



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Rafael Burgos A.
INSTITUTO: Farmacología
FACULTAD: Ciencias Veterinarias

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Dr. Juan L. Hancke O.
INSTITUTO: Farmacología
FACULTAD: Ciencias Veterinarias

“ROL DEL CALCIO SOBRE LOS CAMBIOS DE pH INTRACELULAR INDUCIDO POR PAF EN NEUTRÓFILOS DE BOVINO Y SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN DE SUPERÓXIDO ”.

Tesis de grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Título de Químico Farmacéutico.

JEANETTE PRAXEDES RIQUELME MIRANDA

VALDIVIA-CHILE
2005

Esta tesis esta dedicada:

A mi Familia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a DIOS por su fidelidad y ayuda en estos años de estudio, acompañándome en todo momento.

A mi mama y papá por el apoyo incondicional y por la confianza que siempre depositaron en mí. A mis hermanos, Zuny, Tote y Nano por financiar mi sueño y hacerlo realidad. A mi pololo Jocesito y hermanito Andy por su amor y paciencia.

A mis amigos especialmente a Ale, Marce, por su ayuda y compañía.

Al Instituto de Farmacología, por prestarme sus dependencias para ejecutar mis experimentos. Y a todas las personas que allí trabajan que me ayudaron a realizar la parte práctica y teórica de mi tesis.

Finalmente pero no menos importante y de forma muy especial, quiero agradecer al Doctor Rafael Burgos por su disposición y ayuda en todo lo que estuviera a su alcance. Y al financiamiento del proyecto Fondecyt 1010204.

INDICE

Capítulo	Página
1. ABREVIATURAS	5
2. RESUMEN	6
3. SUMMARY	7
4. INTRODUCCIÓN	8
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6. RESULTADOS	30
7. DISCUSIÓN.....	37
8. LITERATURA CITADA	41

1. ABREVIATURAS

- BAPTA-AM: 1,2-bis-(o-aminofenoxi) -etano-N,N,N',N'-ácido tetraacético tetra-(acetoximetil) Ester.
- BCECF- AM: 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(γ-6)-carboxifluoreceína, acetoximetil ester.
- DAG: Diacilglicerol.
- DMSO: Dimetilsulfoxido.
- EGTA: Etilenoglicol-bis-(β-aminoetil)-N,N,N',N'-ácido tetraacético.
- FURA-2AM: 1-(2-(5-carboxioxazol-2-il)-6aminobenzofuran-5oxi)-2-(2'-amino-5'-metilfenoxi)-etano-N,N,N',N'-ácido tetraacético, pentaacetoximetil ester.
- HBSS: Solución salina balanceada de Hank's.
- IP3: Inositol 1, 4, 5-trifosfato.
- MAP quinasa: Proteínas quinasas activadas por mitógeno.
- NHE: Intercambiador Na^+ / H^+ .
- PAF: Factor activante plaquetario.
- PKC: Proteína quinasa C.
- PLC: Fosfolipasa C.
- PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato.
- SOD: Superóxido dismutasa.

2. RESUMEN

Los neutrófilos cumplen un rol fundamental en los procesos inflamatorios e infecciones bacterianas mediante la generación de radicales superóxido, que ayudan a la destrucción de los patógenos. Una de las sustancias que regulan la actividad del neutrófilo es el factor activante plaquetario (PAF), que causa alcalinización intracelular precedida por un período leve y transitorio de acidificación intracelular. En el presente trabajo se evaluó el rol del calcio intracelular sobre cambios de pH intracelular y la producción de superóxido en neutrófilos de bovino, inducidos por PAF.

Para el estudio se utilizaron neutrófilos de bovino. La determinación de calcio y pH intracelular, se realizó por técnicas fluorimétricas, utilizando las sondas FURA-2AM y BCECF-AM, respectivamente. Para la medición de superóxido se utilizó el método de citocromo C reductasa en microplaca.

La movilización de calcio inducida por PAF fue reducida por EGTA o BAPTA-AM y completamente bloqueada cuando se usó EGTA más BAPTA-AM. La inhibición de la entrada de calcio redujo la alcalinización inducida por PAF. La producción de superóxido fue inhibida por Gö6850, EGTA, BAPTA-AM y EGTA+BAPTA-AM, no así con SB203580, LY294002 y UO126.

Los resultados sugieren que el aumento de calcio intracelular en neutrófilos de bovino es mayoritariamente debido a la entrada de calcio externo, y que este participa en el aumento de pH inducido por PAF. Por otro lado, PAF activaría la producción de superóxido a través de una vía dependiente de PKC, que no sería controlada por PI3K, ERK1/2 o p38.

3. SUMMARY

The neutrophils fulfill a fundamental role in the inflammatory processes and bacterial infections by means of the generation of superoxide radical, which help the destruction of pathogen. One of the substances that regulates the activity of neutrophils is the platelet-activating factor (PAF) that causes intracellular alkalinization preceded by a light and transitory period of intracellular acidification. The present work evaluated the role of intracellular calcium on changes of intracellular pH and superoxide production in neutrophils of bovine, induced by PAF.

For the study bovine neutrophils was used. The determination of calcium and intracellular pH, were carried by fluorescence, using FURA-2AM probes and BCECF-AM, respectively. For the measurement of superoxide the method of citochrome C reductase in microplate was used.

The mobilization of calcium induced by PAF was reduced by EGTA or BAPTA-AM and totally blocked when EGTA was used BAPTA-AM. The inhibition of the entry of calcium reduced the alkalinization induced by PAF. The superoxide production was inhibited by Gö6850, EGTA, BAPTA-AM and EGTA+BAPTA-AM, but not with SB203580, LY294002 and UO126.

The results suggest that the increase of calcium intracellular in neutrophils of bovine is for the most part due to the entry of external calcium, and participates in the pH increase induced by PAF. On the other hand, PAF seems to activate the superoxide production through a dependent pathway of PKC, and would not be controlled by PI3K, ERK1/2 or p38.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 NEUTRÓFILOS.

El sistema inmune humano, y de los vertebrados en general, consiste en varios órganos y distintos tipos de células, que le permiten al organismo distinguir lo propio y eliminar lo extraño. Las células del sistema inmune incluyen distintas células fagocíticas, organizada en los tejidos linfoides. En los mamíferos existen dos tipos de glóbulos blancos que son considerados profesionales al fagocitar eficientemente: los macrófagos y los neutrófilos (Edwards, 1994). El neutrófilo polimorfonuclear es el principal tipo celular en el sistema mieloide. Este es formado en la médula ósea y migra al torrente sanguíneo, donde permanece por aproximadamente 12 horas antes de llegar a los tejidos. Su vida media es de unos pocos días. (Tizard, 1982). La gran cantidad de ellos que debe ser producida diariamente, indica la importancia de estas células en la protección del huésped contra infecciones.

Los neutrófilos juegan un rol esencial en la defensa del huésped y representan una de las primeras líneas de defensa en contra de los microorganismos potencialmente dañinos (Kaneko y col., 1997; Smith, 1994; Swain y col., 1998). Estas células no se dividen ni se diferencian significativamente una vez que penetran en los tejidos, esto les permite ahorrar energía y tiempo en la diferenciación, de esta forma siempre están preparados para ejercer su función. (Edwards, 1994).

El mecanismo bactericida que utilizan consiste en la fagocitosis de patógenos, generación de radicales superóxido, y descarga de proteínas bactericidas al fagosoma (Babior, 1999; Bokoch, 1995). La producción de superóxido por NADPH oxidasa es esencial para las propiedades bactericidas del neutrófilo (Yamamori y col., 2000).

La fagocitosis es el proceso que reconoce a los agentes infecciosos y los envuelve, separándolos del tejido normal. Una etapa inicial de la fagocitosis es el reconocimiento, por parte de la célula fagocítica, de la partícula a ser fagocitada. Para ello las células fagocíticas poseen 2 grupos de receptores, capaces de reconocer: ligandos propios de los organismos o células a fagocitar (p.e. receptor de manosa) y moléculas que se han unido a ellas y que favorecen la fagocitosis: opsoninas, (Receptores de fragmento Fc de IgG (Fc γ R) e IgA (Fc α R) unido a un dímero de cadena γ , los receptores de complemento y otros receptores) (de Haas y col., 1995; Witthaut y col., 1994).

4.2. FACTOR ACTIVANTE PLAQUETARIO.

PAF está íntimamente implicado en el proceso de inflamación aguda y crónica, produciendo agregación de polimorfonucleares (Edwards, 1994), liberación de leucotrienos y enzimas lisosómicas, generación de superóxido (Goodman y Gilman, 1996), hipotensión, broncoconstricción y aumento de la permeabilidad vascular (Edwards, 1994).

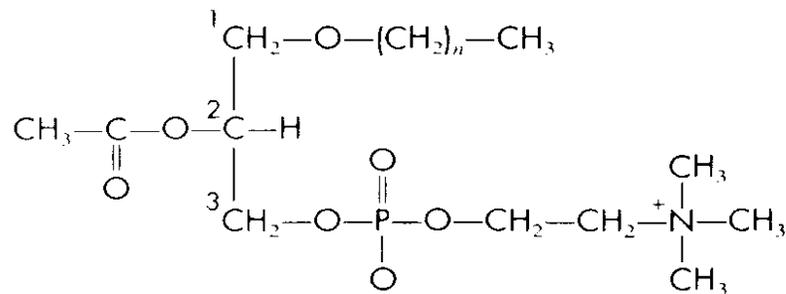


Figura 1. Estructura del factor activante plaquetario (PAF). PAF corresponde a 1-O-alkuil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina. (N = 11 a 17)

Henson en 1971, demostró que los leucocitos secretaban un factor soluble que generaba agregación plaquetaria. Otros investigadores confirmaron las observaciones mencionadas y lo llamaron factor activante plaquetario (Platelet-activating factor o PAF). PAF corresponde a 1-O-alkuil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina (Fig. 1) y su precursor es 1-O-alkuil-2-acil-glicerofosfocolina, lípido que se encuentra en gran concentración en membranas de varios tipos de células (Goodman y Gilman, 1996; Prescott y col., 2000).

PAF es sintetizado a partir de dicho sustrato en dos fases. La primera comprende la acción de la fosfolipasa A₂ con la formación de liso-PAF y un ácido graso libre (ácido araquidónico). En algunas células como los neutrófilos, esta reacción es una fuente importante de ácido araquidónico, el cual es metabolizado hasta dar prostaglandinas y leucotrienos. En una segunda etapa, liso-PAF es acetilado por acetil-CoA para formar PAF (Fig.2). La síntesis de PAF puede ser estimulada durante las reacciones antígeno-anticuerpo o por otras sustancias como agentes quimiotácticos, trombina, colágeno y autocoides (Goodman y Gilman, 1996).

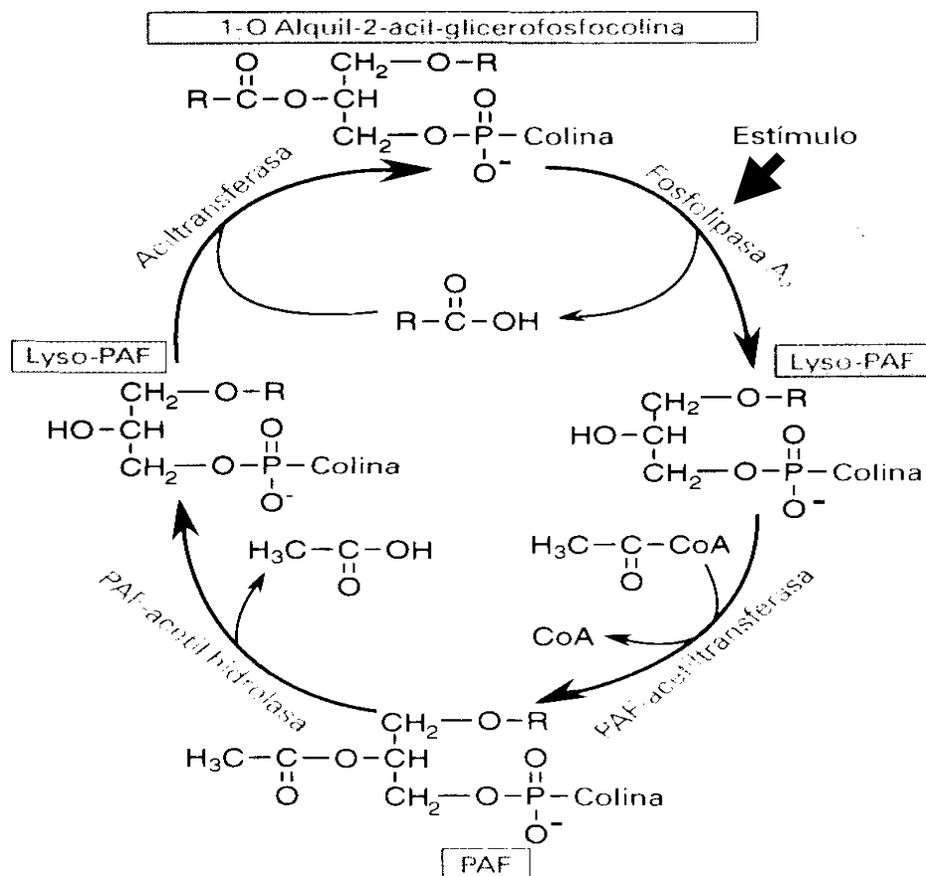


Figura 2. Síntesis y degradación del factor activante plaquetario (PAF).

Los receptores de PAF han sido encontrados en varias células y tejidos, como plaquetas humanas, de conejo y perro, neutrófilos humanos, células musculares lisas de cobayo, tejido hepático humano, células diferenciadas de leucemia humana, leucocitos mononucleares periféricos humanos, cerebro, células de Kúpffer y membrana plasmática de hígado de rata (Snyder, 1990). Estudios en neutrófilos de bovinos, indicaron que estas células expresan sólo un tipo de receptor de PAF, y es probable que este receptor está envuelto en los procesos inflamatorias (Burgos y col, 2004).

En la actividad inflamatoria de los PMN modulada por PAF, el primer paso es la interacción de este con un receptor específico de 7 dominios transmembrana, lo cual luego activa la proteína G heterotrimérica activando señales intracelulares y generando segundos mensajeros que activan la enzima intracelular fosfolipasa C (PLC)-gamma encontrada en la gran mayoría de las células mamíferas que estimula la formación de diacilglicerol (DAG) y inositol trifosfato (IP_3) que induce la elevación de $[Ca^{2+}]_i$ por la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares al citoplasma. El efecto neto de la activación de la enzima PLC-gamma es la fosforilación proteínica intracelular. (Chao y Olson, 1993; Ishii y Shimizu, 2000). Los niveles de Ca^{2+} intra y extracelular regulan la biosíntesis y liberación de PAF. Los aumentos en el Ca^{2+} intracelular puede permitir la síntesis de PAF (pero no la liberación), mientras que el aumento de Ca^{2+} extracelular puede permitir la síntesis y liberación de una manera dosis-dependiente (Edwards, 1994).

4.3 CALCIO.

El calcio como mensajero intracelular en los procesos de comunicación celular, es uno de los más ubicuos y con mayor protagonismo en los procesos de regulación celular.

A pesar de que las células se encuentran sumergidas en elevadas concentraciones de calcio, los niveles del catión que se encuentran en el citosol en forma libre son extremadamente bajos: hay 10000 veces más calcio en el exterior

(10^{-3} M) y en el retículo endoplasmático (ER) que en el interior celular (10^{-7} M). A este elevado gradiente químico se suma el hecho de que el calcio, cargado positivamente, es atraído hacia el interior celular por el ambiente eléctrico negativo que allí predomina. (Flórez, 1997). Cuando una señal abre transitoriamente los canales de calcio en alguna de estas dos membranas (plasmática o ER), el calcio fluye principalmente al citosol, incrementando dramáticamente la concentración local de calcio y activando mecanismos celulares sensibles a calcio.

La entrada de calcio dentro de las células es mostrado en la figura 3 donde muchos agonistas (p.e. PAF) unen a receptores acoplados a proteína G o Tirosina quinasa. Este activa un fosfoinositol específico a través de Fosfolipasa C (PLC), con formación de Diacilglicerol (DAG) y Inositol 1,4,5-trifosfato, pequeña molécula hidrosoluble ($\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ o IP_3) que se origina de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) (Edwards, 1994). $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ difunde rápidamente por todo el citosol y se une al receptor de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ($\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3\text{R}$) en la membrana del retículo endoplasmático similar a los canales de liberación de calcio (receptores de rianodina del retículo sarcoplásmico de las células musculares, que desencadena el proceso de contracción muscular, que tiene cuatro residuos de cisteína y es un tetrámero de 4 subunidades), con estimulación de la liberación de calcio desde los depósitos internos, regulado por retroalimentación positiva, permitiendo que el calcio liberado puede unirse a los canales, incrementando aun más la liberación. $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ es metabolizado a Inositol 1,4-bifosfato ($\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$) por 5'fosfatasa ($\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$), o a Inositol 1,3,4,5-tetraquisfosfato ($\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$) por 3'quinasa sensible a calcio. Sobre la liberación de calcio hacia el

exterior este es regulado por: canales operados por depósitos (SOCC), canales operados por voltaje (VOCC) y canales operados por un receptor (ROCC) (Berridge y col., 2000).

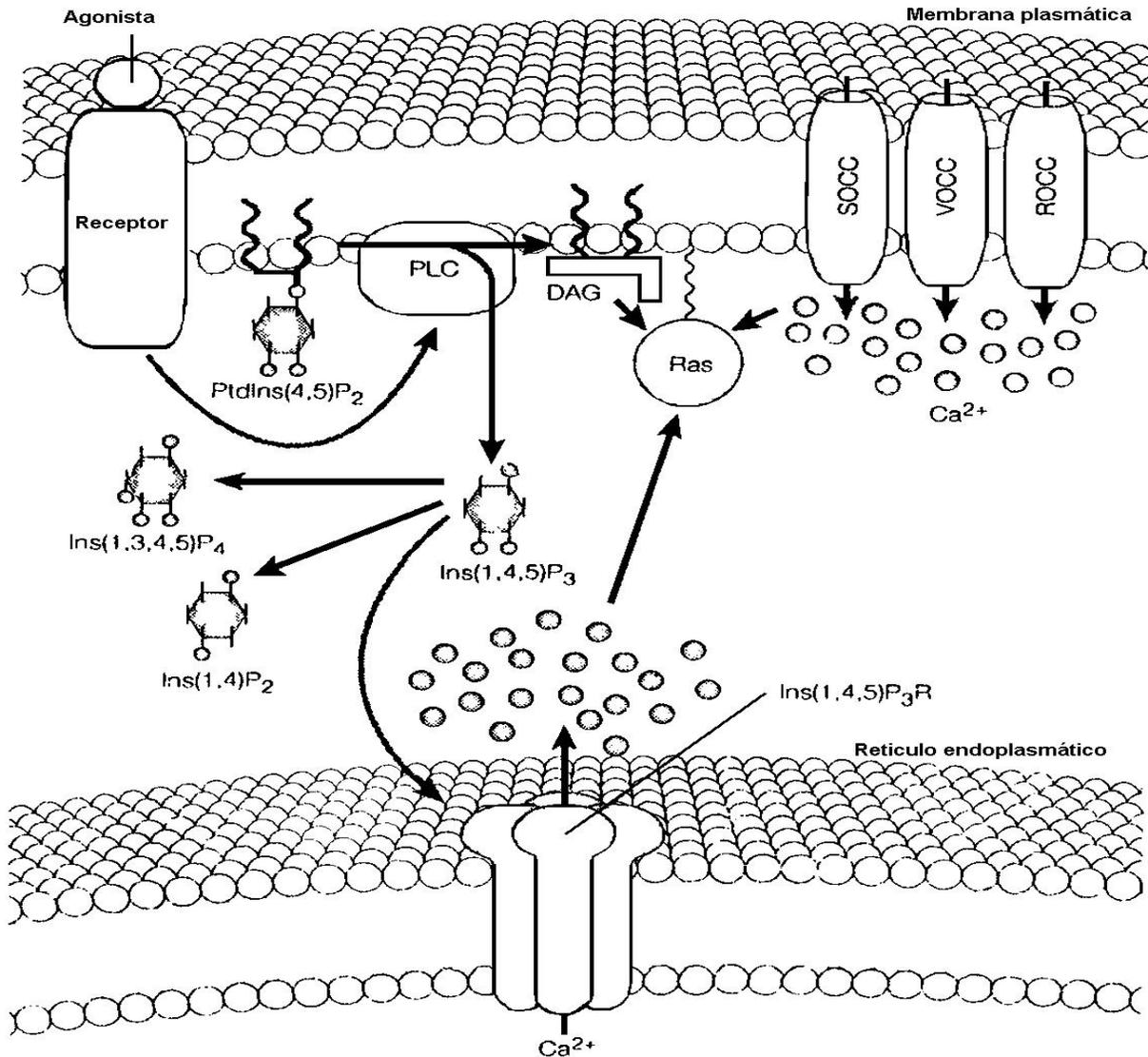


Figura 3. Resumen de la generación de calcio por vías mediadas por receptor. La entrada de calcio dentro de las células es controlado por varios mecanismos, incluyendo los canales operados por voltaje (VOCC), canales operados por un receptor

que abre en respuesta a un ligando extracelular (ROCC), y canales operados por depósitos que abren después del vaciamiento de los depósitos de calcio interno (SOCC).

Varias líneas de evidencia independiente apuntan a un rol del Ca^{2+} en la activación de la NADPH oxidasa por algunos agonistas: Aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular a menudo anteceden a la activación de oxidantes (Granfeldt y col., 2002). La activación de la oxidasa por agonistas tales como PMA ocurre en ausencia de aumentos de Ca^{2+} intracelular. Así DAG es generado en cantidades suficientemente altas para activar la proteína quinasa C, y a la oxidasa (Karlsson y col., 2000). Por esto, se sugiere que el aumento de Ca^{2+} intracelular no es requerido directamente para activar el estallido respiratorio, pero estaría involucrado en la activación de enzimas o procesos requeridos para la activación de oxidasa (Edwards, 1994).

4.4 pH INTRACELULAR.

El pH intracelular afecta las funciones del neutrófilo, aunque su regulación no esta completamente entendida. El balance entre el protón cargado en el citosol y su expulsión es importante porque puede influir en las funciones del neutrófilo (Coakley y col., 2002).

Cuando el neutrófilo normal es activado con PMA se produce un cambio bifásico en el $\text{pH}_{(i)}$ con una pequeña acidificación inicial seguida de una recuperación

prolongada del $\text{pH}_{(i)}$, ocasionalmente excediendo los niveles alcalinos. Un intercambiador que cambia Na^+ extracelular por H^+ intracelulares juega un rol esencial en la regulación del $\text{pH}_{(i)}$ en la mayoría de las células mamíferas (Nanda y col., 1992). En el caso de PAF este es conocido por causar cambios en el pH en los microambientes dentro y fuera de las células polimorfonucleares (PMN) (Naccache y col., 1986; Gronert y col., 1998). En particular, la alcalinización a sido relacionada a quimiotaxis, degranulación y generación de radicales libres. (Simchowitz, 1985; Simchowitz y Cragoe, 1986; Wright y col., 1988; Gewirtz y col., 1998) y es dependiente de NADPH oxidasa (Grinstein y col., 1986).

El exceso de protones generados por la reacción $2\text{O}_2^- + \text{H}^+ + \text{NADP}^+$, dependiente de la activación de NADPH oxidasa, produce una acidificación intracelular transitoria. Esta es revertida principalmente por la activación de un intercambiador de Na^+/H^+ (NHE), hasta generar una alcalinización intracelular (Putney y col., 2002). La acidificación extracelular y alcalinización intracelular son claves en el proceso de quimiotaxis, aumentan la vida media del neutrófilo, favorecen la liberación de superóxido, y de metabolitos derivados de lipoxigenasa, lo que finalmente ayuda a intensificar la respuesta inflamatoria aguda. El flujo de protones en la membrana plasmática está regulado por varias familias de intercambiadores de iones, incluyendo los intercambiadores Na^+/H^+ (NHEs) (Putney y col., 2002).

4.5. NHE, INTERCAMBIADOR Na^+/H^+ .

Los intercambiadores Na^+/H^+ (NHEs), son una familia de proteínas que regulan el flujo de protones en la membrana plasmática. Se han identificado hasta ahora, seis miembros de la familia NHE. NHE1, NHE2, NHE3, NHE4 y NHE5 que comparten aproximadamente del 34 al 60% de su identidad aminoacídica. NHE1 juega un rol importante en el pH intracelular y homeostasis, su actividad está regulada por diversas clases de receptores de superficie celular, incluyendo receptor tirosina quinasa, receptores acoplados a proteína G, y receptores integrina (Krump y col., 1997; Putney y col., 2002).

En cambio, NHE2, NHE3, NHE4 y NHE5 tienen una distribución en los tejidos más limitada y tienen una función más especializada. NHE2 y NHE4 son expresadas predominantemente en el riñón y tracto gastrointestinal, donde únicamente se encuentra función de NHE2 primariamente en la reabsorción de sodio, y puede actuar en coordinación con NHE4, promoviendo la osmoregulación renal de células medulares. NHE3 está específicamente apuntada para la membrana apical del epitelio tubular renal proximal y el borde cepillo del epitelio intestinal maduro (Putney y col., 2002). En el riñón, NHE3 es importante en la reabsorción de Na^+ y HCO_3^- , lo cual contribuye significativamente para mantener la osmolaridad sanguínea y el balance ácido base. NHE5 es expresada predominantemente en el cerebro y se piensa es importante en la regulación del $\text{pH}_{(i)}$ en neuronas. El más reciente miembro de la familia NHE identificado, NHE6, es el más divergente en secuencia, compartiendo solo el 20% de

identidad con las otras isoformas. NHE6 se localiza exclusivamente en la mitocondria, con una gran expresión en tejidos metabólicos, tales como corazón, cerebro y músculo esquelético (Haworth y col., 2003; Putney y col., 2002).

Distintos factores quimiotacticos pueden activar el intercambiador Na^+/H^+ sensible a amilorida (NHE), COMO N-formilmetionina-leucil-fenilalanina (fMLP), LTB4 y C5a (Simchowitz, 1985).

4.6 PRODUCCION DE SUPEROXIDO Y NADPH

Una vez fagocitados los microorganismos, éstos son destruidos por mecanismos dependientes e independientes del oxígeno, también denominados mecanismos oxidativos (HOCl , H_2O_2 , O_2^- , etc.) y no oxidativos (pH ácido, lisozima, lactoferrina, defensinas, etc.), respectivamente. En 1960 se propuso y se demostró experimentalmente que H_2O_2 fue generado durante la fagocitosis; por lo tanto, esto sugirió que el estallido respiratorio era requerido para la generación de metabolitos derivados del oxígeno, involucrados en la destrucción de patógenos. Se calculo que todo el oxígeno extra consumido durante el estallido respiratorio era convertido a O_2^- , y después convertido a H_2O_2 , importante en la destrucción de patógenos (Edwards, 1994).

Durante la fagocitosis, proceso dependiente de energía, se produce un aumento del consumo de oxígeno que depende de la oxidación de la glucosa y de la producción de metabolitos del oxígeno. La generación de estos últimos se debe a la activación de

NADPH oxidasa, que al oxidar NADPH reduce el oxígeno molecular a ión superóxido (O_2^-), el que se convierte en peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (Edwards, 1994) (Fig. 4).

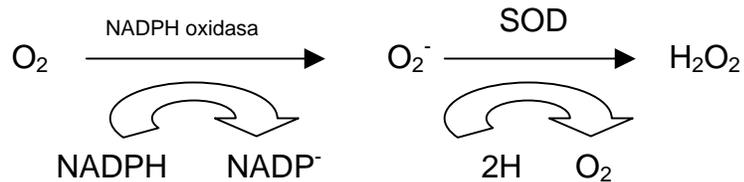


Figura 4. Mecanismos microbicidas oxidativos. Una oxidasa cataliza la reducción de oxígeno a ión superóxido. El O_2^- es transformado a H_2O_2 y O_2 por la superóxido dismutasa (SOD).

La oxidasa dependiente de NADPH, es una enzima de múltiples componentes que consiste en al menos dos proteínas de membrana (de dos tipos de gránulos: vesículas secretoras y gránulos secundarios) y tres proteínas citosólicas, cuando la célula está en reposo (Dahlgren y col., 1999). El componente de membrana es un heterodímero formado por una proteína de 91 kDa (gp91phox) y una proteína de 22 kDa (p22phox). Estas proteínas, junto con flavin adenin dinucleótido (FAD) forman un flavocitocromo denominado citocromo b_{558} . Adicionalmente en la membrana participa una proteína de unión de nucleótidos de guanina denominado rap 1. La subunidad de 91 kDa presenta el sitio de unión para el NADPH. Ambas subunidades presentan grupos HEME. El componente citoplasmático está formado por tres proteínas independientes: p40phox, p47phox y p67phox. Además participa otra proteína de unión de nucleótidos de guanina, rac 2; en reposo una GDP y cuando la célula es activada una GTP. En células en reposo, la oxidasa inactiva y sus componentes permanecen

separados entre la membrana y el citosol. Cuando se exponen los neutrófilos a estímulos apropiados la NADPH oxidasa es activada por asociación de estos componentes en la membrana plasmática seguida por producción de superóxido (Inanami y col. 1998) (Fig. 5).

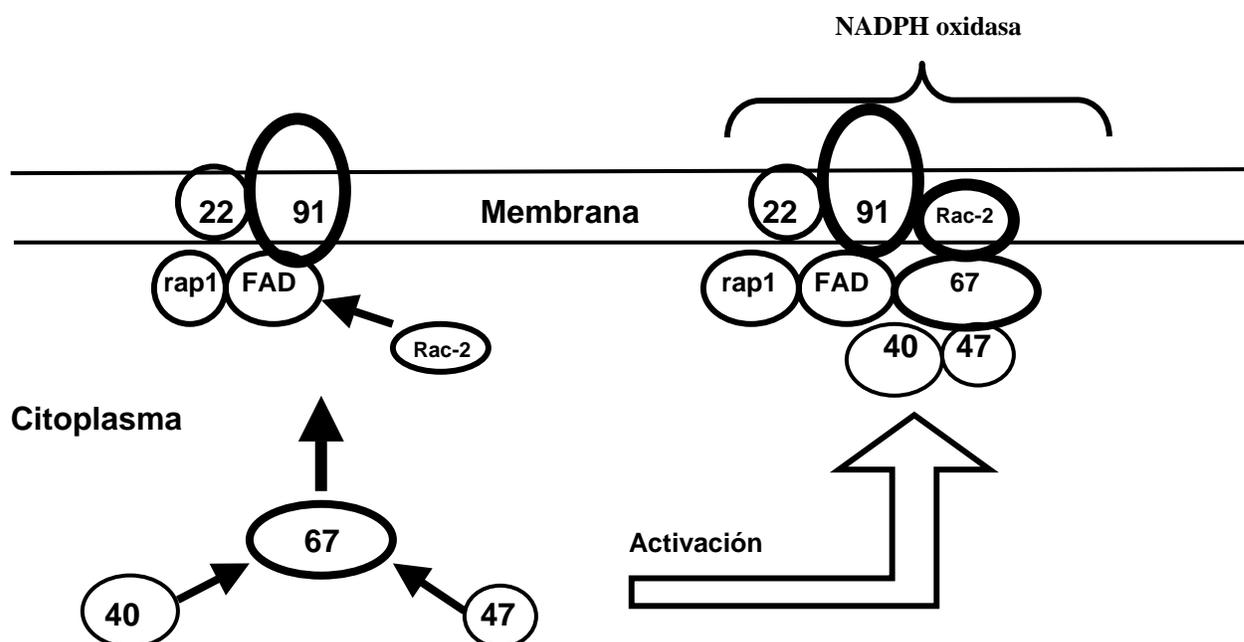


Figura 5. NADPH oxidasa. La oxidasa dependiente NADPH está formada por proteínas de membrana (gp91phox y p22phox), unidas a flavin adenin dinucleótido (FAD) y a proteínas citosólicas (p40phox, p47phox, p67phox y Rac 2). Estas últimas se translocan a la membrana cuando el neutrófilo es activado.

Las vías de señalización p38, ERK1/2 MAPK y PI3K participan en la activación de la NADPH oxidasa con producción de superóxido y en la fagocitosis, mientras que la PKC solo participa en la activación de la NADPH oxidasa en neutrófilos de bovino (Yamamori y col., 2000).

4.7 HIPOTESIS DE TRABAJO.

El aumento de calcio intracelular en neutrófilos de bovino, inducido por PAF, genera aumento de pH intracelular y a su vez esta relacionado con la producción de superóxido.

4.8 OBJETIVO GENERAL.

Demostrar la participación de calcio en el aumento de pH y su relación con la generación de superóxido en neutrófilos de bovino, inducido por PAF.

4.9 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

4.9.1 Evaluar el rol del calcio intracelular en los cambios de pH inducido por PAF.

4.9.2 Evaluar el rol de PKC en el aumento de superóxido inducido por PAF.

4.9.3 Evaluar el rol de PI3K en el aumento de superóxido inducido por PAF.

4.9.4 Evaluar el rol de MEK1/2 en el aumento de superóxido inducido por PAF.

4.9.5 Evaluar el rol de MAPK p38 en el aumento de superóxido inducido por PAF.

4.9.6 Evaluar el rol del calcio intracelular en el aumento de superóxido inducido

por PAF.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 MATERIALES.

5.1.1 EXTRACCIÓN DE SANGRE:

- Agujas Vacutainer^R 21 G1¹/₂.
- Tubos al vacío Vacutainer^R de 8,5 ml con 1,5 ml de anticoagulante (Solución de citrato de sodio dextrosa).
- Guantes de látex y algodón con alcohol.

5.1.2 AISLAMIENTO DE NEUTRÓFILOS:

- Tubos Falcon^R de 15 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Pipetas automáticas BOECO^R de 1 ml, 200 µl, 50 µl, 10 µl.
- Centrífuga Mikro 22 R Hettich^R.
- Cámara de Neubauer.
- Microscopio óptico Motic^R.
- Sales: fosfato de potasio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, d-glucosa, fosfato monosódico de Merck^R.
- Balanza analítica de Scientech^R.

5.1.3 ENSAYOS DE MEDICIÓN DE MOVILIZACIÓN DE CALCIO:

- PAF (Factor activante plaquetario) de Calbiochem^R.
- Etanol de Merck^R.
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml.
- Pipetas automáticas BOECO^R de 1 ml, 200 µl, 50 µl, 10 µl.
- Baño termoregulado Memmert^R.
- Balanza analítica de Scientech^R.
- FURA-2AM de Calbiochem^R.
- Vortex V-1 de BOECO^R.
- DMSO de Merck^R.
- BAPTA-AM de Calbiochem^R.
- EGTA de Sigma^R.
- Espectrofluorímetro LS55 Perkin Elmer.
- Incubadora Memmert.

5.1.4 ENSAYOS DE MEDICIÓN DE PH INTRACELULAR:

- PAF (factor activante plaquetario) de Calbiochem^R.
- Etanol de Merck^R.
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml.
- Pipetas automáticas BOECO^R de 1 ml, 200 µl, 50 µl, 10 µl.
- Baño termoregulado Memmert^R.

- Balanza analítica de Scientech^R.
- Vortex V-1 de BOECO^R.
- BCECF-AM de Molecular probes^R.
- BAPTA-AM de Calbiochem^R.
- EGTA de Sigma^R.
- Espectrofluorímetro LS55 Perkin Elmer.
- Incubadora Memmert.

5.1.5 ENSAYOS DE MEDICIÓN DE SUPERÓXIDO:

- PAF (factor activante plaquetario) de Calbiochem^R.
- Balanza analítica de Scientech^R.
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml.
- Vortex V-1 de BOECO^R.
- Pipetas automáticas BOECO^R de 200 µl, 50 µl, 20 µl, 10 µl.
- Baño termoregulado Memmert^R.
- Microplaca de 96 posillos fondo plano de Falcon^R.
- Lector de ELISA de Sunrise Tecan^R.
- Citocromo C de Sigma^R.
- SOD de Sigma^R.
- Gö6850 de Calbiochem^R.
- LY294002 de Promega^R.
- UO126 de Promega^R.

- SB203580 de Calbiochem^R.
- BAPTA-AM de Calbiochem^R.
- EGTA de Sigma^R.

5.2 METODOS

5.2.1 AISLAMIENTO DE NEUTROFILOS DE BOVINO.

Los neutrófilos de bovino se obtuvieron según el procedimiento utilizado por Roth y Kaeberle (1981) con algunas modificaciones.

Se utilizaron bovinos Frisón Negro de 4 a 9 años de edad del Hospital del Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias y Fundo Vista Alegre, ambos predios pertenecientes a la Universidad Austral de Chile. La sangre se obtuvo por punción de la vena yugular utilizando tubos al vacío de 9 ml que contienen citrato de sodio (Vacutainer^R). La muestra de sangre se centrifugó a 1.000 x g por 15 minutos. Se eliminó el plasma y capa flogística con pipeta Pasteur y se completó con medio HBSS (Hanks balanced salt solution o solución salina de Hanks, que contiene 0,0004 M de fosfato de potasio; 0,00034 M de fosfato de sodio; 0,13 M de cloruro de sodio; 8,02 M de d-glucosa y 0,0053 M de cloruro de potasio). Se resuspendió el contenido figurado utilizando una pipeta Pasteur y se traspasó a un tubo Falcon de 15 ml. Se realizó el mismo método de centrifugación y luego de eliminar el plasma y capa flogística, se aplicaron 2 volúmenes de medio de lisis (que contiene 0,0048 M de fosfato monosódico y 0,0084 M de fosfato

dipotásico) por un minuto, homogenizando. Luego se agregó 1 volumen de medio hipertónico (que contiene 0,0048 M de fosfato monosódico, 0,0084 M de fosfato dipotásico y 0,43 M de cloruro de sodio), se completó con medio HBSS y se centrifugó a 600 x g por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1 ml de medio HBSS; se agregó 2 ml de medio de lisis por 1 minuto; se aplicó 1 ml de medio hipertónico; se completó con medio HBSS y se homogenizó. Se realizó una segunda centrifugación a 600 x g por 10 minutos. Se lavaron los neutrófilos precipitados dos veces con medio HBSS y se resuspendió en 5 ml de HBSS. A continuación se estimó la viabilidad con azul de tripán 0,5% en PBS y se cuantificaron los neutrófilos. Ambas estimaciones se realizaron con microscopio óptico utilizando cámara de Neubauer. Los ensayos se realizaron con una viabilidad sobre el 95%. Para determinar el porcentaje de los neutrófilos presentes después del aislamiento se utilizó la tinción de Giemsa, haciendo un frotis por "cytopspin".

5.2.2 PREINCUBACION DE NEUTRÓFILOS CON FURA-2AM.

20×10^6 /ml neutrófilos fueron resuspendidos en un buffer HBSS (0.4 mM KH_2PO_4 , 0.3 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 6 mM Glucosa, 5.04 mM KCL, pH 7.4) e incubados con FURA2-AM (2 μM) por 30 min. a 37 °C. Las células fueron lavadas tres veces y resuspendidas a 2×10^6 /ml con buffer HBSS/ Ca^{2+} (0.9 mM).

5.2.2.1 EVALUACIÓN DE LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO INDUCIDO POR PAF, MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE LA ENTRADA DE CALCIO EXTERNO CON EGTA Y DE CALCIO INTERNO CON BAPTA-AM, EN NEUTRÓFILOS DE BOVINO.

Aproximadamente 4 millones de células en 2 ml de HBSS, fueron depositadas en cubetas de cuarzo, e incubadas con EGTA 0.3 mM o BAPTA-AM 50 μ M por 10 minutos, las mediciones de la movilización de calcio intracelular se realizaron con un espectrofluorímetro, con agitación magnética, a 37°C, utilizando una excitación de 340 nm - 380 nm y emisión a 509 nm. Luego de obtener los registros basales de fluorescencia durante 100 segundos, se agregó 20 μ l de PAF 100 nM en experimentos individuales. Se utilizó como control DMSO.

5.2.3 PREINCUBACIÓN DE NEUTRÓFILOS CON BCECF- AM.

En una concentración aproximadamente de 20×10^6 /ml los neutrófilos fueron resuspendidos en un buffer pH (140 mM NaCl, 10 mM Glucosa, 1 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM Hepes, pH 7.2) e incubados con BCECF-AM (2 μ M) por 30 min. a 37 ° C. Las células fueron lavadas tres veces con buffer pH y resuspendidas a 2×10^6 / ml.

5.2.3.1. EVALUACIÓN DEL CAMBIO DE $pH_{(i)}$ INDUCIDO POR PAF, INHIBIENDO LA ENTRADA DE CALCIO EXTERNO CON EGTA Y DE CALCIO INTERNO CON BAPTA-AM, EN NEUTRÓFILOS DE BOVINO.

4 millones de células en 2 ml de HBSS, fueron depositadas en cubetas de cuarzo, e incubadas con EGTA 0.3 mM o BAPTA-AM 50 μ M por 10 minutos, las mediciones de pH intracelular se realizaron con un espectrofluorímetro, con agitación magnética, a 37° C, utilizando una excitación de 440 nm - 495 nm y emisión a 535 nm. Luego de obtener los registros basales de fluorescencia durante 100 segundos, se agregó 20 μ l de PAF 100 nM en experimentos individuales. Se utilizó como control DMSO.

5.2.4. MEDICIÓN DE SUPERÓXIDO POR EL MÉTODO DE CITOCROMO C REDUCTASA EN MICROPLACAS:

Este método se basa en el protocolo descrito por Edgar Pick (1986), con algunas modificaciones.

Las células (0,4 millones/por pocillo), fueron incubadas en HBSS por 60 minutos a 37° C, en presencia de citocromo c (200 μ M).

Algunos pocillos fueron estimulados con PAF (100 nM), en presencia y/o ausencia de SOD (90 UI/ml).

Un grupo de células fueron preincubada por 10 minutos a 37° C con los inhibidores Gö6850 (0,5 μ M), LY294002 (30 y 3 μ M), UO126 (1 y 0,1 μ M), SB203580 (20 μ M), BAPTA-AM (50 μ M) y posteriormente fue estimulada con PAF 100 nM.

La contribución de calcio extracelular en células estimuladas con PAF fue evaluado, incubando células en HBSS/Ca²⁺ y/o HBSS/EGTA 5 mM (libre de calcio).

5.2.5. ANALISIS ESTADISTICO.

Para evaluar las diferencias estadísticas se realizó un análisis de varianza de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Tukey, el nivel de significancia usado fue del 5 %. Los resultados fueron expresados como media aritmética \pm su error típico. Para todos los análisis se utilizó el programa software GraphPad Prism versión 3.0.

6. RESULTADOS

6.1. EVALUACIÓN DEL AUMENTO DE CALCIO INTRACELULAR INDUCIDO POR PAF EN NEUTRÓFILOS DE BOVINO.

Al medir la movilización de calcio inducida con PAF (100 nM) a los 100 segundos en neutrófilos de bovino marcadas con FURA2-AM, se observó un alza rápida de calcio citosólico (Fig. 6a). Los resultados muestran que al agregar EGTA o BAPTA-AM se redujo la liberación de calcio y cuando se usó EGTA más BAPTA-AM fue completamente bloqueado (fig. 6).

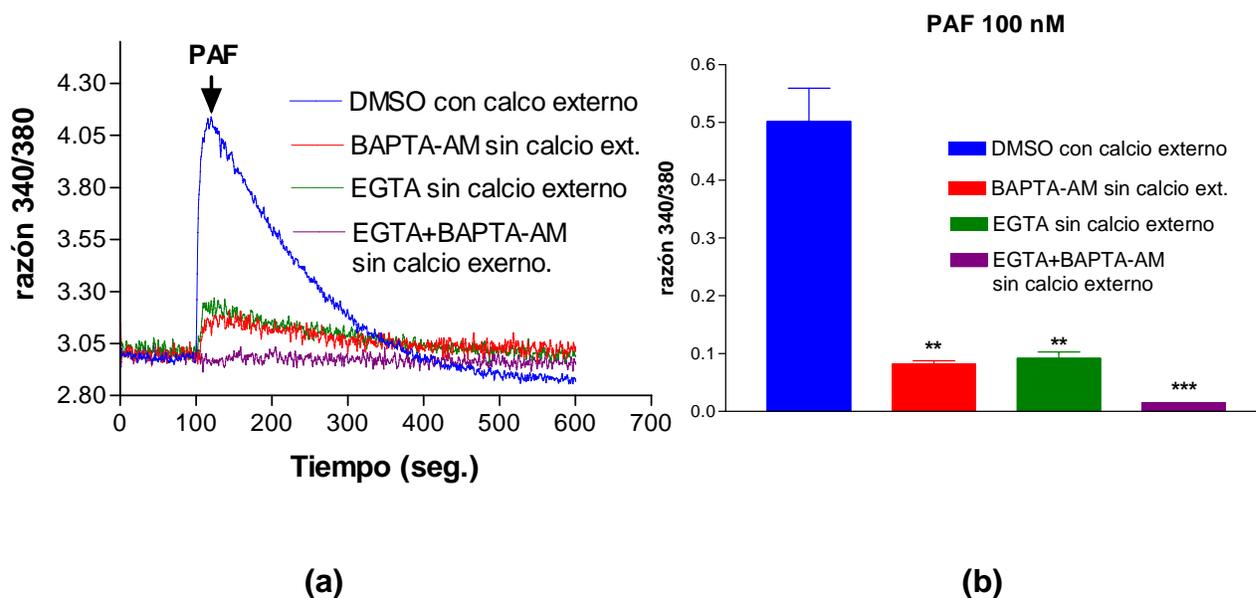


Figura 6. (a) Registro representativo de la movilización de calcio intracelular inducida por PAF 100 nM en el tiempo, y el efecto de quelantes de calcio intracelular (BAPTA-AM, 50 μ M) y extracelular (EGTA, 0.3 mM), monitoreado fluorimétricamente, en neutrófilos marcados con FURA-2AM. (b) Cada barra representa el promedio \pm error

estándar, n = al menos 3 experimentos independientes, ** p < 0.01, *** p < 0.001 comparado con el control.

6.2. EFECTO DE CALCIO SOBRE EL pH, INDUCIDO POR PAF EN NEUTRÓFILOS DE BOVINO.

El efecto de calcio sobre el $\text{pH}_{(i)}$ inducido por PAF (100 nM) fue medido como se muestra en el ejemplo de la figura 7, midiendo la diferencia de la acidificación y de la alcalinización, como indican los paréntesis en la representación grafica y en las barras.

En la figura 8 se observa que PAF causa alcalinización intracelular precedida por un período leve y transitorio de acidificación intracelular en un medio con calcio externo a diferencia de lo que ocurre en un medio libre de calcio externo donde no se observa alcalinización intracelular, pero si acidificación intracelular.

Se muestra en la figura 9 el efecto de calcio sobre la alcalinización y acidificación inducida por PAF (100 nM) e inhibida por quelantes de calcio extracelular (EGTA 0.3 mM) e intracelular (BAPTA-AM 50 μM). La inhibición de la entrada de calcio redujo la alcalinización inducida por PAF.

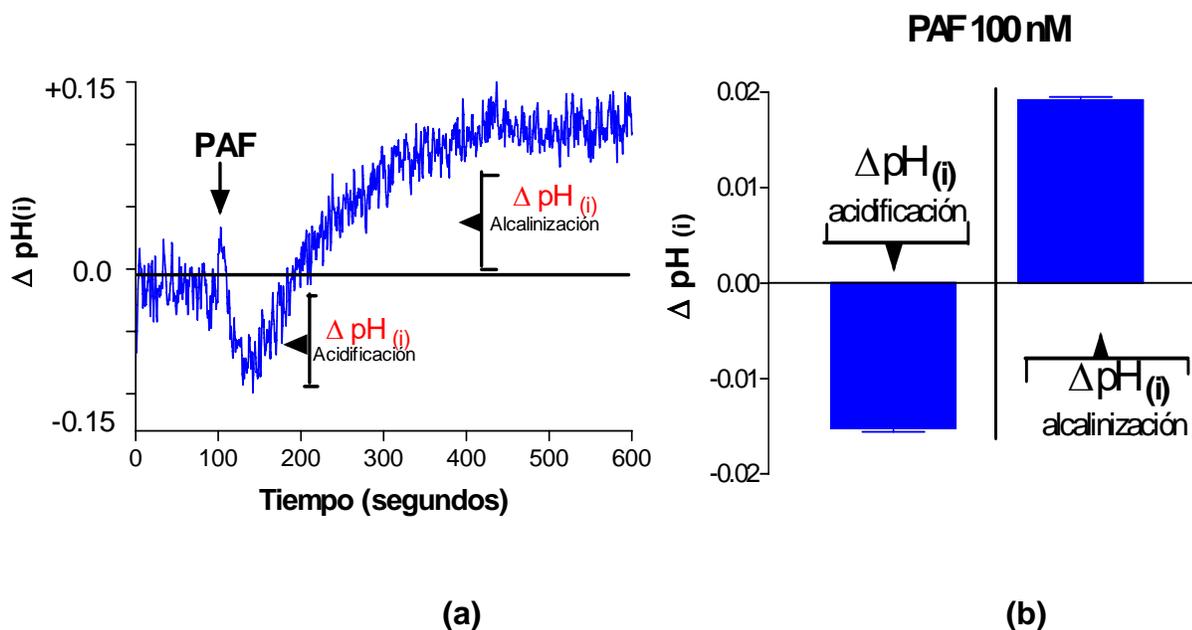
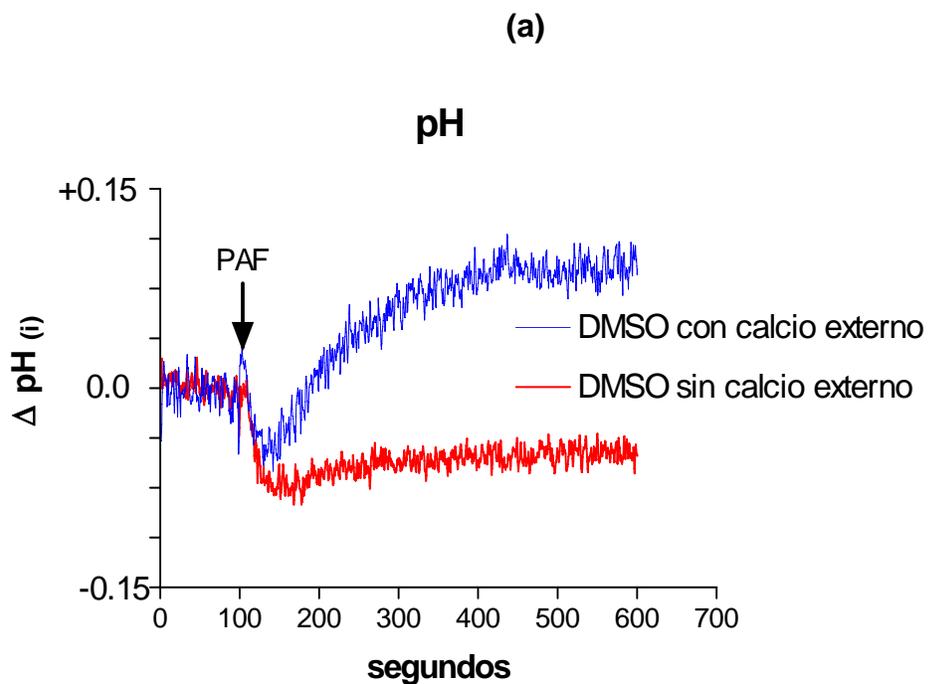


Figura 7. Medición de $\text{pH}_{(i)}$ en neutrófilos de bovino inducido por PAF 100nM. **(a)** Representación gráfica de la diferencia de $\text{pH}_{(i)}$. **(b)** En el grafico de barra se representa la acidificación con datos negativos, en cambio la alcalinización se representa con datos positivos, $n =$ al menos 3 experimentos independientes.



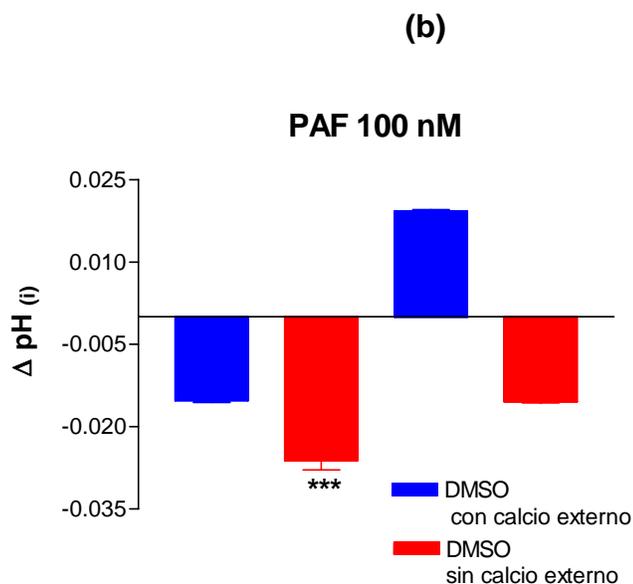
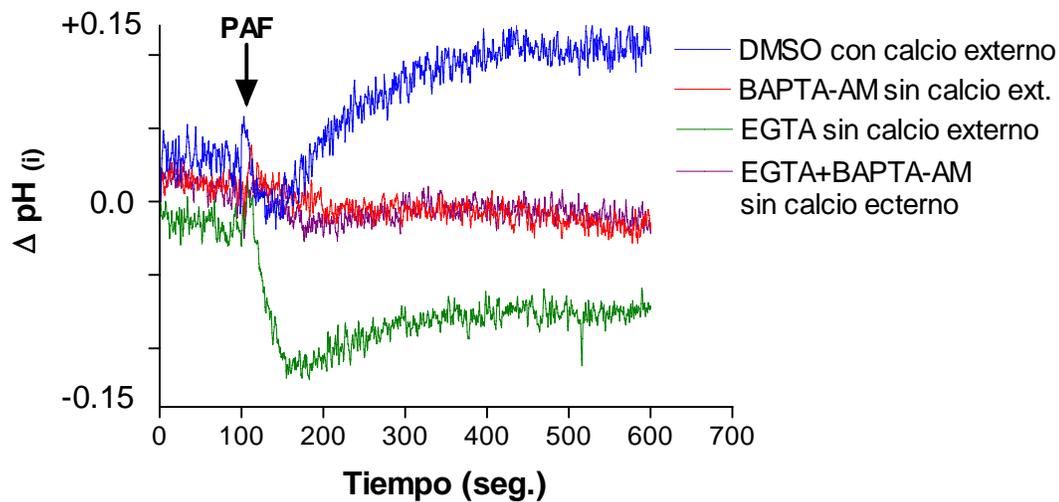


Figura 8. Medición de $\text{pH}_{(i)}$ en neutrófilos de bovino inducido por PAF 100 nM. **(a)** Representación gráfica de la diferencia de $\text{pH}_{(i)}$, en un medio con calcio externo (azul) así como en un medio sin calcio externo (rojo). **(b)** Cada barra representa el promedio \pm error estándar, $n =$ al menos 3 experimentos independientes, *** $p < 0.001$ comparado con el control.



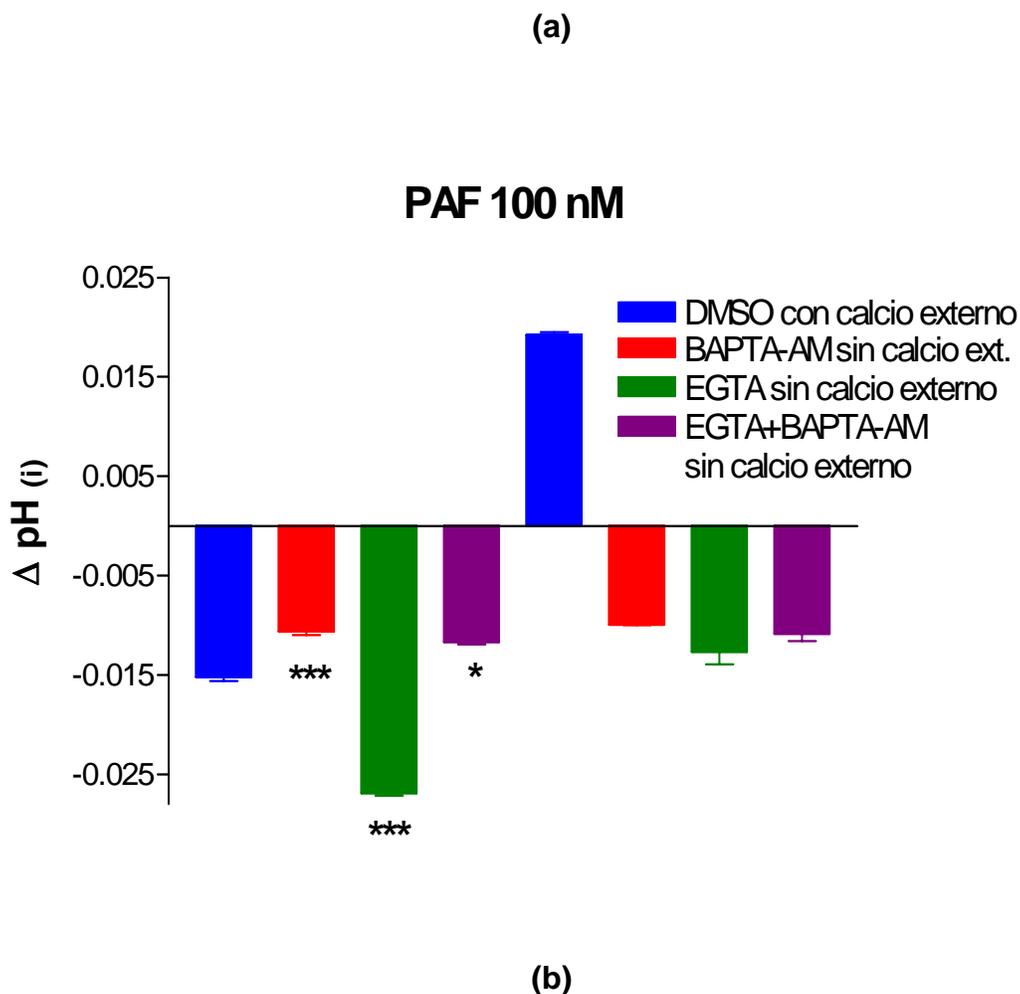


Figura 9. (a) Cambio de pH intracelular inducida por PAF 100 nM en el tiempo y el efecto de BAPTA-AM 50 μ M y EGTA 0.3 mM, monitoreado fluorimétricamente, en neutrófilos marcados con BCECF-AM. **(b)** Efecto de BAPTA-AM y EGTA sobre la acidificación y alcalinización, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes, * p < 0.05, *** p < 0.001 comparado con el control (DMSO con calcio externo).

6.3. EFECTO DE CALCIO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE SUPERÓXIDO, INDUCIDO POR PAF EN NEUTRÓFILOS DE BOVINO.

El incremento de superóxido inducido por PAF (100 nM) fue analizado como se observa en la fig. 10, usando quelantes de calcio extracelular (EGTA, 5 mM) y intracelular (BAPTA-AM, 50 μ M), También se usó un inhibidor específico de PKC (Gö6850), PI3K (LY294002), ERK1/2 (UO126) y de MAPK p38 (SB203580) para evaluar las vías de traducción involucradas (fig.11). Los resultados obtenidos indican que 100 nM de PAF activa la producción de superóxido en polimorfonucleares y que esta producción de superóxido fue inhibida por Gö6850, EGTA, BAPTA-AM y EGTA+BAPTA-AM, observada a través de la reducción de citocromo C, no así con SB203580, LY294002 y UO126.

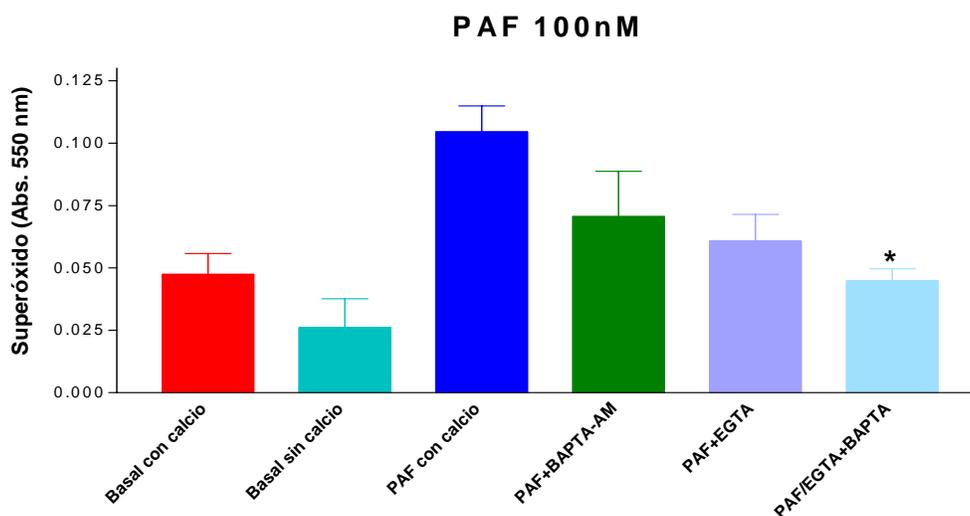


Figura 10. Efecto de los quelantes de calcio intracelular (BAPTA-AM, 50 μ M) y extracelular (EGTA, 5 mM) y una combinación de BAPTA-AM + EGTA sobre la producción de superóxido inducida por PAF 100nM. Cada barra representa el promedio

± error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes, * p < 0.05, comparado con el control (PAF con calcio, en azul).

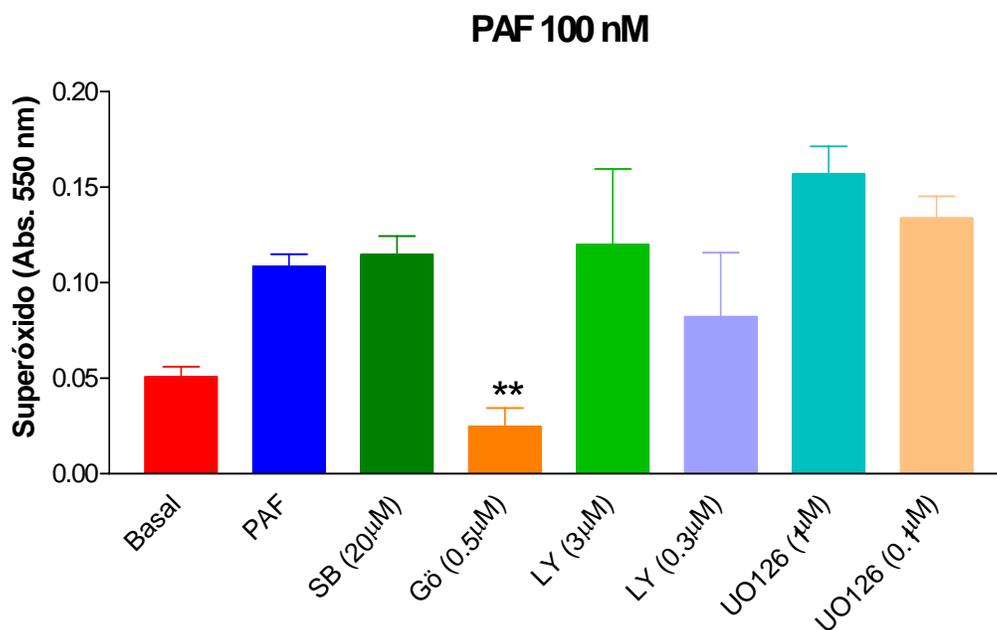


Figura 11. Efecto de los inhibidores específicos de PKC (Gö6850, 0.5 µM), PI3K (LY294002, 0.3-3 µM), p38 (SB203580, 20 µM) y ERK1/2 (UO126, 1-0.1 µM) sobre la producción de superóxido en neutrófilos de bovino inducidos por PAF 100nM. Cada barra representa el promedio ± error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes, ** p < 0.01, comparado con el control (PAF, en azul).

7. DISCUSIÓN

Los resultados claramente muestran que 100 nM de PAF causan un incremento significativo en la movilización de calcio intracelular, medida en células marcadas con FURA2-AM (Fig. 6). Se sabe que PAF y FMLP causan un alza rápido de los niveles de Ca^{2+} citosólico, y estos cambios de Ca^{2+} son necesarios para la quimiotaxis, fosforilación de proteína tirosina, liberación de gránulos secretorios, síntesis de mediadores proinflamatorios y en el caso de FMLP activación del ensamblaje de NADPH oxidasa (Elzi y col., 2001). Estos eventos son el resultado de la liberación de calcio de los depósitos intracelulares (calciosomas), de la entrada de calcio, o de ambos (Berridge y col., 2000). PAF activa los canales de calcio operados por receptor sugiriendo que la entrada de calcio es importante para la activación máxima de los PMN, un fenómeno atribuido al llamado depósito operado por entrada de calcio (SOCC) (Elzi y col., 1997). Se observó además en este trabajo que la movilización de calcio inducida por PAF fue inhibida con EGTA 5 mM o BAPTA-AM 50 μM y cuando se usó EGTA más BAPTA-AM fue completamente bloqueada, al inhibir tanto el calcio interno como externo (Fig.6), siendo más importante el pool de calcio externo.

PAF 100 nM produjo un cambio en el pH intracelular, observándose un incremento significativo en la acidificación intracelular medida en células marcadas con BCECF-AM (Fig. 8), se sabe que PAF es conocido por causar cambios en el pH en los microambientes dentro y fuera de las células polimorfonucleares (PMN) (Naccache y col., 1986). La acidificación extracelular y alcalinización intracelular son claves en el

proceso de quimiotaxis, aumentan la vida media del neutrófilo, favorecen la liberación de superóxido, y de metabolitos derivados de lipoxigenasa, lo que finalmente ayuda a intensificar la respuesta inflamatoria aguda (Putney y col., 2002). El exceso de protones generados por la reacción $2O_2^- + H^+ + NADP^+$, dependiente de la activación de NADPH oxidasa, produce una acidificación intracelular transitoria. Esta es revertida principalmente por la activación de un intercambiador de Na^+/H^+ (NHE), sensible a amilorida y que es activado por ERK 1/2 (Hidalgo y col., 2004), hasta generar una alcalinización intracelular.

En la figura 8 se evidencia que es posible que para la producción de protones inducida por PAF, no participe la NADPH oxidasa ($NADPH + 2O_2 \rightarrow 2O_2^- + NADP^+ + H^+$), esto se observa al ver que la acidificación no se ve afectada en un ambiente libre de calcio externo, esto hace pensar que el H^+ puede provenir de otro lugar, ya sea de la ruta de las pentosas fosfato ($Glucosa\ 6-P + 2\ NADP^+ + 2H_2O \rightarrow Ribosa\ 5-P + 2\ NADPH + 2\ H^+ + CO_2$) o del anhídrido carbónico ($CO_2 + H_2O \rightarrow H^+ + HCO_3^-$) (Edwards, 1994).

Cuando estas células se incubaron en un medio libre de calcio la alcalinización se redujo, y sólo fue inhibida cuando se utilizó EGTA más BAPTA-AM. No así con BAPTA-AM 50 μM o EGTA 5 mM donde la acidificación intracelular no se logro inhibir (Fig 9). En presencia de Ca^{2+} extracelular FMLP produce un aumento en Ca^{2+} libre en todo el citosol. Sin embargo, en ausencia de Ca^{2+} extracelular la estimulación inducida por

FMLP produce un aumento de Ca^{2+} libre citosólico altamente localizado en el retículo endoplasmático, mitocondrias y otras membranas celulares en neutrófilo (Davies y col., 1991). Aunque los neutrófilos tienen un almacén de Ca^{2+} , el cual puede ser liberado por FMLP en la ausencia de Ca^{2+} extracelular, lo cual puede tener una pequeña activación de la oxidasa obtenida bajo estas condiciones, la mayor fuente de Ca^{2+} responsable de la subida de Ca^{2+} citosólico se origina del influjo extracelular (Davies y col., 1991).

En el neutrófilo la NADPH-oxidasa puede ser activada por agonistas de PKC, tales como PMA (phorbol myristate acetate), resultando en la liberación del anión superóxido (Karlsson y col., 2000), sugiriendo una diversidad de vías de transducción de señal que llevan a su activación, tanto de aquellas ligadas a membrana plasmática como a las provenientes de los pools de NADPH oxidasa localizadas en los gránulos respectivamente (Granfeld y col., 2002). PAF 100 nM activó la producción de superóxido en el neutrófilo (Fig. 10 y 11), al igual que PMA que estimula significativamente la producción del anión superóxido sobre PMN (Allard y col., 1999). Los quelantes de calcio extracelular EGTA (5 mM) e intracelular BAPTA-AM (50 μM), produjeron inhibición de la producción de superóxido inducido por PAF en neutrófilos de bovino (Fig. 10). La disminución de la producción de superóxido inducida por FMLP es provocada por la ausencia de calcio extracelular como de la liberación de calcio de los compartimentos intracelulares, y no es restaurado por una subsiguiente adición de calcio, indicando que un influjo de calcio externo es requerido para la iniciación del estallido respiratorio (Valentin y col., 2001), en neutrófilos de bovino estimulados por

PMA se inhibió el incremento de la producción de superóxido con BAPTA-AM (Allard y col., 1999).

La inhibición específica de PKC con Gö6850 (Fig. 11), resultó en una clara inhibición de la generación de superóxido, esto sugiere que entre las vías de control de la generación de superóxido, al interior del neutrófilo, estaría bajo control de PKC. En neutrófilos de bovino estimulados por PMA y usando un inhibidor de PKC, calpostina C se observó un bloqueo de la estimulación del efecto de PMA sobre la producción de superóxido (Allard y col., 1999). PKC fue un factor importante en la activación de NADPH oxidasa en PMN estimulados con zimosan opsonizado (Yamamori y col., 2000).

PAF, por lo tanto, activaría la producción de anión superóxido pero no sería controlada por PI3K, ERK1/2 o p38 ya que al usar LY2940002, UO126 y SB203580, inhibidores de las distintas vías de señalización respectivamente, no se bloqueo la producción de superóxido (Fig. 11). Por otro lado en neutrófilos estimulados con zimosan opsonizado e inhibiendo MAPK p38 con SB20380 se redujo la actividad NADPH oxidasa (Yamamori y col., 2002), teniendo presente que es otro estímulo utilizado.

En resumen la producción de superóxido inducida por PAF fue inhibida por Gö6850, EGTA, BAPTA-AM y EGTA+BAPTA-AM, no así con SB203580, LY294002 y UO126.

En conclusión, los resultados sugieren que el aumento de calcio intracelular $[Ca^{+2}]_i$ inducido por PAF en neutrófilos de bovino es mayoritariamente debido a la entrada de calcio externo, la entrada de calcio podría estar relacionado a TRP que se postula a canal capacitativo (Dutta, 2000). Calcio participa además en el aumento de pH intracelular, siendo el pool de calcio externo importante en la alcalinización y el interno en la acidificación, a través de la vía PI3K-ERK1/2 mediada por el intercambiador Na^+/H^+ sensible a amilorida (Hidalgo y col, 2004). Por otro lado, PAF activaría la producción de superóxido a través de una vía dependiente de PKC, y no sería controlada por PI3K, ERK1/2 o p38.

8. LITERATURA CITADA

ALLARD, B., LONG, L., BLOCK, E. AND ZHAO, X. (1999) Dependence of superoxide anion production on extracellular and intracellular calcium and protein kinase C in PMA-stimulated bovine neutrophils. *Can. J. Vet. Res.* 63, 13-17.

BABIOR, B.M., (1999) NADPH oxidase an update, *Blood* 93, 1464-1476.

BERRIDGE, M. J., LIPP, P. AND BOOTMAN, M.D., (2000) The versatility and universality of Ca²⁺ signalling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 11-21.

BOKOCH, G.M. (1995) Chemoattractant signalling and leukocyte activation. *Blood*, 86, 1649-1660

BURGOS, R.A., HIDALGO M.A., MATTHEI S.A., HERMOSILLA, R., FOLCH, H. AND HANCKE, J.L. Determination of specific receptor sites for platelet activating factor in bovine neutrophils. *Am J Vet Res* 65, 628-636.

CHAO, W. AND OLSON, M.S. (1993) Platelet-activating factor: receptor and signal transduction. *Biochem. J.* 292, 617-629.

COAKLEY, J. R., TAGGART, C., MCELVANEY, G. N. AND O'NEILL, J. S. (2002)

Cytosolic pH and the inflammatory microenvironment modulate cell death in human neutrophils after phagocytosis. *Am. Soc. of Hematol.* 100, 3383-3391.

DAHLGREN, C. AND KARLSSON, A. (2002) Ionomycin-induced neutrophil NADPH

oxidase activity is selectively inhibited by the serine protease inhibitor diisopropyl fluorophosphate. *Antioxid. Redox. Signal.* 4, 17-25.

DAVIES, E. V., HALLETT, M. B. AND CAMPBELL, A. K. (1991) Localized superóxido

release by neutrophils can be provoked by a cytosolic calcium "Cloud". *Immunology.* 73, 228-234

DUTTA, D. (2000) Mechanism of store-operated calcium entry. *J.Biosci.* 25, 397-404.

DE HAAS, M., VOSSEBELD, P.J., VON DEM BORNE, A.E. AND ROOS, D. (1995) Fc

gamma receptors of phagocytes. *J. Lab. Clin. Med.* 126, 330-341.

EDWARDS, S.W., (1994) Biochemistry and physiology of the neutrophil. 1^a ed.,

Cambridge University Press. U.S.A. Engineered PAF receptor mutant mice. *Prog. Lipid Res.* 39: 41-82.

ELZI, D. J., BJORNSEN, A. J. KENZIE, T. M., WYMAN, T. H. AND SILLIMAN, C. C.

(2001) Ionomycin causes activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *Am. J. Physiol. Cell.* 281, C350-C360.

ELZI, D. J., HIESTER A.A. AND SILLIMAN C.C. (1997) Receptor-mediated calcium

entry is required for maximal effects of platelet activating factor primed responses in human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240, 763-765.

FLÓREZ J., (1997) *Farmacología Humana*. 3ª Edición. Masson, S.A. 637-640.

GEWIRTZ, A.T., SEETOO, K.F. AND SIMONS, E.R. (1998) Neutrophil degranulation

and phospholipase D activation are enhanced if the Na⁺/H⁺ antiport is blocked. *J. Leukoc. Biol.*, 64, 98-103.

GOODMAN, L., A. GILMAN. (1996) *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9º ed.

México. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 26, 654-657

GRANFELDT, D., SAMUELSSON, M. AND KARLSSON, A. (2002) Capacitative Ca²⁺

influx and activation of the neutrophil respiratory burst. different regulation of plasma membrane and granule-localized NADPH-oxidase. *J. Leukoc. Biol.* 71, 611-616.

GRINSTEIN, S., FURUYA, W. AND BIGGAR, W.D. (1986) Cytoplasmic pH regulation in normal and abnormal neutrophils. Role of superoxide generation and Na⁺/H⁺ exchange. *J. Biol. Chem.* 261,512-514.

GRONERT, K., COLGAN, S.P. AND SERHAN, C.N. (1998) Characterization of human neutrophil and endothelial cell ligand-operated extracellular acidification rate by microphysiometry: impact of reoxygenation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285:252-261.

HAWORTH, R.S., MCCANN, C., SNABAITIS, A.K., ROBERTS, N.A. AND AVKIRAN, M. (2003) Stimulation of the plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 by sustained intracellular acidosis: evidence for a novel mechanism mediated by the ERK pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 31676-31684.

HIDALGO, M., OJEDA, F., EYRE, P., LABRANCHE, T., SMITH, C., HANCKE, J., AND BURGOS, R. (2004) Platelet-activating factor increases pH_(i) in bovine neutrophils through the PI3K–ERK1/2 pathway. *Br. J. Pharmacol.* 141,311-321.

INANAMI, O., JOHNSON, J. AND BABIOR, B. (1998) The leukocyte NADPH oxidase subunit p47^{phox}: the role of the cysteine residues, *Arch. Biochem. Biophys.*, 350,36-40.

ISHII, S. AND SHIMIZU T. (2000) Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog. Lipid. Res.* 39, 41-82.

KANEKO, J.J., HARVEY, J.W. AND BRUSS, M.L. (1997) *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5^o ed. Ed. Academic Press. U.S.A.

KARLSSON, A., NIXON, J. B. AND MCPHAIL, L. C. (2000) Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Leukoc. Biol.* 67, 396-404.

KRUMP, E., NIKITAS, K., AND GRINSTEIN, S. (1997) Induction of tyrosine phosphorylation and Na⁺/H⁺ exchanger activation during shrinkage of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 272, 17303-17311.

NACCACHE, P.H., MOLSKI, M.M.,VOLPI, M., SHEFCYK, J., MOLSKI, T.F., LOEW, L., BECKER, E.L. AND SHA'AFI, R.I. (1986) Biochemical events associated with the stimulation of rabbit neutrophils by platelet-activating factor. *J. Leukoc. Biol.* 40:533-548.

NANDA, A., GUKOVSKAYA, A., TSENG, J. AND GRINSTEIN, S. (1992) Activation of vacuolar-type proton pumps by protein kinase c. *J. Biol. Chem.* 267, 22740-22746.

PICK, E., (1986) Microassays for superoxide and hydrogen peroxide production and Nitroblue tetrazolium reduction using an Enzyme immunoassay microplate reader. *Meth. Enzimol.* 132, 407-421.

PRESCOTT, S.M., ZIMMERMAN, G.A., STAFFORINI, D.M. AND MCINTYRE, T.M.

(2000) Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 419-445.

PUTNEY, L.K., DENKER, S.P. AND BARBER, D.L. (2002) The changing face of the

Na⁺/H⁺ exchanger, NHE1: structure, regulation and cellular actions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 527-552.

ROTH, J.A. AND KAEBERLE, M.L. (1981) Evaluation of bovine polymorphonuclear

leukocyte function. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2, 157-174.

SIMCHOWITZ, L. & CRAGOE J.R. (1986) Regulation of human neutrophil chemotaxis

by intracellular pH. *J. Biol. Chem.* 261, 6492-6500.

SIMCHOWITZ, L. (1985) Intracellular pH modulates the generation of superoxide

radicals by human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 76, 1079-1089.

SMITH, J.A. (1994) Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword.

J. Leukoc. Biol. 56,672-686.

SNYDER, F. 1990. Platelet-activating factor receptor and related acetylated lipids as

potent biologically active cellular mediators. *Am. J. Physiol.* 259, C697-C708.

SUSZTÁK, K., MÓCSAI, A., LIGETI, E. AND CAPUZ, A. (1997) Electrogenic H⁺ pathway contributes to stimulus-induced changes of internal pH and membrane potential in intact neutrophils: role of cytoplasmic phospholipase A₂. *Biochem. J.* 325, 501-510.

SWAIN, S.D., BUNGER, P.L., SIPES, K.M., NELSON, L.K., JUTILA, K.L., BOYLAN, S.M. AND QUINN, M.T. (1998) Platelet-activating factor induces a concentration-dependent spectrum of functional responses in bovine neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 64, 817-827.

TIZARD, I., (1982) An introduction to veterinary immunology. W.B. Saunders, Philadelphia. U.S.A.

VALENTIN F., BUEB J.L., CAPDEVILLE-ATKINSON C AND TSCHIRHART E. (2001) Rac-1-mediated O₂⁻ secretion requires Ca²⁺ influx in neutrophil-like HL-60 cells. *Cell calcium.* 29, 409-415.

WITTHAUT, R., FARHOOD, A., SMITH, C.W. AND JAESCHKE, H. (1994) Complement and tumor necrosis factor-alpha, contribute to mac-1 (CD116/CD18) up-regulation and systemic neutrophil activation during endoxemia in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 55, 105-111.

WRIGHT, J., MARIDONNEAU-PARINI, I., CRAGOE J.R., SCHWARTZ, E.J. AND

TAUBER, A.I. (1988) The role of the Na⁺/H⁺ antiporter in human neutrophil NADPH oxidase activation. *J. Leukoc. Biol.* 43, 183-186.

YAMAMORI, T., INANAMI, O., NAGAHATA, H., CUI, Y. AND KUWABARA, M., (2000)

Roles of p38 MAPK, PKC and PI3K in the signaling pathways of NADPH oxidase activation and phagocytosis in bovine polymorphonuclear leukocytes. *FEBS Lett.* 467, 253-258.

YAMAMORI, T., INANAMI, O., SUMIMOTO, H., AKASAKI, T., NAGAHATA H. AND

KUWABARA, M., (2002) Relationship between p38 mitogen-activated protein kinase and small GTPase Rac for the activation of NADPH oxidase in bovine neutrophils. *Biochem. Biophys. Res.* 293, 1571-1578.