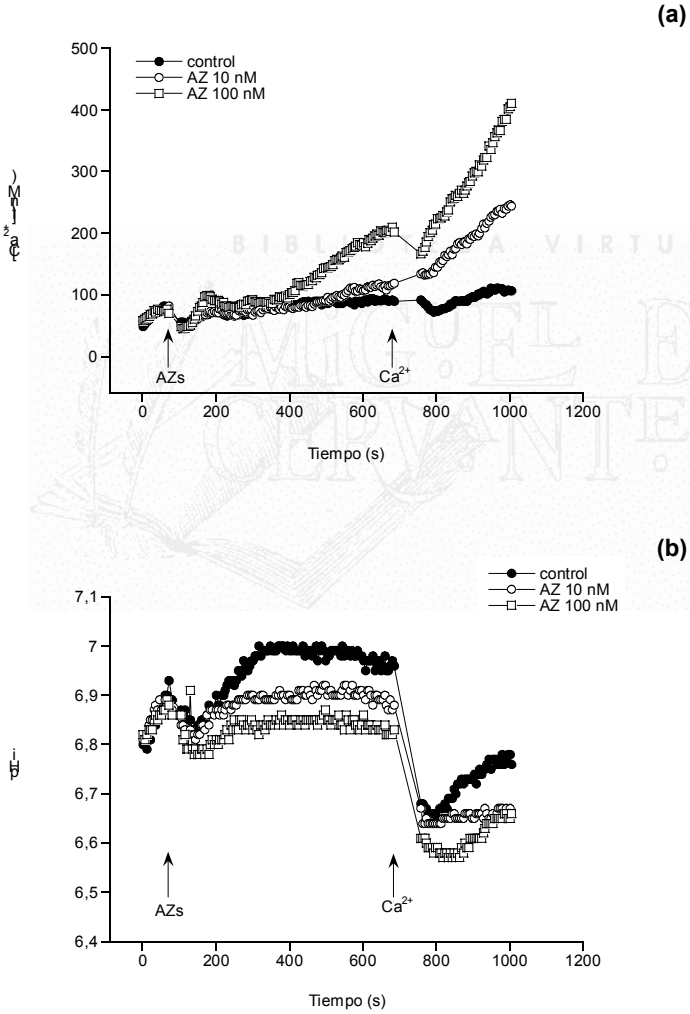


Figura 4.72. Efecto de la adición del extracto AZs (10 y 100 nM), con una mezcla de AZ-1, 2 y 3, sobre **a)** $[Ca^{2+}]i$ y **b)** pHi de linfocitos humanos bañados por un medio sin Ca^{2+} y con HCO_3^-. Donde indica la flecha, se agregó la concentración especificada de extracto disuelto en DMSO, o bien DMSO al 0,1 % como control, a continuación se sustituyó el medio extracelular por uno que contenía Ca^{2+}. Promedio de 2 experimentos.

Una vez obtenidos estos resultados, decidimos comparar el efecto del extracto AZs con el extracto purificado de AZ1. Utilizamos una concentración de 100 nM para observar claramente tanto el vaciamiento de reservorios como la entrada de Ca^{2+}, así como el efecto sobre el pHi. En la figura 4.73 se comprueba una vez más que el extracto AZs (con AZ-1, 2

y 3) produce vaciamiento de reservorios, seguido de una importante entrada de Ca^{2+} (4.73a) también se comprueba que este extracto inhibe la alcalinización citosólica observada en células control (4.73b).

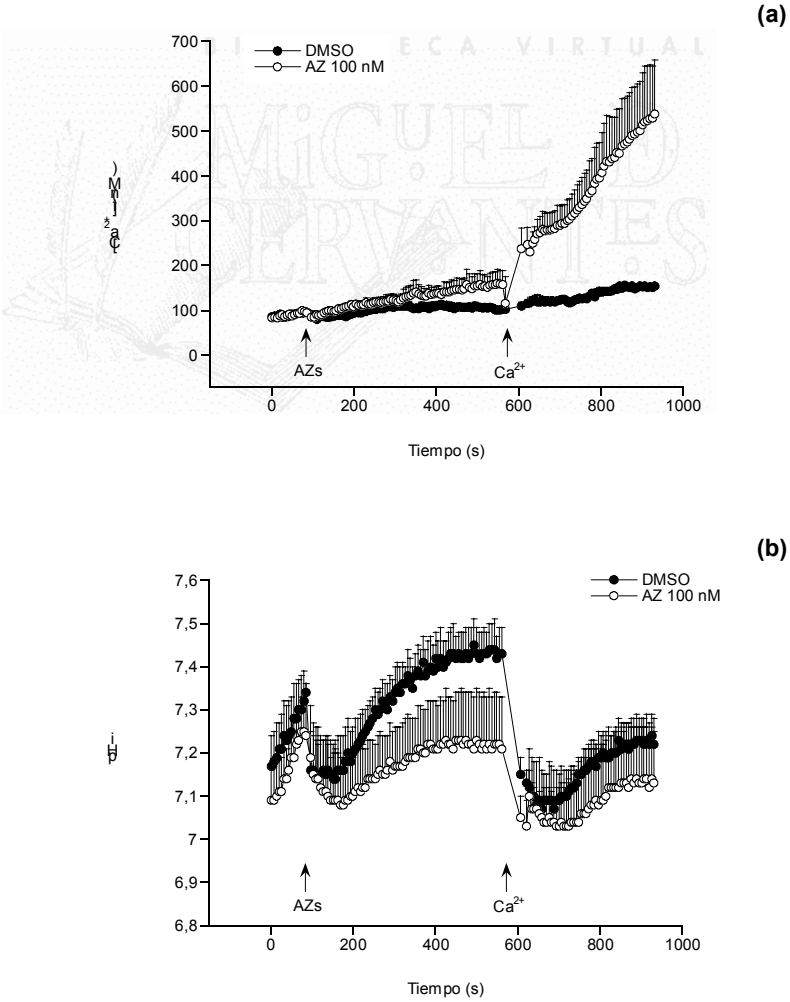


Figura 4.73. Efecto del extracto AZs 100 nM sobre **a)** $[Ca^{2+}]i$ y **b)** pHi de linfocitos humanos bañados por un medio sin Ca^{2+} que fue sustituido por uno que contenía este ion. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

Sorprendentemente, la figura 4.74 muestra que el extracto AZ1 no tiene ningún efecto sobre la $[Ca^{2+}]i$ de linfocitos bañados por un medio sin Ca^{2+}; sino que, por el contrario, inhibe ligeramente la entrada de Ca^{2+} producida por adición de Ca^{2+} extracelular (4.74a). Por otro lado, el efecto sobre el pHi tampoco resulta significativo (4.74b). Esta falta de efecto es difícil de explicar, a pesar de que, como habíamos mencionado antes, la toxicidad

del AZ-1 es ligeramente menor que la de sus derivados 2 y 3 (164); sin embargo, como se observa en la figura 4.72a, una concentración 10 nM (10 veces inferior) del extracto AZs ya es capaz de producir un cambio significativo de $[Ca^{2+}]i$ y pHi (hay que considerar que los cambios en el pHi son, en esta figura, poco significativos).

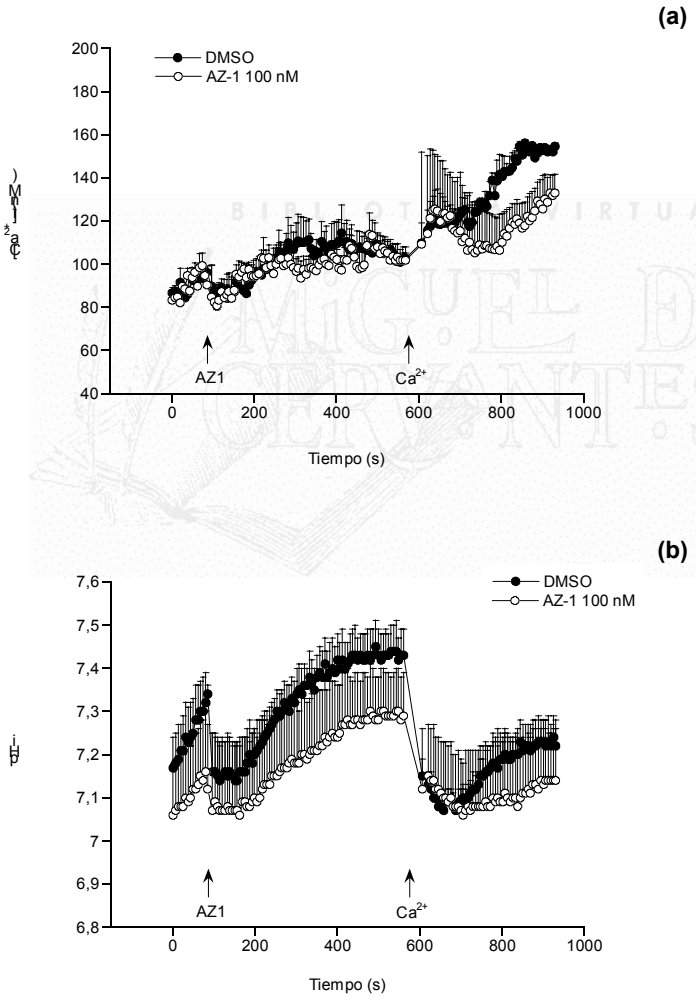


Figura 4.74. Efecto del extracto AZ1 100 nM sobre **a)** $[Ca^{2+}]i$ y **b)** pHi de linfocitos humanos bañados por un medio sin Ca^{2+} que fue sustituido por uno que contenía este ion. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

Además como se puede comprobar en la tabla 4.4 el extracto AZs (Standard 3) está compuesto mayoritariamente por AZ-1.Estos resultados indican por lo tanto que existe un gran sinergismo entre los tres derivados AZ, importante sobre todo en la capacidad de movilización de Ca^{2+} intra y extracelular.

Por último se estudió el efecto del AO sobre las modificaciones de $[Ca^{2+}]i$ y pHi inducidas por el extracto AZs con el propósito de comprobar se esta toxina también podría tener un efecto sinérgico sobre la acción del AZ.

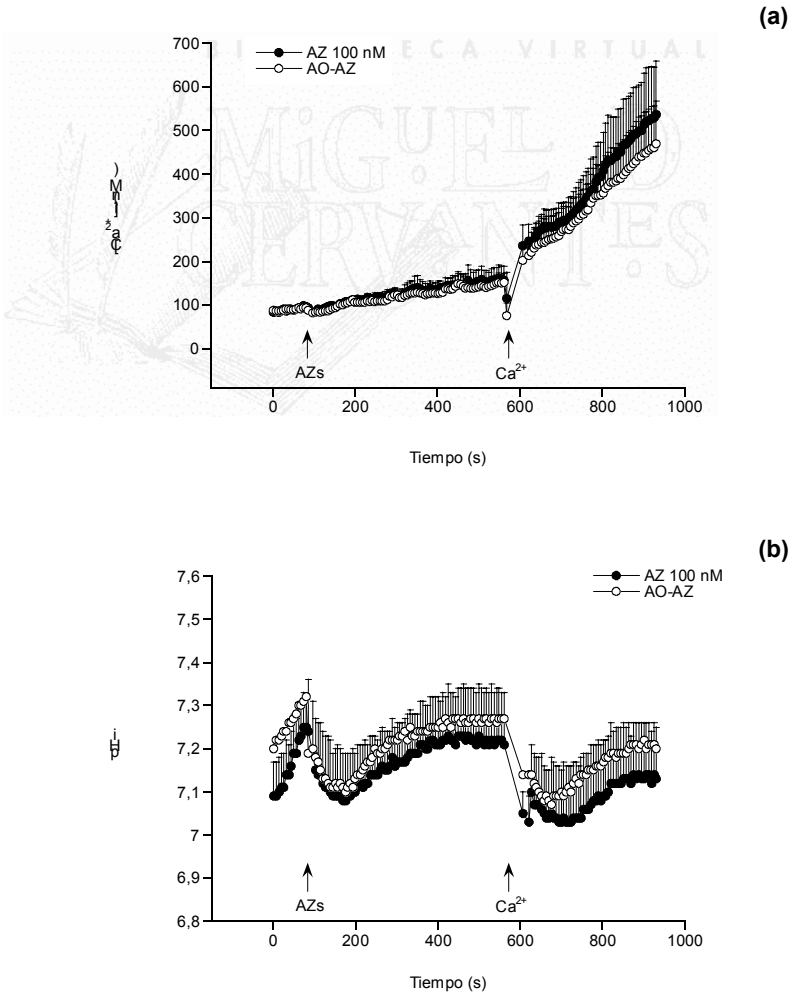


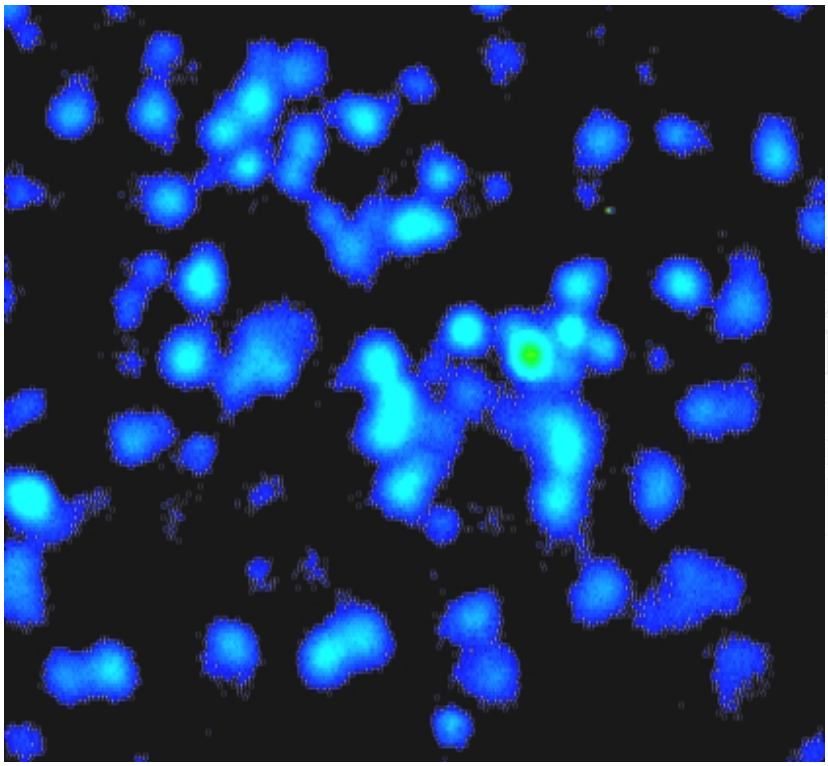
Figura 4.75. Efecto de 10 minutos de preincubación con AO sobre **a)** el incremento de $[Ca^{2+}]i$ y **b)** la inhibición de la alcalinización citosólica; inducidos por AZs en linfocitos humanos bañados por un medio sin Ca^{2+} que fue sustituido por uno que contenía este ion. La preincubación con AO se llevó a cabo en células cargadas con indicadores fluorescentes y adheridas al cubreobjetos, justo antes de comenzar la medición de fluorescencia. Promedio ± SEM de 3 experimentos.

En la figura 4.75 se observa que una preincubación de 10 minutos con AO no modificó de ninguna manera el efecto del AZs. Esto es muy importante ya que, como sucede con la YTX, AO y AZ se hayan asociadas en eventos de contaminación de alimentos. A pesar de

que el AO no modifica la acción del extracto con la mezcla AZ-1, 2 y 3; podría ser necesario estudiar el efecto de los AZs sobre la acción del AO. A este respecto, la modulación del pHi inducida por AZ, parece indicar que sería conveniente realizar un estudio más detallado acerca del efecto de esta toxina sobre la actividad individual de los distintos transportadores iónicos implicados en la regulación del pHi en linfocitos humanos. Es muy probable que la combinación AO-AZ tenga cierta importancia en la regulación de estos mecanismos.

En conclusión, estos son resultados preliminares sobre el modo de acción de una toxina muy importante para la salud pública. Nuestros datos indican que los derivados del azaspirácido poseen una importante capacidad de movilizar Ca^{2+} en linfocitos humanos; esta toxinas parecen actuar a través de un mecanismo de vaciamiento de reservorios acoplado a la entrada capacitativa, por lo que podrían estar implicados otros segundos mensajeros. Además, este efecto es dependiente de la mezcla de derivados AZ. Por otro lado los AZs también están implicados en la modulación de la actividad de algún mecanismo regulador del pHi; este efecto es dependiente del Ca^{2+} extracelular y podría ser importante también en el mecanismo de acción del AZ-1 que sin, embargo es en este caso también mucho menos potente solo que combinado con sus derivados.

Conclusiones



Linfocitos cargados con Fura2
λ_{exc} 340 nm; λ_{em} 520 nm
AZ con Calcio

1) Los linfocitos humanos poseen un intercambiador Na^+/H^+ y un transportador de HCO_3^- dependiente de Na^+, que alcalinizan, y un intercambiador Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+, que acidifica el citosol.

2) La activación de la PKA y la inhibición de la cinasas de tirosina y PI 3-cinasa inhiben el intercambiador Na^+/H^+ y el transportador de HCO_3^- dependiente de Na^+. La activación de la PKC estimula específicamente el intercambiador Na^+/H^+. La ruptura de la red de microtúbulos estimula la alcalinización citosólica dependiente de HCO_3^-.

3) El ácido ocadaico estimula la actividad de los intercambiadores Cl^-/HCO_3^- independiente de Na^+ y Na^+/H^+.

4) La yessotoxina produce entrada de Ca^{2+} no capacitativa, a través de una ruta sensible a SKF 96365 y nifedipina. La PKC y la toxina colérica inhiben este efecto.

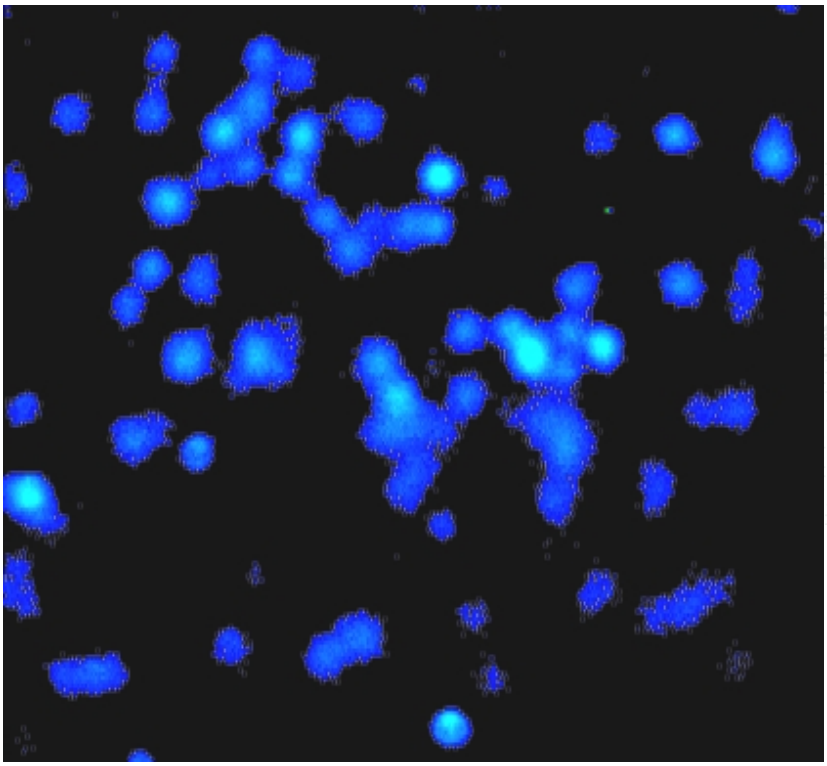
5) La maitotoxina es un potente activador de la entrada de Ca^{2+} por un mecanismo sensible a SKF 96365, insensible a dihidropiridinas, estimulado por una baja concentración de Ni^{2+} y por inhibición de PKC, y parcialmente dependiente de la activación de PI 3-cinasa.

6) La estimulación o la inhibición de la actividad basal de la PKA inhiben la entrada capacitativa de Ca^{2+}. El AMPc reduce la liberación de Ca^{2+} de reservorios sensibles a tapsigargina, a través de un mecanismo independiente de la activación de PKA.

7) La mezcla de azaspirácidos 1, 2 y 3, pero no el azaspirácido 1, produce vaciamiento de reservorios y entrada de Ca^{2+}. Los azaspirácidos alteran la homeostasis del pHi mediante un mecanismo dependiente del Ca^{2+} extracelular.

BIBLIOTECA VIRTUAL

Bibliografía



Linfocitos cargados con Fura2
λ_{exc} 380 nm; λ_{em} 520 nm
AZ con Calcio

1. Agnew, W. S. Voltage-regulated sodium channel molecules. *Annu Rev Physiol* 46: 517-30, 1984.

2. Akasaka, K., H. Ohrui, H. Meguro, y T. Yasumoto. Fluorimetric determination of diarrhetic shellfish toxins in scallops and mussels by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 729: 381-6, 1996.

3. Akha, A. A. S., N. J. Willmott, K. Brickley, A. C. Dolphin, A. Galione, y S. V. Hunt. Anti-Ig-induced calcium influx in rat B lymphocytes mediated by cGMP through a dihydropyridine-sensitive channel. *J Biol Chem* 271: 7297-300, 1996.

4. Alberi, S., J. J. Dreifuss, y M. Raggenbass. The oxytocin-induced inward current in vagal neurons of the rat is mediated by G protein activation but not by an increase in the intracellular calcium concentration. *Eur J Neurosci* 9: 2605-12, 1997.

5. Alfonso, A., M. A. Botana, M. R. Vieytes, y L. M. Botana. Functional characterization of the Na+-H+ exchanger in rat mast cells: crosstalks between different kinase pathways. *Eur J Pharmacol* 267: 289-96, 1994.

6. Alper, S. L. The band 3-related AE anion exchanger gene family. *Cell Physiol Biochem* 4: 265-81, 1994.

7. Alvaro, D., P. D. Guardia, A. Bini, A. Gigliozzi, S. Furfaro, T. La Rosa, C. Piat, y L. Capocaccia. Effect of glucagon on intracellular pH regulation in isolated rat hepatocyte couplets. *J Clin Invest* 96: 665-75, 1995.

8. Alvaro, D., A. Mennone, y J. L. Boyer. Role of kinases and phosphatases in the regulation of fluid secretion and Cl-/HCO3. exchange in cholangiocytes. *Am J Physiol* 273: G303-13, 1997.

9. Anderson, A. O. Structure and organization of the limphatyc system. En: *Immunophysiology. The role of cells and cytokines in immunity and inflamation*, editado por J. J. Oppenheim y E. M. Shevach Oxford University Press, 1990, p. 14-45.

10. Anderson, D. M. Red tides. *Sci Am* 271: 52-8, 1993.

11. Aronson, P. S. Distribution of sodium chloride across cell membranes. En: *The regulation of sodium and chloride balance*, editado por D. W. Seldin y G. Giebish. New York: Raven Press, 1990, p. 3-21.

12. Astoul, E., S. Watton, y D. Cantrell. The dynamics of protein kinase B regulation during B cell antigen receptor engagement. *J Cell Biol* 145: 1511-20, 1999.

13. Aune, T., y M. Yndestad. Diarrhetic shellfish poisoninig. En: *Algal toxins in seafood and drinking water*, editado por I. R. Falconer. London: Academic Press, 1993, p. 87-104.

14. Azarani, A., J. Orlowski, y D. Goltzman. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide activate the Na+/H+ exchanger NHE-1 isoform in osteoblastic cells (UMR-106) via a cAMP-dependent pathway. *J Biol Chem* 270: 23166-72, 1995.

15. Baden, D. G., y D. J. Adams. Brevetoxins: chemistry, mechanism of action and methods of detection. En: *Seafood and freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*, editado por L. M. Botana. New York: Marcel Dekker Inc., 2000, p. 505-32.

16. Balasubramanyam, M., y J. P. Gardner. Protein kinase C modulates cytosolic free calcium by stimulating calcium pump activity in Jurkat cells. *Cell Calcium* 18: 526-41, 1995.

17. Barker, S. A., D. Lujan, y B. S. Wilson. Multiple role of PI 3-kinase in the regulation of PLC gamma activity and Ca2+ mobilization in antigen-stimulated mast cells. *J Leukoc Biol* 65: 321-9, 1999.

18. Barton, K., N. Muthusamy, M. Chanyangam, C. Fischer, C. Clendenin, y J. M. Leiden. Defective thymocyte proliferation and IL-2 production in transgenic mice expressing a doinant-negtive form of CREB. *Nature* 379: 81-5, 1996.

19. Bax, B. E., V. S. Shankar, C. M. Bax, A. S. Alam, S. Zara, B. S. Moonga, M. Pazianas, C. L. Huang, y M. Zaidi. Functional consequences of the interaction of Ni2+ with the osteoclast Ca2+ 'receptor'. *Exp Physiol* 78: 517-29, 1993.

20. Benos, D. J., S. McPherson, H. Hahn, M. A. Chaikin, y E. N. Benveniste. Cytokines and HIV envelope glycoprotein gp120 stimulate Na+/H+ exchange in astrocytes. *J Biol Chem* 269: 13811-6, 1994.

21. Benten, W. P., M. Lieberherr, G. Giese, y F. Wunderlich. Estradiol binding to cell surface raises cytosolic free calcium in T cells. *FEBS lett* 422: 349-53, 1998.

22. Bernardo, A. A., F. T. Kear, J. A. Stim, Y. Y. Qiu, O. S. Ruiz, H. Weidman, y J. A. Arruda. Renal cortical basolateral Na+/HCO3. cotransporter. III. Evidence for a regulatory protein in the inhibitory effect of protein kinase A. *J Membrane Biol* 145: 67-74, 1995.

23. Berridge, M. J. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* 499: 291-306, 1997.

24. Bevensee, M. O., M. Apkon, y W. F. Boron. Intracellular pH regulation in cultured astrocytes from rat hippocampus .2. Electrogenic Na/HCO3 cotransport. *J Gen Physiol* 110: 467-83, 1997.

25. Bialojan, C., y A. Takai. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J* 256: 283-90, 1988.

26. Bianchini, L., M. Woodside, C. Sardet, J. Pouyssegur, A. Takai, y S. Grinstein. Okadaic acid, a phosphatase inhibitor, induces activation and phosphorylation of the Na+/H+ antiport. *J Biol Chem* 266: 15406-13, 1991.

27. Bielfeld-Ackerman, A., C. Range, y C. Korbmacher. Maitotoxin (MTX) activates a nonselective cation channel in Xenopus laevis oocytes. *Pflügers Arch* 436: 329-37, 1998.

28. Boron, W. F. Intracellular pH transients in giant barnacle muscle fibers. *Am J Physiol* 233: C61-73, 1977.

29. Boron, W. F., y E. L. Boulpaep. Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Basolateral HCO3- transport. *J Gen Physiol* 81: 53-94, 1983.

30. Boron, W. F., M. A. Hediger, E. L. Boulpaep, y M. F. Romero. The renal electrogenic Na+:HCO3- cotransporter. *J Exp Biol* 200: 263-8, 1997.

31. Bosman, G., C. Renkawek, A. Reijnen-Aalbers, y W. De Grip. Anion exchange proteins and regulation of intracellular pH in cultured rat astrocytes and neurones. *NeuroReport* 8: 427--30, 1997.

32. Bossart, G. D., D. G. Baden, R. Y. Ewing, B. Roberts, y S. D. Wright. Brevetoxicosis in manatees (*Trichechus manatus latirostris*) from the 1996 epizootic: gross, histologic and immunohistochemical features. *Toxicol Pathol* 26: 276-82, 1998.

33. Botana, L. M., y D. W. MacGlashan. Differential effects of cAMP-elevating drugs on stimulus-induced cytosolic calcium changes in human basophils. *J Leuk Biol* 55: 798-804, 1994.

34. Boussouf, A., R. C. Lambert, y S. Gaillard. Voltage-dependent Na+-HCO3- cotransporter and Na+/H+ exchanger are involved in intracellular pH regulation of cultured mature rat cerebellar oligodendrocytes. *Glia* 19: 74-84, 1997.

35. Buhl, A. M., y J. C. Cambier. Phosphorylation of CD19 Y484 and Y515, and linked activation of phosphatidylinositol 3-kinase, are required for B cell antigen receptor-mediated activation of Bruton´s tyrosine kinase. *J Immunol* 162: 4428-46, 1999.

36. Burnham, C. E., H. Amlal, Z. Wang, G. E. Shull, y M. Soleimani. Cloning and functional expression of a human kidney Na+:HCO3- cotrasnporter. *J Biol Chem* 272: 19111-4, 1997.

37. Cabado, A. G., S. Despa, M. A. Botana, M. R. Vieytes, M. González, y L. M. Botana. Membrane potential changes associated with calcium signals in human lymphocytes and rat mast cells. *Life Sci* 64: 681-96, 1999.

38. Cabado, A. G., M. R. Vieytes, y L. M. Botana. Rat pleural and peritoneal mast cells stimulated at different cellular levels: Difference in and influence of purification media. *Int Arch Allergy Immunol* 100: 234-39, 1993.

39. Cantrell, D. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol* 14: 259-74, 1996.

40. Cataldi, N., A. Secondo, A. D'alesio, M. Tagliatela, F. Hofmann, N. Klugbauer, G. Di Renzo, y L. Annuziato. Studies on maitotoxin-induced intracellular Ca2+ elevation in chinese hamster ovary cells stably transfected with cDNAs encoding for L-type Ca2+ channel subunits. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 725-30, 1999.

41. Catterall, W. A., y M. Gainer. Interaction of brevetoxin A with a new receptor site on the sodium channel. *Toxicon* 23: 497-504, 1985.

42. Chan, A. C., D. M. Desai, y A. Weiss. The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu Rev Immunol* 12: 555-92, 1994.

43. Chattopadhyay, N. Biochemistry, physiology and pathophysiology of the extracellular calcium-sensing receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 32: 789-804, 2000.

44. Chen, J., A. B. Strawbridge, y S. A. Kempson. Microtubule disruption stimulates system A transport in cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 268: C1512-9, 1995.

45. Chiono, M., R. Mahey, G. Tate, y D. M. F. Cooper. Capacitative Ca2+ entry exclusively inhibits cAMP synthesis in C6-2B glioma cells. *J Biol Chem* 270: 1149-55, 1995.

46. Chouaib, S., R. J. Roob, K. Welte, y B. DuPont. Analysis of prostaglandin E3 effect on T lymphocytes activation. Abrogation of prostaglandin E2 inhibitory effect by the tumor promotor 12.0 tetradecanoyl phorbol-13 acetate. *J Clin Invest* 80: 333-40, 1987.

47. Choudhry, M. A., Z. Ahmed, y M. M. Sayeed. PGE(2)-mediated inhibition of T cell p59(fyn) is independent of cAMP. *Am J Physiol* 277: C302-9, 1999.

48. Chow, S. C., G. E. N. Kass, y S. Orrenius. Two independently regulated Ca2+ entry mechanisms coexist in Jurkat T cells during T cell receptor antigen activation. *Biochem J* 293: 395-8, 1993.

49. Chung, S. C., T. V. McDonald, y P. Gardner. Inhibition by SK&F 96365 of Ca2+ current, IL-2 production and activation in T-lymphocytes. *Br J Pharmacol* 113: 861-8, 1994.

50. Ciminello, P., E. Fattorusso, M. Forino, S. Magno, R. Poletti, y R. Viviani. Isolation of 45-hydroxyyessotoxin from mussels of the Adriatic Sea. *Toxicon* 37: 689-93, 1999.

51. Cooper, D. M. F., y G. Brooker. Ca2+ - inhibited adenylyl cyclase in cardiac tissue. *Trends Pharmacol Sci* 14: 34-6, 1993.

52. Cornet, M., J. Ubl, y H. Kolb. Cytoskeleton and ion movements during volume regulation in cultured PC12 cells. *J Membrane Biol* 133: 161-70, 1993.

53. Daly, J. W., J. Lueders, W. L. Padgett, Y. Shin, y F. Gusovsky. Maitotoxin-elicited calcium influx in cultured cells. Effect of calcium-channel blockers. *Biochem Pharmacol* 50: 1187-97, 1995.

54. De Almeida, B., y J. L. Stow. Disruption of microtubules alters polarity of basement membrane proteoglycan secretion in epithelial cells. *Am J Physiol* 260: C691--700, 1991.

55. de la Rosa, L. A., A. G. Cabado, M. A. Botana, M. R. Vieytes, J. I. Vidal, y L. M. Botana. Evidence for an electrogenic, negatively protein-kinase-A-modulated, Na+-dependent HCO3- transporter in human lymphocytes. *Pflügers Arch* 437: 935-43, 1999.

56. de Rooij, J., F. J. T. Zwartkruis, M. H. G. Verheijen, R. H. Cool, S. M. B. Nijman, A. Wittinghofer, y J. L. Bos. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cAMP. *Nature* 396: 474-7, 1998.

57. Dechraoui, M., J. Naar, S. Pauillac, y A. Legrand. Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels. *Toxicon* 37: 125-43, 1998.

58. Deckert, M., C. Aussel, A. Bernard, y J. P. Breittmayer. Phenilarsine oxide and phorbol myristate acetate inhibit the CD3 induced rise in cytosolic Ca2+ in Jurkat cells by refilling internal Ca2+ stores. *Biochem J* 297: 567-72, 1994.

59. DeFranco, A. L. B-lymphocyte activation. En: *Fundamental Immunology. Fourth Edition*, editado por W. E. Paul. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999, p. 225-61.

60. Delbro, D. S., y S. Lange. Effect of ganglionic blocking compounds on in-vivo fluid secretion in the rat small intestine. *J Pharm Pharmacol* 49: 1109-13, 1997.

61. Densmore, J. J., D. M. Haverstick, G. Szabo, y L. S. Gray. A voltage-operable current is involved in Ca2+ entry in human lymphocytes whereas ICRAC has no apparent role. *Am J Physiol* 271: C1494-503, 1996.

62. DiFrancesco, M., y P. Tortora. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351: 145-7, 1991.

63. Draisci, R., E. Ferretti, L. Palleschi, C. Marchiafava, R. Poletti, A. Milandri, A. Ceredi, y M. Pompei. High levels of yessotoxin in mussels and presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea. *Toxicon* 37: 1187-93, 1999.

64. Draisci, R., L. Lucentini, L. Giannetti, y P. Boria. Determination of diarrheic shellfish toxins in mussels by microliquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J AOAC Int* 81: 441-7, 1998.

65. Draisci, R., L. Lucentini, y A. Mascioni. Pectenotoxins and yessotoxins: chemistry, toxicology, pharmacology and analysis. En: *Seafood and freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*, editado por L. M. Botana. New York: Marcel Dekker Inc., 2000, p. 289-324.

66. Dupuis, G., F. Aoudjit, I. Ricard, y M. D. Payet. Effects of modulators of cytosolic Ca2+ on phytohemagglutin-dependent Ca2+ response and interleukin-2 production in Jurkat cells. *J Leukoc Biol* 53: 66-72, 1993.

67. Estacion, M. Ciguatera toxins: mechanism of action and pharmacology of maitotoxin. En: *Seafood and freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*, editado por L. M. Botana. New York: Marcel Dekker Inc., 2000, p. 473-503.

68. Exton, J. H. Role of G proteins in activation of phosphoinositide phospholipase C. En: *Cell signalling. Biology and medicine of signal transduction*, editado por B. L. Brown y P. R. M. Dobson. New York: Raven Press, 1993, p. 65-72.

69. Fagan, K. A., R. Mahey, y D. M. F. Cooper. Functional co-localization of transfected Ca2+-stimulable adenylyl cyclases with capacitative Ca2+ entry sites. *J Biol Chem* 271: 12438-44, 1996.

70. Fernandez, M. T., V. Zitko, S. Gascón, y A. Novelli. The marine toxin okadaic acid is a potent neurotoxin for cultured cerebellar neurons. *Life Sci* 49: 157-62, 1991.

71. Fernandez, R., y G. Malnic. H+ ATPase and Cl- interaction in regulation of MDCK cell pH. *J Membrane Biol* 163: 137-45, 1998.

72. Fernando, K. C., R. B. Gregory, y G. J. Barritt. Protein kinase A regulates the disposition of Ca2+ which enters hte cytoplasmic space through store-activated Ca2+ channels in rat hepatocytes by diverting inflowing Ca2+ to mitochondria. *Biochem J* 330: 1179-87, 1998.

73. Ferriere, F., N. A. Khan, P. Meyniel, y P. Deschaux. 5-Hydroxytryptamine-induced calcium-channel gating in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) peripheral blood lymphocytes. *Biochem J* 323: 251-8, 1997.

74. Fewtrell, C. Ca2+ oscillations in non-excitable cells. *Annu Rev Physiol* 55: 427-54, 1993.

75. Francis, S. H., y J. D. Corbin. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol* 56: 237-72, 1994.

76. Frelin, C., P. Vigne, A. Ladoux, y M. Lazdunski. The regulation of intracellular pH in cells from vertebrates. *Eur J Biochem* 174, 1988.

77. Fujiki, H., y M. Suganuma. Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: The okadaic acid class of compounds. *Adv Cancer Res* 61: 143-94, 1993.

78. Fukushima, T., T. K. Wadell, S. Grinstein, G. G. Goss, J. Orlowski, y G. P. Downey. Na+/H+ exchange activity during phagocytosis in human neutrophils: role of Fcgamma receptors and tyrosine kinases. *J Biol Chem* 132: 1037-52, 1996.

79. Galione, A. Cyclic ADP-ribose: a new way to control calcium. *Science* 259: 325-6, 1993.

80. Ganz, M. B., G. Boyasky, R. B. Sterzel, y W. F. Boron. Arginine-vasopressin enhances pHi regulation in the presence of HCO3- by stimulating three acid-base transport systems. *Nature* 337: 648-51, 1989.

81. Garcia-Soto, J. J., y S. Grinstein. Determinants of the transmembrane distribution of chloride in rat lymphocytes: role of Cl^--HCO_3^- exchange. *Am J Physiol* 258: C1108-16, 1990.

82. Genot, E., y D. A. Cantrell. Ras regulation and function in lymphocytes. *Curr Op Immunol* 12: 289-94, 2000.

83. Gilman, A. G. G proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56: 615-49, 1987.

84. Gleeson, D., N. P. Smith, y J. L. Boyer. Bicarbonate-dependent and independent intracellular pH regulatory mechanisms in rat hepatocytes. Evidence for Na:HCO3-cotransport. *J Clin Invest* 84: 312-1, 1989.

85. Gonzalez, J. C., M. R. Vieytes, J. M. Vieites, y L. M. Botana. Improvement on sample clean-up for high-performance liquid chromatographic -fluorimetric determination of diarrhetic shellfish toxins using 1-bromoacetylpyrene. *J Chromatogr A* 793: 509-15, 1998.

86. Gouy, H., D. Cefai, S. B. Christensen, P. Debre, y G. Bismuth. Cyclic AMP- and inositol phosphate-independent inhibition of Ca2+ influx by cholera toxin in CD3-stimulated Jurkat T cells. A study with a cholera toxin-resistant cell variant and the Ca2+ endoplasmic reticulum-ATPase inhibitor thapsigargin. *J Immunol* 147: 757-66, 1991.

87. Graves, J. D., y E. G. Krebs. Protein phosphorilation and signal trasduction. *Pharmacol Ther* 82: 111-21, 1999.

88. Green, J., y C. R. Kleeman. Role of calcium and cAMP messenger systems in intracellular pH regulation of osteoblastic cells. *Am J Physiol* 262: C11-21, 1992.

89. Grinstein, S., S. Cohen, J. D. Goetz, y A. Rothstein. Osmotic and phorbol ester-induced activation of Na+/H exchange. Possible role of protein phosphorylation in lymphocyte volume regulation. *J Cell Biol* 101: 269-76, 1985.

90. Grinstein, S., S. Cohen, J. D. Goetz, A. Rothstein, y E. W. Gelfand. Characterization of the activation of Na+/H+ exchange in lymphocytes by phorbol esters: change in cytoplasmic pH dependence of the antiport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 1429-33, 1985.

91. Grinstein, S., S. Cohen, y A. Rothstein. Cytoplasmic pH regulation in thymic lymphocytes by an amiloride-sensitive Na+/H+ antiport. *J Gen Physiol* 83: 341-69, 1984.

92. Grinstein, S., y S. J. Dixon. Ion transport, membrane potential, and cytoplasmic pH in lymphocytes: changes during activation. *Physiol Rev* 69: 417-81, 1989.

93. Grinstein, S., y J. K. Foskett. Ionic mechanisms of cell volume regulation in leukocytes. *Annu Rev Physiol* 52: 399-414, 1990.

94. Grinstein, S., J. D. Goetz, S. Cohen, A. Rothstein, y E. W. Gelfand. Regulation of Na+/H+ exchange in lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 456: 207-19, 1985.

95. Grinstein, S., S. J. D. Goetz, D. Stewart, B. J. Beresford, y A. Mellors. Protein phosphorylation during activation of Na+/H+ exchange by phorbol esters and by osmotic shrinking. Possible relation to cell pH and volume regulation. *J Biol Chem* 261: 8009-16, 1986.

96. Grynkiewicz, G., M. Poenie, y R. Y. Tsien. A new generation of Ca^{++} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-50, 1985.

97. Guizouarn, H., F. Borgesse, B. Pellisier, F. Garcia-Romeu, y R. Motais. Regulation of Na+/H+ exchange activity by recruitment of new Na+/H+ antiporters: effect of calyculin A. *Am J Physiol* 268: C434-41, 1995.

98. Guse, A. H. Ca2+ signalling in T-lymphocytes. *Crit Rev Immunol* 18: 419-48, 1998.

99. Guse, A. H., I. Berg, C. P. da Silva, B. V. L. Potter, y G. W. Mayr. Ca2+ entry induced by cyclic ADP-ribose in intact T-lymphocytes. *J Biol Chem* 272: 8546-50, 1997.

100. Guse, A. H., C. P. da Silva, I. Berg, A. L. Skapenko, K. Weber, P. Heyer, M. Hohenegger, G. A. Ashamu, H. Schulze-Koops, B. V. L. Potter, y G. W. Mayr. Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature* 398: 70-3, 1999.

101. Guse, A. H., E. Roth, y F. Emmrich. Intracellular Ca2+ pools in Jurkat T-lymphocytes. *Biochem J* 291: 447-51, 1993.

102. Gusovsky, F., J. A. Bitran, T. Yasumoto, y J. W. Daly. Mechanism of maitotoxin-stimulated phosphoinositide breakdown in HL-60 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 252: 466-73, 1990.

103. Guzmán-Pérez, S. E., y D. L. Park. Ciguatera toxins: chemistry and detection. En: *Seafood and freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*, editado por L. M. Botana. New York: Marcel Dekker Inc., 2000, p. 401-18.

104. Haug, L. S., V. Jensen, Ø. Hvalby, S. I. Walaas, y A. C. Østvold. Phosphorilation of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate receptor by cyclic nucleotide-dependent kinases *in Vitro* and in rat cerebellar slices *in Situ*. *J Biol Chem* 274: 7467-73, 1999.

105. Häussler, U., M. Rivet-Bastide, C. Fahlke, D. Müller, E. Zachar, y R. Rüdel. Role of the cytoskeleton in the regulation of Cl- channels in human embryonic skeletal muscle cells. *Pflügers Arch* 428: 323-30, 1994.

106. Herzig, S., y J. Neumann. Effects of serine/treonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* 80: 173-210, 2000.

107. Hilden, S. A., C. A. Johns, y N. E. Madias. Cl-dependent ATP-driven H+ transport in rabbit renal cortical endosomes. *Am J Physiol* 255: F885-97, 1988.

108. Hoiting, B. H., H. M. Schuiling, R. Kuipers, C. R. S. Elzinga, y J. Zaagsma. Modulation od agonist-induced phosphoinositide metabolism, Ca2+ signalling and contraction of smooth muscle by cAMP-dependent mechanisms. *Br J Pharmacol* 117: 419-26, 1996.

109. Hosokawa, M., H. Tsukada, T. Saitou, M. Kodama, M. Onomura, H. Nakamura, K. Fukuda, y Y. Seino. Effects of okadaic acid on rat colon. *Dig Disease Sci* 43: 2526-35, 1998.

110. Hoth, M., y R. Penner. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol* 465: 359-86, 1993.

111. Huang, J. M., C. H. Wu, y D. G. Baden. Depolarizing action of a red-tide dinoflagellate brevetoxin on axonal membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 229: 615-21, 1984.

112. Ishiguro, H., M. C. Steward, R. W. Wilson, y R. M. Case. Bicarbonate secretion in interlobular ducts from guinea-pig pancreas. *J Physiol* 495: 179-91, 1996.

113. Ito, E., M. Satake, K. Ofuji, N. Kurita, T. McMahon, K. James, y T. Yasumoto. Multiple organ damage caused by a new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland. *Toxicon* 38: 917-30, 2000.

114. Jaken, S. Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr Op Cell Biol* 8: 168-73, 1996.

115. James, K. J., A. G. Bishop, y A. Furey. New toxins on the horizon. En: *Seafood and freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*, editado por L. M. Botana. New York: Marcel Dekker Inc., 2000, p. 693-714.

116. Janmey, P. A. The cytoskeleton and cell signalling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev* 78: 763-81, 1998.

117. Jayaraman, T., E. Ondriasková, K. Ondrias, D. Harnick, y A. Marks. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for T-cell receptor signalling. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6007-11, 1995.

118. Kaminuma, O., A. Mori, K. Ogawa, H. Kikkawa, A. Nakata, K. Ikezawa, y H. Okudaira. Cyclic AMP suppresses interleukin-5 synthesis by human helper T cells via the downregulation of the calcium mobilization pathway. *Br J Pharmacol* 127: 521-9, 1999.

119. Kandasamy, R. A., F. H. Yu, R. Harris, A. Boucher, J. W. Hanrahan, y J. Orlowski. Plasma membrane Na+/H+ exchanger isoforms (NHE-1, -2, and -3) are differentially responsible to second messenger agonists of the protein kinase A and C pathways. *J Biol Chem* 270: 29209-16, 1995.

120. Kane, L. P., J. Lin, y A. Weiss. Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Op Immunol* 12: 242-9, 2000.

121. Kaplan, D. L., y W. F. Boron. Long-term expression of c-H-ras stimulates Na-H and Na+-dependent Cl-HCO3 exchange in NIH-3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 269: 4116-24, 1994.

122. Kaplan, O., y J. S. Cohen. Lymphocyte activation and phospholipid pathways. 31P magnetic resonance studies. *J Biol Chem* 266: 3688-94, 1991.

123. Kawasaky, H., G. M. Springett, N. Mochizuki, S. Toki, M. Nakaya, M. Matsuda, D. E. Housman, y A. M. Graybiel. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282: 2275-9, 1998.

124. Kiss, L., y S. J. Korn. Modulation of N-type Ca2+ channels by intracellular pH in chick sensory neurons. *J Neurophysiol* 81: 1839-47, 1999.

BIBLIOTECA VIRTUAL

125. Kobayashi, Y., T. Pang, T. Iwamoto, S. Wakabayashi, y M. Shigekawa. Lithium activates mammalian Na+/H+ exchangers: isoform specificity and inhibition by genistein. *Pflügers Arch* 439: 455-62, 2000.

126. Konoki, K., M. Hashimoto, T. Nonomura, M. Sasaki, M. Murata, y K. Tachibana. Inhibition of maitotoxin-induced Ca2+ influx in rat glioma C6 cells by brevetoxins and synthetic fragments of maitotoxin. *J Neurochem* 70: 409-16, 1998.

127. Kramhoft, B., E. K. Hoffmann, y L. O. Simonsen. pHi regulation in Ehrlich mouse ascites tumor cell: role of sodium-dependent and sodium-independent chloride-bicarbonate exchange. *J Membrane Biol* 138, 1994.

128. Kurashima, K., E. Z. Szabó, G. Lukacs, J. Orlowski, y S. Grinstein. Endosomal recycling of the Na+/H+ exchanger NHE3 isoform is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 273: 20828-36, 1998.

129. Kurosaki, T. Functional dissection of BCR signaling pathways. *Curr Op Immunol* 12: 276-81, 2000.

130. Lagadic-Gossmann, D., K. J. Buckler, y R. D. Vaughan-Jones. Role of bicarbonate in pH recovery from intracellular acidosis in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol (London)* 458: 361-84, 1992.

131. Lagos, N. W., y D. Andrinolo. Paralytic shellfish poisoning: toxicology and kinetics. En: *Seafood and freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*, editado por L. M. Botana. New York: Marcel Dekker Inc., 2000, p. 203-15.

132. Lahouratate, P., J. Guibert, J. C. Camelin, y I. Bertrand. Specific inhibition of cardiac and skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca2+ pumps by H-89. *Biochem Pharmacol* 54: 991-8, 1997.

133. Lai, Z. F., Y. Z. Chen, Y. Nishimura, y K. Nishi. An amiloride-sensitive and voltage-dependent Na+ channel in an HLA-DR-restricted human T cell clone. *J Immunol* 165: 83-90, 2000.

134. L'Allemain, G., S. Paris, y J. Pouysségur. Role of a Na+-dependent Cl-/HCO3- exchange in regulation of intracellular pH in fibroblasts. *J Biol Chem* 260: 4877-83, 1985.

135. Launay, S., R. Bobe, C. Lacabaratz-Porret, R. Bredoux, T. Kovàcs, J. Enouf, y B. Papp. Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump expression during T lymphocyte activation. *J Biol Chem* 272: 10746-50, 1997.

136. Lee, B. S., R. B. Gunn, y R. R. Kopito. Functional differences among nonerythroid anion exchangers expressed in a transfected human cell line. *J Biol Chem* 266: 11448-54, 1991.

137. Leira, F., J. M. Vieites, M. R. Vieytes, y L. Botana. Apoptotic events induced by the phosphatase inhibitor okadaic acid in normal human lung fibroblasts. *Toxicon* , En prensa.

138. Levine, S. A., M. H. Montrose, C. M. Tse, y M. Donowitz. Kinetics and regulation of three cloned mammalian Na+/H+ exchangers stably expressed in a fibroblast cell line. *J Biol Chem* 268: 25527-35, 1993.

139. Lewis, R., J. Molgó, y D. J. Adams. Ciguatera toxins: pharmacology of toxins involved in ciguatera and related fish poisonings. En: *Seafood and freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*, editado por L. M. Botana. New York: Marcel Dekker Inc., 2000, p. 419-47.

140. Lewis, R. S., y M. D. Cahalan. Mitogen induced oscillations of cytosolic Ca2+ and transmembrane Ca2+ current in human leukemic T cells. *Cell Regul* 1: 99-112, 1989.

141. Lewis, R. S., y C. M.D. Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 13: 623-53, 1995.

142. Luckas, B. Phycotoxins in seafood--toxicological and chromatographic aspects. *J Chromatogr* 624: 439-56, 1992.

143. Ma, Y. H., H. P. Reusch, E. Wilson, J. A. Escobedo, W. J. Fantl, L. T. Williams, y H. E. Ives. Activation of Na+/H+ exchange by platelet-derived growth factor involves phosphatidylinositol 3'-kinase and phospholipase Cgamma. *J Biol Chem* 269: 30734-9, 1994.

144. Madshus, I. H. Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem J* 250: 1-8, 1988.

145. Malarkey, K., C. M. Belham, A. Paul, A. Graham, A. McLees, y P. H. Scott. The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 309: 361-75, 1995.

146. Mason, M. J., B. Mayer, y L. J. Hymel. Inhibition of Ca2+ transport pathways in thymic lymphocytes by econazole, miconazole and SKF 96365. *Am J Physiol* 264: C654-62, 1993.

147. Mason, M. J., J. D. Smith, J. J. Garcia-Soto, y S. Grinstein. Internal pH-sensitive site couples Cl-HCO3 exchange to Na-H antiport in lymphocytes. *Am J Physiol* 253: C177-92, 1989.

148. Masserini, M., P. Palestini, M. Pitto, V. Chigorno, M. Tomasi, y G. Tettamanti. Cyclic AMP accumulation in HeLa cells induced by cholera toxin. Involvement of the ceramide moiety of GM1 ganglioside. *Biochem J* 271: 107-11, 1990.

149. McCloskey, M. A., y L. Zhang. Potentiation of Fce receptor I-activated Ca2+ current (ICRAC) by cholera toxin: possible mediation by ADP ribosylation factor. *J Cell Biol* 148: 137-46, 2000.

150. McLeod, R. J., F. Redican, P. Lembessis, J. R. Hamilton, y M. Field. Sodium-bicarbonate cotransport in guinea pig ileal crypt cells. *Am J Physiol* 270: C786-93, 1996.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

151. Metcalfe, S., y J. Milner. Phosphatases PP1 and PP2A act after the G0/G1 interface in lymphocyte activation. *Immunol Lett* 26: 177-82, 1990.

152. Moore, T. M., P. M. Chetham, J. J. Kelly, y T. Stevens. Signal transduction and regulation of lung endothelial cell permeability. Interaction between calcium and cAMP. *Am J Physiol* 275: L203-22, 1998.

153. Morimoto, Y., T. Ohba, S. Kobayashi, y T. Haneji. The protein phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A induce apoptosis in human osteoblastic cells. *Exp Cell Res* 230: 181-6, 1997.

154. Morris, R. G., A. Tousson, D. J. Benos, y J. A. Schafer. Microtubule disruption inhibits AVT-stimulated Cl- secretion but not Na+ reabsorption in A6 cells. *Am J Physiol* 274: F300-14, 1998.

155. Nakahata, N., S. Ohkubo, E. Ito, M. Nakano, K. Terao, y Y. Ohizumi. Comparison of maitotoxin with thromboxane A2 in rabbit platelet activation. *Toxicon* 37: 1375-89, 1999.

156. Nakamura, T., y G. H. Gold. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfatory receptor cilia. *Nature* 325: 442-4, 1987.

157. Neer, E. J., Y. Chow, S. Garen-Fazio, T. Michel, C. J. Schmidt, y S. Silbert. The family of G proteins. En: *Biology of cellular transducing signals*, editado por J. Y. Vanderhoek. New York: GWUMC Department if Biochemistry, 1990, p. 83-92.

158. Nijjar, M. S., y S. NIjjar. Ecobiology, clinical symptoms and mode of action of domoic acid, an amnesic shellfish toxin. En: *Seafood and freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*, editado por L. M. Botana. New York: Marcel Dekker Inc., 2000, p. 325-58.

159. Noël, J., y J. Pouysségur. Hormonal regulation, pharmacology and membrane sorting of vertebrate Na+/H+ exchanger isoforms. *Am J Physiol* 268: C283-96, 1995.

160. Nofer, J., M. Tepel, M. Walter, U. Seedorf, G. Assmann, y W. Zidek. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C regulates thapsigargin-induced calcium influx in human lymphocytes. *J Biol Chem* 272: 32861-8, 1997.

161. Noll, T., H. Holschermann, K. Koprek, D. Gunduz, W. Haberbosch, H. Tillmanns, y H. M. Piper. ATP reduces macromolecular permeability of endothelial monolayers despite increasing [Ca2+]i. *Am J Physiol* 276: H1892-901, 1999.

162. Nuydens, R., M. de Jong, G. Van Den Kieboom, C. Heers, G. Dispersyn, F. Cornelissen, R. Nuyens, M. Borgers, y H. Geerts. Okadaic acid-induced apoptosis in neuronal cells: evidence for an abortive mitotic attempt. *J Neurochem* 70: 1124-33, 1998.

163. Obrietan, K., y A. van den Pol. GABA activity mediating cytosolic Ca2+ rises in developing neurons is modulated by cAMP-dependent signal transduction. *J Neurosci* 17: 4785-99, 1997.

164. Ofuji, K., M. Satake, T. McMahon, J. Silke, K. J. James, H. Naoki, Y. Oshima, y T. Yasumoto. Two analogs of azaspiracid isolated from mussels *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland. *Nat Toxins* 7: 99-102, 1999.

165. Olsnes, S., J. Ludt, T. I. Tonnessen, y K. Sandvig. Bicarbonate/chloride antiport in Vero cells: II. Mechanisms for bicarbonate-dependent regulation of intracellular pH. *J Cell Physiol* 132: 192-202, 1987.

166. Ozaki, Y., Y. Matsumoto, Y. Yatomi, M. Higashihara, y S. Kume. Modification of Na+/H+ Exchanger in Human Platelets by 1,2-Dioctanoylglycerol, a Protein Kinase-C Activator. *Thromb Haemost* 64: 165-71, 1990.

167. Parczyk, K., W. Haase, y C. Kondor-Koch. Microtubules are involved in the secretion of proteins at the apical cell surface of the polarized epithelial cell, Madin-Darby canine kidney. *J Biol Chem* 264: 16837-46, 1989.

168. Paris, S., y J. Pouysségur. Growth factors activate the Na+/H+ antiporter in quiescent fibroblasts by increasing its affinity for intracellular H+. *J Biol Chem* 259: 10989-94, 1984.

169. Partiseti, M., F. Le Deist, C. Hivroz, A. Fisher, H. Korn, y D. Choquet. The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency. *J Biol Chem* 269: 32327-35, 1994.

170. Paul, W. E. The immune system: an introduction. En: *Fundamental Immunology. Fourth Edition*, editado por W. E. Paul. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999, p. 1-18.

171. Petersen, C. C. H., y M. J. Berridge. G-protein regulation of capacitative calcium entry may be mediated by protein kinases A and C in Xenopus oocytes. *Biochem J* 307: 663-8, 1995.

172. Pham, N., I. Cheglakov, C. A. Koch, C. L. de Hoog, M. F. Moran, y D. Rotin. The guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF activates Ras in response to cAMP and cGMP. *Curr Biol* 10: 555-8, 2000.

173. Pleasance, S., y M. A. Quilliam. Ionspray mass spectrometry of maine toxins. IV. Determination of diarrhetic shellfish poisoning toxins in mussel tissue by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 6: 121-7, 1992.

174. Pouysségur, J. Molecular biology and hormonal regulation of vertebrate Na+/H+ exchanger isoforms. *Renal Physiol Biochem* 17: 190-3, 1994.

175. Premack, B. A., y P. Gardner. Signal trasduction by T-cell receptors:mobilization of Ca and regulation of Ca-dependent effector molecules. *Am J Physiol* 263: C1119-40, 1992.

176. Premack, B. A., T. V. McDonald, y P. Gardner. Activation of Ca2+ current in Jurkat T cells following the depletion of Ca2+ stores by microsomal Ca2+-ATPase inhibitors. *J Immunol* 152: 5226-40, 1994.

177. Pucéat, M., S. Roche, y G. Vassort. Src-family tyrosine kinase regulates intracellular pH in cardiomyocytes. *J Cell Biol* 147: 1637-46, 1998.

178. Putney, J. W. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11: 611-24, 1990.

179. Qiu, R., K. L. Melmon, y M. M. Khan. Cyclic AMP is not a direct regulator of calcium flux and hydrolysis of phosphoinositides in human lymphocytes. *Immunopharmacol* 25: 37-49, 1993.

180. Quednau, B., D. Rosskopf, H. P. Reusch, F. C. Luft, y W. Siffert. Enhanced Na+-H+ exchanger activity and NHE-1 mRNA levels in human lymphocytes during metabolic acidosis. *Am J Physiol* 266: C480-8, 1994.

181. Randriamampita, C., G. Bismuth, P. Debré, y A. Trautmann. Nitrendipine-induced inhibition of calcium influx in a human T-cell clone: role of cell depolarization. *Cell Calcium* 22: 91-7, 1991.

182. Randriamampita, C., y R. Y. Tsien. Emptying of intracellular Ca2+ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca2+ influx. *Nature* 364: 809-14, 1993.

183. Ratner, S., W. S. Sherrod, y D. Lichlyter. Microtubule retraction into the uropod and its role in T cell polarization and motility. *J Immunol* 159: 1063-7, 1997.

184. Redon, J., y D. Batlle. Regulation of intracellular pH in the spontaneously hypertensive rat. Role of bicarbonate-dependent transporters. *Hypertension* 23: 503-12, 1994.

185. Reusch, H. P., R. Reusch, D. Rosskopf, W. Siffert, J. F. Mann, y F. C. Luft. Na+/H+ exchange in human lymphocytes and platelets in chronic and subacute metabolic acidosis. *J Clin Invest* 92: 858-65, 1993.

186. Richards, F. M., J. Milner, y S. Metcalfe. Inhibition of the serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A in lymphocytes: effect on mRNA levels for interleukin-2, IL-2R alpha, krox-24, p53, hsc70 and cyclophilin. *Immunology* 76: 642-7, 1992.

187. Roitt, I., J. Brostoff, y D. Male. *Inmunología*. Barcelona: Masson-Salvat, 1993.

188. Romero, M. F., y W. F. Boron. Electrogenic Na+/HCO3- cotransporters: cloning and physiology. *Annu Rev Physiol* 61: 699-723, 1999.

189. Romero, M. F., D. Henry, S. Nelson, P. J. Harte, A. Dillon, y C. M. Sciortino. Cloning and characterization of a Na+-driven anion exchanger (NDAE1). *J Biol Chem* 275: 24552-9, 2000.

190. Roos, A., y W. J. Boron. Intracellular pH. *Physiol Rev* 61: 296-434, 1981.

191. Rothman, B. L., N. Kennure, K. A. Kelley, M. Katz, y T. M. Aune. Elevation of intracellular cAMP in human T lymphocytes by an Anti-CD44 mAb. *J Immunol* 151: 6036-42, 1993.

192. Ruiz, O. S., y J. A. Arruda. Regulation of the renal Na-HCO3 cotransporter by cAMP and Ca-dependent protein kinases. *Am J Physiol* 262: F560-5, 1992.

193. Ruiz, O. S., Y. T. Qiu, L. R. Cardoso, y J. A. Arruda. Regulation of the renal Na-HCO3 cotransporter: VII. Mechanism of the cholinergic stimulation. *Kidney Int* 51: 1069-77, 1997.

194. Ruiz, O. S., Y. Y. Qiu, L. R. Cardoso, y J. A. Arruda. Regulation of the renal Na-HCO3 cotransporter: IX. Modulation by insulin, epidermal growth factor and carbachol. *Regul Pept* 77: 155-61, 1998.

195. Ruscetti. Interleukin 2. En: *Immunophysiology. The role of cells and cytokines in immunity and inflamation*, editado por J. J. Oppenheim y E. M. Shevach Oxford University Press, 1990, p. 46-66.

196. Sagi-Eisenberg, R., y H. P. Lieman, I. Protein kinase C regulation of the receptor-coupled calcium signal in histamine-secreting rat basophilic leukaemia cells. *Nature* 313: 59-60, 1985.

197. Sardet, C., P. Fafournoux, y J. Pouysségur. α-Thrombin, epidermal growth factor, and okadaic acid activate the Na+/H+ exchanger, NHE-1, by phosphorylating a set of common sites. *J Biol Chem* 266: 19166-71, 1991.

198. Satake, M., K. Ofuji, H. Naoki, K. J. James, A. Furey, T. McMahon, J. Silke, y T. Yasumoto. Azaspiracid, a new marin toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from irish mussels, *Mytilus edulis*. *J Am Chem Soc* 120: 9967-8, 1998.

199. Sauvage, M., P. Mazière, H. Fathallah, y F. Giraud. Insulin stimulates NHE1 activity by sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C zeta in human erythrocytes. *Eur J Biochem* 267: 955-62, 2000.

200. Schilling, W. P., W. G. Sinkins, y M. Estacion. Maitotxin activates a nonselective cation channel and a P2Z/P2X7-like cytolytic pore in human skin fibroblasts. *Am J Physiol* 277: C755-65, 1999.

201. Schulman, H. The multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinases. *Curr Op Cell Biol* 5: 247-53, 1993.

202. Schulte, E. A., A. Hohendahl, H. Stegemann, J. R. Hirsch, H. Saleh, y E. Schlatter. Natriuretic peptides and diadenosine polyphosphates modulate pH regulation of rat mesangial cells. *Cell Physiol Biochem* 9: 310-22, 1999.

203. Schwiening, C. J., y W. F. Boron. Regulation of intracellular pH in pyramidal neurones from the rat hippocampus by Na+-dependent Cl-/HCO3- exchange. *J Physiol* 475: 59-67, 1994.

204. Sei, Y., M. Takemura, F. Gusovsky, P. Skolnick, y A. Basile. Distinct mechanisms for Ca2+ entry induced by OKT3 and Ca2+ depletion in Jurkat T cells. *Exp Cell Res* 216: 222-31, 1995.

205. Selliah, N., M. M. Bartik, S. L. Carlson, W. H. Brooks, y T. L. Roszman. cAMP accumulation in T-cells inhibits anti-CD3 monoclonal antibody-induced actin polimerization. *J Neuroimmunol* 56: 107-12, 1995.

206. Sharp, B. M., N. A. Shahabi, W. Heagy, K. McAllen, M. Bell, C. Huntoon, y D. J. McKean. Dual signal transduction through delta opioid receptors in a transfected human T-cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8294-9, 1996.

207. Shepherd, P. R., B. J. Reaves, y H. W. Davidson. Phosphoinositide 3-kinases and membrane traffic. *Trends Cell Biol* 6: 92-7, 1996.

208. Shimuzu, Y. Chemistry and mechanism of action. En: *Seafood and freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*, editado por L. M. Botana. New York: Marcel Dekker Inc., 2000, p. 151-72.

209. Shivnan, E., y D. R. Alexander. Protein kinase C activation inhibits TCR-mediated calcium influx but not inositol trisphosphate production in HPB-ALL T cells. *J Immunol* 154: 1146-56, 1995.

210. Shuttleworth, T. J. Arachidonic acid activates the noncapacitative entry of Ca2+ during [Ca2+]i oscillations. *J Biol Chem* 271: 21720-5, 1996.

211. Shuttleworth, T. J. What drives calcium entry during [Ca2+]i oscillations? - challenging the capacitative model. *Cell Calcium* 25: 237-46, 1999.

212. Siczkowski, M., J. E. Davies, y L. L. Ng. Activity and density of the Na+/H+ antiporter in normal and trasnformed human lymphocytes and fibroblasts. *Am J Physiol* 267: C745-52, 1994.

213. Skalhegg, B. S., B. F. Landmark, S. O. Doskeland, V. Hansson, T. Lea, y T. Jahnsen. Cyclic AMP-dependent protei kinase type I mediates the inhibitory effects of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate on cell replication in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 267: 15707-14, 1992.

214. Soergel, D. G., T. Yasumoto, J. W. Daly, y F. Gusovsky. Maitotoxin effects are blocked by SK&F 96365, an inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Mol Pharmacol* 41: 487-93, 1992.

215. Song, O., G. D. Baxter, E. M. Kovacs, D. Findik, y M. F. Lavin. Inhibition of apoptosis in hman tumour cells by okadaic acid. *J Cell Physiol* 153: 550-6, 1992.

216. Song, S. K., S. Y. Choi, y K. T. Kim. Opposing effects of protein kinase A and C on capacitative calcium entry into HL-60 promyelocytes. *Biochem Pharmacol* 56: 561-7, 1998.

217. Spiegel, A. M., L. S. Weinstein, A. Shenker, S. Hermouet, y J. J. Meredino. G proteins: from basic to clinical studies. En: *Cell signalling. Biology and medicine of signal transduction*, editado por B. L. Brown y P. R. M. Dobson. New York: Raven Press, 1993, p. 37-46.

218. Stein, R. C., y M. D. Waterfield. PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Mol Med Today* 6: 347-57, 2000.

219. Stein, W. D. *Channels, carriers and pumps. An introduction to membrane transport*. San Diego: Academic Press, 1990.

220. Takahashi, M., Y. Ohizumi, y T. Yasumoto. Maitotoxin, a Ca2+ channel activator candidate. *J Biol Chem* 257: 7287-89, 1982.

221. Takemura, H., S. Hatta, K. Yamada, y H. Ohshika. Beta-adrenergic receptor-mediated calcium mobilization in the Jurkat T cell line. *Life Sci* 56: 1443-54, 1995.

222. Tamir, I., J. M. Dal Porto, y J. C. Cambier. Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: regulators or B cell signal transduciton. *Curr Op Immunol* 12: 307-15, 2000.

223. Tanimura, A., A. Nezu, Y. Tojyo, y Y. Matsumoto. Isoproterenol potentiates α-adrenergic and muscarinic receptor-mediated Ca2+ response in rat parotid cells. *Am J Physiol* 276: C1282-7, 1999.

224. Tapia, R., F. Peña, y C. Arias. Neurotoxic and synaptic effects of okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases. *Neurochem Res* 24: 1423-30, 1999.

225. Taylor, C. W., y L. M. Broad. Pharmacological analysis of intracellular Ca2+ signalling: problems and pitfalls. *Trends Pharm Sci* 19: 370-5, 1998.

226. Tepel, M., O. Nesbit, F. Tokmak, y W. Zidek. Sodium-dependent Cl-/HCO3-exchange in patients with chronic renal failure: correlation with renal function. *Kidney Int* 53: 432-8, 1998.

227. Terao, K., E. Ito, M. Oarada, M. Murata, y T. Yasumoto. Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning--5. The effects in mice of yessotoxin isolated from Patinopecten yessoensis and of a desulfated derivative. *Toxicon* 28: 1095-104, 1990.

228. Thastrup, O., P. J. Cullen, B. K. Drbak, M. R. Hanley, y A. P. Dawson. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca2+ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2466-70, 1990.

229. Thion, L., C. Mazars, P. Thuleau, A. Graziana, M. Rossignol, M. Moreau, y R. Ranjeva. Activation of plasma membrane voltage-dependent calcium-permeable channels by disruption of microtubules in carrot cells. *FEBS lett* 393: 13-8, 1996.

230. Thomas, J. A., R. N. Buchsbaum, A. Zimniak, y E. Racker. Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry* 18: 2210-8, 1979.

231. Tonnessen, T. I., J. Ludt, K. Sandvig, y S. Olsnes. Bicarbonate/Chloride antiport in Vero cells: I. Evidence for both sodium-linked and sodium-independent exchange. *J Cell Physiol* 132: 183-91, 1987.

232. Tonnessen, T. I., K. Sandvig, y S. Olsnes. Role of Na+-H+ and Cl--HCO3- antiports in the regulation of cytosolic pH near neutrality. *Am J Physiol* 27: C1117-26, 1990.

233. Torgersen, K. M., J. T. Vaage, F. O. Levy, V. Hansson, B. Rolstad, y K. Taskén. Selective activation of cAMP-dependent protein kinase type I inhibits rat natural killer cell cytotoxicity. *J Biol Chem* 272: 5495-500, 1997.

234. Tripuraneni, J., A. Koutsouris, L. Pestic, P. Lanerolle, y G. Hecht. The toxin of diarrheic shellfish poisoning, okadaic acid, increases intestinal epithelial paracellular permeability. *Gastroenterology* 112: 100-8, 1997.

235. Tsao, N., y H. Y. Lei. Activation of the Na(+)/H(+) antiporter, Na+/HCO3(-)/CO3(2-) cotransporter or Cl(-)/HCO3(-) exchanger in spontaneous thymocyte apoptosis. *J Immunol* 157: 1107-16, 1996.

236. Tse, C. M., S. A. Levine, C. Yun, S. R. Brant, S. Nath, J. Pouysségur, y M. Donowitz. Molecular properties, kinetics and regulation of mammalian Na+/H+ exchangers. *Cell Physiol Biochem* 4: 282-300, 1994.

237. Tse, M., S. Levine, C. Yun, S. Brant, L. T. Counillon, J. Pouyssegur, y M. Donowitz. Structure/function studies of the epithelial isoforms of the mammalian Na+/H+ exchanger gene family. *J Membrane Biol* 135: 93-108, 1993.

238. Tubaro, A., C. Florio, E. Luxich, S. Sosa, R. Loggia, y T. Yasumoto. A protein phosphatase 2A inhibition assay for a fast and sensitive assesment of okadaic acid contamination in mussels. *Toxicon* 34: 743-52, 1996.

239. Uhal, D. B., M. Papp, K. Flynn, y M. E. Steck. Cholera toxin stimulates type II pneumocyte proliferation by a cAMP-independent mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1405: 99-109, 1998.

240. Ulbricht, W. Effects of veratridine on sodium currents and fluxes. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 133: 1-54, 1998.

241. Usugawa, T., M. Nishimura, Y. Itoh, U. T., y T. Yasumoto. Preparation of monoclonal antibodies against okadaic acid prepared from the sponge Halichondria okadai. *Toxicon* 27: 1323-30, 1989.

242. Utz, J., R. Eckert, y W. Trautwein. Changes of intracellular calcium concentrations by phenylephrine in renal arterial smooth muscle cells. *Pflügers Arch* 438: 725-31, 1999.

243. Van Dolah, F. Diversity of marine and freshwater algal toxins. En: *Seafood and freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*, editado por L. M. Botana. New York: Marcel Dekker Inc., 2000, p. 19-43.

244. van Tits, L. J. H., M. C. Michel, H. J. Motulsky, A. S. Maisel, y O. E. Brodde. Cyclic AMP counteracts mitogen-induced inositol phosphate generation and increases in intracellular Ca2+ concentrations in human lymphocytes. *Br J Pharmacol* 103: 1288-94, 1991.

245. Venkataraman, C., P. J. Lu, A. M. Buhl, C. S. Chen, J. C. Cambier, y S. Bondada. CD72-mediated B cell activation involves recruitment of CD19 and activatio of phosphatidylinositol 3-kinase. *Eur J Immunol* 28: 3003-16, 1998.

246. Vieites, J. M., y F. Leira Sanmartin. Incidence of marine toxins on industrial activity. En: *Seafood and freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*, editado por L. M. Botana. New York: Marcel Dekker Inc., 2000, p. 741-60.

247. Vieytes, M. R., O. I. Fontal, F. Leira, J. De Sousa, y L. M. Botana. A fluorescent microplate assay for diarrheic shellfish toxins. *Anal Biochem* 248: 258-64, 1997.

248. Vieytes, M. R., M. C. Louzao, A. Alfonso, A. G. Cabado, y L. M. Botana. Mechanism of action and toxicology. En: *Seafood and freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*, editado por L. M. Botana. New York: Marcel Dekker Inc., 2000, p. 239-56.

249. Vilariño, N., L. A. de la Rosa, M. R. Vieytes, y L. M. Botana. HCO3- ions modify the role of PKC isoforms in the modulation of rat mast cell functions. *Cell Signal* , En prensa.

250. Vilariño, N., M. R. Vieytes, J. M. Vieytes, y L. M. Botana. Role of HCO3- ions in cytosolic pH regulation in rat mast cells: evidence for a new Na+-independent, HCO3--dependent alkalinizing mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 320-4, 1998.

251. Wadsworth, S. J., y G. D. van Rossum. Role of vacuolar adenosine triphosphatase in the regulation of cytosolic pH in hepatocytes. *J Membrane Biol* 142: 21-34, 1994.

252. Walton, K. M., y J. E. Dixon. Protein tyrosine phosphatases. *Annu Rev Biochem* 62: 101-20, 1993.

253. Wang, J. Y. J., y J. R. McWhirter. Tyrosine-kinase-dependent signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med* 4: 264-70, 1994.

254. Watanabe, A., Y. Ishida, H. Honda, M. Kobayashi, y Y. Ohizumi. Ca2+-dependent aggregation of rabbit platelets induced by maitotoxin, a potent marine toxin, isolated from a dinoflagellate. *Br J Pharmacol* 109: 29-36, 1993.

255. Watson, A. J. M., S. Levine, M. Donowitz, y M. Montrose. Serum regulates Na+/H+ exchange in Caco-2 cells by a mechanism which is dependent on F-actin. *J Biol Chem* 267: 956-62, 1992.

256. Weber, W. M., C. Popp, W. Clauss, y W. Van Driessche. Maitotoxin induces insertion of different ion channels into the Xenopus oocyte plasma membrane via Ca2+ stimulated exocytosis. *Pflügers Arch* 439: 363-9, 2000.

257. Weiss, A. T-lymphocyte activation. En: *Fundamental Immunology. Fourth Edition*, editado por W. E. Paul. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999, p. 411-47.

258. Weller, M., U. Malipiero, P. Groscurth, y A. Fontana. T cell apoptosis induced by interleukin-2 deprivation or transforming growth factor-beta 2: modlation by the phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A. *Exp Cell Res* 221: 395-403, 1995.

259. Westphal, R. S., K. A. Anderson, A. R. Means, y B. E. Wadzinski. A signaling complex of Ca2+-calmodulin-dependent protein kinase IV and protein phosphatase 2A [see comments]. *Science* 280: 1258-61, 1998.

260. Wilson, H. A., D. Greenblatt, M. Poenie, F. D. Finkelman, y R. Y. Tsien. Crosslinkage of B lymphocyte surface immunoglobulin by anti-Ig or antigen induces prolonged oscillation of intracellular ionized calcium. *J Exp Med* 166: 601-6, 1987.

261. Wilson, O. I., I. Marriott, M. P. Mahaut-Smith, L. J. Hymel, y M. J. Mason. Isolation and characterization of membrane potential changes associated with release of calcium from intracellular stores in rat thymic lymphocytes. *J Membrane Biol* 137: 159-68, 1994.

262. Worley, J. F., M. S. McIntrye, B. S. Spencer, y I. D. Dukes. Depletion of intracellular Ca2+ stores activates a maitotoxin-sensitive nonselective cation current in beta-cells. *J Biol Chem* 269: 32055-8, 1994.

263. Wright, J. L. C., R. K. Boyd, A. S. W. DeFreitas, M. Falk, R. A. Foxall, W. D. Jamieson, A. W. Laycock, A. W. McCulock, A. G. McInnis, P. Odense, V. P. Pathak, M. A. Quillian, M. A. Regan, P. G. Sim, P. Therault, J. A. Walter, M. Gilgan, D. A. J. Richrard, y D. Dewar. Identification of domoic acid, a neurotexcitatory amino acid in mussels from eastern Prince Edward Island. *Can J Chem* 67: 481-90, 1989.

264. Wu, M. L., W. H. Chen, I. H. Liu, C. D. Tseng, y S. M. Wang. A novel effect of cyclic AMP on capacitative Ca2+ entry in cultured rat cerebellar astrocytes. *J Neurochem* 73: 1318-28, 1999.

265. Xi, D., M. Van Dolah, y J. S. Ramsdell. Maitotoxin induces a calcium-dependent depolarization in GH4C1 pituitary cells via activation of type L voltage-dependent calcium channels. *J Biol Chem* 267: 25025-31, 1992.

266. Yang, C. M., H. L. Tsao, C. T. Chiu, L. W. Fan, y S. M. Yu. Regulation of 5-Hydroxytryptamine-induced calcium mobilization by cAMP-elevating agents in cultured canine tracheal smooth muscle cells. *Pflügers Arch* 432: 708-16, 1996.

267. Yasumoto, T. Historic considerations regardinig seafood safety. En: *Seafood and freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*, editado por L. M. Botana. New York: Marcel Dekker Inc., 2000, p. 1-17.

268. Yasumoto, T., y M. Murata. Marine Toxins. *Chem Rev* 93: 1897-909, 1993.

269. Yasumoto, T., Y. Oshima, y M. Yamaguchi. Ocurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku Distric. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 44: 1249-55, 1978.

270. Yokoyama, W. M. Natural killer cell receptors. *Curr Op Immunol* 10: 298-305, 1998.

271. Yu, X., L. Hao, y G. Inesi. A pK change of acidic residues contributes to cation countertransport in the Ca2+-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Role of H+ in Ca2+ ATPase countertransport. *J Biol Chem* 269: 16656-67, 1994.

272. Zweifach, A., y R. S. Lewis. Clacium-dependent potentiation of store-operated calcium channels in T lymphocytes. *J Gen Physiol* 107: 597-610, 1996.

273. Zweifach, A., y R. S. Lewis. Mitogen-regulated Ca2+ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca2+ stores. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6295-9, 1993.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES