



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 DE CALCIO SOBRE LOS CAMBIOS DE pH INTRACELULAR Y SU
RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN DE SUPERÓXIDO EN NEUTRÓFILOS DE
BOVINO”.**

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

ALEJANDRA MARIBEL SANHUEZA SILVA

VALDIVIA-CHILE
2005

A Dios y a mi madre.

INDICE

1. Abreviaturas	4
2. Resumen	5
3. Summary	6
4. Introducción	7
5. Materiales y Métodos	20
6. Resultados	26
7. Discusión	36
8. Referencias Bibliográficas	42

1. ABREVIATURAS

BCECF-AM	2,7-bis-(2-carboxietil)-5-(y-6)- carboxifluorecein acetoximetil ester.
DAG	Diacilglicerol.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
ERK1/2	Quinasas reguladas por señales extracelulares.
FMLP	N-formilmetionina-leucil-fenilalanina.
HBSS	Solución salina balanceada de Hank's.
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato.
LTB₄	Leucotrieno B₄.
MAP quinasa	Proteínas quinasas activadas por mitógeno
NHE	Intercambiador Na⁺/ H⁺.
PAF	Factor activante plaquetario.
pH⁽ⁱ⁾	pH intracelular.
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa.
PKC	Proteína quinasa c.
PLC	Fosfolipasa c.
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato.

2. RESUMEN

En el presente trabajo de tesis, se evaluó la participación de Ca^{2+} intracelular sobre los cambios de pH y la producción de superóxido en neutrófilos de bovino, utilizando ionomicina como ionóforo de Ca^{2+} . El aumento de Ca^{2+} intracelular en neutrófilos está asociado a una serie de respuestas celulares, como liberación de gránulos secretorios, síntesis de mediadores proinflamatorios y producción de radicales libres derivados del oxígeno. Este último proceso es dependiente de la activación de NADPH oxidasa, cuya reacción genera $2\text{O}_2^- + \text{H}^+ + \text{NADP}^+$. El exceso de protones generados por esta reacción produce una acidificación intracelular transitoria. Esta es revertida principalmente por la activación de un intercambiador de Na^+/H^+ (NHE), hasta generar una alcalinización intracelular. La acidificación extracelular y alcalinización intracelular son claves en el proceso de quimiotaxis, puesto que 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. Se aislaron neutrófilos de bovino, en los cuales se midió el aumento intracelular de Ca^{2+} y los cambios de pH intracelular utilizando las sondas FURA2-AM y BCECF-AM, respectivamente. La medición de superóxido se realizó registrando a 550 nm la reducción de citocromo c en un lector de microplacas. Se concluyó que la estimulación con ionomicina $2\mu\text{M}$ causa un incremento rápido de Ca^{2+} citosólico, activando la producción de superóxido en polimorfonucleares. Se observó una acidificación transitoria controlada por la MAPK p38 y una alcalinización sostenida, vía PKC, PI3K Y ERK1/2.

3. SUMMARY

In the present thesis work, the participation of intracellular Ca^{2+} on the changes of pH and superoxide production in bovine neutrophils, using ionomycin like ionophore the Ca^{2+} was evaluated. The increase in intracellular Ca^{2+} in neutrophils is associated to a series of cellular responses, like release of secretory granules, synthesis of proinflammatory mediators and production of free radicals derived from oxygen. This last process depends on the activation of NADPH oxidase, a reaction that generates $2\text{O}_2^- + \text{H}^+ + \text{NADP}^+$. The excess of protons generated by this reaction produces a transitory intracellular acidification. This is reverted mainly by the activation of an interchanger of Na^+/H^+ (NHE), till the generation of intracellular alkalinization. The extracellular acidification and intracellular alkalinization are key events in the process of chemotaxis, increase in the life span of neutrophils, they favour the liberation of superoxide and metabolites derived from lipoxigenase, which finally help to intensify the acute inflammatory response. Neutrophils of bovine were isolated, in which the intracellular increase of Ca^{2+} and the intracellular change of pH was measured using FURA2-AM and BCECF-AM, respectively. The superoxide was measured by registering at 550 nm the reduction of cytochrome c in microplate reader. It is concluded that the stimulation with ionomycin $2\mu\text{M}$ causes a fast increase of cytosolic Ca^{2+} , activating the superoxide production in polymorphonuclears and the induced increase in pH intracellular, with a transitory acidification of MAPK p38 and a maintained alkalinization via PKC, PI3K and ERK1/2.

4. INTRODUCCIÓN

4.1. NEUTRÓFILOS.

El principal tipo celular en el sistema mieloide es el neutrófilo polimorfonuclear. 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 muy pocos días. Los neutrófilos constituyen el principal leucocito de la sangre de los mamíferos, y representa alrededor de un 20 a 30% de los leucocitos en los rumiantes (Tizard, 1982). La gran cantidad de neutrófilos que debe ser producida diariamente, indica la importancia de estas células en la protección del huésped contra infecciones. Los neutrófilos son la primera línea de defensa del organismo contra infecciones bacterianas y fúngicas, son las primeras células en ser reclutadas al sitio de la infección y deben responder en forma rápida y potente (Edwards, 1994). Esto se debe a que poseen una alta movilidad dentro de los tejidos en respuesta a señales quimiotácticas y su mecanismo defensivo es complejo, incluyendo fagocitosis, producción de oxígenos reactivos, enzimas proteolíticas y péptidos bactericidas (Swain y col., 1998).

Aunque los neutrófilos de bovinos y humanos poseen una función semejante respecto a la defensa del huésped, algunos estudios han demostrado ciertas diferencias que pueden reflejar variaciones en los mecanismos regulatorios. Por ejemplo, en estudios con microscopía electrónica se demostró que los neutrófilos de bovino poseen un gránulo de gran tamaño que no se encuentra presente en los neutrófilos humanos

(Gennaro y col., 1983). Además, los neutrófilos bovinos poseen menor concentración de lisozima en comparación con los neutrófilos humanos. Debido a estas diferencias es posible que la respuesta biológica en neutrófilos de bovinos frente a agentes inflamatorios sea diferente a la respuesta de neutrófilos humanos y podría ser de utilidad terapéutica el estudio de los diferentes tipos de respuesta celular en el bovino (Swain y col., 1998).

Los neutrófilos no se dividen ni se diferencian significativamente una vez que penetran los tejidos, esto les permite ahorrar energía y tiempo en la diferenciación, de esta forma siempre están preparados para ejercer su función. Los neutrófilos poseen una compleja mezcla de armas antibacterianas, presentes en sus gránulos. Estos gránulos, además de mieloperoxidasa, contienen defensina, hidrolasa, elastasa y colagenasa (Edwards, 1994).

4.2. Receptores en neutrófilos.

Las células pueden responder a agonistas solubles, los cuales generan eventos tales como: cambios en expresión de receptor, adherencia, agregación y quimiotaxis, o a un estímulo diferente en particular (bacteria opsonizada y complejo inmune), los cuales generalmente estimulan fagocitosis. Sin embargo, algunos agonistas solubles (fMet-Leu-Phe, C5a y LTB₄) estimulan a bajas concentraciones adherencia y quimiotaxis, pero a altas concentraciones pueden activar degranulación y producción de oxidantes reactivos. En parte esto se debe a que muchos receptores existen en la

membrana plasmática en alto y bajo estado de afinidad. Un agonista con alta afinidad por el receptor lo puede ocupar a bajas concentraciones y puede activar quimiotaxis y adherencia; cuando la afinidad del agonista por el receptor es baja, la concentración tiene que ser alta para ocupar el receptor y así poder activar la degranulación y la NADPH oxidasa. Claramente pensar en estos dos estados de afinidad en algunos receptores, puede explicar diferentes procesos de transducción de señales y respuestas. (Edwards, 1994).

PAF es uno de los más potentes mediadores de la inflamación que regula la función de los neutrófilos. PAF es un fosfolípido biológicamente activo, producido por neutrófilos, plaquetas, basófilos, células asesinas naturales, monocitos, macrófagos, eosinófilos, mastocitos y células del endotelio vascular. Los niveles de Ca^{2+} intracelular 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).

PAF modula la actividad inflamatoria de los PMN por la interacción con un receptor específico de 7 dominios transmembranosos, acoplado a proteína G, activando PLC- γ , estimulando la formación de IP_3 y DAG. El efecto neto de la activación de PLC- γ es la fosforilación proteínica intracelular (Chao y Olson, 1993; Ishii y Shimizu, 2000).

4.3. CALCIO.

Uno de los principales mecanismos de activación de segundos mensajeros intracelulares en el neutrófilo, es aquel inducido por la unión de un agonista a receptores acoplados a proteína G, que en la mayoría de los casos activa PLC, la cual genera IP_3 y DAG un agonista de PKC. IP_3 induce la elevación de $Ca^{2+}_{(i)}$ por la liberación de calcio desde los compartimentos intracelulares al citoplasma. Los calciosomas (compartimentos de Ca^{2+}) poseen un receptor a IP_3 , una Ca^{2+} -ATPasa y calreticulina, la proteína Ca^{2+} -ligada. En el interior del calciosoma, las concentraciones de Ca^{2+} pueden ser altas (1mM); el flujo de calcio desde estos compartimentos es regulado por la actividad del receptor IP_3 , mientras el influjo de Ca^{2+} en estos compartimentos es regulado por la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa. El receptor IP_3 puede tener una estructura similar a un receptor de rianodina, presentando cuatro residuos conservados de cisteína y es un tetrámero de 4 subunidades. La estimulación de la cabeza de este receptor abre de este modo los canales para liberar Ca^{2+} de estos compartimentos al citoplasma. Una vez que estos compartimentos son vaciados, el influjo de Ca^{2+} en la célula es estimulado por la apertura de la entrada de Ca^{2+} en la membrana plasmática. Este influjo de Ca^{2+} es necesario para mantener el Ca^{2+} citoplasmático en niveles elevados, y también para repletar los compartimentos (Edwards, 1994). Esta liberación de $Ca^{2+}_{(i)}$ seguida por un influjo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, es llamado SOCE (Store-operated Ca^{2+} entry) (Hauser y col., 2000; Granfeldt y col., 2002). La fase de liberación de Ca^{2+} es normalmente transitoria, desactivándose totalmente en unos segundos. Sin embargo muchos procesos requieren

un aumento sostenido de Ca^{2+} citosólico (descarga de hormonas y transcripción de genes), y por consiguiente, la entrada de Ca^{2+} a la célula es crucial (Parekh y col., 1997).

La caída de la concentración de Ca^{2+} dentro de los organelos ER (retículo endoplasmático), activaría una o mas señales que permitirían la apertura de los canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática (Putney, 2001). En la actualidad, la identidad molecular de SOCE es desconocida, sin embargo los homólogos de la superfamilia de genes TRP de mamíferos representan los candidatos más promisorios. Algunos mecanismos propuestos para SOCE son:

-CIF (calcium influx factor): Una vez que se agota el almacén se libera una señal difundible y activa el SOCE.

-Exocitosis: Una vez agotado el ER se produce una fusión de vesículas (unidas a ER) que contienen a los SOCE y expone el canal.

-Regulación de Ca^{2+} : El almacén completo mantiene en estado inhibitorio a los canales en la membrana y el vaciamiento los activa.

-Modelo de acoplamiento conformacional: Una vez que se descarga el ER el receptor IP_3 cambia conformacionalmente y es transmitido al canal en la membrana por interacción directa proteína-proteína. (Putney, 2001)

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).

En neutrófilos en los cuales los niveles de Ca^{2+} son manipulados usando un quelante de Ca^{2+} (BAPTA) o quin-2, evitan esta secreción de oxidantes reactivos (Edwards, 1994). Sin embargo, aumentos de Ca^{2+} intracelular son insuficientes para activar la oxidasa por que los niveles de este catión pueden ser artificialmente aumentados en la ausencia de la actividad oxidasa (adición de ionóforos de Ca^{2+} tal como la ionomicina) (Elzi y col., 2001). Además, 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. Ionomicina.

Ionomicina es un ionóforo de calcio hidrofóbico, que se intercala en la bicapa lipídica de la membrana celular y aumenta la permeabilidad del Ca^{2+} (Elzi y col., 2001).

Ionomicina es usado experimentalmente para producir un aumento de Ca^{2+} citoplasmático, independiente de la elevación de este por un factor activador. Cuando Ca^{2+} es elevado por ionomicina se observan respuestas de un aumento tanto de la entrada como de liberación de Ca^{2+} intracelular, más aún se sabe que la ionomicina es capaz de activar proteínas del grupo de las MAPK (Elzi y col., 2001).

Ionomicina también modula funciones de polimorfonucleares como la adherencia a las células endoteliales y cambios en la fosforilación de proteína tirosina (Elzi y col., 2001).

La elevación de Ca^{2+} intracelular en células por ionóforos de Ca^{2+} , inducirá activación de NADPH oxidasa intracelular en analogía con la activación inducida por taspigargina. De hecho se ha demostrado que ionomicina puede inducir la activación extracelular de NADPH-oxidasa a concentraciones específicas de Ca^{2+} extracelular (Granfeldt, 2002).

4.5. VIAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR CALCIO.

La enzima activa por diacilglicerol se denomina proteína quinasa C (PKC), debido a que es dependiente de Ca^{2+} (Alberts, 2002). Los miembros de la familia PKC han sido clasificados de acuerdo a sus similitudes estructurales y el cofactor requerido. PKCs clásicos (α , β I, β II y γ) son activados y recluidos a la membrana plasmática por Ca^{2+} y DAG, otras isoformas de PKC (ϵ , η , δ y θ) son regulados principalmente por Ca^{2+} . PKCs atípicos (ι/λ y ζ) no son activados ni por DAG ni por Ca^{2+} (Sinnecker y col., 2004). Las isoformas que se han descrito en neutrófilos de bovino son: la β -isoforma en una mayor proporción y en una menor proporción la δ -isoforma (Stasia y col., 1990).

Las isoformas de PKC tienen dos dominio funcionales: el dominio COOH-terminal (el cual contiene sitios de unión para la proteína fosfato aceptor y el nucleótido

fosfato donador) y un dominio regulatorio NH₂-terminal (el cual contiene los sitios de unión para Ca²⁺, fosfolípidos y DAG) (Edwards, 1994).

La inhibición de la actividad de PI3K por Wortmanina produce una inhibición parcial de la movilización del Ca²⁺ liberado de los compartimentos intracelulares, esto indicaría que la activación de una porción considerable de la PLC sería independiente de la vía PI3K (Liu y col., 2003). La PI3K es una enzima heterodimérica (formada por una subunidad regulatoria de 85 kDa y una catalítica de 110 kDa) que fosforila la posición D-3 de la cabeza del inositol de los lípidos fosfoinositidos. La familia PI3K comprende 3 clases (I, II, III) dependiendo de la especificidad del sustrato y estructura proteínica (Vanhaesebroeck y col., 1997; Fruman y col., 1998; Wymann y Pirola, 1998). La familia I está dividida en subfamilias (Ia y Ib), 4 conocidas isoformas de PI3K ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$), todas expresadas en leucocitos (Wymann y Pirola, 1998). Varias evidencias experimentales sugieren que PI3K es clave en la quimiotaxis, producción de superóxidos y fosforilación de ERK inducida por quimioattractantes en polimorfonucleares (Okada y col., 1994; Hirsch y col., 2000; Sasaki y col., 2000)

Los cambios en la concentración de Ca²⁺ citosólico juegan un papel importante en la fosforilación y activación de p38 y ERK 1/2 MAPK. Sin embargo la p38 MAPK requiere del Ca²⁺ intracelular para su activación y la ERK 1/2 MAPK puede requerir de Ca²⁺ extracelular para su máxima fosforilación dual (Elzi y col., 2001). Una molécula que es sensible a cambios de los niveles intracelulares de Ca²⁺ es Ras, que es una proteína de bajo peso molecular unida a GTP. Esta GTPasa funciona como una

molécula binaria que regula la proliferación y diferenciación celular. La relación entre Ca^{2+} y Ras sería estrecha debido a que un aumento de Ca^{2+} citosólico produce la activación de Ras. Los efectores de Ras comienzan con la serina/treonina quinasa Raf los que activan a ERK/MAPK. Otros efectores característicos de Ras son la PI3K y una isoforma específica de PLC ($\text{PLC}\epsilon$) (Cullen y col., 2002).

Las MAPK es un grupo de proteínas que se encuentran en las células de mamíferos, existiendo por lo menos tres subtipos de MAPK: ERK, p38 MAPK, y c-jun. Cada subtipo de MAPK es activado por fosforilación en los residuos de treonina y tirosina por quinasas de especificidad-dual, tales como MAPK/ERK quinasa (MEK), MAPK quinasa-3 o -6 (MKK3/6), y MKK4/7. La activación de los distintos subtipos de MAPK es dependiente del tipo de célula y del estímulo usado, y el rol funcional de cada subtipo MAPK puede ser diferente de acuerdo a los tipos de células (Kutsuna y col., 2004). En neutrófilos, la vía MAPK controla varias respuestas incluyendo priming, expresión de genes (Yaffe y col., 1999), fagocitosis y producción de superóxido (Downey y col., 1998).

ERK 1/2 MAPK pertenece a la familia de proteínas de 40-45 kDa, serina/treonina quinasas, que son activadas por muchos estímulos extracelulares, incluyendo factores de crecimiento y hormonas. MAPKs requiere fosforilación de ambos residuos de treonina y tirosina en thr183-glu-tyr185 para llegar a ser activada (Payne y col., 1991; Granot y col., 1993). PAF tiene un efecto leve sobre la fosforilación de ERK1/2 en neutrófilos (Nick y col., 1997). Al contrario de los neutrófilos humanos, los neutrófilos de

bovino son estimulados fuertemente por PAF vía fosforilación de ERK1/2 (Hidalgo y col., 2004).

Otro miembro de la familia de las MAPK activada por Ca^{2+} , es la proteína quinasa 2a (SAPK2A), también conocida como P38, es una vía que es activada fuertemente por estrés celular, citoquinas proinflamatorias y por lipopolisacáridos bacterianos (Davies y col., 1991; Elzi y col., 2001).

4.6. REGULACIÓN DE pH INTRACELULAR.

El pH intracelular ($\text{pH}_{(i)}$) afecta las funciones del neutrófilo, aunque su regulación no esta completamente entendida. La homeostasis del $\text{pH}_{(i)}$ es únicamente requerida en neutrófilos en estado de fagocitosis, ya que la activación celular genera suficientes equivalentes ácido para acidez letal de la célula, que es expulsado de tal manera que el pH extracelular ($\text{pH}_{(o)}$) en sitios inflamados es muchas veces disminuido. El balance entre el protón cargado en el citosol y su expulsión es importante porque puede influir en las funciones del neutrófilo, incluyendo actividad microbicida, en migración celular y generación intracelular de oxidantes, ya que estas funciones son pH dependientes (Coakley y col., 2002).

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. Cuando el neutrófilo normal es activado con ester de forbol se produce un cambio bifásico en el

pH_(i) con una pequeña acidificación inicial seguida de una recuperación prolongada del pH_(i), ocasionalmente excediendo los niveles alcalinos (Nanda y col., 1992).

La fase de recuperación es Na⁺- dependiente y sensible a amilorida y se le atribuye al intercambiador Na⁺/H⁺. El intercambiador no es directamente estimulado por el ester de forbol, o sea la activación es secundaria a la acidificación citoplasmática, la naturaleza de la acidificación no es absolutamente conocida, desde un punto de vista farmacológico la evidencia sugiere que esta es debido al aumento de la producción del ácido metabólico. La mayor vía metabólica estimulada durante la activación del neutrófilo es dependiente del metabolismo oxidativo: reducción de O₂ por NADPH oxidasa y la hexosa monofosfato shunt (HMS) (Grinstein y col., 1986).

4.7. INTERCAMBIADOR Na⁺/H⁺ (NHE).

El flujo de protones a través de membranas conducen a un número de procesos fisiológicos, incluyendo la comunicación dentro y entre células, migración celular, y la proporción en que las células crecen, se dividen y diferencian. El flujo de protones en la membrana plasmática está regulado por varias familias de intercambiadores de iones, incluyendo los NHEs (Putney y col., 2002)

Hasta ahora, seis miembros de la familia NHE han sido identificados (NHE1-NHE6). NHE1, NHE2, NHE3, NH4 y NHE5 comparten aproximadamente del 34 al 60% de su identidad aminoacídica. NHE1 está ampliamente expresada y está compuesta de

813 a 822 aminoácidos, con una masa molecular de 91 kDa, su función es electroneutralizar intercambiando H^+ intracelular por Na^+ extracelular, de esta forma regula el $pH_{(i)}$ y volumen celular (Krump y col., 1997). En contraste, NHE2, NHE3, NH4 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 NH2 primariamente en la reabsorción de sodio, y puede actuar en coordinación con NH4, promoviendo la osmoregulación renal células medulares. NH3 esta específicamente apuntada para la membrana apical del epitelio tubular renal proximal y el borde cepillo del epitelio intestinal maduro. En el riñón, NH3 es importante en la reabsorción de Na^+ y HCO_3^- , lo cual contribuye significativamente para mantener la osmolaridad sanguínea y el balance ácido base. NH5 es expresada predominantemente en el cerebro y se piensa que es importante en la regulación del $pH_{(i)}$ en neuronas. El miembro de la familia NHE más recientemente identificado, NH6, es el más divergente en secuencia, compartiendo sólo el 20% de identidad con las otras isoformas. NH6 se localiza exclusivamente en la mitocondria, con una gran expresión en tejidos metabólicos, tales como corazón, cerebro y músculo esquelético (Putney y col., 2002).

Una característica distinta del NHE1 es que su actividad está regulada por diversas clases de receptores de la superficie celular, incluyendo receptor tirosina quinasas, receptores acoplados a proteína G, y receptores integrina (Putney y col., 2002). La activación de NHE1 es regulada por la acidosis intracelular y se sugiere que

el efecto estimulador de la acidosis intracelular ocurre a través de un mecanismo mediado por la activación de la vía ERK (Haworth y col., 2003)

4.8. Radicales libres derivados del oxígeno.

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 tóxicos derivados del oxígeno que son involucrados en la destrucción de patógenos. Posteriormente se descubrió la enzima superóxido dismutasa (SOD) y el hecho notable de que todas las células aeróbicas generaban O_2^- durante el metabolismo oxidativo (Fridovich, 1978). Los neutrófilos durante la fagocitosis generan O_2^- (Babior, Kipnes y Curnutte, 1973). Se calculó que todo el oxígeno extra consumido durante el estallido respiratorio es convertido a O_2^- , y después convertido a H_2O_2 , importante en el mecanismo microbicida (Edwards, 1994).

El estallido respiratorio durante la fagocitosis es catalizado por una NADPH oxidasa ligada a membrana y responsable de la reacción: $NADPH + 2O_2 \rightarrow 2O_2^- + H^+ + NADP^+$. La enzima es localizada en la membrana plasmática (aunque algunos componentes son también localizados en el citosol y en las membranas de los gránulos específicos y vesículas secretoras), y se encuentra latente en células en reposo (Dahlgren y col., 1999). Múltiples vías de transducción de señales intracelulares son requeridas para iniciar el ensamblaje de la oxidasa en respuesta a activación de señales específicas. Aparte de esta translocación subcelular, los componentes de la

oxidasa pueden también ser modificados por fosforilación, y cofactor tal como GTP y ácido araquidónico que son requeridos para la activación. (Edwards, 1994). La NADPH oxidasa es una enzima de múltiples componentes que consiste en al menos dos proteínas de membrana, gp91^{phox} y p22^{phox}, que juntas forman el flavocitocromo b558 y tres proteínas citosolicas (p47^{phox}, p67^{phox} y Rac). 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).

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).

Por lo anterior, Ca²⁺ podría ser el principal regulador de NADPH oxidasa (Granfeld y col., 2002) y de los cambios de pH (Kimuras y col., 1990), en neutrófilos durante la activación en el proceso inflamatorio.

4.9. HIPÓTESIS.

El aumento de Ca^{2+} intracelular inducido por ionomicina, genera un aumento de $\text{pH}_{(i)}$ y produce generación de superóxido en neutrófilos de bovino.

Para aceptar o rechazar esta hipótesis se realizarán los siguientes experimentos cuyos objetivos son:

4.10. OBJETIVOS.

- 4.10. 1.** Evaluar la movilización de Ca^{2+} intracelular inducido por ionomicina.
- 4.10. 2.** Evaluar el rol de Ca^{2+} intracelular y extracelular en el aumento de superóxido inducido por ionomicina.
- 4.10. 3.** Evaluar el rol de Ca^{2+} intracelular en los cambios de pH inducidos por ionomicina.
- 4.10. 4.** Evaluar el rol de p38 en los cambios de pH inducidos por ionomicina.
- 4.10. 5.** Evaluar el rol de PKC en los cambios de pH inducidos por ionomicina.
- 4.10. 6.** Evaluar el rol de PI3K en los cambios de pH inducidos por ionomicina.
- 4.10. 7.** Evaluar el rol de ERK1/2 en los cambios de pH inducidos por ionomicina.
- 4.10. 8.** Evaluar el rol de p38 en el aumento de superóxido inducido por ionomicina.
- 4.10. 9.** Evaluar el rol de PKC en el aumento de superóxido inducido por ionomicina.
- 4.10. 10.** Evaluar el rol de PI3K en el aumento de superóxido inducido por ionomicina.
- 4.10. 11.** Evaluar el rol de ERK1/2 en el aumento de superóxido inducido por ionomicina.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. MATERIALES.

5.1.1. Extracción de sangre:

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

5.1.2. Aislamiento de neutrófilos:

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

5.1.3. Ensayos de medición de pH intracelular:

Balanza analítica de Scientech^R.

BAPTA-AM de SIGMA.

Baño termoregulado Memmert^R.

Citocromo C de SIGMA.

DMSO de Merck^R.

Espectrofluorímetro LS55 Perkin Elmer.

Gö6850 de Calbiochem^R.

Incubadora Memmert.

IONOMICINA (ionóforo de Ca²⁺) de Calbiochem^R.

Lector de ELISA (sunrise tecan).

LY294002 de Calbiochem^R.

Microplaca de 96 posillos fondo plano (FALCON).

Pipetas automáticas BOECO^R de 1 ml, 200 µl, 50 µl, 10 µl.

Sales: TRIS de Winkler Ltda, EGTA de Amersham Pharmacia Biotech^R.

SB203580 de Calbiochem^R.

SOD de SIGMA.

Sonda BCECF-AM de Molecular Probes^R.

Sonda FURA2-AM de Molecular Probes^R

Tubos Eppendorf de 1,5 ml.

UO126 de Calbiochem^R.

Vortex V-1 de BOECO^R.

5.2. METODOLOGÍA

5.2.1. Aislamiento de neutrófilos de bovino.

Para obtener los neutrófilos de bovino se siguió 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 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 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. 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 "citospin".

El proceso de aislamiento de neutrófilos demoró aproximadamente 3 horas e inmediatamente se realizó la preincubación con FURA2-AM y BCECF-AM y la medición de Ca^{2+} y pH intracelular, respectivamente. La estandarización en unidades de pH fue realizada usando el método de calibración de nigericina (Grinstein y col., 1984).

5.2.2. Preincubación de neutrófilos con FURA2-AM Y Medición de Ca^{2+} intracelular.

2×10^6 / ml neutrófilos fueron resuspendidos en un buffer HBSS/ Ca^{2+} e incubados con FURA2-AM (stock diluido en 50 μ l de DMSO 100%) por 30 min at 37 °C. Las células fueron lavadas tres veces y resuspendidas a 2×10^6 / ml con buffer HBSS/ Ca^{2+} . La fluorescencia fue medida con un espectrofluorímetro termoregulado, con agitador a 440nm y 495 nm de excitación y 535 nm de emisión. Las células fueron estimuladas

con ionomicina $2\mu\text{M}$, y en algunos casos el Ca^{2+} fue quelado extracelularmente con EGTA e intracelularmente con BAPTA-AM y en algunos experimentos con ambos a la vez.

5.2.3. Preincubación de neutrófilos con BCECF-AM y medición de pH.

2×10^6 / ml los neutrófilos fueron resuspendidos en un buffer pH (140 mM NaCl, 10 mM Glucosa, 1 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 20 mM Hepes, pH 7.2) e incubados con BCECF-AM ($2,5 \mu\text{M}$) por 30 min at 37°C . Las células fueron lavadas tres veces y resuspendidas a 4×10^6 /ml. en buffer pH. La fluorescencia fue medida con un espectrofluorímetro termoregulado, a 440nm y 495 nm de excitación y 535 nm de emisión. Algunas de estas células fueron preincubadas por 10 minutos a 37°C con los inhibidores específicos Gö6850 ($0.5\mu\text{M}$), LY294002 ($3.0\mu\text{M}$), UO126 ($0.1\mu\text{M}$), SB203580 ($20\mu\text{M}$), para estudiar la participación de las vías PKC, PI3K, ERK1/2 y p38, respectivamente en los cambios de $\text{pH}_{(i)}$ inducidos por ionomicina.

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/posillo) fueron incubadas en HBSS por 60 minutos a 37°C , en presencia de citocromo c ($200 \mu\text{M}$). Algunos posillos fueron estimulados con ionomicina ($2 \mu\text{M}$), en presencia y/o ausencia de SOD (90UI/ML). Un

grupo de células fue preincubada por 10 minutos a 37°C con los inhibidores Gö6850 (0,5µM), Ly294002 (30 y 3µM), UO126 (1 y 0,1 µM), SB203580 (20µM), BAPTA-AM (50µM) y posteriormente son estimuladas con ionomicina. La contribución de Ca^{2+} extracelular estimulado con ionomicina es evaluada, incubando células en HBSS/ Ca^{2+} y/o HBSS/EGTA 5mM (libre de Ca^{2+}).

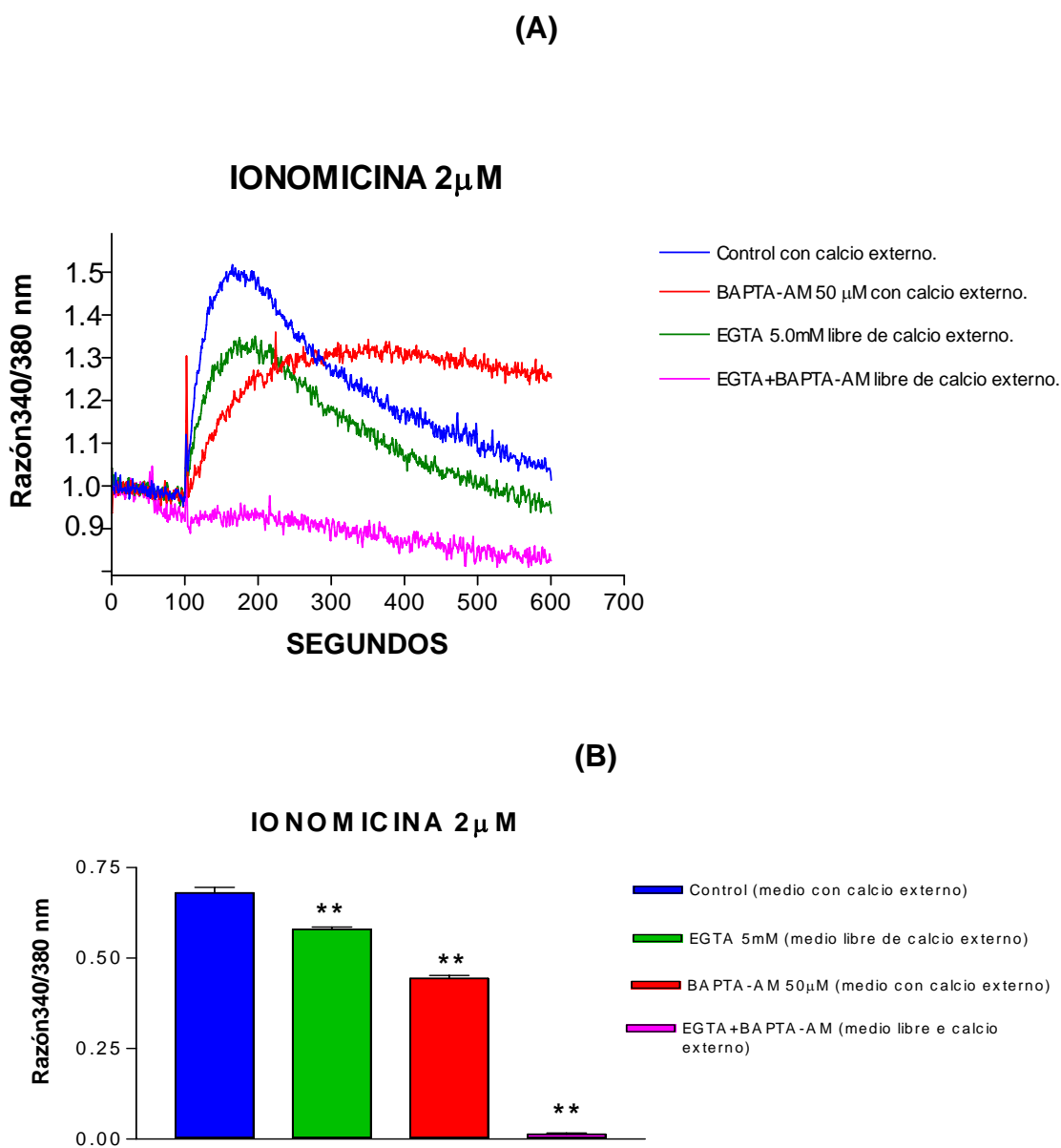
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados como media aritmética \pm su error típico. Se realizó Análisis de Varianza de una vía, seguido de test de comparación múltiple de Tukey, se utilizó un nivel de significancia del 5%. Todos los análisis fueron realizados con el programa GRAPH-PAD 3.0.

6. RESULTADOS

6.1. EVALUACION DEL AUMENTO DE CALCIO INTRACELULAR INDUCIDO POR IONOMICINA.

Como primer control se analizó el aumento de Ca^{2+} inducido por $2\mu\text{M}$ de ionomicina, en donde se observó un alza rápida de Ca^{2+} citosólico medido en células marcadas con FURA2-AM. Al agregar EGTA el aumento de Ca^{2+} inducido por ionomicina, al igual que el control, fue rápido, pero menos sostenido disminuyendo rápidamente, en cambio en presencia de BAPTA-AM el aumento de Ca^{2+} es más lento, pero se mantiene de manera más sostenida. Al estar quelados el Ca^{2+} extracelular y el intracelular con EGTA+BAPTA-AM, no se observó una movilización significativa de Ca^{2+} citosólico inducido por ionomicina. Se visualiza en la figura 1 que el aumento de Ca^{2+} intracelular inducido por ionomicina disminuye significativamente en presencia de EGTA Y BAPTA-AM, pero en mayor grado cuando ambos están juntos. Sin embargo, se puede concluir que el aumento de calcio se ve más afectado al quelar el Ca^{2+} intracelular que al quelar el Ca^{2+} extracelular.



6.2. EFECTO DE IONOMICINA SOBRE LA ACIDIFICACIÓN Y ALCALINIZACIÓN INTRACELULAR EN NEUTRÓFILOS DE BOVINO.

En la figura 2.B., se observa que ionomicina induce una disminución de 0.2 unidades de pH en neutrófilos de bovino, la que fue rápida y seguida de una recuperación lenta y sostenida a niveles sobre el basal de 0.16 unidades de pH promedio.

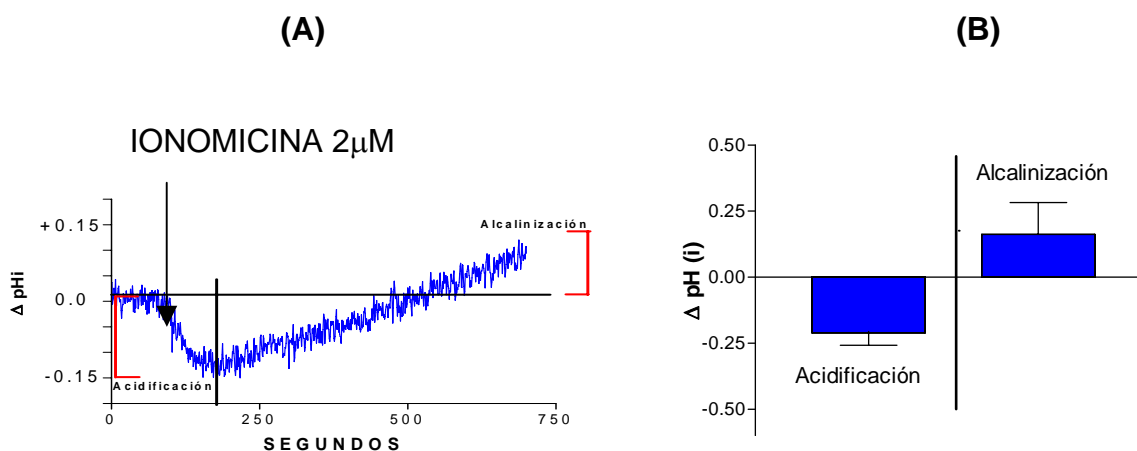


Figura 2.A.-En el gráfico de registro muestra el efecto de ionomicina y la medición de la acidificación y alcalinización. B.-En el gráfico de barras se representa la acidificación con datos negativos, en cambio la alcalinización se representa con datos positivos, n= al menos 3 experimentos independientes.

6.3. EVALUACION DE LOS CAMBIOS DE pH_i INDUCIDO POR IONOMICINA, EN UN MEDIO CON CALCIO EXTERNO Y UNO LIBRE DE CALCIO EXTERNO.

Los resultados muestran que ionomicina $2\mu\text{M}$ produjo un cambio de pH notorio en presencia de Ca^{2+} externo, mientras que se muestra claramente que si el medio esta libre de Ca^{2+} solo hay acidificación.

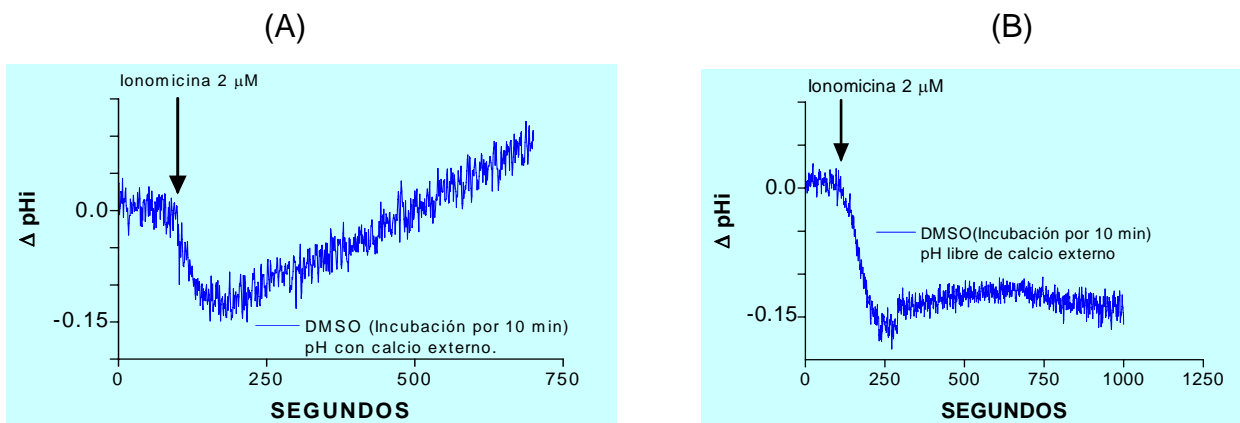


Fig. 3 A. Ionomicina induce una acidificación transitoria y una alcalinización sostenida en un medio con Ca^{2+} externo. **B.** Ionomicina solo causa una acidificación transitoria en un medio libre de Ca^{2+} externo y luego el pH se mantiene.

6.4 EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS DE $\text{pH}_{(i)}$ INDUCIDOS POR IONOMICINA, EN UN MEDIO CON CALCIO EXTERNO Y UNO LIBRE DE CALCIO EXTERNO TRATADOS CON EGTA Y BAPTA-AM.

Los resultados muestran que 2 μM de ionomicina indujo cambios en el pH intracelular, observando una acidificación transitoria y una alcalinización sostenida medidas en células marcadas con BCECF-AM. Cuando estas mismas células se incubaron con BAPTA-AM se observó solamente alcalinización. Las células que se incubaron en un medio libre de Ca^{2+} con EGTA ionomicina sólo indujo acidificación. En los dos tipos de medio en que se incubaron las células al ser tratadas con EGTA más BAPTA-AM se observó una ligera acidificación. Por lo tanto, el Ca^{2+} extracelular está mayoritariamente asociado a la alcalinización y el Ca^{2+} intracelular participaría principalmente de la acidificación, y ambas participarían en la regulación del pH intracelular.

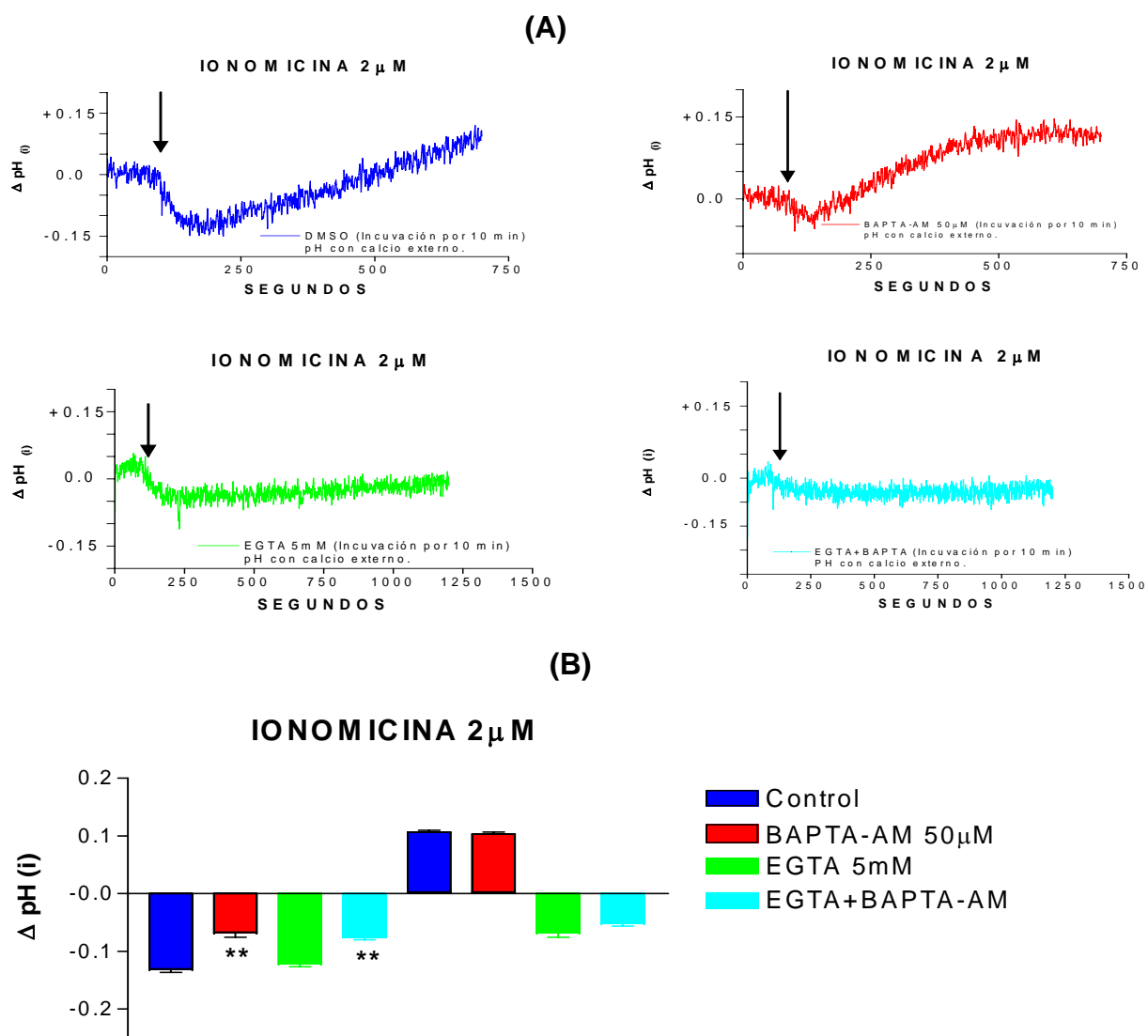


Fig. 4 A. Cambios de pH en neutrófilos estimulados con ionomicina $2\mu M$ con el calcio extracelular e intracelular quelado, viendo el efecto de esto sobre la acidificación y la alcalinización **B.** Cada barra representa el promedio \pm error estándar, $n=$ al menos 3 experimentos independientes, ** $p < 0.01$ comparado con el control.

6.5 EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS DE PH_(i) INDUCIDOS POR IONOMICINA, INHIBIENDO PKC CON UO126, p38 CON SB203580, PI3K CON LY294002 Y ERK1/2 CON Gö6850 EN UN MEDIO CON CALCIO EXTERNO.

Los resultados muestran claramente que SB203580 inhibe principalmente la acidificación, en cambio los inhibidores UO126, LY294002, Gö6850 muestran una marcada inhibición de la alcalinización y una menos marcada inhibición de la acidificación.

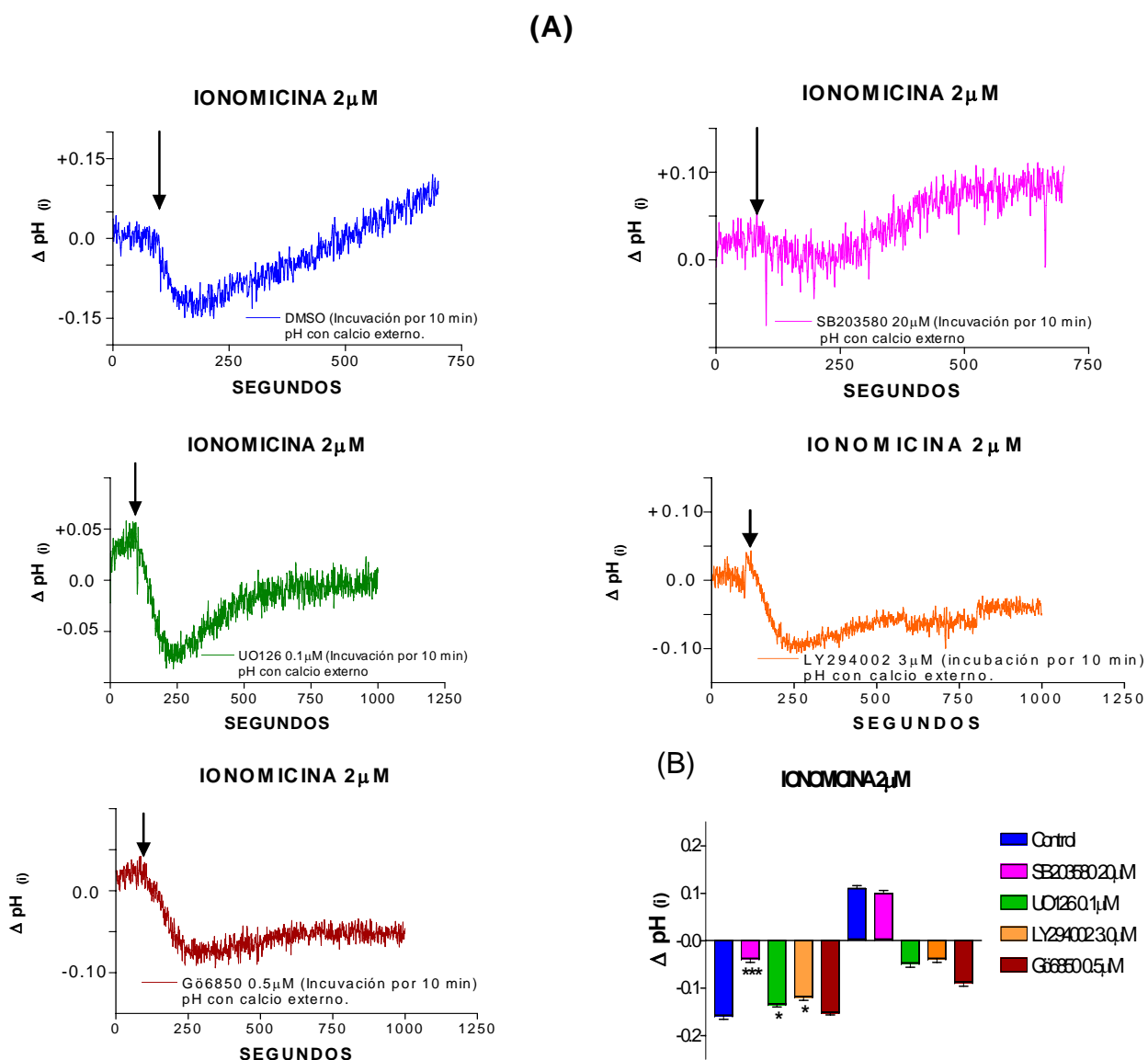


Fig. 5 A. Registro representativo del efecto de los inhibidores específicos, SB203580 (20 μ M), UO126 (0.1 μ M), LY294002 (0.30 μ M) y Gö6850 (0.5 μ M) par observar la participación de las vías p38, ERK1/2, PI3K Y PKC respectivamente en los cambios de pH inducidos por ionomicina 2 μ M. **B.** Cada barra representa el promedio \pm error estándar, n= al menos 3 experimentos independientes, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ comparado con el control.

6.6. EVALUACION DE LA PRODUCCIÓN DE SUPERÓXIDO INDUCIDO POR IONOMICINA, SOBRE EL EFECTO DE LOS QUELANTES DE CALCIO EGTA Y BAPTA-AM Y DE LOS INHIBIDORES DE LAS VÍAS ERK1/2, p38, PI3K Y PKC.

Los resultados muestran que ionomicina 2 μM activan la producción de superóxido en polimorfonucleares. Al agregar los quelantes Ca^{2+} extracelular EGTA e intracelular BAPTA-AM, se produce una marcada inhibición de la producción de superóxido, especialmente cuando estos quelantes se agregan en conjunto. Sin embargo, los resultados muestran que la producción de superóxido inducida por ionomicina es principalmente dependiente del Ca^{2+} extracelular.

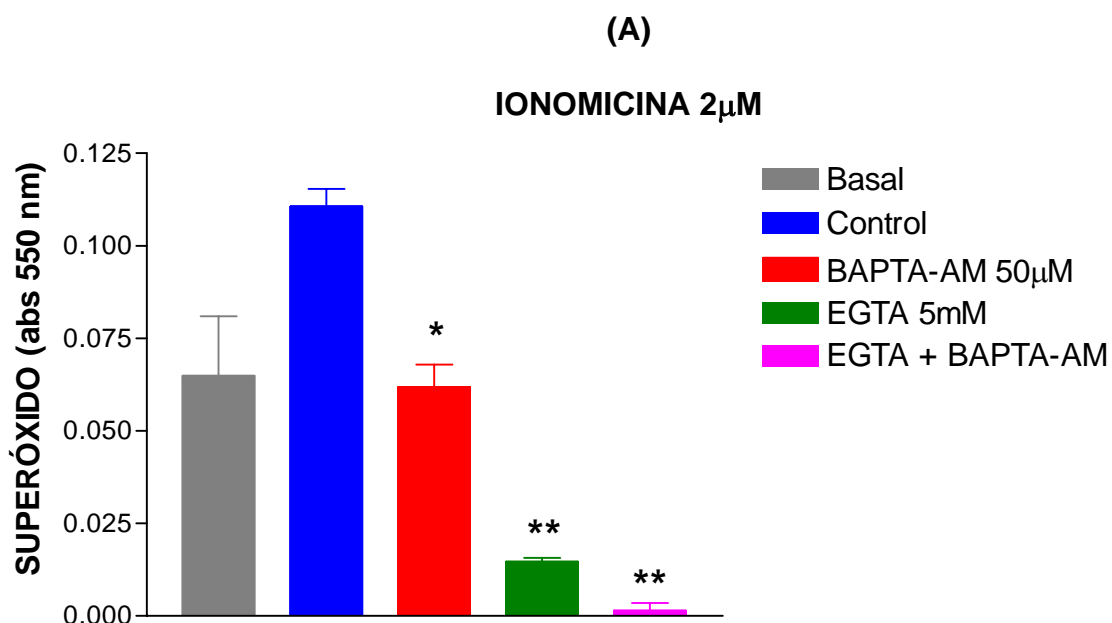


Fig. 6. A. Efecto de quelantes de calcio extracelular (EGTA) e intracelular (BAPTA-AM), sobre la producción de superóxido inducida por ionomicina, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n= al menos 3 experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control.

Los resultados de la producción de superóxido inducida por ionomicina $2\mu\text{M}$ sugiere una participación tanto de la vía p38 como de la PKC, ya que al usar los inhibidores específicos SB203580 y Gö6850 respectivamente se observó una notable disminución de la producción de superóxido.

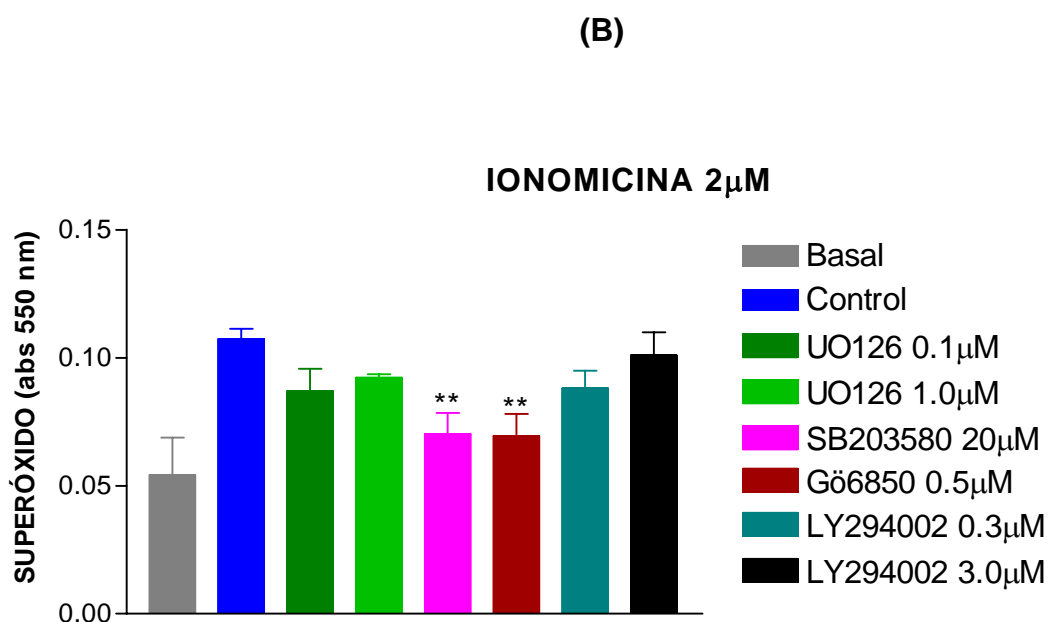


Fig. 6 B. Efecto de los inhibidores específicos de PKC, PI3K, p38 Y ERK1/2 sobre la producción de superóxido inducido con ionomicina $2\mu\text{M}$, cada barra representa el promedio \pm error estándar, $n =$ al menos 3 experimentos independientes, ** $p < 0.01$ comparado con el control.

6.7. EVALUACIÓN DE AMILORIDE SOBRE EL INTERCAMBIADOR NHE.

Los resultados muestran claramente que ionomicina aumenta el pH(i) en neutrófilos de bovino vía NHE sensible a Amiloride.

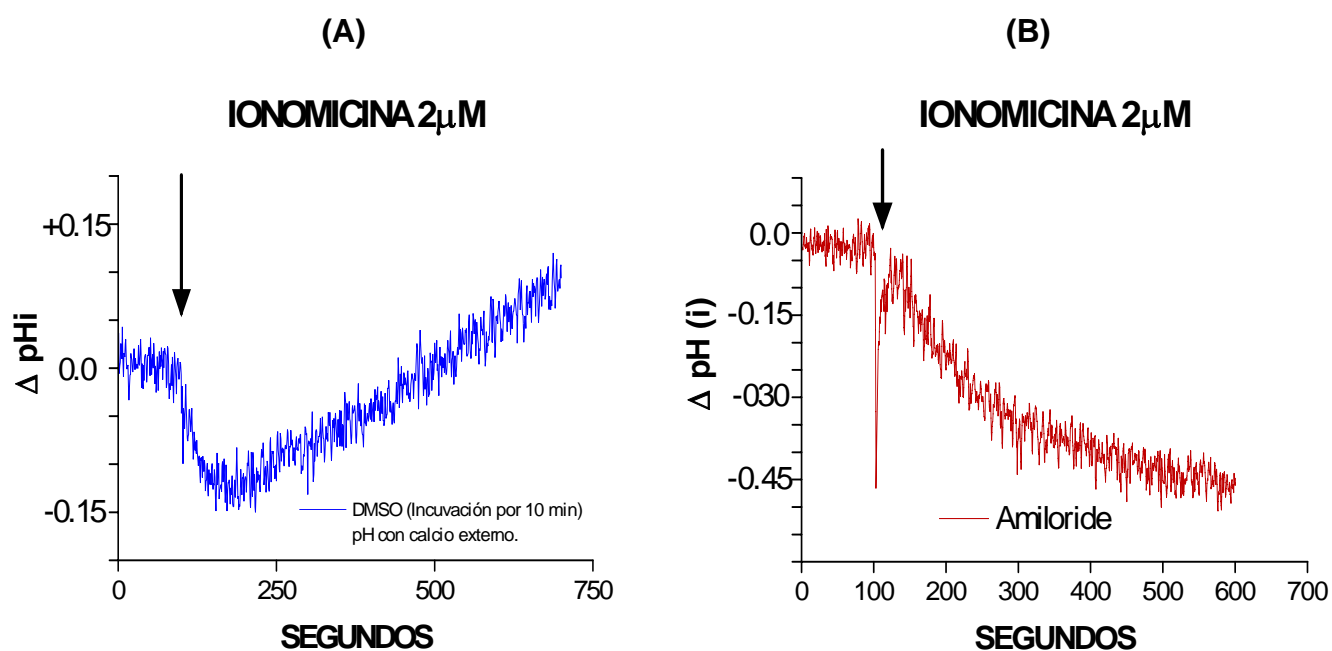


Fig. 7:

A.- Registro representativo de los cambios de pH inducidos por ionomicina,

B.-Registro representativo de la inhibición del NHE con Amiloride.

7. DISCUSIÓN

En este estudio, los resultados demostraron que ionomicina ($2\mu\text{M}$) estimuló un alza rápida de Ca^{2+} citosólico. Cuando estas mismas células son tratadas con EGTA 5mM o BAPTA-AM $50\mu\text{M}$, la movilización de Ca^{2+} inducida por ionomicina se ve afectada, ya que al quelar el Ca^{2+} extracelular la subida es rápida, pero transitoria y al quelar el Ca^{2+} intracelular la subida es más lenta llegando a un punto en que se mantiene estable (figura 1). De hecho los cambios en el Ca^{2+} citosólico juegan un papel íntegro en la señalización mediada por receptor en polimorfonucleares, y estos eventos son el resultado de la liberación de Ca^{2+} de los compartimentos intracelulares, la entrada de Ca^{2+} , o ambos. Por ejemplo, PAF y FMLP causan una rápida alza de los niveles de Ca^{2+} citosólico, y estos cambios de Ca^{2+} son necesarios para la quimiotaxis, fosforilación de proteína tirosina, y ensamblaje de oxidasa (Elzi y col., 2001). En ausencia de Ca^{2+} externo se observa igual un aumento de Ca^{2+} intracelular estimulado con ionomicina, ya que esta tiene la capacidad de aumentar tanto la entrada como la liberación de Ca^{2+} intracelular (Elzi y col., 2001).

Ionomicina produjo un cambio en el pH intracelular, observándose una acidificación transitoria y una alcalinización sostenida (figura 3). Intracelularmente hay un cambio bifásico de pH que se caracteriza por una rápida acidificación y una gradual alcalinización dependiente del intercambiador Na^+/H^+ (figura 7), con acidificación en el medio extracelular lo cual es clave en el proceso de quimiotaxis, aumento de la vida media del neutrófilo y liberación de superóxido (Naccache y col., 1986; Gronert y col.,

1998). Este patrón es también observado en neutrófilos activados con fMLP y TPA (Grinstein y col., 1986; Sustak y col., 1997). Ha sido demostrado que una acidificación intracelular sostenida incrementa la actividad NHE1 y la vía de activación ERK 1/2 (Haworth y col., 2003). Quimioattractantes inducen el estallido respiratorio a través de NADPH oxidasa provocando un aumento en la producción de H^+ (Grinstein y col., 1986; Sustak y col., 1997), y es posible que la acidificación intracelular inicial podría contribuir directamente en la actividad de NHE. Sin embargo usando UO126, se observó un efecto sobre la tasa de alcalinización inducido por PAF en neutrófilos de bovino, indicando que la actividad de NHE está controlada por la vía ERK (Hidalgo y col., 2004).

Los resultados claramente muestran que $2\mu M$ de ionomicina causan un incremento significativo en la alcalinización intracelular medida en células marcadas con BCECF-AM. Cuando estas células se incubaron con BAPTA-AM $50\mu M$ se observó solamente el fenómeno de alcalinización. Por otro lado, en las células que se incubaron en un medio libre de Ca^{2+} con EGTA $5Mm$ se observó solamente acidificación, y en los 2 tipos de medio en que se incubaron las células al ser tratadas con EGTA más BAPTA-AM se observó una ligera acidificación (Fig.4). En la 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. 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

fuelle de Ca^{2+} responsable de la subida de Ca^{2+} citosólico se origina del influjo extracelular (Davies y col., 1991)

La inhibición específica de la vía p38 con SB203580, muestra una clara inhibición de la acidificación (figura 5), esto sugiere la participación de esta vía en el aumento de protones para la acidificación. Se ha observado que en neutrófilos estimulados con zimosan opsonizado al tratarlo con SB203580 disminuyó la actividad de la NADPH oxidasa puesto que se reduce la actividad de la vía p38 (Yamamori., 2002).

La inhibición específica de PKC con Gö6850, resultó en una clara inhibición de la alcalinización intracelular del neutrófilo inducido por ionomicina (figura 5), esto sugiere que entre las vías de control del proceso de alcalinización, al interior del neutrófilo, participaría la vía PKC. Se ha demostrado que el intercambiador NHE en neutrófilos está involucrado en la regulación del $\text{pH}_{(i)}$, estaría sujeto a dos mecanismos: directamente a través de PKC e indirectamente por la acidificación del citoplasma. (Grinstein y col., 1986). La estimulación de PKC y la elevación de Ca^{2+} citosólico pueden producir alcalinización, señalando un cambio en el pH por activación del intercambiador NHE. Sin embargo, el efecto del Ca^{2+} citosólico en el pH es más predominante que la estimulación de PKC (Kimuras y col., 1990).

La inhibición específica de PI3K y ERK1/2 mostró una clara inhibición de la alcalinización y una menos marcada inhibición de la acidificación (figura 5), lo que sugiere que estas vías están relacionadas con la actividad de NHE. PAF causa

alcalinización en neutrófilos marcados con BCECF. Este fenómeno parece ser mediado por el intercambiador Na^+/H^+ sensible a amilorida, y es inhibido por LY294002 y UO126. Por lo tanto se sugiere que PAF induce alcalinización intracelular vía activación PI3K-MAPK en neutrófilos de bovino (Hidalgo y col., 2004).

En la acidificación intracelular inducida por ionomicina no participarían significativamente las vías PKC, PI3K y ERK1/2 (figura 5). Sin embargo, es posible que en la producción de protones inducida por ionomicina participe una vía dependiente de p38. Los cambios inducidos por el ionóforo de Ca^{2+} en polimorfonucleares demuestra la importancia de Ca^{2+} para la activación de la p38 MAPK, también se ha demostrado los requerimientos de Ca^{2+} citosólico para la activación de la p38 MAPK en respuesta a diferentes estímulos, incluyendo PAF y FMLP (Elzi y col., 2001).

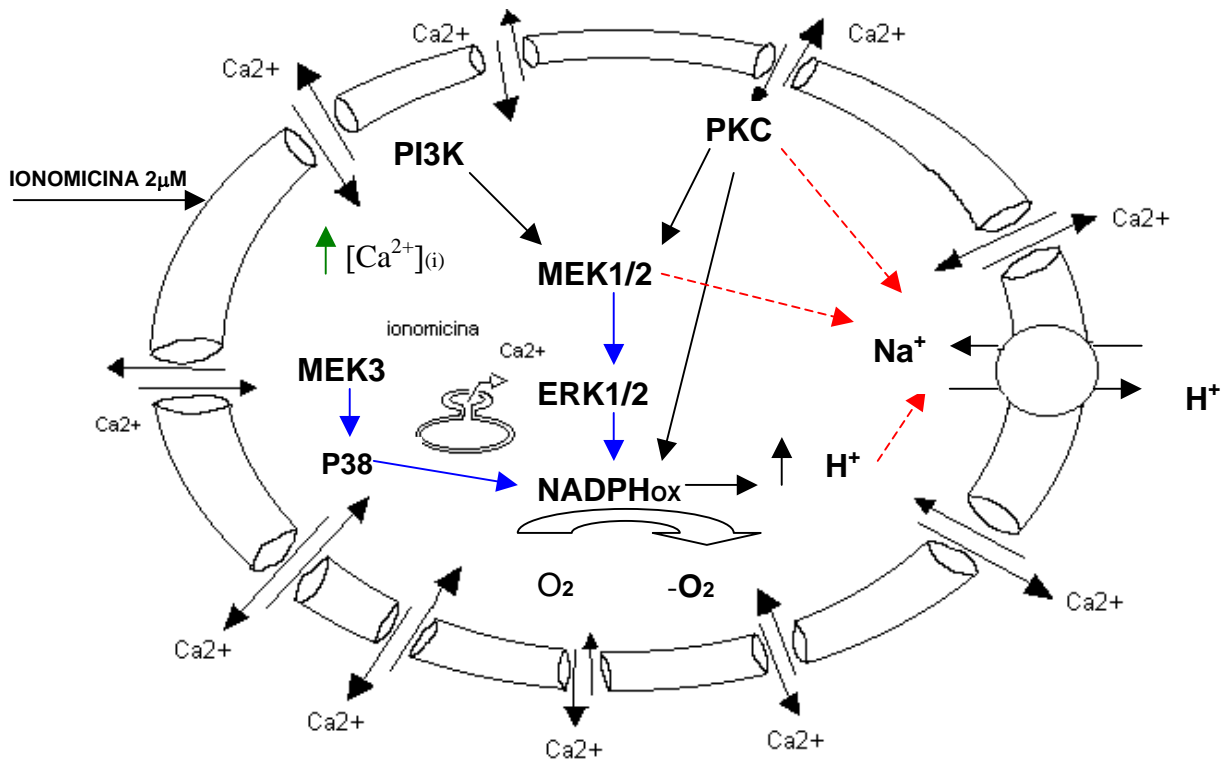
Ionomicina activó la producción de superóxido en polimorfonucleares y los quelantes de Ca^{2+} extracelular EGTA e intracelular BAPTA-AM, produjeron una marcada inhibición de la producción de superóxido (figura 6a). Diferentes estímulos inducen la producción de superóxido, sugiriendo una diversidad de vías de transducción de señal que llevan a su activación, tanto de aquellas ligadas a membrana plasmática y las proveniente de los pools de NADPH oxidasa localizadas en los gránulos respectivamente (Granfeld y col., 2002). En la ausencia tanto de Ca^{2+} extracelular como de la liberación de Ca^{2+} de los compartimentos intracelulares provoca una disminución en la producción de superóxido inducida por FMLP (Valentin y col., 2001).

En la producción de superóxido inducido por ionomicina los datos sugieren una participación tanto de la vía p38 como de la PKC, ya que al usar los inhibidores específicos de estas vías, se observa una notable disminución de la producción de superóxido (figura 6b). La producción de superóxido fue inducido en neutrófilos estimulados con zimosan opsonizado y se atenúo con SB203580 (Yamamori., 2002). En el neutrófilo la NADPH-oxidasa puede ser activada por agonistas de PKC, tales como PMA, resultando en la liberación del anión superóxido. Esta liberación de superóxido es independiente de PI3K, porque al ser inhibida con wortmanina no afecta la respuesta (Karlsson y col., 2000).

En conclusión, en neutrófilos de bovino, el aumento de $Ca^{2+}_{(i)}$ inducido por ionomicina es suficiente para lograr una producción intracelular de radicales del anión superóxido. El Ca^{2+} extracelular tuvo una mayor participación en la alcalinización, mientras que el Ca^{2+} intracelular participaría principalmente de la acidificación, siendo la acidificación controlada por una vía de dependiente de p38 y la alcalinización vía PKC, PI3K y ERK1/2. Ionomicina activó la producción de superóxido en polimorfonucleares principalmente en presencia de Ca^{2+} extracelular por medio de las vías PKC y p38. Se ha demostrado que en los neutrófilos de bovino la activación de NHE inducida por PAF es controlado por la vía de las proteínas PI3K-ERK1/2. Sin embargo, antes que se produzca esta activación se observa un aumento de Ca^{2+} intracelular que se origina tanto de la liberación intracelular como del ingreso de Ca^{2+} externo. El aumento de Ca^{2+} intracelular podría ser la señal que inicie los cambios de pH independiente o como consecuencia del aumento de la producción de superóxido o del control de la actividad

de NHE. Esta regulación podría ser importante en la inflamación, debido al hecho que NHE esta ampliamente expresado en leucocitos, y es el blanco de múltiples vías de señalización y participa activamente durante el proceso inflamatorio (Putney y col., 2002).

Esquema representativo del aumento de Ca^{2+} y cambios de PH intracelular inducido por ionomicina.



Los colores representan el orden en que van ocurriendo los hechos.

-----Aumento de Ca^{2+} intracelular y extracelular.

-----activación de las MAPquinasas.

-----activación de PI3K y PKC.

----- actividad del intercambiador.

8. LITERATURA CITADA

Alberts, B. (2001) *Biología molecular de la célula*. 3ª .Ed. Omega, Barcelona. 195, 514-551, 787-802.

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. *The American Society of Hematology.*, 100: 3383-3391.

Cullen, P. J. and Lockyer, P. J. (2002) Integration of calcium and Ras signalling. *Molecular Cell Biology.*, 3: 339-348.

Dahlgren, C., 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.

Downey, G.P., Butler, J.R., Tapper, H., Fialkow, L., Saltiel, A.R., Rubin, B.B. and Grinstein, S. (1998) Importance of MEK in neutrophil microbicidal responsiveness. *J. Immunol.*, 160:434-443.

Edwards, S.W. 1994. Biochemistry and physiology of the neutrophil. Ed. Cambridge University Press. U.S.A.

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 Physiol.*, 281, C350-C360.

Florez, J. (1997) Farmacología Humana. 3^a Ed. Masson, S.A, Barcelona, 34-37, 969-971.

Fruman, D. A., Meyers, R. E. and Cantley, L. C. (1998) Phosphoinositide kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:481-507.

Fukushima, T., Waddell, T. K., Grinstein, S., Goss, G. G., Orlowsky, J. and Downey, G. P. (1996) Na⁺/H⁺ Exchange activity during phagocytosis in human neutrophils role of fcgamma receptors and tyrosine kinases. *J. Cell Biol.*, 132:1037-1052.

Granfeldt, D., Samuelsson, M. and Karlsson, A. (2002) Capacitative Ca^{2+} influx and activation of the neutrophil respiratory burst. different regulation of plasma membrane and granule-localized NADPH-oxidase. *Journal of Leukoocyte Biology.*, 71, 611-616.

Gennaro, R., Dewald, U., Horisberger, H. U. and Gubler, M. B. (1983) A novel type of cytoplasmic granule in bovine neutrophils. *J. Cell Biol.* 96:1651-1661.

Gillis, D., Shrode, L. D., Krump, E., Howard, C. M., Rubie, E. A., Tibbles, L.A., Woodgett, J. and Grinstein S. 2001. Osmotic stimulation of the Na^+/H^+ exchanger NHE1: relationship to the activation of three MAPK pathways. *J. Membr. Biol.*, 181:205-214.

Granot, Y., Erikson, E., Fridman, H., Van Putten, V., Williams, B., Schrier, R.W., and Maller, J. L. (1993) Direct evidence for tyrosine and threonine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase by vasopressin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 268: 9564-9569.

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.*, 26:512-4.

Grinstein, S., Goetz, J. D. and Rothstein, A. (1984) Na⁺ fluxes in thymic lymphocytes.

II. Amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ exchange pathway; reversibility of transport and asymmetry of the modifier site. *J. Gen. Physiol.*, 84:565-584.

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.

Hauser, C. J., Fekete, Z., Livingston D. H., Adams, J., Garced, M. and Deitch, E.

(2000) Major trauma enhances store-operated calcium influx in human neutrophils. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care.*, 48: 592-598.

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.* 278:31676-84.

Hendey, B., Mamrack, M. D. and Putnam, R. W. (1989) Trombine

induces a calcium transient that mediates an activation of the na⁺/h⁺ exchanger in human fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry.*, 264, 19540-19547.

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.* 141:311-311.

Hirsch, E., Katanaev, V. L., Garlanda, C., Azzolino, O., Pirola, L., Silengo, L., Sozzani, S., Mantovani, A., Altruda, F. and Wymann, M. P. (2000) Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science*, 287:1049-1053.

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.

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. *Journal of Leukocyte Biology.*, 67, 396-404.

Kimuras, M., Gardner, J. P. and Aviv, A. (1990) Agonista-evoked alkaline shift in the cytosolic pH set point for activation of Na^+ / H^+ antiport in human platelets. *The Journal of Biological Chemistry.*, 265, 21068-21074.

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.

Kutsuna, H., Suzuki, K., Kamata, N., Kato, T., Hato, F., Mizuno, K., Kobayashi, H., Ishii, M. and Kitagawa, S. (2004) Actin reorganization and morphological changes in human neutrophils stimulated by tnf, gm-csf, and g-csf: the rol of map kinases. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 286, C55-C64.

Liu, J., Lui, Z., Chuai, S. and Shen, X. (2003) Phospholipase c and phosphatidylinositol 3-kinase signalling are involved in the exogenous arachidonic acid-stimulated respiratory burst in human neutrophils. *J.Leukoc.Biol.* 74: 428-437.

Miike, S., Kurasawa, K., Saito, Y. and Iwamoto, I. (2000) Platelet-activating factor activates mitogen activated protein kinases through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase and tyrosine kinase in human eosinophils. *J. Leukocyte Biol.*, 67:117-126.

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 Leukocyte Biol.*, 67:116-126.

Nanda, A., Gukovskaya, A., Tseng, J. and Grinstein, S. (1992) Activation of vacuolar-type proton pumps by protein kinase c. *The Journal of Biological Chemistry.*, 267: 22740-22746.

Nick, J. A., Avdi, N.J., Young, S. K., Knall, C., Gerwins, P., Johnson, G. L. and Worthen, G. S. (1997) Common and distinct intracellular signalling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FLMP. *J. Clin. Invest.*, 99:975-986.

Okada, T., Sakuma, L., Fukui, Y., Hazeki, O. and Ui, M. (1994) Blockage of chemotactic peptide induced stimulation of neutrophils by wortmanin as a result of selective inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, 269:3563-3567.

Parekh, A. and Penner, R. (1997) Store depletion and calcium influx. *American Physiological Society.*, 77, 902-924.

Payne, D. M., Rossomando, A. J., Martino, P., Erickson, A. K., Her, J. H., Shabanowitz J., Hunt, D. F., Weber, M. J. and Sturgill, T. W. (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.*, 10:885-892.

Persson, K., Larsson, I. and Sandgren, C. H. (1993) Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration *in vivo* and *in vitro*. *Vet. Immunol.*

Immunopathol., 37:99-112.

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.

Simchowicz, L. and Cragoe, E. J. 1986b. Regulation of human neutrophil chemotaxis by intracellular pH. *J. Biol. Chem.*, 261:6492-6500.

Sinnecker, D. and Schaefer, M. (2004) Real-time analysis of phospholipase c activity during different patterns of receptor-induced Ca²⁺ responses in hek293 cells.

Cell Calcium., 35, 29-38.

Stasia, M. J., Strulovici, B., Daniel-Issakani, S., Pelosin, J. M., Dianoux, A. C., Chambaz, E. and Vignais, P. V. (1990) Immunocharacterization of beta- and zeta-subspecies of protein kinase C in bovine neutrophils. *FEBS Lett.*, 274:61-64.

Swain, S. D., Bunger, P. L., Sipes, K. M., Nelson, L. K., Jutila, K. L.,

Boylan, S. M. and M.T. Quinn, M. T. (1998) Platelet-activating factor induces a concentration-dependent spectrum of functional responses in bovine neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 64:817-827.

Vanhaesebroeck, B., Welham, M. J., Kotani, K., Stein, R., Warne, P. H., Zvelebil, M. J., Higashi, K., Volinia, S., Downward, J. and Waterfield, M. D. (1997) P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94:4330-4335.

Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y. and Brown, R. F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem.* 269:5241-8.

Ward, S., Sotsios, Y., Dowden, J., Bruce, I. and Finan, P. (2003) Therapeutic potential of phosphoinositide 3-kinase inhibitors. *Chem Biol.* 10:207-13.

Wymann, M. P. and Pirola, L. (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1436:127-150.

Yaffe, M. B., Xu, J., Burke, P. A., Forse, R. A. and Brown, G. E. (1999) Priming of the neutrophil respiratory burst is species-dependent and involves MAP kinase activation. *Surgery.*, 126:248-254.

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. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 293: 1571-1578.

Zavoicos, G. B., Edward J. C. and Feinstein, M. B. (1986) Regulation of intracellular pH in human platelets. *The Journal of Biological Chemistry.*, 261, 13160-13167.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar le agradezco a DIOS por haberme acompañado en todo momento dándome las fuerzas necesarias para lograr mis objetivos.

A mi madre por el apoyo incondicional y por la confianza que siempre me depositado en mí.

A mis familiares, amigos y cercanos que de alguna u otra manera me ayudaron y me acompañaron en este largo y difícil camino.

A todas las personas que me ayudaron en realizar la parte práctica y teórica de mi tesis, por su gran apoyo técnico. A el Instituto de Farmacología, por prestarme sus dependencias para ejecutar mis experimentos.

Finalmente y de forma muy especial, quiero agradecer al Doctor Rafael Burgos por haber estado siempre dispuesto a ayudarme en todo lo que estuviera a su alcance, además de su paciencia y su manera muy particular de hacernos sentir bien y capaces de lograr todos los objetivos que nos propusiéramos.