



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. J. Luis Hancke O.
INSTITUTO : Farmacología
FACULTAD : Ciencias Veterinarias

“ROL DEL CALCIO CITOSOLICO EN LAS VARIACIONES DE PH INTRACELULAR INDUCIDO POR PROPIONATO EN NEUTROFILOS DE BOVINO”

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

FRANCISCO SANTIAGO TRIVIÑOS CASTILLO

VALDIVIA-CHILE
2005

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Dios por su compañía omnipresente y por las misteriosas formas de manifestarse en los trances más complejos de la vida.

Agradezco a mis padres por estar conmigo siempre en los buenos y malos momentos.

A mis padrinos Alfredo y Eliana por su nobleza de corazón y por apoyarme en alcanzar esta gran meta en la vida.

Quiero agradecer a Silvia y Ricardo por su apoyo y compañía incondicional, en todo momento.

A los integrantes del Instituto de Farmacología por su gran calidad humana. Quiero agradecer especialmente a mi colega Álvaro Sandoval por su excelente disposición.

Finalmente quiero extender dichos agradecimientos, a mis profesores Dr Rafael Burgos y Dr Juan Luis Häncke, no solo por la formación científica entregada, sino que además por el respeto y la solidaridad manifestada, en diferentes jornadas de la vida. Quiero extender este agradecimiento al proyecto Fondecyt 1010204 por financiar este trabajo de titulación.

INDICE

1 ABREVIATURAS	3
2 RESUMEN	4
3 SUMMARY	5
4 INTRODUCCIÓN	6
4.1 Neutrófilos	6
4.2 Calcio.	8
4.3 Ácido propionico y acidificación extracelular	9
4.4 pH intracelular	11
4.5 Intercambiador Na^+/H^+ (NHE).	13
4.6 Hipótesis.	14
4.7 Objetivo genetal.	15
4.8 Objetivos específicos	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1 Materiales	16
5.2 Metodología	18
6 RESULTADOS	26
6.1 Rol de propionato en la movilización de calcio intracelular en neutrófilos bovinos.	26
6.2 Rol del calcio intracelular en los cambios de pH inducido por propionato en neutrófilos bovinos.	28
6.3 Rol del calcio extracelular en los cambios de pH inducido por propionato en neutrófilos bovinos.	31
6.4 Rol del intercambiador Na^+ / H^+ en los cambios de pH inducido por propionato en neutrófilos bovinos.	34
6.5 Rol del canal de H^+ en los cambios de pH inducido por propionato en neutrófilos bovinos.	37

6.6 Rol del intercambiador Na ⁺ / H ⁺ y del canal de H ⁺ en los cambios de pH inducido por propionato en neutrófilos bovinos.	40
6.7 Rol de p38 en los cambios de pH inducidos por propionato en neutrófilos bovinos.	43
6.8. Rol de PKC en los cambios de pH inducidos por propionato en neutrófilos bovinos.	46
6.9 Evaluar el rol de ERK en los cambios de pH inducidos por propionato en neutrófilos bovinos.	49
7. DISCUSIÓN.	52
7.1 Rol de propionato en la movilización de calcio intracelular en neutrófilos bovinos.	52
7.2 Rol del calcio intracelular y extracelular en los cambios de pH inducido por propionato en neutrófilos bovinos.	53
7.3 Rol del intercambiador Na ⁺ / H ⁺ y del canal de H ⁺ en los cambios de pH inducido por propionato en neutrófilos bovinos.	54
7.4 Rol de p38 en los cambios de pH inducidos por propionato en neutrófilos bovinos.	57
7.5 Rol de PKC en los cambios de pH inducidos por propionato en neutrófilos bovinos.	58
7.6 Rol de ERK en los cambios de pH inducidos por propionato en neutrófilos bovinos.	58
8. CONCLUSION.	59
9. Bibliografía.	60

1. ABREVIATURAS

BAPTA:	1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraceticAcid Tetra(acetoxymethyl) Ester.
BCECF- AM :	2,7-bis-(2-carboxietil)-5-(y-6)-carboxifluorecein acetoximetilester
DMSO:	Dimetilsulfoxido.
EGTA:	Ethyleneglycol- <i>bis</i> (A-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetracetic Acid.
ERK:	Extracelullar Signal – Regulated Kinase.
ER:	Endoplasmic Reticulum.
FMLP:	N-formilmetionina-leucil-fenilalanina.
FURA-2:	1-(2-(5-carboxioxazol-2-il)-6aminobenzofuran-5oxi)-2-(2-amino-5´metilfenoxi)-etano-N,N,N',N'-ácidotetracético, pentacético, pentaacetoximetil ester.
GPR:	Receptors coupled to G protein.
HBSS:	Hank's balanced salt solution.
IP ₃ :	Inositol 1, 4,5-trifosfato.
NHE:	Na ⁺ / H ⁺ exchanger.
PAF:	Factor activante plaquetario.
PMA:	Forbol 12-miristato 13-acetato.
PMN:	Polimorfonucleares.
PKC:	Protein Kinase C.
SOCE:	Storage Operated Calcium Entry.

2. RESUMEN

Esta tesis, evaluó en neutrófilos de bovino los mecanismos de regulación de los cambios de pH intracelular inducido por propionato, un ácido graso de cadena corta sintetizado por bacterias presentes en infecciones peridontales y gastrointestinales. Se evaluó el rol del aumento Ca^{2+} intracelular y el ingreso de Ca^{2+} externo, así mismo el rol del intercambiador Na^+/H^+ (NHE), de canales de H^+ y de las vías PKC, p38 y ERK. Para analizar la movilización de calcio intracelular y los cambios de pH se utilizaron técnicas de espectrofluorimetría utilizando FURA2-AM y BCECF-AM, respectivamente. Propionato produjo un aumento Ca^{+2} citoplasmático mediante el ingreso de Ca^{+2} externo y la liberación de calcio intracelular. El aumento de calcio intracelular estuvo asociado a la acidificación intracelular, y el ingreso de calcio extracelular con la alcalinización citosólica. El bloqueo de los canales de H^+ con Zn^{2+} y la inhibición de NHE con amiloride resultó en la inhibición de la acidificación y alcalinización, respectivamente. La inhibición de p38 y ERK fue evaluada con SB283580 30 μM y UO126 1 μM respectivamente. SB283580 redujo la acidificación máxima inducida por propionato y UO126, inhibió la alcalinización intracelular. Por otro lado, Gö6850, un inhibidor selectivo de PKC, no produjo cambios en acidificación o alcalinización intracelular. Los resultados permiten concluir que propionato controla la acidificación, en parte, a través del ingreso de un canal de protones que es dependiente de la liberación de Ca^{+2} intracelular y de p38. Mientras que la alcalinización inducida por propionato es dependiente de la entrada de Ca^{+2} externo y de ERK1/2.

3. SUMMARY

Propionate is a short chain fatty acid synthesized by bacteria present in periodontal and gastrointestinal infections. It is an agonist of receptors coupled to G protein (GPR43) in neutrophils and is associated to the production of IP₃, release of Ca²⁺ and activation of ERK1/2. This thesis, evaluated the mechanisms that regulate the intracellular pH induced by propionate in bovine neutrophils. The role of an increase in intracellular Ca²⁺ and external Ca²⁺, and the role of the Na⁺/H⁺ (NHE) interchange, of H⁺ channels and PKC, p38 and ERK pathways was studied. To analyze the mobilization of intracellular Calcium and the pH changes, spectrofluorometry FURA2-AM and BCECF-AM were used, respectively. Propionate augmented the cytoplasmatic Ca²⁺ via entry of external Ca²⁺ and release of intracellular calcium. The increase of intracellular calcium was associated with intracellular acidification, and the entry of intracellular calcium with cytosolic alkalinization. The blockade of the H⁺ channels with Zn²⁺ and the inhibition of NHE with amiloride resulted in the inhibition of the acidification and alkalinization, respectively. The inhibition of p38 and ERK was evaluated with SB283580 30 M and UO126 1 M, respectively. SB283580 reduced the maximum acidification induced by propionate and UO126 inhibited the intracellular alkalization. Gö6850, a selective inhibitor of PKC, did not caused intracellular acidification or alkalinization. The results permit to conclude that propionate controls the acidification in part, through the entry of a proton channel that is dependant of the liberation of intracellular Ca²⁺ and p38. On the other hand, the alkalinization induced by propionate is dependant on the entry of external Ca²⁺ and ERK1/2.

4. INTRODUCCIÓN

4.1. NEUTRÓFILOS.

El sistema inmunológico está constituido tanto por componentes celulares como moleculares. Dentro de los componentes celulares del citado sistema, se encuentran los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y entre ellos los neutrófilos (Swain y col., 1998; Edwards, 1994).

Los neutrófilos juegan un rol de gran importancia en la organización defensiva contra variados agentes infecciosos, a través de diversos mecanismos como fagocitosis, generación de especies reactivas de oxígeno y péptidos bactericidas (Yamamori y col., 2002), por lo que son considerados la primera línea de defensa del organismo contra infecciones bacterianas o fúngicas (Edwards, 1994). Sin embargo y pese a su documentada capacidad de ser las primeras células en alcanzar los sitios de infección y responder en forma fulminante y potente (Edwards, 1994), los neutrófilos tiene una vida media más bien breve (8-12 hrs), la cual solo se extiende por unos pocos días. De este modo el neutrófilo tras ser formado en la médula ósea migrará al torrente sanguíneo en donde permanecerá aproximadamente 12 horas antes de alcanzar los tejidos comprometidos por una agente infeccioso (Tizard, 1982).

Los neutrófilos tienen la capacidad de responder a distintos y variados estímulos, por lo que la capacidad de respuestas de estos también será variada: quimiotaxis, cambios en la conformación del cito esqueleto, actividad respiratoria y liberación de gránulos internos entre otros, lo cual condiciona una apropiada respuesta a la presencia de agentes patógenos, pero también un cierto daño a nivel tisular (Swain

y col., 1998.). Por ejemplo, en humanos los neutrófilos están involucrados en varias enfermedades inflamatorias incluyendo artritis reumatoide, daños isquémicos y síndrome de distrés respiratorio en adultos (Burgos y col., 2004).

Aunque los neutrófilos 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).

La importancia de los neutrófilos radicaría en la participación de éstos en diferentes patologías que implican cuadros inflamatorios tales como mastitis, donde la migración de neutrófilos al sitio de inflamación es de extrema importancia para la defensa contra infecciones de la glándula mamaria y pezón (Persson y col., 1993).

4.2. CALCIO.

El Calcio es uno de los mensajero intracelulares con mayor protagonismo en los procesos de regulación celular, así el aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólico libre en PMN, está asociado con una serie de eventos en el ámbito intracelular, donde se describen cambios a nivel del citoesqueleto, presentación de moléculas de adhesión y la explosión de la actividad oxidativa, entre otros (Itagaki y col., 2002).

La exposición de los PMN a la gran variedad de agonistas presentes en un proceso inflamatorio, y la correspondiente unión de dichos agonistas a receptores acoplados a proteína G, trae asociado la activación de una serie de señales intracelulares por incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico libre (Itagaki y col., 2002) El aumento de las concentraciones de Ca^{2+} citosólico, puede inducir la fosforilación y activación de proteínas pertenecientes a la familia de las MAPK como p38 y ERK 1/2. (Elzi y col., 2001). De este modo dichos agonistas presentes en un proceso inflamatorio, al activar el correspondiente receptor (acoplado a proteína G) gatillan la liberación de IP_3 al citoplasma, el cual interactúa con su receptor específico en el retículo endoplásmico (ER) resultando en una rápida liberación de Ca^{2+} desde los almacenes del ER. Como esta liberación de Ca^{2+} agota los almacenes del ER, subsecuentemente se produce una entrada de este ión desde el medio extracelular a través de la membrana plasmática por mecanismos relacionados con entradas de calcio operadas por almacenamiento (SOCE, de su sigla en inglés Store – Operated Calcium Entry) o entradas de calcio capacitativas (CCE: Capacitative Channels Entry) (Itagaki y col., 2002)

4.3. ÁCIDO PROPIÓNICO Y ACIDIFICACIÓN EXTRACELULAR

El propionato al igual que el acetato son ácidos grasos de cadena corta, los cuales son producidos en altas concentraciones por bacterias presentes en infecciones periodontales y a nivel intestinal, logrando posteriormente alcanzar la circulación sistémica (Niederman y col., 1997; Le Poul y col., 2003). Estos ácidos grasos de cadena corta manifiestan una inherente capacidad de activación de leucocitos, donde los neutrófilos han resultado ser los más afines con esta propiedad. Así de este modo se ha descrito que ácidos grasos de cadena corta pueden activar receptores acoplados a proteína G, donde propionato se distingue como un potente agonista sobre GPR41 Y GPR43 (Le Poul y col., 2003). Ambos receptores están asociados con la producción de inositol 1, 4,5-trifosfato (IP₃), liberación de Ca²⁺ al citosol y activación de ERK1/2. La selectiva expresión del receptor GPR43 en leucocitos, particularmente PMN, sugieren un rol del propionato en el reclutamiento de la células al sitio de la infección (Le Poul y col., 2003).

El receptor GPR43, que es expresado mayoritariamente y de manera específica en neutrófilos, está potencialmente asociado con el desarrollo de múltiples enfermedades, todas ellas caracterizadas ya sea por una excesivo o un insuficiente reclutamiento y activación de los neutrófilos hacia el foco infeccioso, propios de enfermedades intestinales inflamatorias así como alcoholismo asociado a inmunodepresión (Le Poul y col., 2003)

En la década de los 80 y 90 diversos trabajos establecieron que la acidificación citosólica en neutrófilos humanos tras la exposición de éstos a un microambiente extracelular rico en propionato, estaba acompañada con un incremento en la

concentración de calcio citosólico libre, similar al producido por factores quimiotácticos tales como FMLP o leucotrienos B₄ (Fonteriz y col., 1991). Dicho incremento en la concentración de calcio citosólico libre, por acción de factores quimiotácticos, tendrían su origen tanto en fuentes intra como extra celulares (Naccache y col., 1988). El aporte de calcio citosólico libre desde fuentes intracelulares, tiene su origen desde el retículo endoplasmático, el cual está regulado por IP₃ (Faucher y col., 1987).

Estudios previos establecieron que la adición de propionato a neutrófilos humanos resulta en un rápido aumento en los niveles de calcio citosólico libre, tras ser medidos fluorométricamente con FURA-2 (Faucher y col., 1987), concluyéndose que dicho aumento sería una respuesta dosis dependiente respecto a la concentración de propionato presente en el microambiente extracelular (Naccache y col., 1988).

Lo anterior adquiere relevancia si consideramos que la acidez del medio extracelular es una condición que está normalmente asociada a una variedad de situaciones tanto fisiológicas como patológicas. Es bien documentado que el valor de pH de la orina en el túbulo distal y en la vejiga puede caer a valores de 5.5, bajo condiciones patológicas, de igual modo investigaciones han mostrado que al nivel de microambiente de un tumor es habitualmente más ácido que el normal, con valores de pH del orden de 5.8 (Trevani y col., 1999). Así, estudios anteriores han demostrado que cierta respuesta funcional de los neutrófilos, como movilización de los neutrófilos desde el sistema circulatorio hasta el foco inflamatorio, son afectadas por cambios en las concentraciones de iones de hidrógeno del microambiente (Rabonowitch y col., 1979; Trevani y col., 1999).

Lo anterior resulta coherente, más aún cuando estudios en neutrófilos de humanos y conejos, tendientes a demostrar, la importancia de la acidez extracelular en la migración de PMN, han permitido establecer como resultado a la exposición de éstos a un gradiente de pH entre 5.0 y 8.0, una respuesta migratoria orientada hacia la región más ácida (Zigmond y Hargrove., 1981).

4.4. pH INTRACELULAR.

Tal como fue planteado en el punto 4.1 los neutrófilos juegan un rol de gran importancia en la organización defensiva contra agentes infecciosos (Yamamori y col., 2002), es por esto, que en muchas publicaciones los neutrófilos humanos son considerados dentro de las principales células con actividad fagocítica.

Durante la actividad de fagocitosis los neutrófilos se valen de distintos mecanismos y agentes líticos para llevar a cabo la eliminación o muerte de los agentes patógenos (Muhammad y col., 1995). Así durante la respuesta bactericida los fagosomas contienen una variedad de especies reactivas del oxígeno incluyendo OCl^- , $\bullet\text{OH}$, y H_2O_2 , los cuales son derivados de la producción de ión superóxido por parte de la NADPH oxidasa, la cual es un complejo multienzimático conformado a lo menos por dos proteínas de membrana, gp91phox y p22 phox (Yamamori y col., 2002). La activación y posterior oxidación del complejo NADPH a NADP^- resulta en un incremento en la concentración de H^+ libres y con ello una acidificación del medio intracelular, constituyéndose este complejo como una de las fuentes internas de mayor importancia en la acidificación citosólica (Lowental y col., 1999).

Pero no sólo el proceso de fagocitosis es responsable de la reducción del pH intracelular, también la concentración de H^+ libres en el citoplasma es generado por un número de reacciones metabólicas, incluyéndose por ejemplo hidrólisis de ATP y glicólisis (Bidani y col.,1994). Así, resulta un hecho que la actividad celular trae asociado un alto grado de acidificación intracelular, lo cual exige a la célula contar con eficientes sistemas tanto de neutralización como expulsión de protones, siendo estos sistemas altamente necesarios para mantener la actividad metabólica de la célula. Entre estos mecanismos podemos destacar el intercambiador Na^+/H^+ , el cual rápidamente expulsa los protones desde el citosol hacia el exterior de la célula (Zavoico y col.,1986), además de los sistema de bombas de H^+ ATPasa y canales de H^+ sensibles a metales pesados involucradas en dicho movimiento (Lowenthal y col.,1999). Así, trabajos realizados en la década del noventa describieron una conducción de protones a través de la membrana plasmática en neutrófilos humanos, adjudicados a canales de H^+ , los cuales serían sensibles a ser bloqueados por Zn^{2+} o Cd^{2+} (Schumann y col 1995), postulando además la función moduladora del ácido araquidónico sobre la conducción de H^+ a través de la membrana plasmática en macrófagos (Kapus, y col., 1993).

Además, tras la activación del neutrófilo por un agonista como PMA, se observa un cambio de tipo bifásico en el pH intracelular, describiéndose al inicio una acidificación intracelular, seguida de una recuperación del pH citosólico, hasta alcanzar una condición alcalina (Nanda y col., 1992). Esta respuesta ha sido descrita con otros agonistas de la función del neutrófilo, como fMLP, PAF, C5a entre otros (Hidalgo y col., 2004)

4.5. INTERCAMBIADOR Na⁺/H⁺ (NHE).

Está documentado que la movilización de protones a través de la membrana esta regulada por NHE. El flujo de protones a través de la membrana, mediado por la actividad de dicho intercambiador, estaría asociado con migración celular, intercomunicación celular, división, diferenciación y crecimiento celular entre otros (Putney y col., 2002).

En la actualidad se han descritos seis miembros de la familia NHE (NHE1-NHE6), donde NHE1, NHE2, NHE3, NH4 y NHE5 comparten una homología en su constitución aminoacídica del orden del 34 al 60%. De los seis miembros constitutivos de esta familia, el más ampliamente expresado es NHE1. Este intercambiador NHE1, con un peso de 91kDa y 813 a 822 aminoácidos, tiene por función intercambiar H⁺ intracelular por Na⁺ extracelular, regulando así el pH intracelular y el volumen celular, además de mantener la célula eléctricamente neutra (Krump y col., 1997).

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), no obstante está descrito que su actividad es regulada por diversos receptores de membrana, como receptores acoplados a proteína G, receptor tirosina quinasas y receptores integrina (Putney y col., 2002).

A diferencia de NHE1, los restantes miembros de la familia NHE (NHE2 a NHE6) presentan una distribución en los tejidos más bien limitada, confiriéndole esto una mayor especialización de acuerdo al tejido en que se encuentren. De este modo NHE2 y NHE4, se ubican preferentemente a nivel renal y tracto gastrointestinal, mientras que

NHE3, ha sido descrito en el borde cepillo del epitelio intestinal maduro y en la membrana apical del epitelio tubular renal proximal donde regula la reabsorción de Na^+ y HCO_3^- , contribuyendo así a la mantención del balance ácido base y de paso la osmolaridad sanguínea (Putney y col., 2002).

NHE5 es expresado predominantemente en el cerebro y se piensa que es importante en la regulación del pH intracelular en neuronas (Putney y col., 2002). El más reciente miembro de la familia NHE identificado, NH6, es el más divergente en secuencia, compartiendo sólo 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 (Putney y col., 2002).

4.6. HIPÓTESIS.

Las variaciones de pH en neutrófilos de bovino están relacionadas con el aumento de calcio citosólico de origen intracelular como extracelular inducido por propionato.

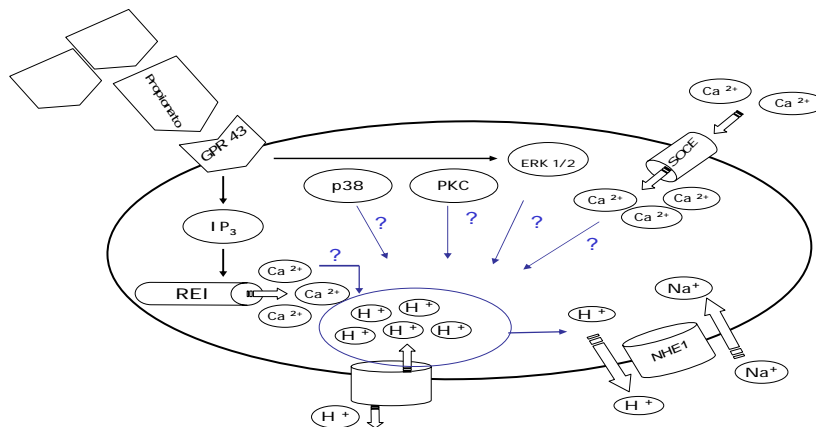


Figura 1 Resumen de los eventos intracelulares según hipótesis

4.7. OBJETIVO GENERAL.

Demostrar la participación de calcio y el rol de las vías p38, PKC, ERK1/2 en los cambios de pH inducidos por propionato en neutrófilos.

4.8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 4.8.1. Evaluar el rol de propionato en la movilización de calcio intracelular.
- 4.8.2. Evaluar el rol del calcio intracelular en los cambios de pH inducido por propionato.
- 4.8.3. Evaluar el rol del calcio extracelular en los cambios de pH inducido por propionato.
- 4.8.4. Evaluar el rol del intercambiador Na^+ / H^+ en los cambios de pH inducido por propionato.
- 7.8.5. Evaluar el rol del canal de H^+ en los cambios de pH inducido por propionato.
- 7.8.6. Evaluar en conjunto el rol del intercambiador Na^+ / H^+ y del canal de H^+ en los cambios de pH inducido por propionato.
- 4.8.7. Evaluar el rol de p38 en los cambios de pH inducidos por propionato.
- 4.8.8. Evaluar el rol de PKC en los cambios de pH inducidos por propionato.
- 4.8.9. Evaluar el rol de ERK1/2 en los cambios de pH inducidos por propionato.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

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 ul, 50 ul, 10 ul

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 (Merck^R).

Balanza analítica (Scientech^R)

5.1.3. Ensayos de medición de pH intracelular:

Propionato de sodio (Merck).

Etanol (Merck^R).

Tubos Eppendorf de 1,5 ml.

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

Baño termoregulado Memmert^R.

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

Balanza analítica (Scientech^R).

Vortex V-1 (BOECO^R).

Gö6850 (Calbiochem^R).

LY294002 (Calbiochem^R)

UO126 (Calbiochem^R)

Espectrofluorímetro LS55 Perkin Elmer.

Incubadora Memmert.

5.1.4. Ensayos de medición de calcio intracelular:

Propionato de sodio (Merck^R)

Etanol (Merck^R)

Tubos Eppendorf de 1,5 ml.

Pipetas automáticas (BOECO^R) de 1 ml, 200 ul, 50 ul, 10 ul.

Baño termoregulado Memmert^R.

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

Balanza analítica (Scientech^R)

Vortex V-1 (BOECO^R)

5.2. METODOLOGÍA

5.2.1 Aislamiento de neutrófilos

Para obtener los neutrófilos de bovino se siguió el procedimiento utilizado por Roth y Kaeberle (Roth y col., 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 Hank, (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), homogenizando 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%.

El proceso de aislamiento de neutrófilos, demoró aproximadamente 3 horas, e inmediatamente finalizado dicho proceso, se realizó la preincubación de 30 minutos con BCECF-AM o FURA2-AM.

Tras dicha preincubación de 30 minutos con los constituyentes BCECF-AM o FURA2-AM, antes descritos, se puede proceder a las correspondientes mediciones de pH o calcio según corresponda.

5.2.2. Preincubación de neutrófilos con BCECF-AM.

20×10^6 /ml 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), o buffer pH con EGTA (140 mM NaCl, 10 mM Glucosa, 1 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , 20 mM Hepes, pH 7.2) e incubados con BCECF-AM (2 μM) por 30 min at 37 °C. Las células fueron lavadas tres veces y resuspendidas a (4×10^6 /ml) con buffer pH, para posterior medición.

5.2.3. Preincubación de neutrófilos con FURA - 2AM.

20×10^6 /ml neutrófilos fueron resuspendidos en un buffer HBSS/ Ca^{2+} (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) e incubados con FURA2-AM (stock

diluir en 50µl de DMSO 100%) por 30 min a 37 °C. Las células fueron lavadas tres veces y resuspendidas a (4×10^6 /ml) con buffer HBSS/ Ca^{+2} , para posterior medición.

5.2.4. Rol de propionato en la movilización de calcio intracelular.

Aproximadamente 4 millones de células, fueron suspendidas en 1 ml de HBSS/ Ca^{2+} , HBSS sin Ca^{2+} / EGTA o HBSS sin Ca^{2+} / EGTA 1mM + BAPTA-AM, según corresponda al ensayo en particular. Posteriormente fueron depositadas en una cubeta de cuarzo, e incubadas en presencia de 5 µl de BAPTA-AM 10mM, o ausencia de esta, según sea el caso, durante un periodo de 10 minutos, a temperatura de 37° C y con agitación magnética constante. Transcurrido este tiempo y alcanzada la temperatura de reacción se procedió a obtener las mediciones basales de fluorescencia correspondiente al movimiento de calcio libre intracelular por un periodo de 100 segundos, en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55, con agitación magnética constante, a 37°C como temperatura de reacción y utilizando longitudes de 340 nm y 380 nm de excitación y 509 nm de emisión. Tras la obtención de la medición basal fue agregado al mismo medio de reacción 20µl de propionato a concentraciones de 1.5M o 0.150M, según corresponda en procedimientos experimentales, individuales e independientes. Se utilizó como control 5 µl de DMSO 100%, vehículo de BAPTA-AM, en los casos que corresponda.

5.2.5. Rol del calcio intracelular en los cambios de pH inducido por propionato.

Aproximadamente 4 millones de células suspendidas en 1 ml de bufer pH / Ca^{2+} , fueron depositadas en una cubetas de cuarzo, e incubadas en presencia de 5 μl de BAPTA-AM 10mM, durante 10 minutos a temperatura de 37° C, y con agitación magnética constante. Transcurrido este tiempo y alcanzada la temperatura de reacción se procedió a obtener las mediciones básicas de fluorescencia correspondiente al pH intracelular por un periodo de 100 segundos, en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55, con agitación magnética constante a 37°C como temperatura de reacción y utilizando una longitudes de 440 nm y 495 nm excitación, y 535nm de emisión. Tras la obtención de la medición basal se agregó al mismo medio de reacción, 20 μl de propionato a concentraciones de 1.5M o 0.150M según correspondiera, en procedimientos experimentales, individuales e independientes. Se utilizó como control 5 μl de DMSO 100%, correspondiente al vehículo de BAPTA-AM.

5.2.6. Rol del calcio extracelular en los cambios de pH inducido por propionato.

Aproximadamente 4 millones de células fueron suspendidas en 1ml de buffer pH libre de Ca^{2+} + EGTA 1mM, Posteriormente fueron depositadas en una cubetas de cuarzo e incubadas, durante 10 minutos a temperatura de 37° C, y con agitación magnética constante. Transcurrido este tiempo y alcanzada la temperatura de reacción se procedió a obtener las mediciones básicas de fluorescencia correspondiente al pH intracelular por un periodo de 100 segundos, en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS

55 con agitación magnética constante a 37°C como temperatura de reacción y utilizando una longitudes de 440 nm y 495 nm excitación, y 535nm de emisión. Tras la obtención de la medición basal

Se agregó al mismo medio de reacción, 20µl de propionato a concentraciones de 1.5M o 0.150M según corresponda, en procedimientos experimentales, individuales e independientes. Se utilizó como control agua destilada, la cual era el vehículo tanto de propionato como del EGTA.

5.2.7. Rol del intercambiador Na⁺ / H⁺ en los cambios de pH inducido por propionato en neutrófilos bovinos.

Aproximadamente 4 millones de células suspendidas en 1ml de buffer pH calcio, fueron depositadas en una cubetas de cuarzo, e incubadas con amiloride a una concentración de 500 µM, durante 10 minutos a temperatura de 37° C, y con agitación magnética constante. Transcurrido este tiempo y alcanzada la temperatura de reacción se procedió a obtener las mediciones básicas de fluorescencia correspondiente al pH intracelular por un periodo de 100 segundos, en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 con agitación magnética constante a 37°C como temperatura de reacción y utilizando una longitudes de 440 nm y 495 nm excitación, y 535nm de emisión. Tras la obtención de la medición basal se agregó al mismo medio de reacción, 20µl de propionato a concentraciones de 1.5M en experimentos individuales. Se utilizó como control agua destilada, la cual era el vehículo tanto de propionato como amiloride.

5.2.8. Rol del canal de H⁺ en los cambios de pH inducido por propionato.

Aproximadamente 4 millones de células suspendidas en 1ml de buffer pH calcio, fueron depositadas en una cubetas de cuarzo, e incubadas con ZnCl₂ a una concentración de 50 µM, durante 10 minutos a temperatura de 37° C, y con agitación magnética constante. Transcurrido este tiempo y alcanzada la temperatura de reacción se procedió a obtener las mediciones básicas de fluorescencia correspondiente al pH intracelular por un periodo de 100 segundos, en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 con agitación magnética constante a 37°C como temperatura de reacción y utilizando una longitudes de 440 nm y 495 nm excitación, y 535nm de emisión. Tras la obtención de la medición basal se agrego al mismo medio de reacción 20µl de propionato a concentraciones de 1.5m, en experimentos individuales. Se utilizó como control el vehículo de propionato, agua destilada.

5.2.9. Rol del intercambiador Na⁺ / H⁺ y del canal de H⁺ en los cambios de pH inducido por propionato.

Aproximadamente 4 millones de células suspendidas en 1ml de buffer pH calcio, fueron depositadas en una cubetas de cuarzo, e incubadas concomitantemente con ZnCl₂ a una concentración de 50 µM y amiloride 500µM, durante 10 minutos a temperatura de 37° C, y con agitación magnética constante. Transcurrido este tiempo y alcanzada la temperatura de reacción se procedió a obtener las mediciones básicas de fluorescencia correspondiente al pH intracelular por un periodo de 100 segundos, en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 con agitación magnética constante a 37°C como temperatura de reacción y utilizando una longitudes de 440 nm y 495 nm

excitación, y 535nm de emisión. Tras la obtención de la medición basal se agregan al mismo medio de reacción, 20µl de propionato a concentraciones de 1.5m, en experimentos individuales. Se utilizó como control, el vehículo de propionato agua destilada.

5.3.0. Rol de p38, PKC y ERK en los cambios de pH inducidos por propionato.

Aproximadamente 4 millones de células suspendidas en 1ml de buffer pH / Ca^{2+} , fueron depositadas en cubetas de cuarzo, e incubadas de manera independiente y por separado con los inhibidores correspondientes. La incubación con 6µl de SB283580 5mM inhibidor de p38, 5µl Gö6850 1mM inhibidor PKC y 10µl de UO0126 0.1mM inhibidor ERK, transcurrió por separado durante 10 minutos a temperatura de 37° C, y con agitación magnética constante. Transcurrido este tiempo y alcanzada la temperatura de reacción se procedió a obtener las mediciones básicas de fluorescencia correspondiente al pH intracelular por un periodo de 100 segundos, en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 con agitación magnética constante a 37°C como temperatura de reacción y utilizando una longitudes de 440 nm y 495 nm excitación, y 535 nm de emisión. Tras la obtención de la medición basal se agrego al mismo medio de reacción, 20µl de propionato a concentraciones de 1.5M, en procedimientos experimentales independientes. Se utilizó como control DMSO 100%, correspondiente al vehículo de los inhibidores.

5.4. Analisis estadístico

Los cambios de pH fueron expresados como delta de pHi y áreas bajo la curva de la razón 440/495 nm. Los cambios de calcio intracelular fueron expresados como razones de fluorescencia (340/380 nm). Todos los resultados fueron graficados como medias aritméticas y error estándar. Se analizó la normalidad por el método de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad de varianza por el método de Bartlett. Para el análisis de los paramétricos y no paramétricos se utilizaron las pruebas de t de Student y Mann-Whitney, respectivamente, empleando un nivel de significancia del 5%.

Para el análisis estadístico se utilizaron los programas FL-WINLAB v 4.00.02, EXCEL v office professional 2000 y GRAPH-PAD PRISM v 3.0.

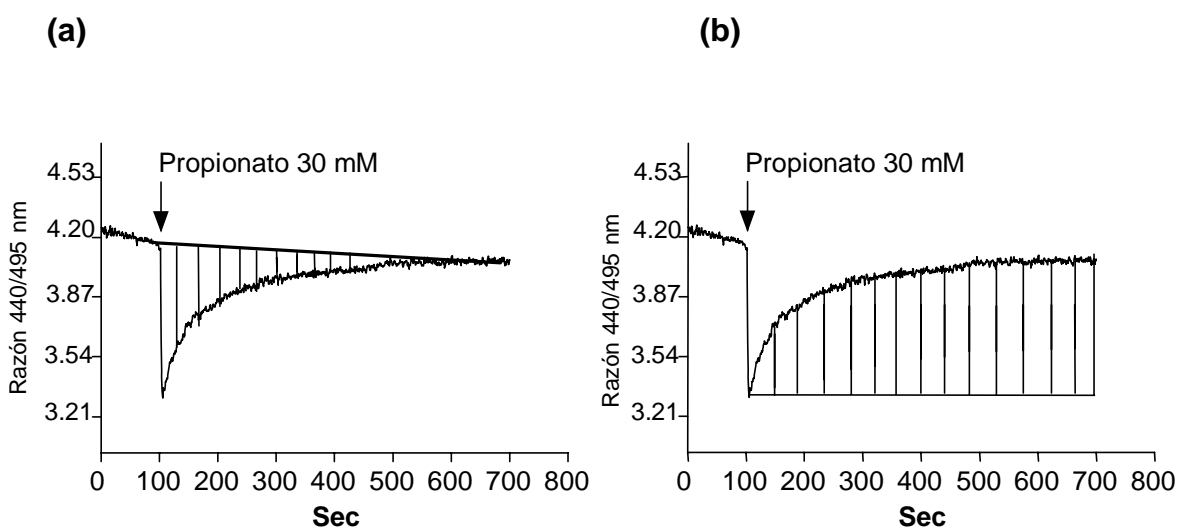


Figura 2 Ejemplo de los cálculos de las áreas bajo la curva, de acidificación (a) y alcalinización (b).

6. RESULTADOS

6.1 Rol de propionato en la movilización de calcio intracelular en neutrófilos bovinos.

En la figura 3 se observó el registro obtenido de la movilización de calcio inducida con propionato (3 y 30mM) a los 100 segundos en neutrófilos de bovino marcadas con FURA2-AM. Se observó un rápido aumento de calcio citosólico libre. Los resultados mostraron que al agregar EGTA se redujo el aumento de calcio citosólico (Fig. 3 b) y cuando se usó EGTA más BAPTA-AM (Fig. 4 b), se mantuvo dicha tendencia hasta casi una depresión absoluta de la señal.

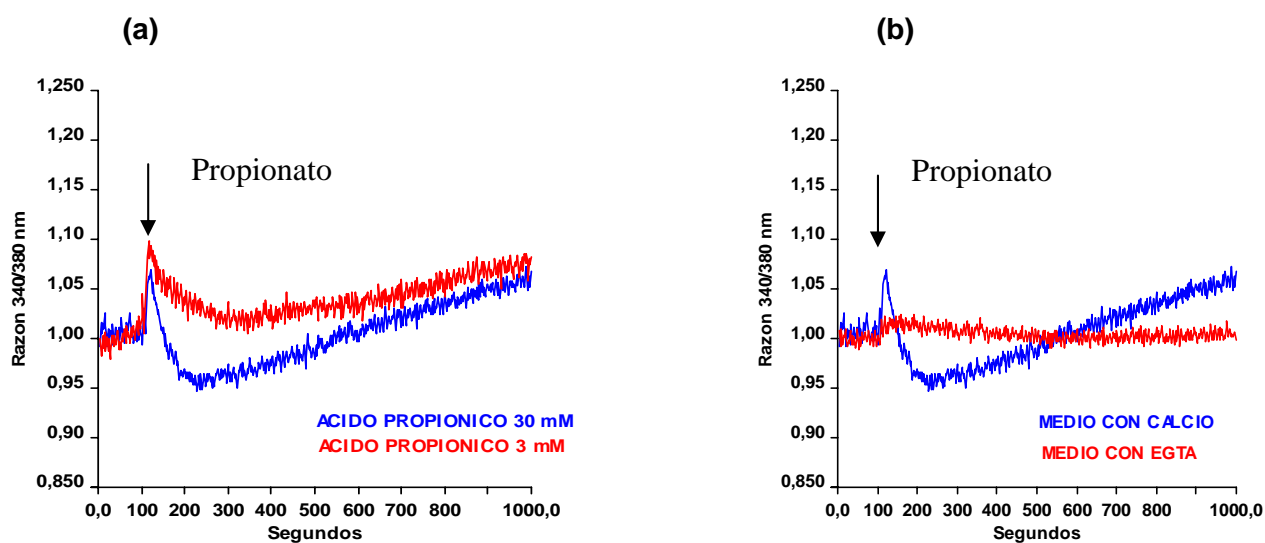


Figura 3. (a) Efecto de propionato 30 y 3mM sobre el movimiento de calcio citosólico, en neutrófilos de bovinos. **(b)** Efecto de EGTA 1mM sobre el movimiento de calcio citosólico, inducido por propionato 30mM.

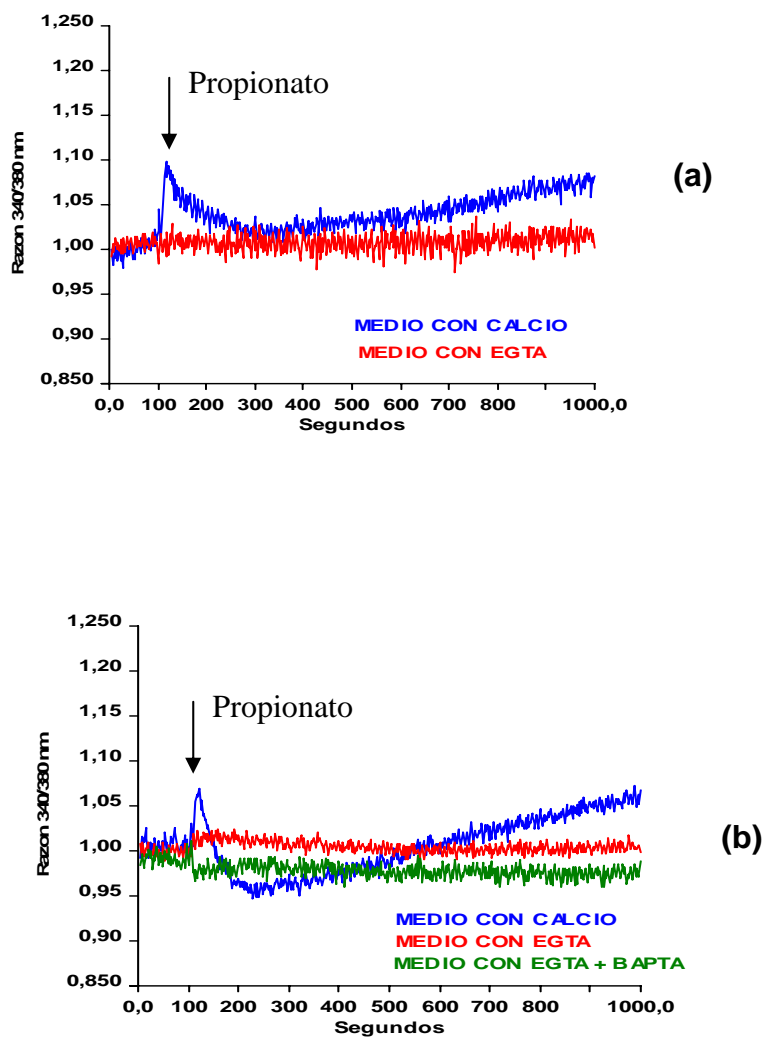


Figura 4. (a) Efecto de EGTA 1mM sobre el movimiento de calcio citosólico, inducido por propionato 3mM. **(b)** Efecto de EGTA 1mM y EGTA 1mM asociado a BAPTA 50 μ M sobre el movimiento de calcio citosólico, inducido por propionato 3mM.

6.2. Rol del calcio intracelular en los cambios de pH inducido por propionato en neutrófilos bovinos.

El rol del calcio citosólico en las variaciones del pH intracelular, inducidos con propionato (3mM y 30mM), fue analizado utilizando un quelante de calcio intracelular, BAPTA-AM 50 μ M (Fig. 5). Los resultados mostraron, que en presencia de BAPTA-AM se deprime significativamente tanto el área de acidificación intracelular (Fig. 6), como el Δ pH de acidificación en presencia de propionato 30mM (Fig. 7), mientras que el Δ pH de alcalinización disminuyó a concentraciones de propionato de 3mM y 30mM (Fig. 7), no observándose cambios en las áreas de alcalinización (Fig. 6).

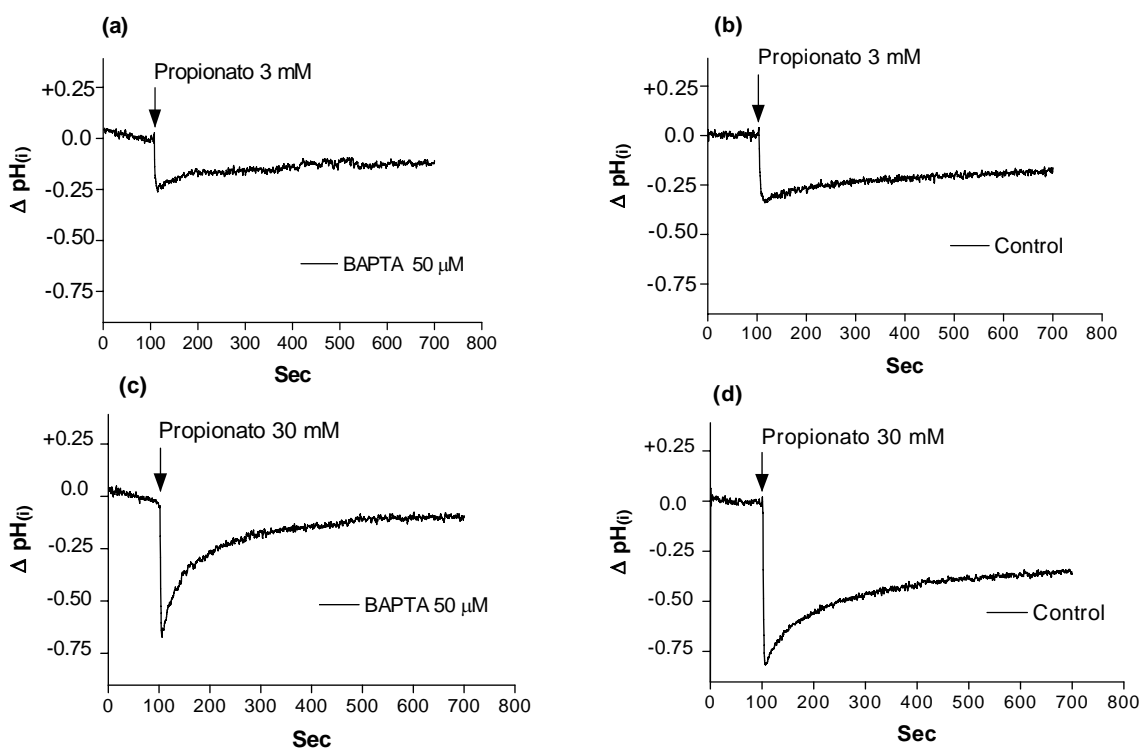


Figura 5. (a) Efecto de BAPTA 50 μ M sobre el pH intracelular inducido por propionato 3mM y su correspondiente control DMSO **(b)**. **(c)** Efecto de BAPTA 50 μ M sobre el pH intracelular inducido por propionato 30mM y su correspondiente control DMSO **(d)**.

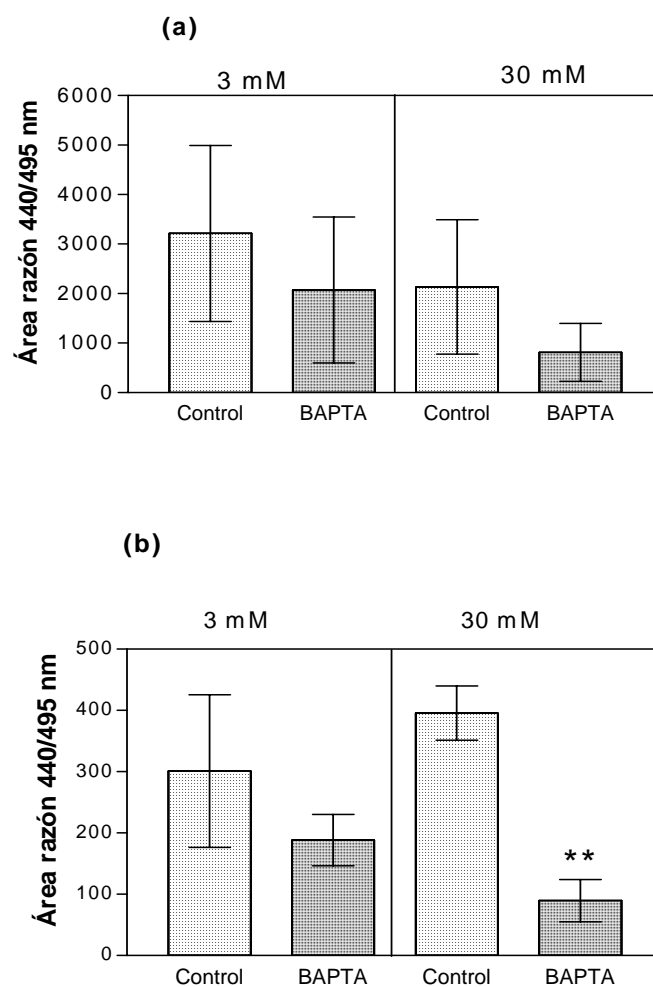


Figura 6. (a) Efecto de BAPTA 50 μ M sobre el área de alcalinización intracelular inducida por propionato 3 y 30mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. **(b)** Efecto de BAPTA 50 μ M sobre el área de acidificación intracelular inducida por propionato 3 y 30mM cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ comparado con el control (DMSO).

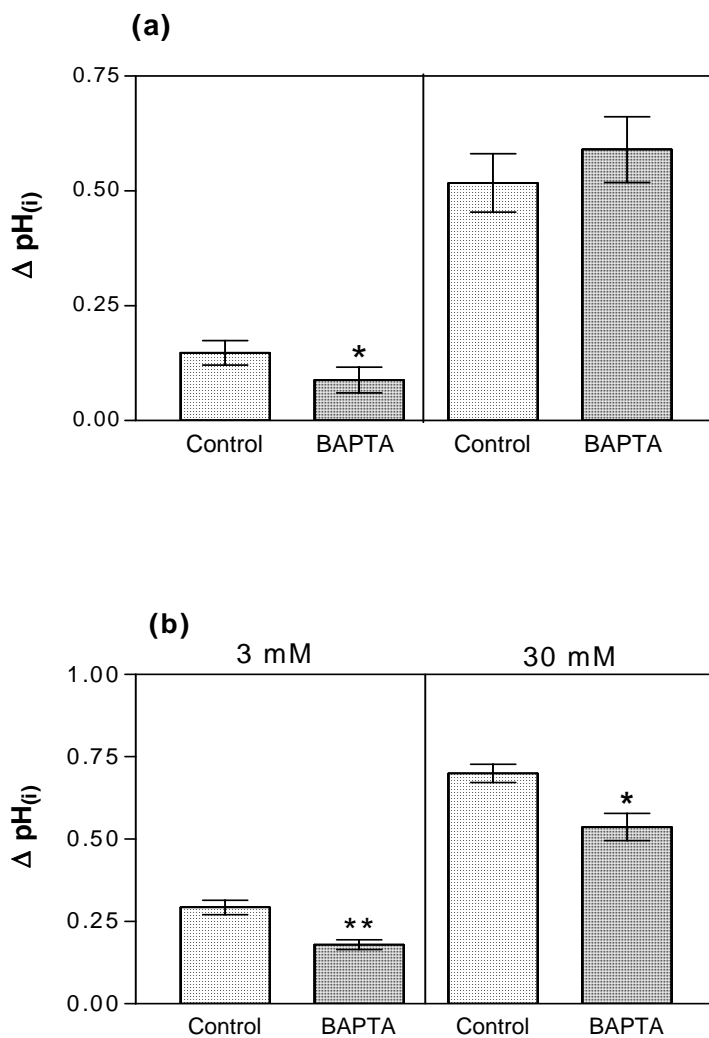


Figura 7. (a) Efecto de BAPTA 50 μ M sobre la alcalinización intracelular inducida por propionato 3 y 30mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. **(b)** Efecto de BAPTA 50 μ M sobre la acidificación intracelular inducida por propionato 3 y 30mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. * p<0.05 comparado con el control (DMSO).

6.3. Rol del calcio extracelular en los cambios de pH inducido por propionato en neutrófilos bovinos.

El rol del calcio extracelular en las variaciones de los pH intracelulares inducidos con propionato (3 mM y 30 mM), fue analizado utilizando un quelante de calcio extracelular EGTA 1mM (Fig. 8). Los resultados mostraron que en presencia de EGTA 1mM se deprimió significativamente tanto el área de alcalinización intracelular (Fig. 9) como el ΔpH de alcalinización a concentraciones de propionato 3mM y 30mM (Fig. 10). Por otro lado el área de alcalinización resulto aumentada en presencia de propionato 30mM al igual que el ΔpH de acidificación en presencia de propionato 3mM (Fig. 9 y Fig 10).

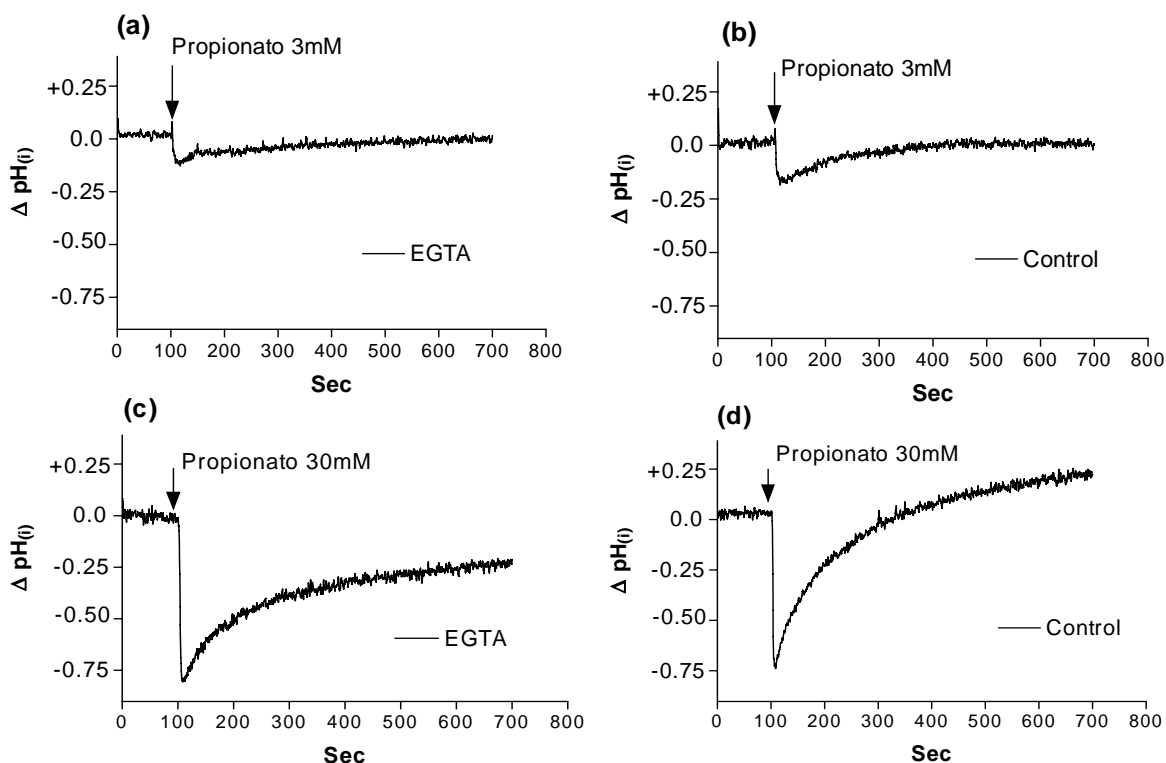


Figura 8. (a) Efecto de EGTA 1mM sobre el pH intracelular inducido por propionato 3mM y su correspondiente control **(b)**. **(c)** Efecto de EGTA 1mM sobre el pH intracelular inducido por propionato 30mM y su correspondiente control **(d)**.

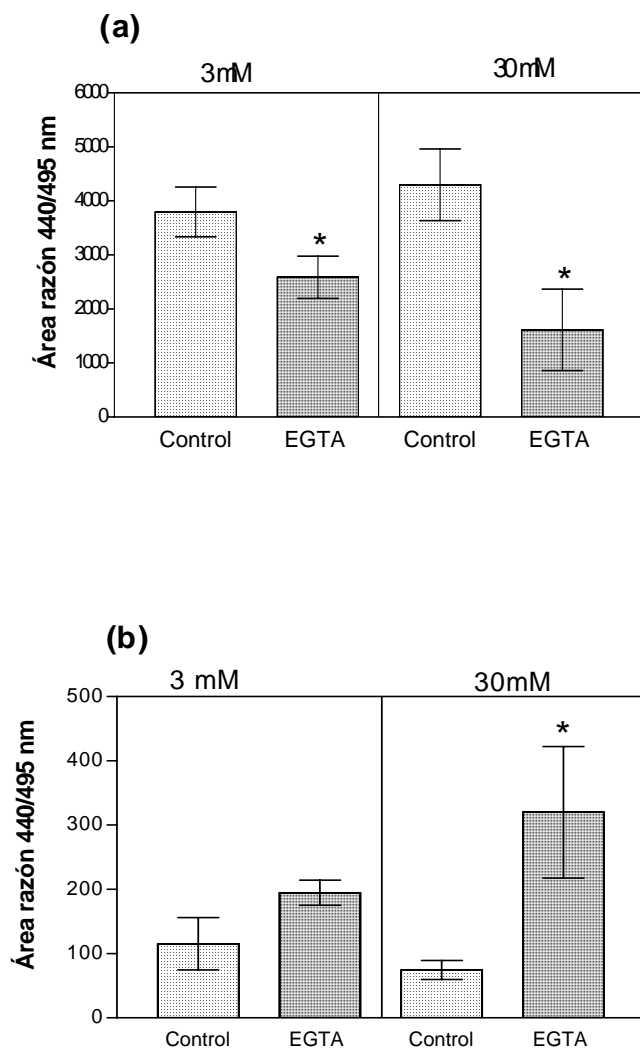


Figura 9. (a) Efecto de EGTA 1mM sobre el área de alcalinización intracelular inducida por propionato 3 y 30mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, $n =$ al menos 3 experimentos independientes. (b) Efecto de EGTA 1mM sobre el área de acidificación intracelular inducida por propionato 3 y 30mM cada barra representa el promedio \pm error estándar, $n =$ al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ comparado con el control.

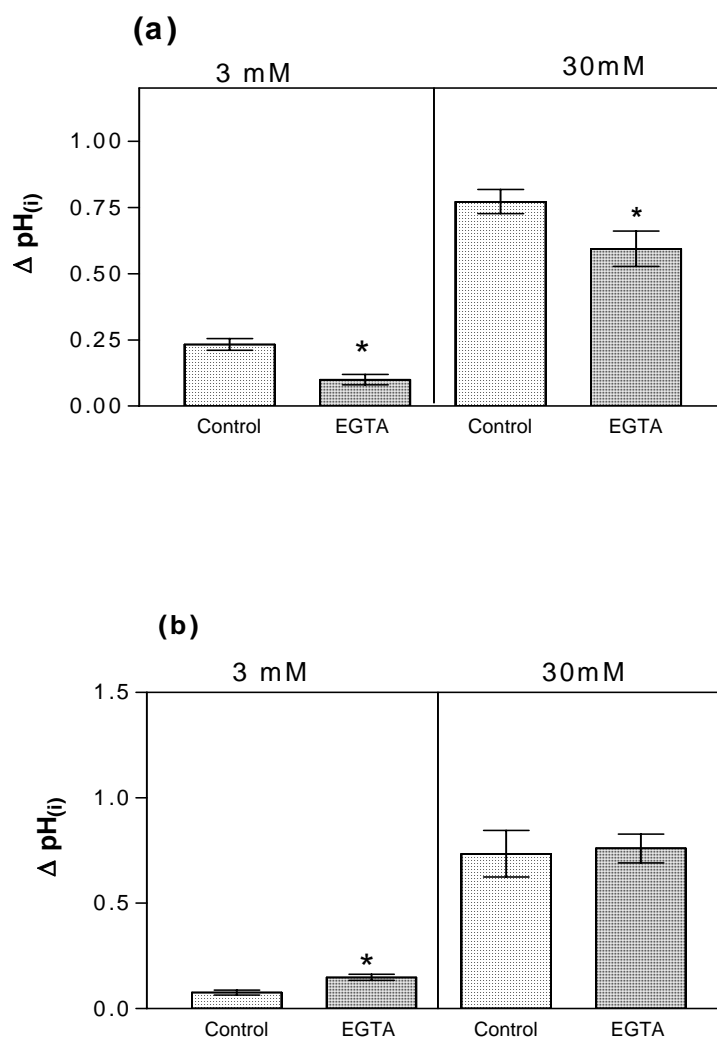


Figura 10. (a) Efecto de EGTA 1mM sobre la alcalinización intracelular inducida por propionato 3 y 30mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. **(b)** Efecto de EGTA 1mM sobre la acidificación intracelular inducida por propionato 3 y 30mM cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ comparado con el control.

6.4. Rol del intercambiador Na^+ / H^+ en los cambios de pH inducido por propionato en neutrófilos bovinos.

El rol del intercambiador de Na^+/H^+ en las variaciones del pH intracelular inducido tras acidificación del microambiente extracelular, con propionato fue analizada utilizando un inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ (NHE1), amiloride 500 μM (Fig.11). Los resultados mostraron que en presencia de amiloride 500 μM se deprime significativamente tanto el área de alcalinización intracelular (Fig.12), como el ΔpH de alcalinización a concentraciones de propionato 30mM (Fig 13). El área y el ΔpH de acidificación no se modificaron por efecto de amiloride (Fig 12 y Fig. 13).

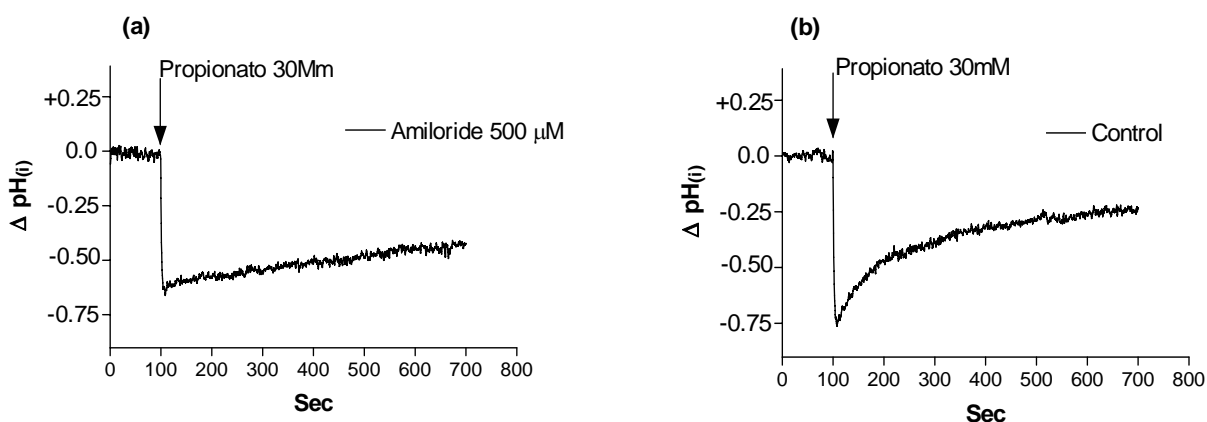


Figura 11. (a) Efecto de amiloride 500 μM sobre el pH intracelular inducido por propionato 30mM y su correspondiente control **(b)**.

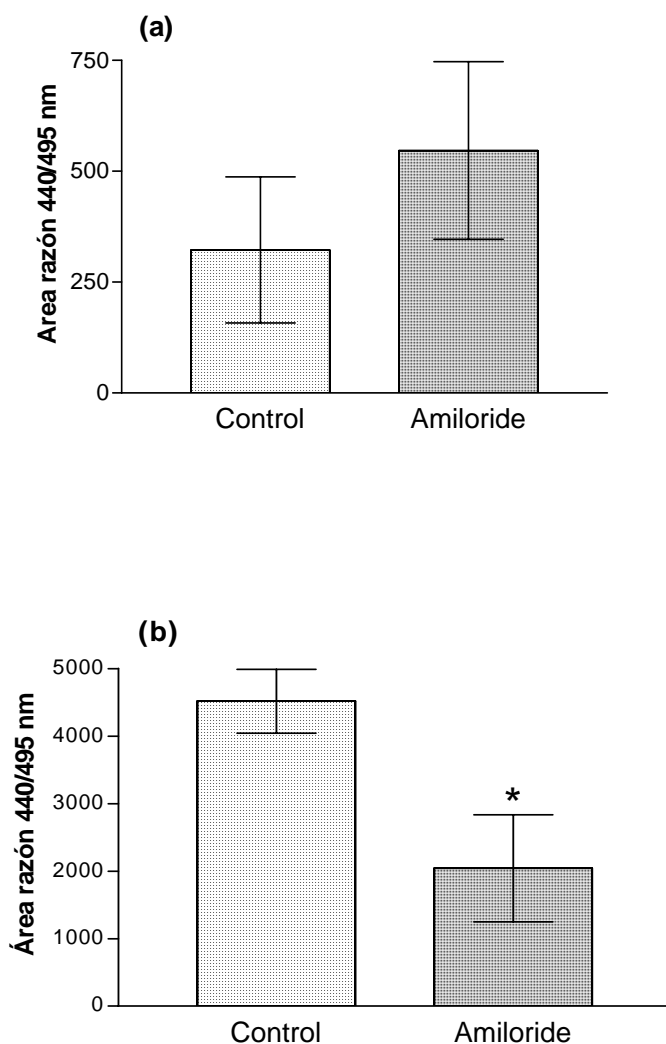


Figura 12. (a) Efecto de amiloride 500μM sobre el área de acidificación intracelular inducida por propionato 30mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. **(b)** Efecto de amiloride 500μM sobre el área de alcalinización intracelular inducida por propionato 30mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ comparado con el control.

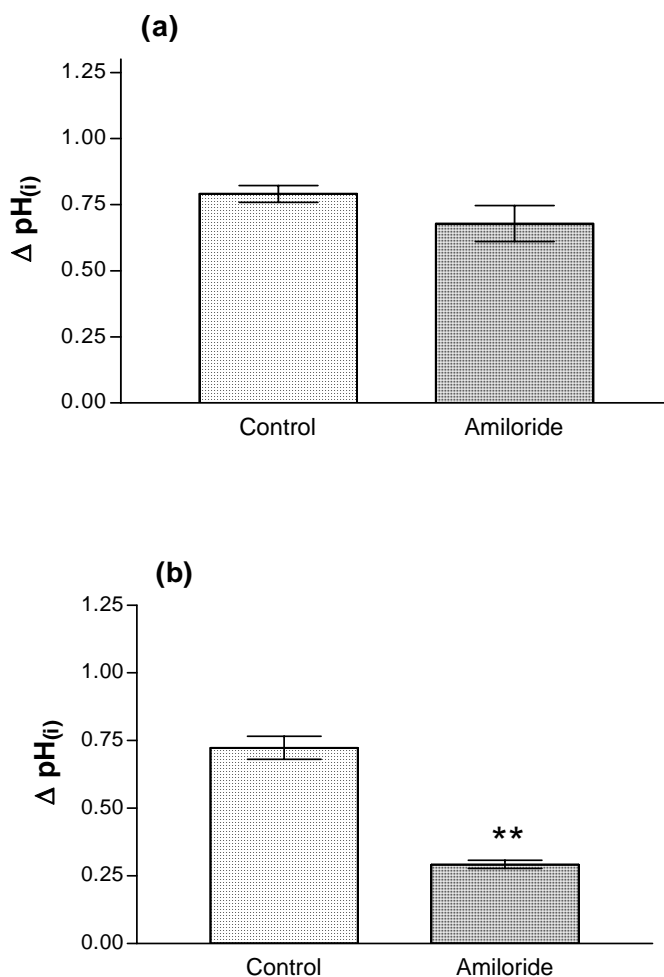


Figura 13. (a) Efecto de amiloride 500 μM sobre la acidificación intracelular inducida por propionato 30mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. **(b)** Efecto de amiloride 500 μM sobre la alcalinización intracelular inducida por propionato 30mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. ** $p < 0.01$ comparado con el control.

6.5. Rol del canal de H^+ en los cambios de pH inducido por propionato en neutrófilos bovinos.

La participación de un canal de protones en las variaciones del pH intracelular inducido tras acidificación del microambiente extracelular con propionato, fue analizado utilizando un bloqueador del canal de H^+ , $ZnCl_2$ 50 μM (Fig. 14). Los resultados mostraron que en presencia de $ZnCl_2$ 50 μM se deprimió significativamente tanto el área de alcalinización intracelular (Fig. 15) como el ΔpH de alcalinización a concentraciones de propionato 30mM (Fig. 16). El ΔpH de acidificación se vio reducido por efecto de $ZnCl_2$, pero no así su área (Fig 15 y Fig. 16).

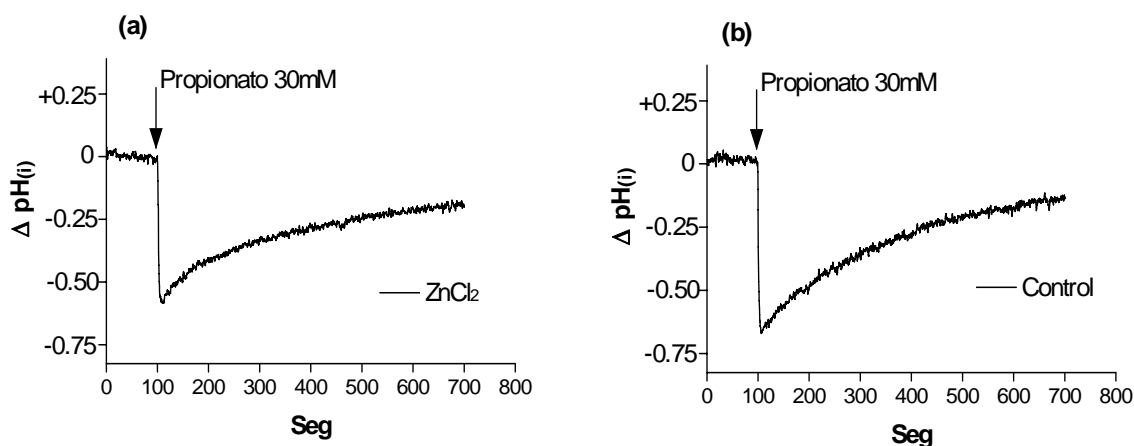


Figura 14. (a) Efecto de $ZnCl_2$ sobre el pH intracelular inducido por propionato 30mM y su correspondiente control **(b)**.

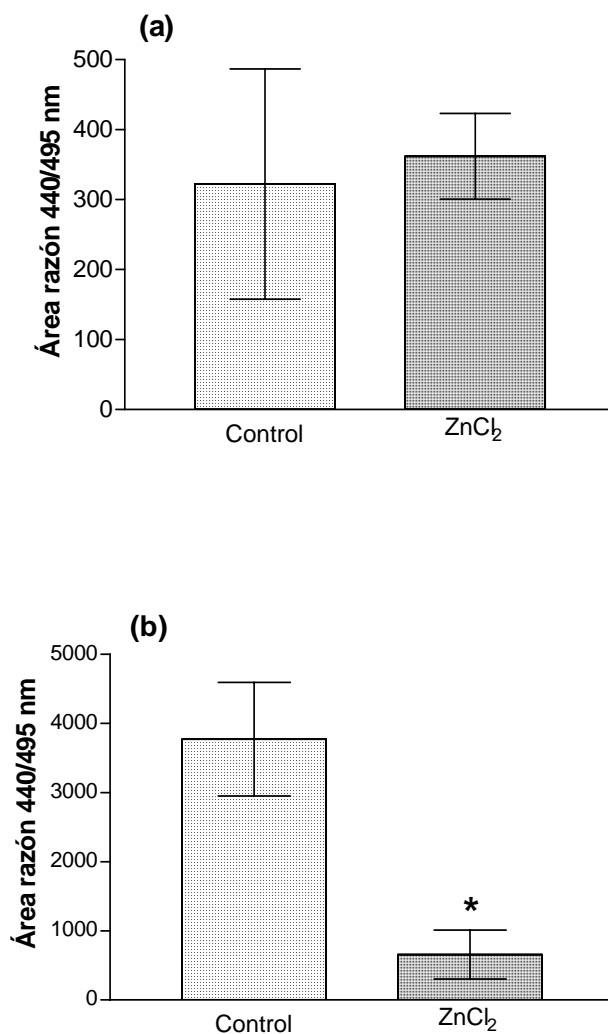


Figura 15. (a) Efecto de ZnCl₂ 50μM sobre el área de acidificación intracelular inducida por propionato 30mM, cada barra representa el promedio ± error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. **(b)** Efecto de ZnCl₂ 50μM sobre el área de alcalinización intracelular inducida por propionato 30mM, cada barra representa el promedio ± error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes * p<0.05 comparado con el control.

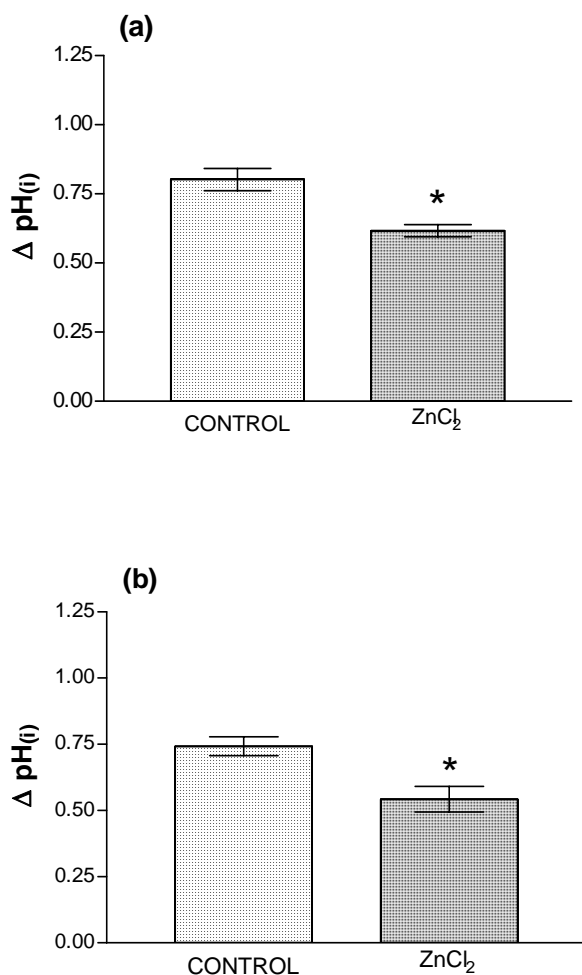


Figura 16. (a) Efecto de ZnCl₂ 50 μM sobre la acidificación intracelular inducida por propionato 30 mM, cada barra representa el promedio ± error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. **(b)** Efecto de ZnCl₂ 50 μM sobre la alcalinización intracelular inducida por propionato 30 mM, cada barra representa el promedio ± error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. * p < 0.05 comparado con el control.

6.6. Rol del intercambiador Na^+ / H^+ y del canal de H^+ en los cambios de pH inducido por propionato en neutrófilos bovinos.

El rol del intercambiador Na^+ / H^+ y del canal de H^+ , en las variaciones de pH intracelular inducido con propionato, fue analizado utilizando amiloride $500 \mu\text{M}$ y ZnCl_2 $50 \mu\text{M}$ (Fig. 17). Los resultados mostraron que en presencia de amiloride $500 \mu\text{M}$ y ZnCl_2 $50 \mu\text{M}$, disminuyó significativamente tanto el área de alcalinización intracelular (Fig. 18) como el ΔpH de alcalinización (Fig. 19) a concentraciones de propionato 30mM . El ΔpH de acidificación se vio reducido, pero no su área (Fig. 19 y Fig. 18).

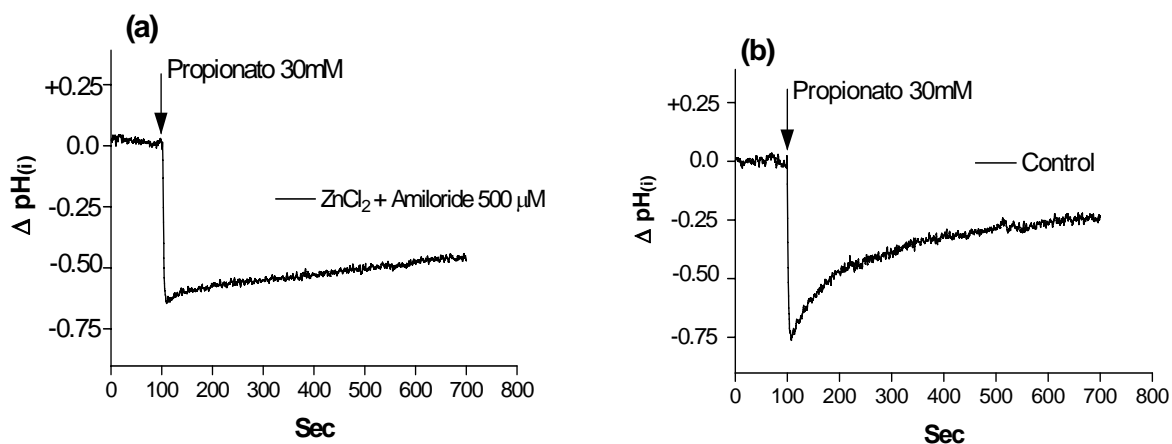


Figura 17. (a) Efecto de amiloride + ZnCl_2 sobre el pH intracelular inducido por propionato 30mM y su correspondiente control **(b)**.

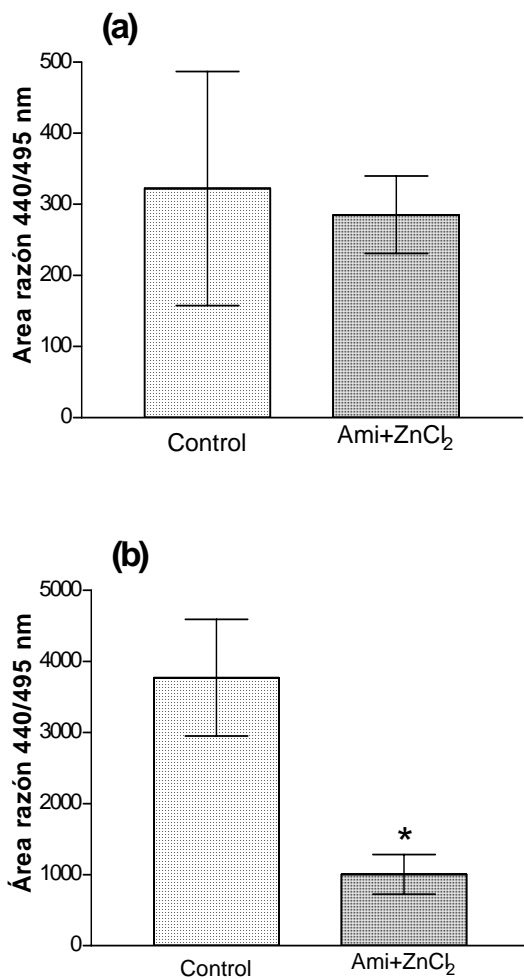


Figura 18. (a) Efecto de Amiloride 500μM + ZnCl₂ 50μM sobre el área de acidificación intracelular inducida por propionato 30mM, cada barra representa el promedio ± error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. **(b)** Efecto de amiloride 500μM + ZnCl₂ 50μM sobre el área de alcalinización intracelular inducida por propionato 30mM, cada barra representa el promedio ± error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. * p<0.05 comparado con el control.

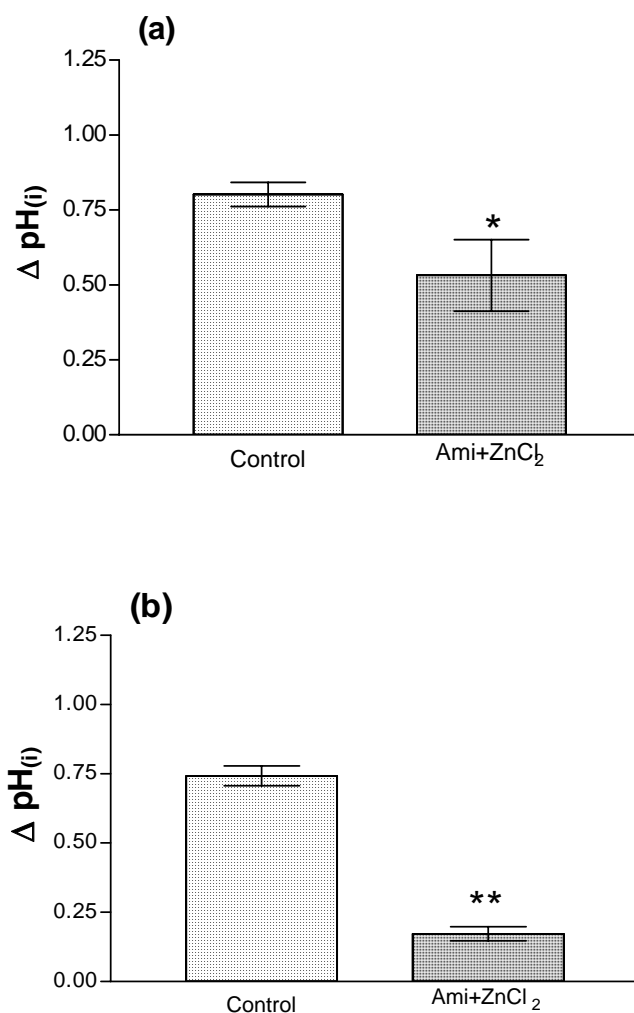


Figura 19. (a) Efecto de amiloride 500 μM + ZnCl₂ 50 μM sobre la acidificación intracelular inducida por propionato 30mM, cada barra representa el promedio ± error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. **(b)** Efecto de amiloride 500 μM + ZnCl₂ 50 μM sobre la alcalinización intracelular inducida por propionato 30mM, cada barra representa el promedio ± error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. * p<0.05, ** p<0.01 comparado con el control.

6.7 Rol de p38 en los cambios de pH inducidos por propionato en neutrófilos bovinos.

El rol de la vía p38 en los cambios de pH intracelular inducido tras acidificación del microambiente extracelular con propionato 30mM, fue analizado usando el inhibidor específico de p38, SB283580 30 μ M (Fig. 20). Los resultados mostraron que en presencia de SB203580 30 μ M las áreas de acidificación y alcalinización no se vieron modificadas significativamente (Fig. 21). No obstante el Δ pH de acidificación se vio reducido significativamente, no así el de alcalinización (Fig. 22).

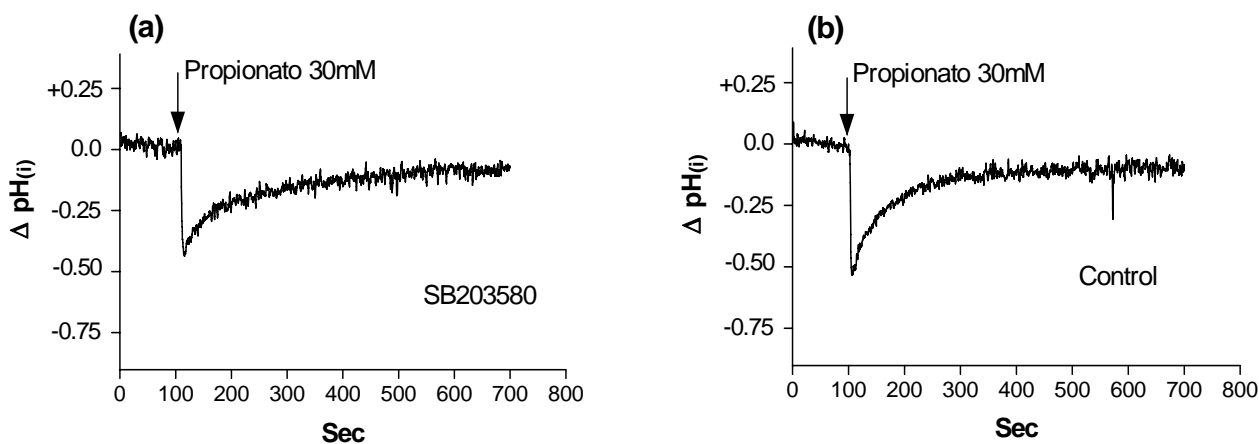


Figura 20. (a) Efecto de SB203580 30 μ M sobre el pH intracelular inducido por propionato 30 mM y su correspondiente control **(b)**.

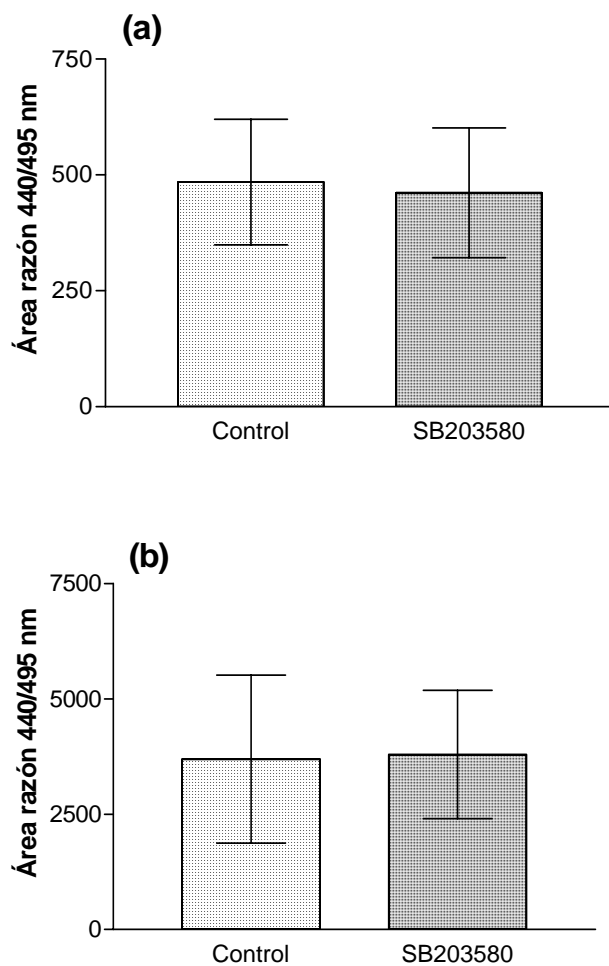


Figura 21. (a) Efecto de SB203580 30 μ M sobre el área acidificación intracelular inducida por propionato 30mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. **(b)** Efecto de SB203580 sobre el área de alcalinización intracelular inducida por propionato 30mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes.

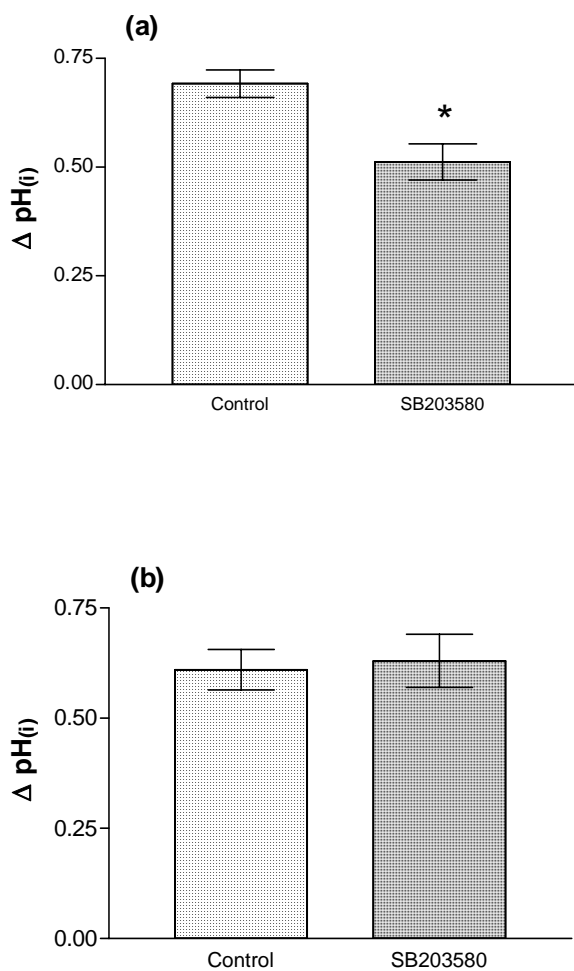


Figura 22. (a) Efecto de SB203580 30 μ M sobre la acidificación intracelular inducida por propionato 30mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. **(b)** Efecto de SB203580 sobre la alcalinización intracelular inducida por propionato 30mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ comparado con el control.

6.8. Rol de PKC en los cambios de pH inducidos por propionato en neutrófilos bovinos.

El rol de la vía PKC en los cambios de pH intracelular inducido tras acidificación del microambiente extracelular con propionato 30mM, fue analizado usando el inhibidor, Gö6850 5 μ M (Fig. 23). Los resultados mostraron que en presencia de Gö6850 5 μ M tanto las áreas (Fig. 24) como los Δ pH acidificación y alcalinización no se vieron modificadas significativamente (Fig 25).

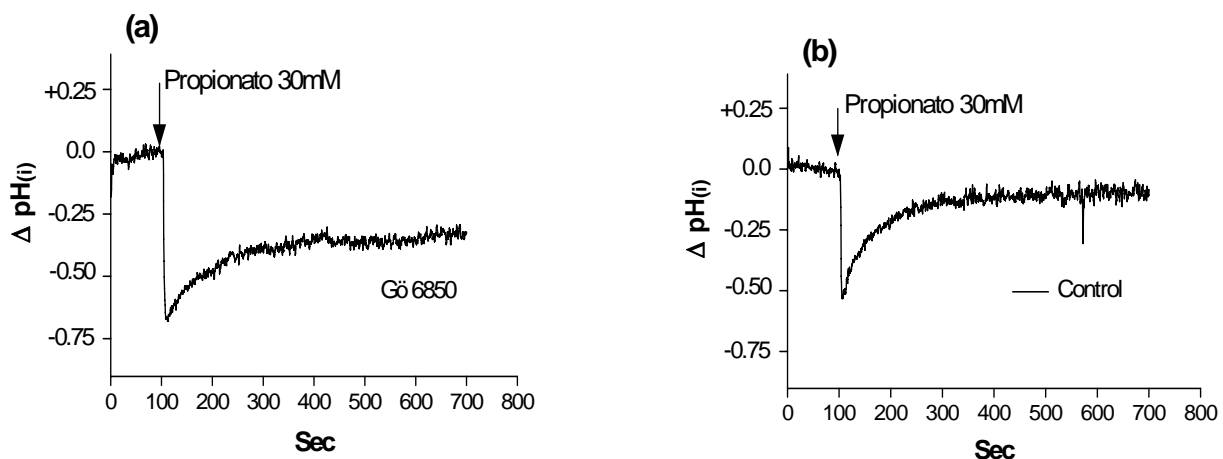


Figura 23. (a) Efecto de Gö6850 5 μ M sobre el pH intracelular inducido por propionato 30mM y su correspondiente control **(b)**.

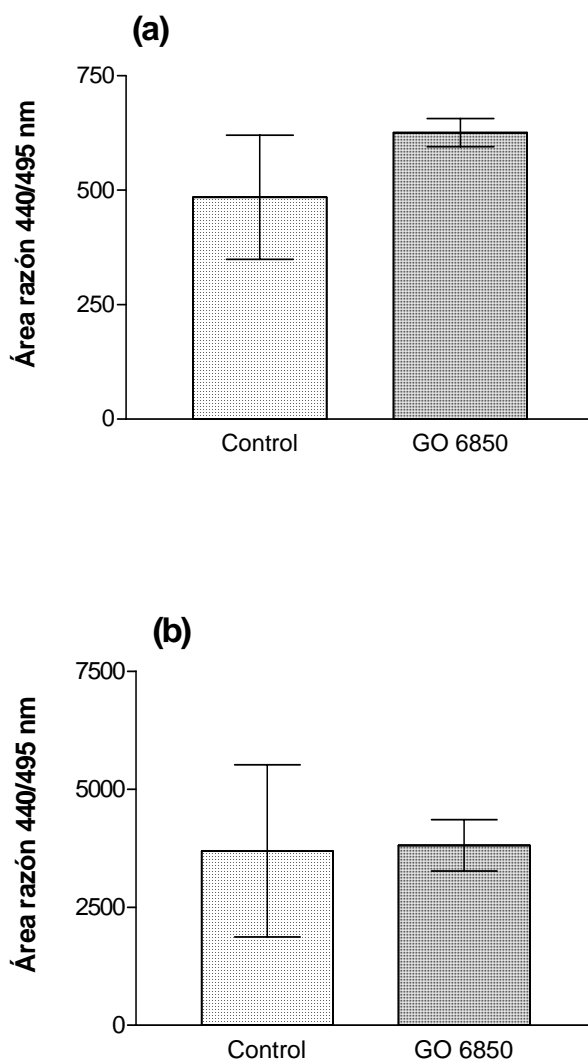


Figura 24. (a) Efecto de Gö6850 5 μ M sobre el área acidificación intracelular inducida por propionato 30mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. **(b)** Efecto de Gö6850 5 μ M sobre el área de alcalinización intracelular inducida por propionato 30 mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes.

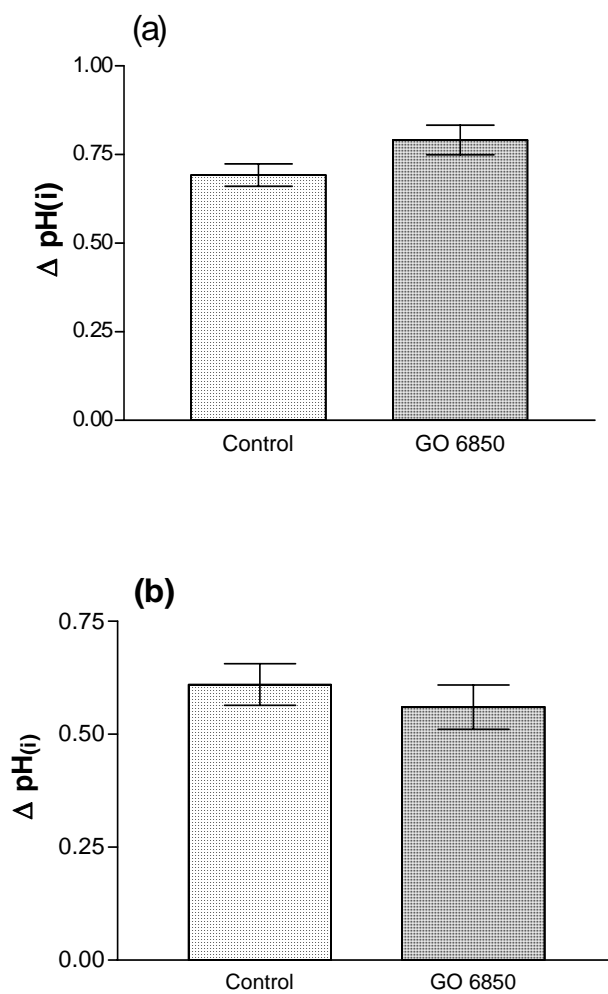


Figura 25. (a) Efecto de Gö6850 5μM sobre la acidificación intracelular inducida por propionato 30mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. **(b)** Efecto de Gö6850 5μM sobre la alcalinización intracelular inducida por propionato 30mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes.

6.9 Rol de ERK en los cambios de pH inducidos por propionato en neutrófilos bovinos.

El rol de la vía ERK1/2 en los cambios de pH intracelular inducido tras acidificación del microambiente extracelular con propionato 30mM, fue analizado usando el inhibidor específico de MEK1/2, UO126 1 μ M (Fig. 26). Los resultados mostraron que en presencia de UO126 1 μ M no se modificaron las áreas de acidificación y alcalinización (Fig. 27) y el Δ pH de acidificación (Fig. 28), sin embargo se observó una reducción significativa del Δ pH de alcalinización (Fig. 28).

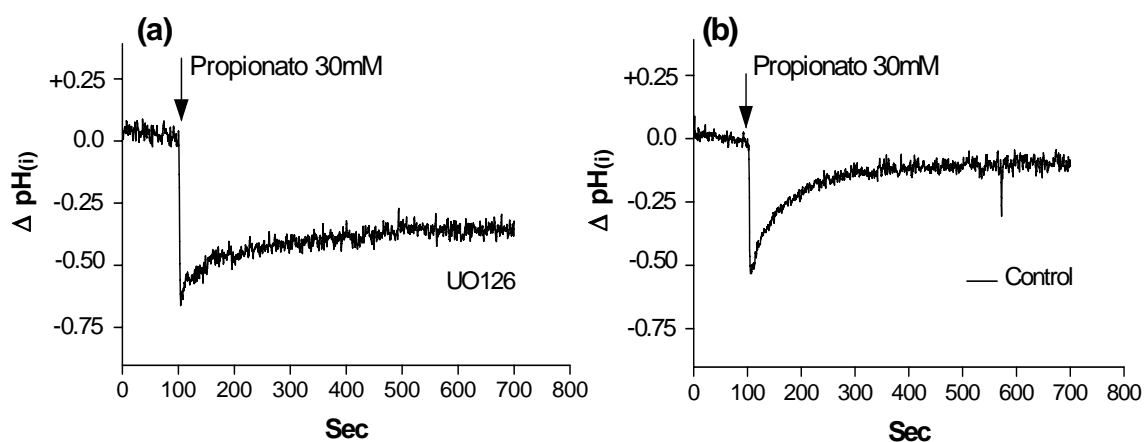


Figura 26. (a) Efecto de UO126 1 μ M sobre el pH intracelular inducido por propionato 30mM y su correspondiente control **(b)**.

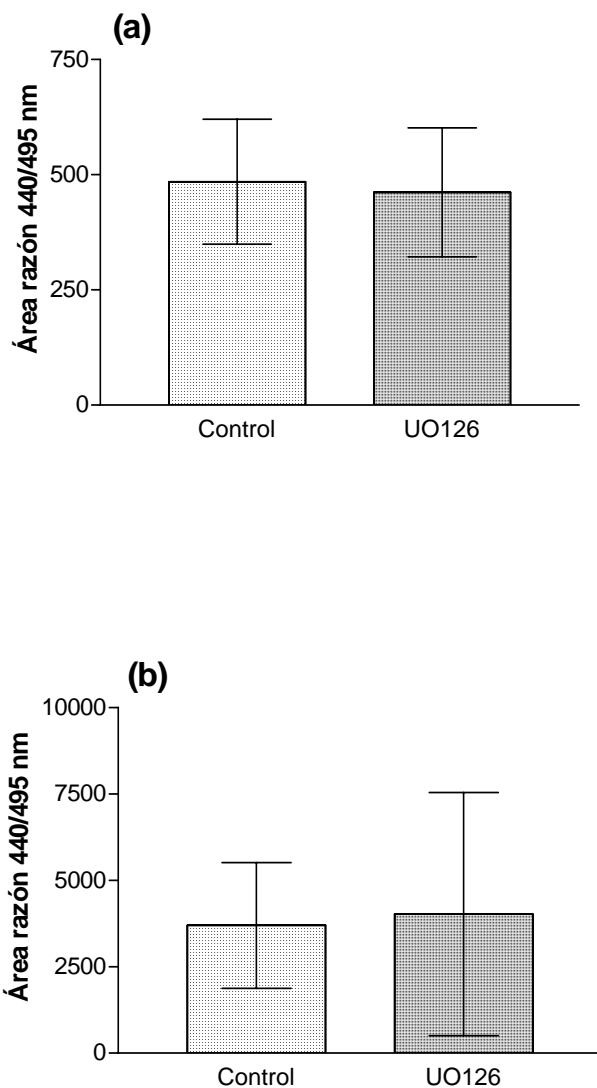


Figura 27. (a) Efecto de UO126 1 μ M sobre el área acidificación intracelular inducida por propionato 30mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. **(b)** Efecto de UO126 1 μ M sobre el área de alcalinización intracelular inducida por propionato 30mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes.

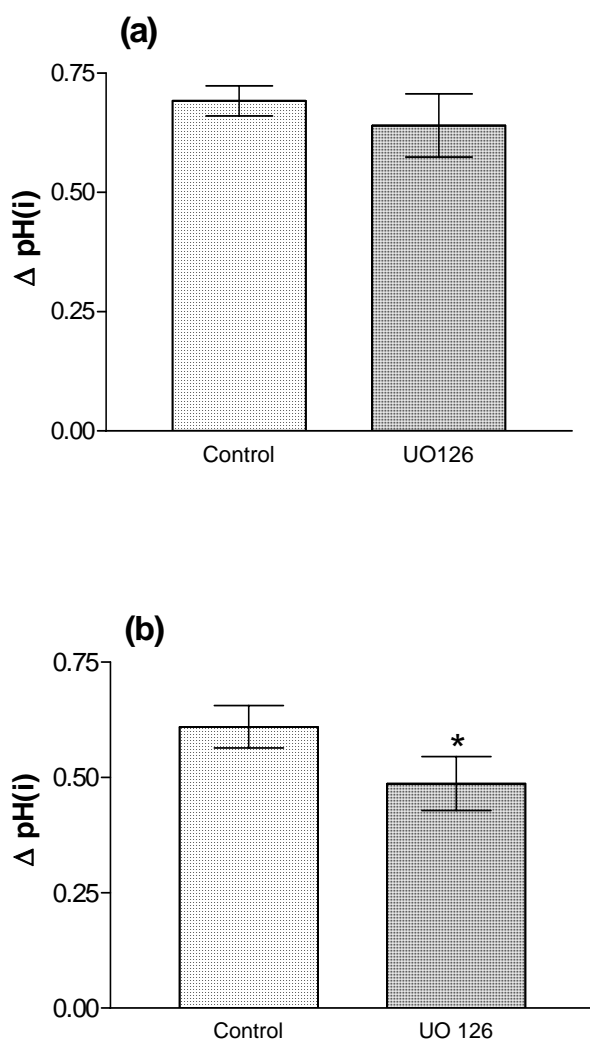


Figura 28. (a) Efecto de UO126 1 μ M sobre la acidificación intracelular inducida por propionato 30mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes. **(b)** Efecto de UO126 1 μ M sobre la alcalinización intracelular inducida por propionato 30 mM, cada barra representa el promedio \pm error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes.

7. DISCUSIÓN

7.1 Rol de propionato en la movilización de calcio intracelular en neutrófilos bovinos.

La exposición de neutrófilos de bovinos a un medio extracelular ligeramente ácido por acción de un ácido graso de cadena corta como propionato, resultó en un aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólico libre (Figura 3.a), al igual que lo planteado por trabajos previos en neutrófilos de humanos (Naccache y col., 1998). Esta evidencia nos permite sugerir que un microambiente ácido, similar al descrito en tejidos que cursan con procesos inflamatorios, tendría la capacidad no sólo de ser un referente en la migración celular y en la extensión de la vida funcional al retardar la entrada espontánea en apoptosis, (Trevani, y col. ,1999), sino que además, intensificar la actividad del neutrófilo bovino, al promover el aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólico libre y con ello las funciones celulares que resulten calcio dependiente.

El aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólico inducido por propionato en neutrófilos de bovinos, se redujo significativamente cuando las células fueron expuestas a un medio con EGTA y libre de calcio, coincidiendo así con trabajos previos en neutrófilos humanos (Faucher y col., 1987). Por lo tanto, podemos sugerir que el aumento de Ca^{2+} intracelular en neutrófilos de bovinos por propionato, estaría modulado en cierto grado por el ingreso de calcio extracelular a través de canales de Ca^{2+} del tipo capacitativo (Itagaki y col., 2002).

Adicionalmente, en los experimentos realizados en presencia de EGTA y BAPTA-AM, se observó la participación de la liberación de calcio intracelular por efecto

de propionato. Esto concuerda con el efecto de propionato sobre el aumento de IP_3 y la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico en neutrófilos humanos (Le Poul y col., 2003). Más aún, la capacidad moduladora de la actividad celular en neutrófilos por parte de propionato, estaría fundada en su condición de agonista de los receptores GPR41 Y GPR43 (receptores asociados a proteína G), presentes en PMN. Ambos receptores están asociados con la activación de IP_3 , liberación de Ca^{2+} al citosol y activación de ERK1/2 (Le Poul y col., 2003).

7.2 Rol del calcio intracelular y extracelular en los cambios de pH inducido por propionato en neutrófilos bovinos.

La eficiencia celular para producir una reducción del pH citosólico, tras estímulo de un ácido graso de cadena corta como propionato, se vio reducida al exponer a los neutrófilos de bovinos a un medio con BAPTA 50 μ M. De este modo podemos proponer que el Ca^{2+} citosólico tendría un carácter modulador de los mecanismos que regulan la acidificación intracelular en neutrófilos de bovinos. Trabajos previos han establecido que propionato induce una acidificación citosólica acompañada de un aumento de Ca^{2+} citosólico con características similares al producido por factores quimiotácticos como fMLP u otros (Fonteriz y col., 1991), de igual modo se ha planteado que la caída del pH intracelular inducido por factores quimiotácticos, sería inhibida por la presencia de un quelante de calcio intracelular como BAPTA (Paul y col., 1989), demostrando con esto que los cambios en el pH intracelular están mediados por cambios en los niveles de Ca^{2+} citosólico.

La eficiencia celular para recuperar la alcalinización intracelular, posterior a un evento de acidificación por acción de un ácido graso de cadena corta como propionato, se vio reducida al exponer a los neutrófilos de bovinos a un medio libre de calcio y EGTA 1mM, derivando lo antes descrito en un aumento en el tiempo de la acidez intracelular, posiblemente por una reducción en la eficiencia de los mecanismos compensatorios de naturaleza calcio dependiente. Por esto, podemos sugerir que el calcio extracelular que ingresa al interior de la célula a través de canales de Ca^{2+} , probablemente como acto secundario a la liberación de calcio de los almacenes intracelulares inducido por propionato (Itagaki y col., 2002), sería responsable de la recuperación del pH intracelular. Estudios realizados con propionato en plaquetas humanas, han logrado establecer una relación existente entre la concentración de Ca^{2+} citosólico libre y la alcalinización intracelular, mediada por activación del intercambiador Na^+/H^+ , constituyéndose el Ca^{2+} citosólico como un requisito esencial en el mantenimiento del pH basal en plaquetas (Kimura y col., 1990.)

7.3 Rol del intercambiador Na^+ / H^+ y del canal de H^+ en los cambios de pH inducido por propionato en neutrófilos bovinos.

La inhibición en la actividad del intercambiador NHE1 sobre la recuperación del pH intracelular, en neutrófilos de bovino sometidos a estímulo con propionato, fue analizado mediante el uso de amiloride. A concentraciones de 500 μM de amiloride se observó una inhibición de la recuperación de pH intracelular, similar a lo observado en neutrófilos de bovinos estimulados con PAF (Hidalgo y col., 2004). Amiloride se describe como un inhibidor competitivo de la actividad del intercambiador Na^+/H^+ , donde

el resultado de dicha inhibición responde a una reducción del 70% en la capacidad celular de expulsar H^+ desde el intracelular hacia el extracelular (Roos and Boron., 1991). Así, diversas publicaciones han descrito a amiloride como un inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ en neutrófilos (Grinstein y col., 1985), fibroblastos (Wauther y col., 1984) y plaquetas humanas, (Zavoicoy col.,1986), coincidiendo todos ellos, en la importancia que tiene el intercambiador Na^+/H^+ en la regulación del pH citoplasmático.

En resumen, podemos concluir que el intercambiador Na^+/H^+ (NHE1) se encuentra presente en neutrófilos de bovinos, y de su normal actividad depende revertir la acidificación intracelular transitoria inducida por propionato. Este mecanismo puede estar asociado a los fenómenos de migración de PMN inducidos por propionato (Zigmond y Hargrove, 1981). Más aún, la actividad del intercambiador Na^+/H^+ esta relacionada a los fenómenos de quimiotáxis (Putney y col., 2002), y donde dicha actividad es sensible a la inhibición por amiloride (Simchowitzy y Cragoe, 1986). Propionato puede inducir la polimerización de F-actina en una magnitud similar a fMLP (Brunkhorst y col., 1992), sin embargo se ha descrito que propionato puede inhibir la quimiotaxis en neutrófilos (Brunkhorst y col., 1992). A pesar de esto, se ha descrito un efecto quimiotáctico de propionato en forma de campana, centrándose en un estrecho rango a nivel de 1 mM (Le poul y col., 2003).

Se ha descrito, a nivel de la membrana plasmática la presencia de canales de H^+ que regularían el pH intracelular, contribuyendo a mantenerlo dentro de un rango fisiológico (Kapus y col., 1993). Así variados estudios han descrito, tanto en neutrófilos humanos como en otros tipos celulares, la relación que existiría entre la conducción de H^+ vía canales y la actividad NADPH oxidasa, indicando además que dicha conducción

resultaría bloqueada de manera reversible por Zn^{2+} o Cd^{2+} (Lowenthal y col., 1999; Schumann y col 1995). Mediante el uso de $ZnCl_2$ (50 μM), se observó una reducción significativa del grado de acidificación intracelular máxima obtenida por efecto de propionato y una reducción en la alcalinización intracelular.

El bloqueo de canales de H^+ inhibiría la eficiencia celular tanto para acidificar como para alcalinizar el medio intracelular, por acción de un ácido graso de cadena corta como propionato. En este sentido, se ha demostrado en eosinófilos que canales sensibles a Zn^{2+} pueden inhibir el tránsito de H^+ en ambas direcciones, ya sea hacia el intracelular como al extracelular (Bánfi y col., 1999).

La entrada de H^+ , inducida con ácidos débiles como propionato (pKa 4.88), ha sido tradicionalmente explicada como un fenómeno pasivo de entrada de la forma no ionizada (Brunkhorst y col., 1992; Decoursey, 2003). Sin embargo, en neutrófilos de humanos se ha logrado establecer que la apertura de los canales de H^+ por estímulo, con sustancias quimiotácticas, no respondería a un cambio en el gradiente de pH en sí, sino más bien a la concentración de ácido araquidónico que regularía el funcionamiento del complejo NADPH oxidasa. Por lo tanto, se sugiere que AA facilitaría la apertura y función de dicho canal y estaría relacionada directamente con la generación de especies reactivas de oxígeno $O_2^{\cdot -}$ (Henderson y col., 1994).

El bloque concomitante de ambas estructuras involucradas en la regulación del pH resultó en una mayor depresión en la eficiencia celular para regularizar su medio intracelular en términos de pH. De este modo, tal como fuese planteado anteriormente estos dos mecanismos pueden contribuir simultáneamente a los cambios de pH intracelular inducido por propionato.

7.4 Rol de p38 en los cambios de pH inducidos por propionato en neutrófilos bovinos.

La inhibición de p38 con SB283580 (30 μ M), no manifiesta cambios en términos de áreas de acidificación y alcalinización, no obstante la evidencia experimental indica una clara inhibición sobre Δ pH de acidificación, no observándose el mismo evento sobre Δ pH de alcalinización. Esto sugeriría que p38 gobernaría en parte el proceso de acidificación máxima inducida con propionato. El mecanismo que explicaría este fenómeno es desconocido, sin embargo puede estar asociado a la respuesta del receptor, gracias a su actividad agonista sobre GPR43 y su regulación sobre la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y liberación de Ca²⁺ al citosol (Le Poul y col., 2003). Más aún, la inhibición de la movilización de calcio intracelular con BAPTA-AM inhibió la acidificación máxima inducida con propionato (Fig. 3 y 5). Esto sugiere que la inhibición de la movilización de calcio intracelular podría afectar el proceso de acidificación a través de la inhibición de p38. En apoyo a esto, la activación de p38 en neutrófilos es reducida por BAPTA-AM en células estimuladas con ionomicina (ionoforo de calcio), PAF y fMLP (Elzi y col., 2001). Además evidencia indirecta sugiere que el canal de protones puede ser activado por fosforilación de proteínas (Decoursey, 2003).

7.5 Rol de PKC en los cambios de pH inducidos por propionato en neutrófilos bovinos.

La inhibición de PKC con Gö6850 5 μ M no evidenció cambios representativos en las áreas de acidificación y alcalinización celular, como de igual en Δ pH tanto de acidificación y alcalinización. En neutrófilos de bovino es conocida la presencia mayoritaria de la isoforma β de PKC en comparación a una menor expresión la isoforma ζ de PKC (Stasia y col., 1990). Gö6850 es capaz de inhibir selectivamente ambas isoformas con una K_i de 10 nM (Toullec y col., 1991). Por cuanto podemos sugerir que, los procesos de acidificación como de alcalinización al interior del neutrófilo inducido por propionato, no serían dependiente del control de PKC.

7.6 Rol de ERK en los cambios de pH inducidos por propionato en neutrófilos bovinos.

La inhibición específica de ERK con UO126 1 μ M no manifiesta cambios representativos en las áreas de acidificación y alcalinización celular. Por otro lado, el Δ pH de acidificación no fue modificado por UO126 y pero si el de alcalinización. Este ácido graso de cadena corta tiene descrito la capacidad de activar a ERK1/2 dada su actividad agonista sobre GPR43 (Le Poul y col., 2003). Además se ha planteado que la exposición de células a un medio ácido incrementaría tanto la actividad del intercambiador NHE1 como la vía ERK1/2 (Haworth y col., 2003), de igual modo la fosforilación de ERK1/2 se ve involucrada en la actividad del NHE (Fukushima y col., 1996) y en neutrófilos de bovinos activado por PAF (Hidalgo y col., 2004).

8. CONCLUSION.

En términos generales podemos concluir a la luz de nuestros resultados, la habilidad demostrada por propionato para aumentar la concentración de Ca^{2+} citosólico en neutrófilos bovinos, al igual cómo fuese demostrado por trabajos previos en neutrófilos humanos. De igual manera logramos evidenciar como el Ca^{2+} desempeña un rol en los cambios de pH intracelular y cómo el origen de este, ya sea desde almacenes intracelulares o del medio extracelular, tiene un rol moderador en el equilibrio de acidificación y alcalinización intracelular. Así se hizo evidente que la acidificación intracelular es un fenómeno que se relaciona significativamente con el calcio de origen intracelular, mientras que la alcalinización con su homólogo extracelular.

En otro ámbito de la investigación se logró establecer la activa participación del intercambiador Na^+/H^+ y de los canales de H^+ sensibles a Zn^{2+} , en la mantención del medio alcalino interno en neutrófilos de bovinos, y como la inhibición y bloqueo de estos expone al medio intracelular por un mayor tiempo a una condición de acidez.

Por otro lado, hemos podido establecer la participación de la vía p38 en proceso de acidificación máxima inducida con propionato, además de asignarle al calcio un rol modulador de la actividad de esta vía y por consiguiente la modulación de la acidificación intracelular. De igual modo se estableció la potencial participación de ERK1/2 en la recuperación de alcalinización intracelular, toda vez que la inhibición de esta vía resulta en una reducción de dicha capacidad. A diferencia de las vías antes

descritas, no fue observable un rol participativo de PKC en los fenómenos antes enunciados.

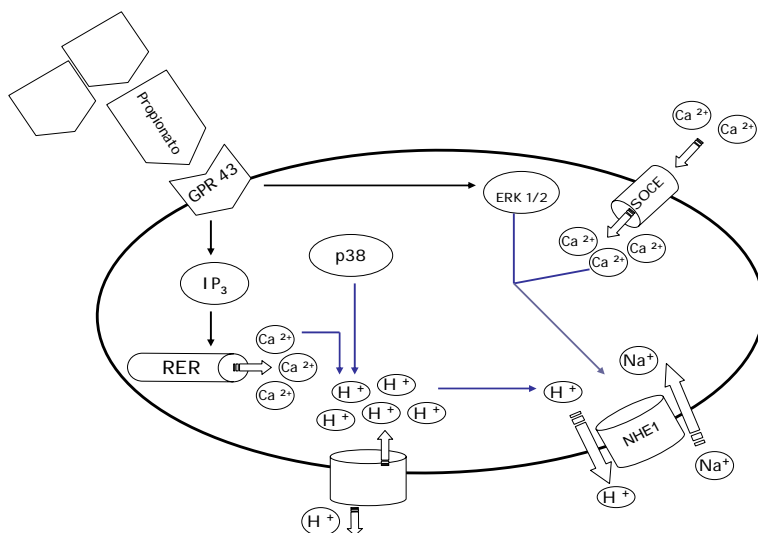


Figura 29 Modelo planteado para los eventos intracelulares, gaviado por propionato.

9. Bibliografía:

BURGOS, R. A., HIDALGO, M. A., MATTHEI, S. M., HERMOSILLA, R., FOLCH H., HANCKE J. 2004. Determination of specific receptor sites for platelet activating factor in bovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.*,65,628-636.

DECOURSEY, T. 2003. Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways. *Physiol. Rev.*,83,475-579.

DOWNEY, G.P., BUTLER, J.R., TAPPER, H., FIALKOW, L., SALTIEL, A.R., RUBIN, B.B. & GRINSTEIN, S. 1998. Importance of MEK in neutrophil microbicidal responsiveness. *J. Immunol.*,160,434-443.

BIDANI, A., BROWN, S.E., AND HEMING, T.A., 1994. pH regulation in alveolar macrophages: relative roles of Na⁺ - H⁺ antiport and H⁺ - ATP ase. *Am. J. Physiol.*, 266,L681-L688.

DOWNEY, G.P., BUTLER, J.R., TAPPER, H., FIALKOW, L., SALTIEL, A.R., RUBIN, B.B. & 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., Bjornsen, A., Mackenzie, T., Wyman, T., and Silliman, C. 2001. Ionomycin causes activation of p 38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*,28,C350-C360.

FUKUSHIMA, T., WADDELL, T.K., GRINSTEIN, S., GOSS, G.G., ORLOWSKY, J. & DOWNEY, G.P. 1996. Na⁺/H⁺ Exchange Activity during Phagocytosis in Human Neutrophils: Role of Fcγ Receptors and Tyrosine Kinases. *J. Cell. Biol.*,132,1037-1052.

FAUCHER, N., AND NACCACHE, P.H., 1987. Relationship Between pH, and Shape Changes in Chemotactic-factor-stimulated Human Neutrophils. *J. Cell. Physiol.*,132,483-491.

FONTERIZ, R.I., SÁNCHEZ, A., MOLLINEDO, F., COLLADO – ESCOBAR, D., AND GARCÍA-SANCHO, J., 1991. The role of intracellular acidification in calcium mobilization in human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta.*,1093,1-6.

GENNARO, R., B. DEWALD, U. HORISBERGER, H.U. GUBLER, M. BAGGIOLINI. 1983. A novel type of cytoplasmic granule in bovine neutrophils. *J. Cell. Biol.*, 96,1651-1661.

GRINSTEIN, S., FURUYA, W., AND BIGGAR, D., 1986. Cytoplasmic pH regulation in normal and abnormal neutrophils. *J. Biol. Chem.*,26,512–514.

HAWORTH, R.S., MCCANN, C., SNABAITIS, A.K., ROBERTS, N.A. & 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.

HENDERSON, L. M., BANTING, G., AND CHAPPELL, J., 1995. The arachidonate – activable, NADPH oxidase-associated H⁺ channel. *J. Biol. Chem.*, 270,5909–5916.

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.

ITAGAKI, K., KANNAN, K. B., LIVINGSTON, D. H., DEITCH, E. A., FEKETE, Z. and HAUSER, C. J. 2002. "Store-Operated Calcium Entry in Human Neutrophils Reflects a Multiple Contributions from Independently Regulated Pathways. *J. Immunol.*,168,4063-4069.

KAPUZ, A., ROMANEK, R., AND GRINSTEIN, S., 1994. Arachidonic acid stimulates the plasma membrane H⁺ conductance of macrophages. *J.Biol. Chem.*,269,4736–4745.

KIMURA, M., GARDNER, J., AND AVIVS, A., 1990. Agonist – evoked alkaline shift in the cytosolic pH set point for activation of Na⁺ / H⁺ antiport in human platelets. *J. Biol. Chem.*, 265,21068–21074.

LE POUL. E., LOISON. C., STRUYF.S., SPRINGAEL. J., LANNOY. V., DECOBECQ. M., BREZILLON . S., DUPRIEZ.V., VASSART. G., VAN DAMME. JO., PARMENTIER. M., AND DETHEUX.M. 2003. Functional Characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J. Biol. Chem.*, 278,25481-25489.

LOWENTHAL, A., AND LEVY, R., 1999. Essential requirement of cytosolic phospholipase A2 for activation of the H⁺ channel in phagocyte – like cells. *J. Biol. Chem.*, 274,21603–21608.

MOOLENAAR, W., TERTOOLEN, L.G., AND DE LAAT, S., 1984. The regulation of cytoplasmic pH in human fibroblast. *J. Biol. Chem.*, 259,7563–7569.

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.

NACCACHE ,P.H., THERRIEN, S., CAON, A.C., LIAO, N., GILBERT, C., AND MCCOLL, S. R., 1989. Chemoattractant-induced cytoplasmic pH Changes and Cytoskeletal Reorganization in Human Neutrophils. *J. Immunol.*,142,2438-2444.

NACCACHE,P.H., FAUCHER, N., CAON,A .C., AND MCCOLL, S. R.,1988. Propionic Acid-Induced Calcium Mobilization in Human Neutrophils. *J. Cell. Physiol.*,136,118-124.

NIEDERMAN.R., ZHANG. J., AND KASHKET. S. 1997. Short–chain carboxylic–acid–stimulated, PMN–mediated gingival inflammation. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, 8 (3), 269-9.

PERSSON, K., I. LARSSON, C.H. SANDGREN. 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. & 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.

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.

RABONOWITCH, M., DE STEFANO. M. S., AND DZIEZANOWSKI.A. 1979. Neutrophil migration under agarose: stimulation by lowered medium pH and osmolarity. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 27, 189.

ROOS, A., BORON, W., 1981. Intracellular pH. *Physiological Reviews.*, 61, 296-434.

ROTH, J.A., M.L. KAEBERLE. 1981. Evaluation of bovine polymorphonuclear leukocyte function. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2,157-174.

STASIA, M.J., STRULOVICI, B., DANIEL-ISSAKANI, S., PELOSI, J.M., DIANOUX, A.C., CHAMBAZ, E. & 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 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.

TREVANI, ANALÍA., ANDONEGUI, G., GIORDANO, M., LÓPEZ, D., GAMBERALE, R., MINUCCI, F., AND JENNIFER, J., 1999. Extracellular acidification induces human neutrophil activation. *J. Immunol.*, 162, 4849-4857.

TOULLEC, D., PIANETTI, P., COSTE, H., BELLEVERGUE, P., GRAND-PERRET, T., AJAKANE, M., BAUDET, V., BOISSIN P., BOURSIER, E., AND LORIOLE, F. 1991. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 266, 15771-15781.

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. Commun.*, 293, 1571-1578.

ZAVOICO, G. B., CRAGOE, E. J., AND FEINSTEIN, M. B., 1986. Regulation of intracellular pH in human platelets. *J. Biol. Chem.*, 261, 13160-13166.

ZIGMOND, S.H., AND HARGROVE, R.L., 1981. Orientation of PMN in a pH gradient: acid-induced release of a chemotactic factor. *J. Immunol.*, 126, 478-481.