

11265 2



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS MEDICAS, ODONTOLÓGICAS  
Y DE LA SALUD**

**REGULACIÓN DEL CALCIO  
INTRACELULAR EN EL MONOCITO  
HUMANO *EX VIVO*.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS MEDICAS**

P R E S E N T A :

**JORGE ANÍBAL DANIEL CORZO PINEDA**

P E D I A T R A   N E O N A T Ó L O G O

**TUTOR: DR. JOSÉ LUIS REYES SÁNCHEZ.  
CO-TUTOR: DR. JOSÉ DANIEL SALAZAR EXAIRE**

MÉXICO, D.F.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# PAGINACIÓN DESCONTINUA

Desde la primera vez que te vi,  
mis sentidos, mis pensamientos,  
mi amor y mis sueños, estuvieron  
siempre contigo, a pesar del tiempo,  
la distancia y no pocos problemas.  
Gracias por iluminar y compartir mi  
vida y por ser una mujer maravillosa  
en todos los aspectos.

**Jorge Daniel y Erick Ricardo.**

**Hay gente que duda a veces de las maravillas que existen en el mundo, sin embargo, tal vez nunca ha tenido la dicha de escuchar la risa de sus hijos, de seguir sus avances, de compartir sus sueños y admirar sus ilusiones, tal vez si estas personas tuvieran hijos como ustedes, lo entenderían.**

**Gracias por darme confianza en el futuro y por hacerme sentir en todo momento lo infinitamente pequeños que somos ante el Universo, pero sobre todo por ser un par de muchachos tan admirables.**

A mi Padre.

Por inculcarme que vivir es tener  
Algo que hacer, tener una meta, un objetivo,  
una tarea, una obra a la cual dedicar el tiempo,  
la energía y dedicar la vida.

Por su ejemplo, amor, consejos y  
apoyo incondicional.

A mi Madre.

Por sus desvelos, enojos y amor.

TESE COM  
FALLA DE ORIGEN

Al Dr. José Luis Reyes Sánchez

Gracias por su gran apoyo, infinita paciencia, sencillez y comprensión, pero sobre todo por ayudarme a germinar el proyecto y por darme la oportunidad de trabajar a su lado.

Al Doctor Ramón Paniagua Sierra

Por ayudarme a lograr mi sueño y dirigirme hacia un gran tutor de Tesis.

Al Dr. José Dante Amato Martínez

por su ejemplo, reconvenciones, consejos pero sobre todo por su gran labor al intentar modificar nuestra conducta crítica hacia el apasionante mundo de la investigación.

A Daniel, Luz María, Bety y Araceli de Inmunobioquímica del Hospital Infantil de México por sus enseñanzas.

A Elsa, Lolita, Maricarmen, Elvis Laura y Gerardo por su ayuda invaluable y su apoyo incondicional durante mis grandes tropiezos y pequeños logros en el CINVESTAV.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

"Hay quienes creen encontrarla  
más allá de las cadenas y prisiones;  
hay quien piensa que se esconde  
en el vuelo ligero de las aves.  
Pero la verdadera libertad  
aquella que circula infinita  
como un torbellino de luz,  
habita en la mirada de un niño  
y en el universo de su corazón".

H.M.V.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INDICE

1.	Introducción	1
1.1	Bloqueadores de los intercambiadores y cotransportadores del calcio y sodio.	3
1.2	Uso de la fluorescencia en el estudio de iones intracelulares.	4
1.3	El monocito humano.	6
1.4	Línea celular de Monocitos U-937.	6
2.	Justificación	8
3.	Hipótesis:	9
4.	Objetivo General:	10
4.1	Objetivos particulares:	10
5.	Material y Métodos.	11
5.1	Sitio de realización del estudio.	11
5.2	Diseño del estudio	11
5.3	Variables	11
5.3.1	Variables independientes.	11
5.3.2	Variable dependiente.	11
5.3.3	Condiciones de experimentación.	12
5.4	Cultivo de la línea celular U-937.	12
5.4.1	Descongelamiento.	12
5.4.2	Prueba de viabilidad con azul de tripano	13
5.4.3	Cambio de medio	13
5.4.4	Congelamiento.	14
5.5	Metodología para medir calcio intracelular con el marcador fluorescente FURA-2AM en monocitos U – 937 .	14
5.6	Efecto de la $[Ca^{2+}]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.	15
5.7	Efecto de las variaciones en la concentración de sodio extracelular sobre el $[Ca^{2+}]_i$ basal en monocitos U – 937.	16
5.8	Efecto del 2,4 dimetilbenzamil y la $[Ca^{2+}]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en	

monocitos U – 937.	16
5.9 Efecto del O-vanadato de sodio y la $[Ca^{2+}]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.	16
5.10 Efecto de la ouabaína sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.	17
5.10 Efecto de amilorida y de la $[Na^+]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.	18
5.11 Efecto de clortalidona y la $[Na^+]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.	18
5.12 Efecto de triclormetiazida y la $[Na^+]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.	19
5.14 Efecto de la sacarosa sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.	20
5.15 Efecto del manitol sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.	20
5.16 Efecto del DMSO sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.	20
5.17 Análisis estadístico.	20
6. Resultados.	21
6.1 Efecto de la $[Ca^{2+}]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.	21
6.2 Efecto de las variaciones en la concentración de sodio extracelular sobre el $[Ca^{2+}]_i$ basal en monocitos U – 937.	22
6.3 Efecto del 2,4 dimetilbenzamil y la $[Ca^{2+}]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.	22
6.4 Efecto del O-vanadato de sodio y la $[Ca^{2+}]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.	23
6.5 Comparación del efecto del 2,4 dimetilbenzamil y ortovanadato entre los grupos estudiados.	24
6.6 Efecto de la ouabaína sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.	24

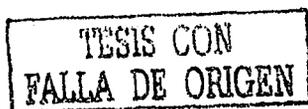
TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

6.7	Efecto de amilorida y la $[Na^+]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.	24
6.8	Efecto de Clortalidona y la $[Na^+]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.	25
6.9	Efecto de Triclormetiazida y la $[Na^+]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.	26
6.10	Comparación del efecto de amilorida, clortalidona y triclormetiazida entre los grupos estudiados.	27
6.11	Efecto de sacarosa y manitol sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.	27
6.12	Efecto del DMSO sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.	27
7.	DISCUSIÓN	28
8.	SUMARIO.	34
9.	SUMMARY	36
10.	PERSPECTIVAS	37
11.	REFERENCIAS.	38
12.	FIGURAS	42

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema simplificado del proceso de medición de la fluorescencia.	42
Figura 2.	Esquema básico de un espectrofluorómetro estándar.	43
Figura 3.	Procedimientos para medir fluorescencia en células vivas.	44
Figura 4.	Microfotografía de monocitos línea celular U – 937 en cultivo en microscopía de contraste de fases.	45
Figura 5.	Monocitos Línea celular U – 937 ( aumento 40X )	46
Figura 6.	Monocitos Línea celular U – 937 (aumento 100X)	47
Figura 7.	Efecto de la concentración de calcio extracelular sobre el calcio citosólico en monocitos U-937.	48
Figura 8.	Efecto de la concentración de calcio externo sobre la respuesta a ATP en monocitos U-937.	49
Figura 9.	Análisis de la relación entre calcio externo y calcio Citosólico	50
Figura 10.	Respuesta a ATP y calibración en monocitos humanos, con $[Ca^{2+}]_e$ 2.4mM y $[Na^+]_e$ 140 mM.	51
Figura 11.	Variación en la $[Ca^{2+}]_i$ a diferentes $[Ca^{2+}]_e$ en monocitos U-937.	52
Figura 12.	Efecto de las variaciones en la concentración del sodio extracelular sobre el $[Ca^{2+}]_i$ basal en monocitos U – 937 con $[Ca^{2+}]_e$ 2.4 mM.	53
Figura 13.	Efecto del 2,4 dimetilbenzamil y la $[Ca^{2+}]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ basal en monocitos U – 937.	54
Figura 14.	Efecto de las variaciones en la $[Ca^{2+}]_e$ sobre la respuesta a ATP en monocitos adicionados con 2, 4 dimetilbenzamil.	55
Figura 15.	Efecto del o-vanadato de sodio y las variaciones en la $[Ca^{2+}]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.	56

Figura 16.	Efecto de las variaciones en $[Ca^{2+}]_e$ sobre la respuesta a ATP en monocitos U - 937 adicionados con ortovanadato de sodio.	57
Figura 17.	Efecto de la ouabaína sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U- 937.	58
Figura 18.	Efecto de la amilorida y las variaciones en la $[Na^+]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U - 937.	59
Figura 19.	Efecto de la $[Na^+]_e$ sobre la respuesta a ATP en monocitos U - 937 adicionados con amilorida.	60
Figura 20.	Efecto del sodio externo sobre la respuesta a ATP.	61
Figura 21.	Efecto de la clortalidona y las variaciones en la $[Na^+]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U - 937	62
Figura 22.	Efecto de la $[Na^+]_e$ sobre la respuesta a ATP en monocitos U - 937 adicionados con clortalidona	63
Figura 23.	Efecto del sodio externo sobre la respuesta a ATP en monocitos humanos en presencia de clortalidona.	64
Figura 24.	Efecto de la triclormetiazida y las variaciones en la $[Na^+]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U - 937	65
Figura 25.	Efecto de la $[Na^+]_e$ sobre la respuesta a ATP en monocitos U - 937 en presencia de triclormetiazida.	66
Figura 26.	Efecto del sodio externo sobre la respuesta a ATP en monocitos U-937 en presencia de triclormetiazida.	67


  
 TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## 1. INTRODUCCION:

El calcio es uno de los iones más importantes del organismo, ya que numerosos procesos como la contracción muscular, la coagulación sanguínea, la secreción de hormonas, la liberación de neurotransmisores, la fertilización, la modulación de canales iónicos y la división celular son dependientes de este ion<sup>1</sup>.

En el cuerpo humano, el calcio es el mineral más abundante. En el humano adulto, hay aproximadamente 1100 a 1200 g del mismo, localizado en un 99 % en los huesos, el 1 % restante se encuentra en la sangre en tres fracciones: ligado a la albúmina (45%), ionizado (50%) y formando complejos con bicarbonato, fosfato o citrato (5%), éstas dos últimas fracciones se conocen como ultrafiltrables o fracciones no combinadas con proteínas<sup>2</sup>. El calcio ionizado es la única de las tres fracciones fisiológicamente activa, y se encuentra en todo momento en intercambio dinámico con las otras dos.

La concentración sérica de calcio depende de un elaborado mecanismo homeostático en el que intervienen las hormonas paratiroidea, calcitonina, de crecimiento, factores de crecimiento similares a la insulina y la vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>D).

La concentración intracelular de calcio libre ( $[Ca^{2+}]_i$ ) tiene importancia crítica en el control de diversos procesos celulares esenciales<sup>3</sup>. Los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  pueden modular funciones especializadas como excitabilidad, contracción, exocitosis y regular actividades celulares fundamentales como metabolismo y expresión genética.

En diversos tipos celulares, el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  puede deberse al aumento en la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales localizados en la membrana celular o por su liberación a partir de depósitos intracelulares de calcio. Las diferencias entre la concentración de calcio extracelular ( $[Ca^{2+}]_o$ ) y la  $[Ca^{2+}]_i$  iónico son enormes ya que la  $[Ca^{2+}]_i$  iónico se mantiene en rango nanomolar y la  $[Ca^{2+}]_o$  está en concentración milimolar; para ello, la membrana plasmática limita y controla cuidadosamente su permeabilidad al  $Ca^{2+}$ . Ante elevaciones en la  $[Ca^{2+}]_o$ , la menor alteración en permeabilidad, resultaría en grandes oscilaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  afectando la regulación de los procesos celulares,

así, una falla en la permeabilidad de la membrana plasmática, con una sobrecarga intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , produciría una situación de emergencia capaz de conducir a la muerte celular, la inundación del citosol con  $\text{Ca}^{2+}$  es un evento frecuente y temprano en la patología celular <sup>4</sup>. Entre los mecanismos de transporte intracelular que contribuyen a la homeostasis intracelular del calcio, se encuentran el intercambiador sodio-calcio que transporta sodio en intercambio por calcio, generalmente en relación 3:1 <sup>1,5,6</sup>. Existen otros transportadores de membrana plasmática como el de sodio-protones que intercambia sodio por hidrógeno en una forma eléctricamente neutra utilizando como fuente energética la hidrólisis del ATP, este intercambiador está involucrado en la regulación del pH intracelular y provee una gran vía de entrada para el sodio a las células, además interviene en la regulación del volumen celular. Este transportador se ha identificado en mitocondrias, en bacterias y en células de mamíferos, habiéndose demostrado también en vesículas del borde en cepillo de células renales e intestinales de conejo y en la actualidad se cree que existe virtualmente en todos los tipos celulares <sup>7,8</sup>. Otro mecanismo de transporte transmembranal es el cotransportador sodio-cloro, aislado en 1993 a partir de clonas de cDNA provenientes de la vejiga del lenguado<sup>9</sup>, el cual codifica este intercambiador que también se ha observado en células de tubo distal de mamíferos<sup>10</sup>. El transporte sodio-cloro es dependiente de una bomba de sodio (ATPasa dependiente de Na y K) localizada en la membrana basolateral y del cotransportador sodio-cloro en la membrana luminal, que contribuye al transporte, introduciendo cloro al epitelio contra un gradiente electroquímico<sup>9</sup>. El sitio de cotransporte eléctrico neutro es el túbulo contorneado distal, expresado ampliamente por RNAm para este intercambiador<sup>10</sup>, no existen reportes de la expresión de este intercambiador en otras líneas celulares.

Otro sistema importante de transporte y regulación encontrado en células eucariotes es el compuesto por los canales de calcio con gran especificidad, localizados en la membrana plasmática, mitocondrias, retículo sarcoplásmico y endoplásmico<sup>11</sup> y por la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **1.1 Bloqueadores de los intercambiadores y cotransportadores del calcio y sodio.**

Se han sintetizado diversos inhibidores de algunas de las moléculas membranales involucradas en el transporte de iones y en la homeostasis celular de éstos.

Se describen a continuación los inhibidores empleados en este proyecto.

### **a) Amilorida:**

La síntesis de amilorida y de sus análogos fue descrita por Cragoe y col., quienes en 1967, demostraron que la amilorida inhibía los canales de sodio presentes en el epitelio urinario de sapo, posteriormente se encontró que la amilorida y sus análogos inhiben otros procesos de transporte iónico, procesos de transporte de membrana y enzimas y se demostró que interactúa con fármacos específicos y receptores hormonales e inhibe el metabolismo celular y la síntesis de DNA, RNA y proteínas. La amilorida reduce el tiempo medio de apertura de los canales de sodio pero no tiene efecto sobre la conductancia del canal único. También produce inhibición del intercambiador sodio-protones, hecho descrito en 1976, a través de los mecanismos siguientes:

1) Disminución del gradiente de pH a través de membranas plasmáticas, organelos y vesículas de membrana.

2) Acúmulo intracelular de amilorida el cual inhibe proteínas intracelulares (proteínas que participan en la regulación del intercambio sodio-hidrógeno) e incrementa el pH intracelular activando dicho intercambiador<sup>12</sup>.

La amilorida es un inhibidor reversible del intercambiador y su inhibición es competitiva con respecto al sodio. Este fármaco interactúa con más de un sitio de unión en el transportador, la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) es dependiente del sodio extracelular ó extravascular y su forma protonada es la que interactúa con el intercambiador<sup>7</sup>.

### **b) 2,4,dimetilbenzamil:**

Es un análogo de la amilorida, el cual tiene una mayor especificidad para inhibir el intercambiador sodio-calcio; este compuesto produce bloqueo reversible y completo de este intercambiador <sup>13,14</sup>.

c) Tiazida:

Las benzotiazidas aumentan predominantemente la excreción urinaria de cloruro de sodio. El sitio de acción de las tiazidas es el túbulo contorneado distal renal y actúa bloqueando el cotransportador sodio-cloro por inhibición competitiva en el sitio receptor de cloro<sup>9,15</sup>.

d) Vanadato de sodio:

Pentacoordinado, análogo del fosfato, que inhibe la unión del residuo aminoácido con el sitio activo de la ATPasa dependiente de calcio. La potencia del vanadato como inhibidor, depende de la composición iónica del medio (Mg, Ca y Na incrementan la inhibición) y de la concentración de ATP, actúa como inhibidor no competitivo contra el sitio de alta afinidad para el ATP<sup>4</sup>.

## 1.2 Uso de la fluorescencia en el estudio de iones intracelulares.

En la última década se ha incrementado notablemente el uso de indicadores fluorescentes para el estudio de iones en células vivas. Esto se debe principalmente a que se trata de un método no invasivo que no compromete la integridad celular ó mitocondrial, sólo requiere de un fluorómetro convencional con temperatura y agitación controlados, el cual, con una calibración adecuada, permite una rigurosa evaluación cuantitativa de los cambios en  $[Ca^{2+}]_i$ ,  $[Mg^{2+}]_i$  y  $[Na^+]_i$  en condiciones fisiológicas y en procesos patológicos. Los indicadores fluorescentes también poseen una velocidad de respuesta más rápida y una alta sensibilidad en el intervalo de concentraciones de interés biológico (0.1 a 1.0  $\mu M Ca^{2+}$ ).

El principio básico de la medición de fluorescencia es sencillo: se requiere de una fuente de luz, una muestra con características físicas que la hagan fluorescer al ser excitadas a una longitud de onda determinada y un detector<sup>16</sup> (figuras 1 y 2).

Existen diversas formas en que puede ser medida la fluorescencia (figura 3). La señal fluorescente puede ser detectada desde la superficie de órganos *in vivo*, utilizando en algunos casos endoscopia y fibra óptica. Puede medirse en secciones de tejido, en células cultivadas en cubreobjetos (confluentes o no confluentes), en suspensiones de células, en sitios seleccionados dentro de las células ó de imágenes de microscopia fluorescente. Con excepción de la última técnica, todas las demás nos dan una lectura promedio de la muestra experimental.

La medición de la concentración de algunos iones intracelulares, puede realizarse gracias al uso de marcadores fluorescentes. Estos marcadores se unen selectivamente a un ión específico generalmente con una estequiometría 1:1. La unión con el ion, produce un cambio profundo en sus propiedades fluorescentes de manera tal que la molécula fluorescente que tiene unido al ion, puede ser fácil y claramente distinguida de la molécula que permanece libre. Los marcadores fluorescentes disponibles para medir calcio han sido derivados del quelante ampliamente conocido como 1,2-bis(2-aminofenoxi)ethan -N,N,N',N'-ácido tetraacético (BAPTA). El BAPTA tiene una gran selectividad por el  $Ca^{2+}$  sobre el  $Mg^{2+}$ , en el rango de 5 a 6 órdenes de magnitud por lo que ha servido como modelo de un marcador fluorescente sensible a calcio, ya que al modificar la molécula se han obtenido nuevos marcadores fluorescentes para calcio como el quin2, indo1 y fura2-AM.

El Fura2-AM es actualmente el indicador de calcio más ampliamente utilizado, su longitud de onda de excitación es ligeramente más larga, su coeficiente de extinción y su eficiencia cuántica son mayores y su fotoestabilidad es mejor. Sus mejores propiedades de absorción y de emisión hacen a la fluorescencia del Fura2-AM aproximadamente 30 veces más brillante que la de otros indicadores por lo que es posible utilizar concentraciones menores del marcador. Su fluorescencia a 340 nm se incrementa hasta 3 veces y la de 380 nm disminuye hasta 10 veces cuando se une a calcio y esto provee bases excelentes para la medición de este catión cuando se usa el cociente de la fluorescencia cuantificada con cada una de esas longitudes de onda <sup>17, 18,19</sup>. Este indicador se utilizó para las mediciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  en esta tesis.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **1.3 El monocito humano.**

Los fagocitos mononucleares comprenden un linaje celular compuesto por macrófagos tisulares y monocitos circulantes; entre las propiedades funcionales de éstos se encuentran<sup>20-22</sup>:

- 1) Fagocitosis y digestión de microorganismos invasores.
- 2) Biosíntesis de productos de secreción.
- 3) Procesamiento de antígenos e interacción con linfocitos en el desarrollo de la respuesta inmune primaria.
- 4) Generación de respuesta citotóxica a células tumorales.
- 5) Mantenimiento de funciones tisulares especializadas en conjunto con otros tipos celulares para preservar la homeostasis extracelular de macromoléculas.

Los monocitos son células sanguíneas que proceden de un progenitor pluripotencial localizado en la médula ósea y existe evidencia considerable sobre la presencia de estas células pluripotenciales para cada línea celular. Uno de esos progenitores llamado colonia formadora de macrófagos y granulocitos (CFMG) es responsable de la diferenciación entre fagocitos mononucleares y granulocitos a través de la acción de las glicoproteínas llamadas factores estimulantes de colonias (FEC). Entre los productos secretados por los monocitos se encuentran compuestos polipeptídicos como el interferón alfa, la interleucina 1, el factor de necrosis tumoral, somatomedina C, proteínas del complemento C2 y C3 y el factor B; de origen similar son las proteínas de matriz extracelular como fibronectinas, proteoglicanos, condroitin sulfato, lípidos bioactivos como las prostaglandinas E<sub>2</sub> e I<sub>2</sub>, iones peróxido, aniones superóxido y algunas enzimas como la lisozima.

### **1.4 Línea celular de Monocitos U-937.**

La línea celular U-937 fue desarrollada a partir de un paciente con linfoma histiocítico. En esta línea, se han realizado estudios sobre variaciones en la [Ca<sup>2+</sup>] con el marcador fluorescente indo1, al ser estimulados con interferón gamma<sup>23</sup>, asimismo se ha empleado el marcador fluorescente Fura2-AM en

estudios sobre el aumento en la capacidad de almacenamiento y entrada de calcio intracelular inducida con dibutilil AMPc <sup>24</sup> ; sobre la estimulación mediante IgG y el aumento subsecuente en la  $[Ca^{2+}]_i$  <sup>25</sup> , y el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  relacionado con la producción de muerte celular con inhibidores de 5-lipooxigenasa <sup>26</sup> .

El contar con una línea celular de origen humano como ésta, provee de un recurso de investigación para observar su diferenciación celular, el comportamiento bioquímico y biológico así como las funciones de células sanguíneas que tienen las mismas características en cuanto a morfología, ultraestructura y fisiología que las células del linaje monocito / macrófago.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2. JUSTIFICACION:

La regulación del calcio a nivel intracelular y la participación de los transportadores de este ión se han estudiado en diversas células (renales, miocitos, epitelio intestinal y vesical), sin embargo no existen trabajos que simulen condiciones de anormalidad en células sanguíneas humanas. El efecto que pueden ejercer estímulos como el aumento y disminución en la  $[Ca^{2+}]_o$  y en la  $[Na^+]_o$ , así como el efecto de la inhibición de los sistemas intercambiadores, cotransportadores y de la ATPasa dependiente del calcio sobre la  $[Ca^{2+}]_i$ ; no se ha explorado de manera sistemática en células sanguíneas como los monocitos humanos, donde el calcio contribuye de manera importante en el control de sus múltiples funciones, de igual manera el conocer si existen modificaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$  cuando varía la concentración extracelular de este catión o la de otros iones extracelulares relacionados con él, dentro de los límites considerados como fisiológicos, podría tener implicaciones sobre la terapéutica de trastornos como la hipocalcemia e infecciones, ya que en el caso de las células tubulares renales, hay variaciones en el calcio celular basal cuando se modifica el calcio extracelular<sup>27</sup>.

### 3. HIPOTESIS:

La concentración basal de calcio citosólico en monocitos humanos en cultivo ( línea celular U - 937 ) y su respuesta a un estímulo fisiológico como la exposición al trifosfato de adenosina, se verán modificados en más del 10 % cuando se varíen las concentraciones de calcio o de sodio en el medio de cultivo.

La modificación en la  $[Ca^{2+}]_i$  de monocitos U 937 será mayor del 10 % ante los cambios en las concentraciones de calcio y sodio extracelular; el bloqueo selectivo de los intercambiadores sodio-calcio, sodio-protones, sodio-cloro y ATPasa dependiente del calcio, incrementará la modificación de la  $[Ca^{2+}]_i$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### **4. OBJETIVO GENERAL:**

- 1.** Desarrollar un modelo experimental para estudiar la regulación intracelular de calcio en monocitos U-937 y su modificación ante cambios en la concentración extracelular de iones como sodio y calcio que simulen los límites clínicos alto y bajo de calcio y sodio extracelulares y explorar la participación de los intercambiadores sodio-calcio, sodio-protones, el cotransportador sodio cloro y la ATPasa dependiente del calcio en la regulación de estos procesos a través de su inhibición selectiva.

#### **4.1 Objetivos particulares:**

- 1 a.** Evaluar los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  de monocitos U-937 al modificar la  $[Ca^{2+}]_o$  a 1.75 mM y 3 mM y medir el efecto que produce la inhibición de los intercambiadores del calcio sobre la  $[Ca^{2+}]_i$ .
- 2 a.** Evaluar la influencia que tiene una  $[Na^+]_o$  de 130 mM y de 150 mM sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  de monocitos U-937 y qué cambios se presentan en ésta al emplear bloqueadores selectivos para moléculas membranales relacionadas con el transporte de sodio y su intercambio con calcio.

## **5. MATERIAL Y METODOS.**

### **5.1 Sitio de realización del estudio.**

La estandarización en manejo, transporte y crioconservación de la línea celular de monocitos U-937 se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunoquímica del Hospital Infantil de México Federico Gómez, bajo la asesoría del Dr. José Daniel Salazar Exaire.

Las maniobras experimentales se realizaron en el Laboratorio No. 35 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados Unidad Zacatenco, bajo la asesoría del Dr. José Luis Reyes Sánchez.

### **5.2 Diseño del estudio:**

Biomédico Básico, Experimental.

### **5.3 Variables:**

#### **5.3.1 Variables independientes.**

$[Ca^{2+}]_o = 1.75 \text{ mM}$  (medio bajo en calcio).

$[Ca^{2+}]_o = 2.4 \text{ mM}$ .

$[Ca^{2+}]_o = 3 \text{ mM}$  (medio alto en calcio).

$[Na^+]_o = 130 \text{ mM}$  (medio bajo en sodio).

$[Na^+]_o = 140 \text{ mM}$ .

$[Na^+]_o = 150 \text{ mM}$  (medio alto en sodio).

#### **5.3.2 Variable dependiente.**

Concentración citosólica de calcio:  $[Ca^{2+}]_i$

### **5.3.3 Condiciones de experimentación.**

O – vanadato de sodio 3  $\mu\text{M}$

2,4 – dimetilbenzamil 10  $\mu\text{M}$

ouabaina 20  $\mu\text{M}$

amilorida 5  $\mu\text{M}$

clortalidona 100  $\mu\text{M}$

triclormetiazida 100  $\mu\text{M}$

ATP 50  $\mu\text{M}$

### **5.4 Cultivo de la línea celular U-937.**

El manejo de la línea celular se realizó en la campana de flujo laminar previa limpieza del interior de ésta y de la parte externa de los viales, tubos de centrifugación y botellas de cultivo con etanol antes de ser introducidos en la misma.

#### **5.4.1 Descongelamiento.**

Los viales almacenados en cilindros de nitrógeno líquido fueron extraídos lentamente empleando para ello pinza, guantes y anteojos protectores.

Se depositaron en un baño maría precalentado a 37 °C hasta que se descongeló el contenido.

Una vez descongeladas, se colocaron en un tubo para centrifugación no adherente de 15 ml y se adicionaron 2 ml de medio de cultivo (RPMI<sup>1640</sup> GIBCO Laboratories<sup>TM</sup>) suplementado con suero fetal bovino al 10%, se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 revoluciones por minuto, se extrajo el sobrenadante sin tocar la placa de células formada en la base del tubo, se adicionaron 2ml de RPMI<sup>1640</sup> homogenizando el contenido y se procede a nueva centrifugación por 5 minutos, se extrajo de nueva cuenta el sobrenadante y se resuspende la pastilla de células en 1 ml de RPMI<sup>1640</sup>, para verificar viabilidad con azul de tripano. Una vez realizada la estimación de la

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

viabilidad, se colocaron en botellas para cultivo con 7 a 10 ml de RPMI<sup>1640</sup> suplementado con suero fetal bovino.

#### **5.4.2 Prueba de viabilidad con azul de tripano<sup>28</sup>.**

Se utilizó azul de tripano al 0.5% en solución salina al 0.85%. Se obtuvieron 10  $\mu$ l de células en suspensión y se depositaron en un tubo Eppendorf, se adicionaron 90  $\mu$ l de azul de tripano y se mezclaron. Se obtuvo una alícuota de 10  $\mu$ l en el hemocitómetro y se colocó el cubreobjetos en el microscopio óptico con aumento a 10X, se procedió a contar las células de los cuatro cuadrantes sumando los totales de éstos y obteniendo el promedio. Una vez obtenido éste, se calculó el número total de células mediante la fórmula siguiente:

$$(\text{Promedio de los 4 cuadrantes}) (\text{Factor de Dilución}) (10,000) = \text{No. Células}$$

Donde: el factor de dilución se obtiene del volumen colocado en el hemocitómetro (por ejemplo 10 si se colocan 10  $\mu$ l).

Las células viables son aquellas sin tinción azul.

Las células muertas son aquellas teñidas de color azul.

#### **5.4.3 Cambio de medio<sup>29</sup>.**

Se extrajo el líquido de las botellas de cultivo empleando pipetas Pasteur esterilizadas, lavando las paredes de los frascos y depositándolo en tubos estériles de 15 ó 50 ml (de acuerdo a la cantidad de medio).

Se colocó 1 ml de RPMI<sup>1640</sup> suplementado en las botellas, mientras se vacía el contenido de las otras botellas.

Se centrifuga a 1500 rpm por 5 minutos, se extrae el sobrenadante y se agrega 1 ml de medio homogenizando con la pipeta Pasteur, se verifica viabilidad y se colocan las células deseadas en el frasco de cultivo dejando los días Lunes y Miércoles  $1 \times 10^6$  células por frasco en 7 a 10 ml de RPMI<sup>1640</sup> suplementado con suero fetal bovino al 10 % y los Viernes  $2.5 \times 10^5$  células

por frasco con 20 ml de RPMI<sup>1640</sup> suplementado para el fin de semana. Las células se mantuvieron a 37 °C y con CO<sub>2</sub> al 5.5 %.

#### **5.4.4 Congelamiento.**

Debe haber idealmente 2.5 x 10<sup>6</sup> células/ml y la viabilidad debe ser mayor del 90%. Se debe consignar en cada vial la fecha de congelación, el número de células, y la viabilidad de las mismas.

Se utilizan viales de 1 ml y se adicionan de acuerdo a la siguiente proporción:

- µl de suspensión de células U- 937 deseada.
- µl de RPMI<sup>1640</sup> suplementado con suero fetal bobino al 10% necesarios para completar 750 µl de contenido.
- 150 µl de suero fetal bovino al 15 %.
- Finalmente, justo antes de colocar el vial en congelación, se adicionan 100 µl de DMSO al 10%.
- Se colocan en el ultracongelador REVCO a - 40 °C por 2 a 3 horas y posteriormente se colocan los viales en nitrógeno líquido.

#### **5.5 Metodología para medir calcio intracelular con el marcador fluorescente FURA-2AM en monocitos U – 937 .**

Se utilizaron monocitos U-937 con viabilidad mayor del 90% en concentración de 1 x 10<sup>6</sup> células/ml.

Las células fueron colocadas en tubos de 15 ml con 2 ml de RPMI<sup>1640</sup> suplementado con suero fetal bovino al 10% precalentado a 37 °C.

Se centrifugaron durante 3 minutos a 1500 rpm y se procede a extraer el sobrenadante sin tocar la pastilla de células, se lavaron por 3 ocasiones con 2 ml de solución Ringer precalentada a 37°C. La solución Ringer contiene (mM): NaCl 140, KCl 5, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1, Glucosa 5, HEPES 20, CaCl<sub>2</sub> 1 a un pH 7.40. Realizados los tres lavados, se preparan 2 µl de Fura-2AM (5 µM) y 1 µl de ácido plurónico (0.01%) en 2 ml de Ringer y se adicionan a la placa de células homogenizando el contenido, protegidas de la luz y se colocan en baño maria precalentado a 37°C con agitación continua durante 30 minutos .

Una vez completado el tiempo de cargado se lavan nuevamente las células con Ringer por 3 ocasiones, se resuspenden con 2 ml de Ringer con calcio y sodio a diferentes concentraciones y se depositan las células en una celda para fluorescencia, colocada en baño maría a 37 °C con agitación magnética continua durante las mediciones de fluorescencia.

Se registran las cifras basales en el espectrofluorómetro y a los 5 minutos se adicionan 2  $\mu$ l de ATP (50  $\mu$ M), a los 10 minutos se adicionan 20  $\mu$ l de digitonina (200  $\mu$ M) para medir fluorescencia máxima y para valorar el grado de compartimentalización del Fura-2AM, a los 15 minutos se agregan 20  $\mu$ l de EGTA (250 mM en tris 60 mM pH 8) (concentración final en cubeta 2.5 mM) para medir la fluorescencia mínima y se concluye el registro a los 20 minutos.

El cálculo del  $[Ca^{2+}]_i$  se efectuó mediante la ecuación de Grynkiewicz<sup>30</sup>:

Para doble longitud de excitación

$[Ca^{2+}]_i = Kd (F_o/F_s) (R - R_{min}/R_{max} - R)$  donde:

$R_{min}/R_{max}$  = Cocientes de fluorescencia mínima y máxima

$F_o$  = fluorescencia detectada a 380 nm en ausencia de calcio.

$F_s$  = fluorescencia medida a 380 nm en saturación de calcio.

$Kd$  = constante de disociación del indicador fluorescente.

(224 en el caso del FURA 2-AM).

En las figuras 4, 5 y 6 se aprecian los monocitos de la línea celular U-937, una vez cargados con FURA-2AM.

### 5.6 Efecto de la $[Ca^{2+}]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U - 937.

Terminado el tiempo de carga del Fura-2AM y realizados los 3 lavados con Ringer, adicionado con Ca 1 mM, se exploró el efecto de las variaciones en el calcio extracelular en soluciones Ringer con Na 140 mM y adicionadas con  $CaCl_2$  en las siguientes concentraciones (mM): 0, 0.4 , 0.8 , 1.2 y 1.6 en la misma población celular.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Se hicieron las lecturas basales, se adicionó ATP a los 5 minutos, seguido de digitonina a los 10 minutos, EGTA a los 15 minutos y fin de las lecturas a los 20 minutos.

### **5.7 Efecto de las variaciones en la concentración de sodio extracelular sobre el $[Ca^{2+}]_i$ basal en monocitos U – 937.**

Las concentraciones intracelulares de sodio ( $[Na^+]_i$ ), se relacionan con las variaciones de  $[Ca^{2+}]_i$ , de tal forma que el aumento en  $[Na^+]_i$  puede activar al intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ , promoviendo salida de calcio celular. Con objeto de conocer si la concentración basal de calcio citosólico podía cambiar en respuesta a variaciones de sodio extracelular, se midió la  $[Ca^{2+}]_i$  modificando las concentraciones de sodio externo.

Terminado el tiempo de carga del Fura-2AM y realizados los 3 lavados con Ringer, adicionado con Ca 1 mM, se exploró el efecto del sodio extracelular en soluciones Ringer con Ca 2.4 mM, adicionadas con NaCl en las siguientes concentraciones: 130 mM, 140 mM y 150 mM.

### **5.8 Efecto del 2,4 dimetilbenzamil y la $[Ca^{2+}]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.**

Terminado el tiempo de carga del Fura-2AM y realizados los 3 lavados con Ringer, adicionado con Ca 1 mM, se exploró el efecto del 2,4 dimetilbenzamil en soluciones Ringer con Na 140 mM y adicionadas con  $CaCl_2$  en concentraciones 1.75 mM, 2.4 mM y 3 mM.

Se tomaron medidas basales, a los 5 minutos se adicionan 20  $\mu$ l de 2,4 dimetilbenzamil (concentración final en la cubeta de 10  $\mu$ M), se agrega ATP a los 10 minutos, digitonina a los 15 minutos y EGTA a los 20 minutos finalizando el registro a los 25 minutos.

### **5.9 Efecto del O-vanadato de sodio y la $[Ca^{2+}]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.**

Para mantener la homeostasis del calcio celular, se han descrito mecanismos de ingreso y de egreso de este catión a la célula. Para el egreso, se han identificado dos mecanismos principales: el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , el cual en su forma de operación habitual expulsa calcio e ingresa sodio a la célula<sup>6</sup>.

El segundo mecanismo es la ATPasa dependiente de calcio, la cual transporta este catión hacia el exterior celular. Para explorar si las modificaciones en el calcio extracelular afectaban la concentración basal de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y el aumento de ésta inducido por ATP extracelular, se inhibió esta ATPasa con O-vanadato de sodio.

Terminado el tiempo de carga del Fura-2AM y realizados los 3 lavados con Ringer, adicionado con Ca 1 mM, se exploró el efecto del O-vanadato de sodio en soluciones Ringer con Na 140 mM y adicionadas con  $\text{CaCl}_2$  en concentraciones 1.75 mM, 2.4 mM y 3 mM.

Se midió la concentración basal, a los 5 minutos se adicionaron 10  $\mu\text{l}$  de o-vanadato de sodio (3  $\mu\text{M}$  concentración final en la cubeta) y se agrega ATP, digitonina y EGTA a los 10, 15 y 20 minutos respectivamente, cerrando el registro a los 25 minutos.

#### **5.10 Efecto de la ouabaína sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.**

Se decidió utilizar un inhibidor de la ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  con el propósito de comparar con la respuesta a ATP en presencia de O-vanadato, inhibidor de la ATPasa dependiente de calcio, el cual, en altas concentraciones, inhibe también la ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

Las células fueron colocadas en tubos de 15 ml con 2ml de RPMI<sup>1640</sup> suplementado con suero fetal bovino al 10% precalentado a 37 °C se centrifugaron durante 3 minutos a 1500 rpm y se procede a extraer el sobrenadante sin tocar la placa de células, se lavaron por 3 ocasiones y se desecha el sobrenadante, se agregan a 2 ml de Ringer 2  $\mu\text{l}$  de Fura-2AM (5  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{l}$  de ácido plurónico 20% y 4  $\mu\text{l}$  de ouabaína 20 mM (concentración final 20  $\mu\text{M}$ ) se adicionan a la placa de células homogenizando el contenido,

protegidas de la luz y se colocan en baño maría precalentado a 37°C con agitación suave y continua.

Una vez completado el tiempo de cargado se lavan nuevamente las células con Ringer por 3 ocasiones, se resuspenden con 2ml de Ringer Na 140 mM y Ca 2.4 mM.

Se mide la fluorescencia basal, a los 5 minutos se agrega ATP, digitonina a los 10 minutos y EGTA a los 15 minutos, finalizando la lectura a los 20 minutos.

### **5.11 Efecto de amilorida y de la $[Na^+]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.**

Dado que la regulación de  $[Ca^{2+}]_i$  está ligada a la de sodio, se probaron tres concentraciones extracelulares diferentes de este catión en presencia de amilorida, la cual inhibe el ingreso de sodio a la célula mediante el bloqueo de los canales de sodio y del intercambiador  $Na^+/H^+$ .

Terminado el tiempo de carga del Fura-2AM y realizados los 3 lavados con Ringer, adicionado con Ca 1 mM, se exploró el efecto de amilorida en soluciones Ringer con Ca 2.4 mM y Na en concentraciones 130 mM, 140 mM y 150 mM.

Para la concentración 130 mM se preservó la osmolaridad con cloruro de colina (290 mOsm/kg  $H_2O$ ).

Se mide concentración basal, a los 5 minutos se adicionan 20  $\mu$ l de amilorida 5 mM (concentración final en cubeta 50  $\mu$ M), a los 10 minutos ATP, digitonina a los 15 minutos y EGTA a los 20 minutos, finalizando la lectura a los 25 minutos.

### **5.12 Efecto de clortalidona y la $[Na^+]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.**

El cotransportador sodio-cloro ( $Na^+/Cl^-$ ) es uno de los mecanismos de ingreso de sodio a la célula. Considerando que la amilorida modificó la respuesta al ATP en presencia de concentraciones altas de  $Na^+$  extracelular, se

decidió estudiar el efecto de clortalidona, inhibidor de este cotransportador sobre al calcio basal y sobre la respuesta a ATP, aún cuando no hay reportes de la presencia de esta molécula transportadora en el monocito U – 937.

Terminado el tiempo de carga del Fura-2AM y realizados los 3 lavados con Ringer, adicionado con Ca 1 mM, se exploró el efecto de clortalidona en soluciones Ringer con Ca 2.4 mM y Na en concentraciones 130 mM, 140 mM y 150 mM.

Para la concentración 130 mM se preservó la osmolaridad con cloruro de colina (290 mOsm/kg H<sub>2</sub>O).

Se mide la concentración basal, a los 5 minutos se adicionan 20 µl de clortalidona 10 mM (concentración final en cubeta 100 µM), a los 10 minutos ATP, digitonina a los 15 minutos y EGTA a los 20 minutos, finalizando lectura a los 25 minutos

### **5.13 Efecto de triclormetiazida y la [ Na<sup>+</sup> ]<sub>e</sub> sobre la [ Ca<sup>2+</sup> ]<sub>i</sub> en monocitos U – 937.**

En vista de que la respuesta a ATP en presencia de clortalidona, inhibidor del cotransportador Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>, cambió en presencia de concentraciones variables de sodio externo, se decidió estudiar el efecto de otro inhibidor de este mecanismo, en las misma condiciones experimentales que la serie anterior.

Se realizaron 10 experimentos por cada modificación en la [ Na<sup>+</sup> ]<sub>e</sub> (130, 140 y 150 mM).

Terminado el tiempo de carga del Fura-2AM y realizados los 3 lavados con Ringer, adicionado con Ca 1 mM, se exploró el efecto de triclormetiazida en soluciones Ringer con Ca 2.4 mM y Na en concentraciones 130 mM, 140 mM y 150 mM.

Se midió la concentración basal, a los 5 minutos se adicionaron 20 µl de triclormetiazida 10 mM (100 µM concentración final en la cubeta) y se agregan ATP, digitonina y EGTA a los 10, 15 y 20 minutos respectivamente, cerrando el registro a los 25 minutos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### **5.14 Efecto de la sacarosa sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.**

Terminado el tiempo de carga del Fura-2AM y realizados los 3 lavados con Ringer, adicionado con Ca 1 mM, se resuspenden las células con Ringer Na 140 mM y Ca 2.4 mM adicionado de 40  $\mu$ l de sacarosa (1 M) para observar el efecto de la osmolaridad en presencia de Clortalidona ó Triclormetiazida sobre la  $[Ca^{2+}]_i$

#### **5.15 Efecto del manitol sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.**

Terminado el tiempo de carga del Fura-2AM y realizados los 3 lavados con Ringer, adicionado con Ca 1 mM, se resuspenden las células con Ringer Na 140 mM y Ca 2.4 mM adicionado de 100  $\mu$ l de manitol 0.5 M para observar el efecto de la osmolaridad en presencia de clortalidona ó triclormetiazida sobre la  $[Ca^{2+}]_i$

#### **5.16 Efecto del DMSO sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.**

Para evaluar el posible efecto del vehículo (DMSO) de clortalidona y triclormetiazida se administró únicamente aquel en lugar de ambos inhibidores para observar su efecto sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  en un Ringer con Na 140 mM y Ca 2.4 mM, adicionado con 100  $\mu$ l de manitol 0.5 M ó con 40  $\mu$ l de sacarosa 1 M.

#### **5.17 Análisis estadístico.**

Se presenta la media  $\pm$  desviación tipo de la media. Se realizaron pruebas de t para muestras dependientes, para comparar las medias dentro de cada uno de los grupos estudiados y análisis de varianza para comparar las medias entre los grupos estudiados, seguida de la prueba de Tukey Kramer para el análisis entre grupos<sup>31</sup>. Se utilizó el programa estadístico Graph Pad, Prism version 3.02 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, Copyright (c) 1994-1999 by GraphPad Software.

## 6. RESULTADOS.

### 6.1 Efecto de la $[Ca^{2+}]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.

En este experimento se determinaron las diferentes cifras de  $[Ca^{2+}]_i$  en una misma población celular sometida a diferentes concentraciones de  $[Ca^{2+}]_e$ , donde se observó aumento en el  $[Ca^{2+}]_i$  basal, así como aumento en la liberación del calcio como efecto del ATP a medida que aumenta la  $[Ca^{2+}]_e$ . Los resultados mostraron además que la  $[Ca^{2+}]_i$  basal, se mantiene dentro de límites normales, a partir de 1.6 mM de  $[Ca^{2+}]_e$  (figuras 7, 8 y 9). A concentraciones más bajas, hubo una relación directa entre la concentración extracelular de calcio y la  $[Ca^{2+}]_i$ . En la figura 10, se muestra un experimento representativo de la calibración y de la respuesta a ATP en monocitos humanos línea celular U -937.

Al agrupar las cifras de  $[Ca^{2+}]_i$  basal del total de las series experimentales en donde se modificó la  $[Ca^{2+}]_e$  encontramos lo siguiente:

En el grupo con  $[Ca^{2+}]_e$  1.75 mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $114.9 \pm 33.9$  nM (intervalo de 64.5 a 200.2). En el grupo con  $[Ca^{2+}]_e$  2.4 mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $90.3 \pm 24$  nM (intervalo de 50.3 a 138.3). En el grupo con  $[Ca^{2+}]_e$  3 mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $88.2 \pm 20.5$  nM (intervalo de 59.6 a 124.1). Si bien, la tendencia observada fue que a mayor  $[Ca^{2+}]_e$  se observó un descenso progresivo en la  $[Ca^{2+}]_i$ , el ANOVA mostró diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) únicamente entre el grupo de 1.75 mM y los de 2.4 y 3 mM, por otra parte, no se encontró diferencia entre los grupos de 2.4 y 3 mM ( $p > 0.05$ ) (figura 11).

## 6.2 Efecto de las variaciones en la concentración de sodio extracelular sobre el $[Ca^{2+}]_i$ basal en monocitos U – 937.

Al agrupar los valores de  $[Ca^{2+}]_i$  basal del total de las series experimentales en donde se modificó la  $[Na^+]_e$  encontramos lo siguiente: En el grupo con  $[Na^+]_e$  130 mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $69.1 \pm 22$  nM (intervalo de 44.1 a 129.4). En el grupo con  $[Na^+]_e$  140 mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $82.8 \pm 19.6$  nM (intervalo de 52.98 a 148). En el grupo con  $[Na^+]_e$  150 mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $63.2 \pm 22$  nM (intervalo de 34.9 a 105.1). Como se muestra en la gráfica 4, las mayores cifras de  $[Ca^{2+}]_i$  fueron observadas en el grupo con  $[Na^+]_e$  140 mM. El ANOVA mostró diferencia significativa entre los grupos con  $[Na^+]_e$  de 130 mM y 140 mM ( $p < 0.05$ ) y de 140 mM y 150 mM ( $p < 0.01$ ), sin embargo no se encontró diferencia ( $p > 0.05$ ) entre los grupos con mayor y menor  $[Na^+]_e$  ( figura12 ).

## 6.3 Efecto del 2,4 dimetilbenzamil y la $[Ca^{2+}]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.

Se realizaron 9 experimentos por cada modificación en la  $[Ca^{2+}]_e$  (1.75, 2.4 y 3 mM).

Los resultados de la determinación de  $[Ca^{2+}]_i$  basal en los grupos estudiados fueron los siguientes:

En el grupo con  $[Ca^{2+}]_e$  1.75 mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $121.4 \pm 17.6$  nM (90.5 – 154.8), En el grupo con  $[Ca^{2+}]_e$  2.4 mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $113.3 \pm 20.4$  nM (97.7 – 134.1), En el grupo con  $[Ca^{2+}]_e$  3 mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $79.4 \pm 11.6$  nM (67.29 – 95.91). Se observó una tendencia a la disminución en las cifras de  $[Ca^{2+}]_i$  basal a medida que la  $[Ca^{2+}]_e$  se incrementaba ( $p < 0.001$  entre los grupos 1.75 y 3 mM y  $p < 0.01$  entre los grupos 2.4 y 3 mM) (figura 13).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los cambios en las cifras de  $[Ca^{2+}]_i$  al administrar el 2,4 dimetilbenzamil, mostraron diferencias significativas con las cifras basales de calcio en los tres grupos ( $p < 0.01$  en el grupo 1.75 mM y  $p < 0.0001$  en los grupos 2.4 y 3 mM). Al administrar el ATP se observaron modificaciones significativas ( $p < 0.001$ ) en la  $[Ca^{2+}]_i$  con respecto a las cifras basales de calcio en cada uno de los grupos estudiados. Al comparar el aumento en la liberación del calcio como efecto del ATP, no encontramos diferencia significativa entre los grupos, sin embargo nuevamente se observó la tendencia a disminuir las cifras de calcio intracelular al aumentar la  $[Ca^{2+}]_e$  (figura 14).

#### **6.4 Efecto del O-vanadato de sodio y la $[Ca^{2+}]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.**

Se realizaron 9 experimentos para las  $[Ca^{2+}]_e$  1.75 y 2.4mM y 10 para la  $[Ca^{2+}]_e$  3 mM.

Los resultados de la determinación de  $[Ca^{2+}]_i$  basal en los grupos estudiados fueron los siguientes:

En el grupo con  $[Ca^{2+}]_e$  1.75mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $94.0 \pm 34.6$  nM (55.6 – 155.9), En el grupo con  $[Ca^{2+}]_e$  2.4 mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $78.6 \pm 22.1$  nM (50.3 – 113.1), En el grupo con  $[Ca^{2+}]_e$  3 mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $87.3 \pm 26.7$  nM (59.6 – 124.1). No se observaron diferencias significativas en la  $[Ca^{2+}]_i$  entre los tres grupos.

La incubación de los monocitos en presencia de O-vanadato modificó significativamente la  $[Ca^{2+}]_i$  con respecto a las cifras basales ( $p < 0.001$  en el grupo 1.75 mM y  $p < 0.0001$  en los grupos 2.4 y 3 mM) (figura 15).

La modificación del calcio citosólico como efecto del ATP, en presencia del ortovanadato, mostró diferencia significativa ( $p < 0.0001$  en todos los grupos) con respecto a la  $[Ca^{2+}]_i$  basal.

Cuando se comparó el aumento en  $[Ca^{2+}]_i$  como efecto del ATP, se observaron cambios menores a medida que aumentó la  $[Ca^{2+}]_e$  ( $p < 0.001$  entre 1.75 y 2.4 mM y  $p < 0.05$  entre 1.75 y 3 mM), no se encontró diferencia entre los grupos 2.4 y 3 mM (figura 16).

### **6.5 Comparación del efecto del 2,4 dimetilbenzamil y ortovanadato entre los grupos estudiados.**

No se observaron diferencias significativas entre los grupos de ambas series experimentales al comparar las cifras basales de  $[Ca^{2+}]_i$ , el efecto de la adición de 2,4 dimetilbenzamil y ortovanadato, ni al observar el aumento en  $[Ca^{2+}]_i$  como respuesta al ATP.

Se observó diferencia significativa entre el grupo 1.75mM DMB + ATP y los grupos 2.4 OV + ATP ( $p < 0.001$ ) y 3 OV + ATP ( $p < 0.05$ ).

### **6.6 Efecto de la ouabaina sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.**

La adición de ouabaina (concentración final 20  $\mu$ M) no produjo modificaciones significativas en la  $[Ca^{2+}]_i$  basal al compararse con las cifras basales de las series con  $[Ca^{2+}]_i$  2.4mM y  $[Na^+]_e$  140 mM. La respuesta a ATP estuvo conservada en presencia de ouabaina, sugiriendo que la participación de la ATPasa de  $Na^+/K^+$  no es significativa (figura 17). No se encontraron diferencias en la respuesta a ATP externo, cuando se compararon los grupos tratados con O-vanadato o con ouabaina.

### **6.7 Efecto de amilorida y la $[Na^+]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.**

Se realizaron 9 experimentos por cada modificación en la  $[Na^+]_e$  (130, 140 y 150 mM).

Los resultados de la determinación de  $[Ca^{2+}]_i$  basal en los grupos estudiados fueron los siguientes:

En el grupo con  $[Na^+]_e$  130 mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $90.8 \pm 22.9$  nM (58.6 – 129.4), En el grupo con  $[Na^+]_e$  140 mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $93.6 \pm 25.0$  nM (52.9 – 148.0), En el grupo con  $[Na^+]_e$  150 mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $93.2 \pm 8.0$  nM (82.2 – 105.1).

No se observó diferencia significativa en la  $[Ca^{2+}]_i$  basal entre los tres grupos, la adición de amilorida aumentó la  $[Ca^{2+}]_i$  en los tres grupos ( $p < 0.0004$  en el grupo 130 mM,  $p < 0.0001$  en los grupos 140 y 150 mM); las cifras de calcio citosólico una vez adicionada la amilorida no mostraron diferencia entre los grupos (figura 18).

Al administrar el ATP se observó aumento significativo en la  $[Ca^{2+}]_i$  con respecto a las cifras basales ( $p < 0.001$  en los grupos 130 y 140 mM y  $p < 0.01$  en el grupo 150 mM).

Se encontró que el aumento de calcio como efecto del ATP disminuye en forma significativa al aumentar la  $[Na^+]_e$  ( $p < 0.001$  entre el grupo 130 y los grupos 140 y 150 mM y  $p < 0.01$  entre los grupos 140 y 150 mM (figuras 19 y 20).

### **6.8 Efecto de Clortalidona y la $[Na^+]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.**

Se realizaron 10 experimentos para las series experimentales con  $[Na^+]_e$  130 y 150 mM y 9 para la serie con  $[Na^+]_e$  140mM.

Los resultados de la determinación de  $[Ca^{2+}]_i$  basal en los grupos estudiados fueron los siguientes:

En el grupo con  $[Na^+]_e$  130 mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $50.7 \pm 11.7$  nM (35.9 – 72.4), en el grupo con  $[Na^+]_e$  140 mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $69.3 \pm 8.2$  nM (59.4 – 81.4), en el grupo con  $[Na^+]_e$  150 mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $46.4 \pm 4.7$  nM (37.3 – 53.4).

Se encontró diferencia entre las cifras basales de los grupos estudiados ( $p < 0.001$  entre los grupos 130 - 140 y 140 - 150 mM). La adición de

clortalidona aumentó en forma significativa la  $[Ca^{2+}]_i$  con respecto a las cifras basales ( $p < 0.01$  entre los grupos 130 – 140 y  $p < 0.001$  entre los grupos 140 y 150 mM) (figura 21).

Al administrar el ATP se observó aumento significativo en la  $[Ca^{2+}]_i$  con respecto a las cifras basales ( $p < 0.001$  en los tres grupos). Se encontró que el aumento de calcio como efecto del ATP disminuye en forma significativa al aumentar la  $[Na^+]_e$  ( $p < 0.05$  entre los grupos 130 y 140 mM,  $p < 0.001$  entre los grupos 130 y 150 mM y 140 y 150 mM) (figuras 22 y 23).

### **6.9 Efecto de Triclorometiazida y la $[Na^+]_e$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.**

Los resultados de la determinación de  $[Ca^{2+}]_i$  basal en los grupos estudiados fueron los siguientes:

En el grupo con  $[Na^+]_e$  130 mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $51.2 \pm 5.2$  nM (44.1 – 56.5), en el grupo con  $[Na^+]_e$  140 mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $69.7 \pm 4.1$  nM (56.0 – 94.2), en el grupo con  $[Na^+]_e$  150 mM, la media de  $[Ca^{2+}]_i$  fue de  $53.0 \pm 10.01$  nM (34.9 – 62.0).

La adición de triclorometiazida aumentó los niveles basales de  $[Ca^{2+}]_i$  en forma significativa ( $p < 0.0001$  en los grupos 130 y 140 mM y  $p < 0.0002$  en el grupo 150 mM) (figura 24).

Al administrar el ATP se observó aumento significativo en la  $[Ca^{2+}]_i$  con respecto a las cifras basales ( $p < 0.0001$  en los tres grupos).

Se encontró que el aumento de calcio como efecto del ATP fue significativamente menor al aumentar la  $[Na^+]_e$  ( $p < 0.05$  entre los grupos 130 y 140, y  $p < 0.001$  entre los grupos 130 y 150 mM y 140 y 150 mM) (figuras 25 y 26).



#### **6.10 Comparación del efecto de amilorida, clortalidona y triclormetiazida entre los grupos estudiados.**

No se observaron diferencias significativas entre las cifras basales de  $[Ca^{2+}]_i$  de las tres series experimentales estudiadas, ni en el aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  al adicionar amilorida, clortalidona ó triclormetiazida. Se observaron diferencias en la liberación de calcio como efecto del ATP entre las series experimentales con  $[Na^+]_e$  130 mM ( $p < 0.001$ ), en tanto que no se encontró diferencia significativa entre las series con  $[Na^+]_e$  140 y 150 mM.

#### **6.11 Efecto de sacarosa y manitol sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.**

Dado que la concentración extracelular de sodio 150 mM, modificó significativamente la respuesta a ATP, se decidió explorar si este efecto era dependiente de cambios en la osmolaridad o de la mayor concentración de sodio, se probaron tanto sacarosa como manitol en condiciones de osmolaridad similar a la de las soluciones que contenían Na 150 mM, sin observarse diferencia entre éstas (manitol y sacarosa), en relación a la respuesta a ATP en el grupo con sodio 140 mM, por lo que se concluyó que este efecto era producto de la mayor concentración de sodio.

#### **6.12 Efecto del DMSO sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en monocitos U – 937.**

Debido a que el DMSO se empleó como vehículo para la administración de clortalidona y triclormetiazida, se evaluó su efecto sobre la  $[Ca^{2+}]_i$ , en las mismas condiciones de las series, sin encontrarse diferencia significativa.

## 7. DISCUSION

La homeostasis de la composición hidroelectrolítica del medio extracelular en los mamíferos depende fundamentalmente de dos órganos, el pulmón y el riñón. En el mediano y largo plazo depende fundamentalmente del funcionamiento renal. En condiciones fisiológicas las células sanguíneas se encuentran rodeadas por un líquido con una composición estable, lo cual les permite un funcionamiento adecuado. Sin embargo en diversas condiciones patológicas puede haber variaciones importantes en las concentraciones de los iones en suero, que tienen consecuencias adversas sobre los diversos tejidos que forman el organismo. Un ejemplo de esto son las variaciones del funcionamiento de la fibra cardíaca, cuando la concentración de potasio aumenta o disminuye, manifestándose esos cambios en alteraciones del trazo electrocardiográfico. En caso de alteraciones en la concentración de calcio, se presentan cambios en el ritmo cardíaco que pueden llevar a riesgos importantes en el funcionamiento cardíaco. Las células de mamífero cuentan con diversos mecanismos que permiten conservar la homeostasis de sus iones, aun en presencia de variaciones de éstos iones en el medio extracelular. Sin embargo cuando estos mecanismos de homeostasis son rebasados, puede haber alteraciones funcionales, como es el caso de las crisis convulsivas en situaciones de hipernatremia o hipocalcemia. Debe hacerse notar que los mecanismos que regulan las concentraciones intracelulares del sodio y del calcio son interdependientes, por lo que variaciones en uno de estos iones frecuentemente llevan a cambios en el otro.

Con el propósito de conocer las probables modificaciones que suceden en el  $[Ca^{2+}]_i$  cuando hay variaciones en la concentración de calcio o de sodio extracelulares, se utilizó una línea celular de monocitos humanos, ya que estas células habitualmente se encuentran en un medio de composición iónica estable, en contraste con las células epiteliales, que habitualmente se encuentran expuestas a medios con grandes variaciones en su composición iónica.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Se observó que dentro del rango de variación de la  $[Ca^{2+}]_i$ , considerado como normal en humanos, los monocitos no mostraron cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  basal, lo que sugiere que los mecanismos de regulación de este catión son suficientes para mantener su homeostasis en esas condiciones. Sin embargo si se reduce la  $[Ca^{2+}]_o$  por debajo de 1.2 mM, hay una disminución del calcio citosólico dependiente de la concentración externa (Figura 7). Debe señalarse que estas cifras de  $[Ca^{2+}]_o$  no suceden en el humano, sin ocasionar alteraciones severas en el funcionamiento de tejidos excitables, como las células nerviosas o cardiacas, o la muerte. En el caso de las células sanguíneas, como el monocito, estas variaciones no parecen requerir corrección por parte del médico.

Con respecto a las cifras basales de calcio citosólico determinadas en nuestro trabajo, son comparables con las reportadas por Buyn<sup>26</sup> ( $130 \pm 8.3$  nM) quien empleó el indicador Fura-2 y se encuentran dentro del promedio de las referidas por Floto<sup>32</sup> ( $64 \pm 58$ ) (indicador Fura-2) y Klein<sup>23</sup> ( $202 \pm 13$ ) (indicador Indo-1). Es importante resaltar que la estandarización en el manejo de la línea celular permitió disminuir las desviaciones que encontraron estos autores.

Se conoce que el ATP extracelular, puede activar el ingreso de calcio al citosol en varias estirpes celulares de mamífero<sup>33</sup>, por un mecanismo doble, entrada de calcio del medio extracelular y liberación de los depósitos en organelos intracelulares. Con el objeto de confirmar que la línea de monocitos U-937 manifestaba esta respuesta, se expusieron las células a este nucleótido. Como era de esperarse, la exposición de los monocitos al ATP incrementó el  $[Ca^{2+}]_i$ ,<sup>34</sup> lo cual permitió verificar su adecuado funcionamiento y utilizar este estímulo para evaluar los cambios en una respuesta fisiológica, en presencia de modificaciones del calcio o el sodio extracelulares. Cuando se modificó la  $[Ca^{2+}]_o$ , se encontró que la respuesta a ATP estaba relacionada directamente con calcio extracelular, siendo mayor al incrementar la  $[Ca^{2+}]_o$ , indicando que el incremento en calcio citosólico inducido por este nucleótido depende del calcio extracelular. Debe hacerse notar que la magnitud de la dependencia al calcio externo fue más notable en la respuesta al ATP que en el mantenimiento del calcio basal, lo cual sugiere que al aumentar el requerimiento celular de

calcio por el estímulo del nucleótido, se hace más evidente la dependencia del calcio externo, que cuando la célula se encuentra en reposo (Figura 10). Por otro lado, el ATP estimula las propiedades adhesivas en neutrófilos humanos, lo cual muestra su relevancia en la fisiología de las células sanguíneas<sup>35</sup>.

Las concentraciones de sodio intracelular modifican la  $[Ca^{2+}]_i$  basal, de forma que un aumento en el ingreso de sodio a la célula, activa el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ , estimulando la salida de sodio y permitiendo el ingreso de calcio, sin embargo, un exceso de sodio intracelular puede inactivar al intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ <sup>36</sup>. En nuestras series experimentales en las que se modificó la concentración de sodio en el medio de incubación, se observó que las concentraciones de 130 mM y de 150 mM, consideradas como límites fisiológicos de este catión se acompañaron de cifras de  $[Ca^{2+}]_i$  menores que la de 140, que se considera como normal en el humano. Sin embargo, a pesar de que estas variaciones alcanzaron a ser significativamente diferentes de sus valores en condiciones basales, no excedieron el rango normal de  $[Ca^{2+}]_i$ .

Las células de mamífero, incluido el humano, mantienen una concentración de calcio citosólico libre cercana a los 100 nM. Esta concentración es aproximadamente 10,000 veces menor que la sérica, lo cual muestra la eficiencia de los mecanismos que la regulan. Diversos estímulos fisiológicos aumentan la  $[Ca^{2+}]_i$  de los leucocitos, la cual rápidamente es llevada a su concentración basal por mecanismos como las proteínas intracelulares que unen al calcio, por su captura por organelos intracelulares como el retículo endoplásmico y las mitocondrias y por mecanismos de extrusión celular. De éstos, dos se encuentran en la mayoría de las células. El primero es el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  y el segundo es la ATPasa dependiente de calcio, la cual expulsa al calcio de la célula. El intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  fue inhibido por el 2, 4 dimetilbenzamil<sup>37</sup>. Cuando se probó la posible participación de este intercambiador en la  $[Ca^{2+}]_i$  basal y bajo estimulación con ATP se observó un aumento significativo del calcio citosólico basal, como era de esperarse, ya que se bloqueó uno de los mecanismos de expulsión de calcio. Sin embargo, en condiciones de estimulación del ingreso de calcio a la célula por el ATP, no hubo variaciones en el periodo de recuperación de las

concentraciones iniciales de este catión, asociadas a la concentración externa de calcio. De forma semejante, no hubo diferencias en la magnitud de la respuesta al nucleótido en los tres grupos (Figura 14). Estos datos sugieren que los mecanismos de regulación del calcio citosólico que no dependen de la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , fueron suficientes para llevar sus concentraciones a los valores previos a la estimulación por ATP.

Para estudiar la participación de la ATPasa dependiente de calcio sobre la regulación basal de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , se utilizó como inhibidor de esta enzima al O-vanadato de sodio<sup>38</sup>. En presencia de este inhibidor hubo aumento significativo de la concentración basal de calcio, que tuvo una magnitud semejante en los tres grupos estudiados. Este cambio fue similar a lo observado con el dimetilbenzamil, inhibidor del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . La inhibición inducida por O-vanadato ha mostrado ciertas diferencias dependientes de la célula involucrada. En células renales de rata, la inhibición se ha logrado con concentraciones de vanadato tres veces menores que en las células cardíacas<sup>39,40</sup>. Clough<sup>40</sup>, reportó que el sodio externo a concentraciones de 100 mM podía inhibir a la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa cardíaca y renal en ratas, en nuestro estudio la concentración mas alta de sodio (150 mM) inhibió la respuesta a ATP externo, sin embargo ni el ortovanadato, ni la ouabaina tuvieron este efecto, lo que sugiere que dicha inhibición no fue debida a un efecto sobre esta ATPasa. No se tiene información acerca de la sensibilidad del monocito humano al ortovanadato, sin embargo en eritrocitos humanos la  $K_{1/2}$  de inhibición fue 1.5  $\mu\text{M}$ <sup>38</sup>. En este estudio se utilizó una concentración de 3  $\mu\text{M}$ , con lo cual se esperaba un efecto inhibitorio adecuado. En linfocitos humanos, la incubación con ouabaina, en presencia de sodio externo bajo, aumentó el  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  basal<sup>41</sup>.

Como se señaló anteriormente, el aumento de sodio intracelular puede activar la salida de calcio. Se ha descrito que el vanadato a concentraciones elevadas, puede inhibir a la ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , por lo que se decidió utilizar a la ouabaina, un inhibidor de esta enzima, para comparar sus efectos con los observados en presencia del O-vanadato. La ouabaina no alteró significativamente la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  basal, ni la respuesta al ATP. Estos datos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

sugieren que esta enzima no participa de manera relevante en la respuesta al nucleótido en los monocitos<sup>41</sup>.

Dado que hay una relación estrecha en la regulación del calcio y del sodio intracelulares, se estudió el efecto de inhibir el ingreso de sodio a la célula, por bloqueo de tres de los principales mecanismos para este flujo de entrada. Con este propósito se utilizaron a la amilorida, que bloquea a los canales de sodio y al intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y a dos inhibidores del cotransportador  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ , que fueron la clortalidona y la triclometiazida. Estos inhibidores se probaron en presencia de 130, 140 y 150 mM de sodio externo, considerados como el rango de normalidad de concentraciones extracelulares de este catión. La  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aumentó en presencia de estos inhibidores y este incremento fue similar para cada una de las concentraciones de sodio externo y para cada uno de los inhibidores, indicando la interrelación del sodio y el calcio intracelulares, ya que el bloqueo del ingreso de uno (sodio), incrementó la concentración interna del otro (calcio), independiente del inhibidor utilizado. En contraste, hubo diferencias en la respuesta a ATP para los dos tipos de inhibidores. En el caso de la amilorida se observó una relación inversa entre la concentración de sodio externo y la magnitud de la respuesta al nucleótido, de manera que a la concentración de 150 mM, esta respuesta fue prácticamente nula. A diferencia de lo observado en presencia de amilorida, cuando se inhibió el intercambiador  $\text{Na}/\text{Cl}$  con tiazidas, no hubo diferencias en la respuesta a ATP en presencia de 130 y de 140 mM de sodio externo y la respuesta estuvo significativamente disminuida. Esta diferencia en la respuesta a concentraciones de 130 y 140 mM pudiera relacionarse con el efecto que tienen las tiazidas de aumentar la absorción de calcio y de disminuir el flujo de entrada del sodio a la célula<sup>9</sup>.

La presencia de concentraciones de sodio extracelular en el límite superior (150 mM) inhibió el incremento en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por ATP, lo cual sugiere que en el flujo de ingreso de calcio a la célula, influye de manera relevante la concentración externa de sodio. Este efecto es específico de este catión y no parece estar relacionado con el aumento en osmolaridad de los medios de incubación, debido a la alta concentración de sodio, ya que esa inhibición no se

presentó cuando los monocitos fueron estimulados con ATP en presencia de sodio normal externo y de osmolaridades altas obtenidas por la adición de sacarosa o de manitol.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 8. SUMARIO.

- 1) En presencia de concentraciones de calcio extracelular en los límites superior e inferior, así como en cifras normales, la línea celular U-937 de monocitos humanos mantiene valores semejantes de  $[Ca^{2+}]_i$ , los cuales se encuentran dentro del rango normal, lo cual sugiere que los mecanismos responsables de la homeostasis celular de calcio funcionan adecuadamente en esas concentraciones. A concentraciones menores de 1.6 mM de  $[Ca^{2+}]_o$ , hubo disminución de  $[Ca^{2+}]_i$ , lo cual sugiere que en estas condiciones los mecanismos de regulación celular de este catión fueron rebasados.
- 2) La respuesta a ATP fue dependiente de la  $[Ca^{2+}]_o$ , de manera que a mayor concentración, la magnitud de la respuesta fue mayor, confirmando que el ATP incrementa la  $[Ca^{2+}]_i$  principalmente por ingreso a la célula de calcio extracelular, con participación menor de los depósitos intracelulares.
- 3) La concentración basal de calcio citosólico aumentó, de manera semejante, en presencia de dimetilbenzamil, inhibidor del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  o del O-vanadato, inhibidor de la ATPasa de Ca, sugiriendo una participación semejante de ambos mecanismos en la regulación de la  $[Ca^{2+}]_i$  en el monocito. La respuesta a ATP en presencia de estos dos inhibidores mostró que dicho efecto, en presencia de dimetilbenzamil, fue similar en presencia de concentraciones variables de  $[Ca^{2+}]_o$ , en tanto que dicha respuesta fue menor con las concentraciones más altas de calcio extracelular, cuando se aplicó el estímulo con ATP, en presencia de O-vanadato.
- 4) En contraste con los cambios discretos en la respuesta a ATP cuando se probó su efecto variando el calcio extracelular, las variaciones en el ingreso de sodio a la célula se acompañaron de una respuesta mínima a este nucleótido, en presencia de la concentración más alta de sodio (150 mM). Estos datos sugieren que hay una interdependencia entre el ingreso de calcio inducido por el ATP y las concentraciones altas de sodio en el líquido extracelular.
- 5) El efecto inhibitorio en la respuesta al ATP, observado en presencia de altas concentraciones de sodio extracelular, no parece ser dependiente de el

aumento en osmolaridad, ya que la exposición a soluciones de sacarosa o manitol con osmolaridades iguales, no bloqueó la respuesta a ATP, sugiriendo que el efecto es específico del sodio y no está asociado a hiperosmolaridad.

- 6) La concentración basal de  $[Ca^{2+}]_i$  presenta variaciones dentro de una misma línea celular, las cuales obligan a estudiar el efecto de los diferentes estímulos en alícuotas de la misma población para disminuir la variabilidad de los resultados.

## 9. SUMMARY.

1. We studied the dependency of cytosolic free-calcium concentrations ( $[Ca^{2+}]_i$ ), on the presence of varying concentrations of this cation in the incubation media of cultured human monocytes (line U-937). Between 1.75 and 3.0 mM of external calcium there were no variations in  $[Ca^{2+}]_i$ . Below 1.6 mM, there was a decrement in  $[Ca^{2+}]_i$ , that was concentration dependent, suggesting that the cell homeostatic mechanisms were not sufficient to maintain cytosolic concentrations within physiological concentrations.
2. The increment in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by extracellular ATP was directly dependent on external calcium, in the range 1.75 to 3.0 mM.
3. Basal  $[Ca^{2+}]_i$  increased in the presence of dimethylbenzarnyl (inhibitor of Ca/Na exchanger) or of O-vanadate, suggesting that the mechanisms involved in calcium extrusion participate in the cell homeostasis of this cation, in this cell line of monocytes.
4. Variations in the concentration of external sodium showed an inverse relationship with the response to ATP. The highest concentration (150 mM) was related to a minimal response to this nucleotide.
5. The inhibition of the response to ATP by high external sodium was not related to the increment in osmolarity, since the response to this nucleotide was preserved in the presence of solutions of sucrose or mannitol with a similar osmolarity to that of 150 mM of sodium chloride, suggesting that the effect was due to sodium and not to increased osmolarity.
6. Cytosolic calcium under basal conditions showed some variations. This characteristic makes advisable to perform the studies with a control group to evaluate the responses under the different experimental conditions.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **10. PERSPECTIVAS.**

En las condiciones experimentales utilizadas se encontró que el monocito regula adecuadamente sus concentraciones basales de calcio citosólico y la respuesta a un estímulo fisiológico como el ATP, cuando el calcio externo varía en el rango considerado normal. Fue muy notable que el aumento en la concentración de sodio extracelular disminuyera la respuesta a este nucleótido, lo cual conduce a especular que en condiciones de hipernatremia, las funciones del monocito pudieran verse alteradas, por lo que aspectos tan relevantes como el efecto de estos cambios sobre la fagocitosis deberían tomarse en cuenta para la realización de estudios posteriores.

## 11. REFERENCIAS.

1. Clapham DE. Calcium signaling.  
Cell 1995; 80: 259 – 683.
2. Greer FR. Disorders in calcium homeostasis. en : Spitzer AR editor.  
Intensive care of the fetus and neonate St. Louis; 1996: 993 – 1012.
3. Tsien RW. Calcium, channels, stores, and oscillations  
Annu Rev Cell Biol 1990; 6: 715 – 60.
4. Carafoli E. Calcium pump of the plasma membrane.  
Physiol Rev 1991; 71: 129 – 53.
5. Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J. Molecular and cellular  
physiology of intracellular calcium stores.  
Physiol Rev 1994; 74: 595 – 636
6. Donnadieu E, Trautmann A.  
Is there a Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in macrophages and in lymphocytes ?  
Eur J Physiol 1993; 424: 448 – 55.
7. Kleyman TR, Cragoe EJ.  
Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport.  
J Membrane Biol 1988; 89: 1 – 21.
8. Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J.  
Molecular physiology of vertebrate Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers.  
Physiol Rev 1997; 77: 51 – 74.
9. Jackson EK. Chapter 29 Diuretics. En: Hardman JG, Limbird LE es.  
Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics 9<sup>th</sup> ed.  
New York: Mc Graw-Hill , 1996
10. Kaczorowski GJ, Slaughter RS, King VF, Garcia ML. Inhibitors of sodium-  
calcium exchange: identification and development of probes of transport  
activity. Biochim et Biophys Acta 1989; 988: 287 - 302
11. Carafoli E. The Ca<sup>2+</sup> pump of the plasma membrane.  
J Biol Chem 1992; 267: 2115 – 8.
12. Rodriguez MG, Reyes JL. Induction of alkalization in cultured renal cells  
(MDCK line) by prostaglandin E<sub>2</sub>.  
Prostaglandins 1995; 49: 79 – 91.

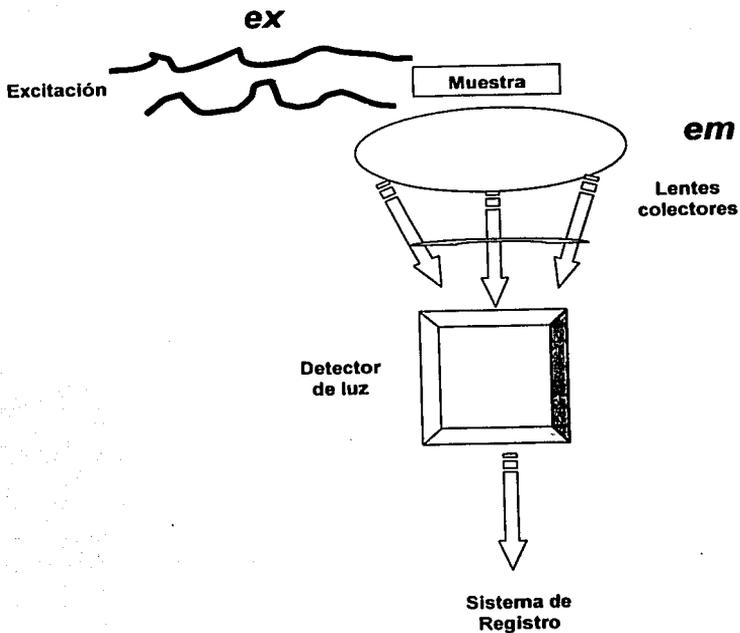
13. Kaczorowski GJ, Slaughter RS, King VF, Garcia ML. Inhibitors of sodium-calcium exchange identification and development of probes of transport activity. *Biochem et Biophys Acta* 1989; 988: 287 –302.
14. Kraut RP, Greenberg AH, Cragoe EJ, Bose R. Pyrazine compounds and the measurement of cytosolic Ca<sup>2+</sup>. *Anal Biochem* 1993; 214: 413 – 9.
15. Bachmann S, Velázquez H, Obermüller N, Reilly RF, Moser D, Ellison DH. Expression of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter by rabbit distal convoluted tubule cells. *J Clin Invest* 1995; 96: 2510 – 4.
16. Lakowicz JR ed. Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum Press. New York 1986
17. Thomas AP, Delaville F. The use of fluorescent indicators for measurement of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells. En: McCormack JG, Cobbold PH, editores. Cellular calcium. Great Britain, 1991: 1 – 54.
18. Slavik J. Fluorescent probes. En: Cellular and molecular biology. CRC Press. Florida, 1994 pp 1 – 12 .
19. Kao, JP. Practical aspects of measuring [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> with fluorescent indicators. In: Nuccitelli R. Ed. A practical guide to the study of calcium in living cells. Academic Press, 1994 pp 155 – 80.
20. Douglas SD, Ho W. Morphology of monocytes and macrophages en: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ. Eds. Williams Hematology 5<sup>th</sup> Ed. Mc Graw Hill. New York 1995: 861 – 68.
21. Yoder MC, Douglas SD. Mononuclear phagocyte system . in: Polin RA, Fox WW,. Fetal and neonatal physiology 2<sup>nd</sup> Ed. Volume 2. WB Saunders Co. Philadelphia; 1998. P 1931 – 54.
22. Minta JO, Pambrun L. In vitro induction of cytologic and functional differentiation of the immature human monocyte-like cell line U-937 with phorbol myristate acetate. *Am J Pathol* 1985; 119: 111 – 26.
23. Klein JB, McLeish KR, Sonnenfeld G, Dean WL.

Potential mechanisms of cytosolic calcium modulation in interferon- $\gamma$  treated U-937 cells.

Biochem Biophys Res Commun 1987; 145: 1295 – 1301.

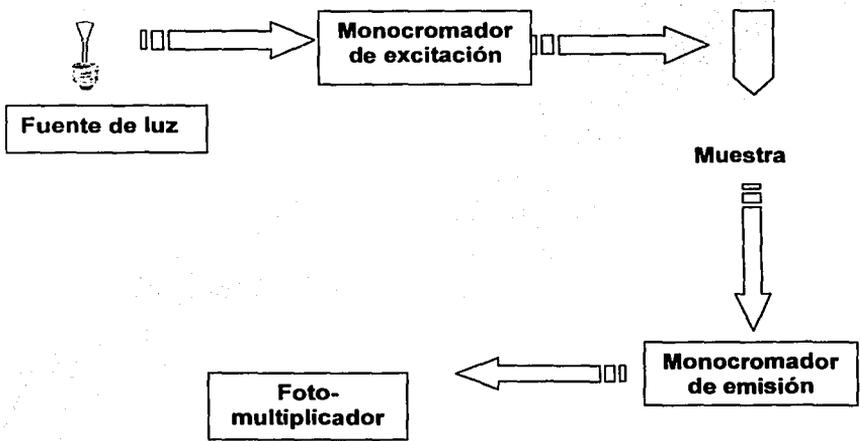
24. Davis W, Halliwell EI, Sage SO, Allen JM.  
Increased capacity for store regulated calcium influx in U-937 cells differentiated by treatment with dibutiryl cAMP.  
Cell Calcium 1995; 17: 345 – 53.
25. Davis W, Sage SO, Allen JM.  
Cytosolic calcium elevation in response to Fc receptor cross-linking in undifferentiated and differentiated U-937 cells.  
Cell Calcium 1994; 16: 29 – 36.
26. Buyn T, Dudeja P, Harris JA, Ou D, Seed T, Sawlani D, Meng J, Bonomi P, Anderson KM. A 5 lipoxigenase inhibitor at micromolar concentration raises intracellular calcium in U-937 cells prior to their physiologic cell death.  
Prostaglandins-Leukot-Essent-Fatty-Acids 1997; 56: 69 - 77
27. Champigneulle A, Siga E, Vassent G, Imbert-Teboul M. Relationship between extra and intracellular calcium in distal segments of the renal tubule. Role of the  $Ca^{2+}$  receptor RaKCaR.  
J Memb Biol 1997; 156: 117 – 29.
28. Palmer DF, Cavallaro JJ, Walsh EJ, Gordon DS, McDougal JS, Spira T, Martin IS, Hubbard MR. Quantitation and functional assay of T and B Cells. U. S. Department of health, education and welfare. Center for Disease control, Bureau of laboratories. Atlanta, Georgia; 1978: 65 – 7.
29. Miller PJ, Stevenson HC. Suspension culture of human monocytes.  
Methods in Enzymology 1986; 132: 243 – 50.
30. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties.  
J Biol Chem 1985; 260: 3440 – 50.
31. Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Newman TB, Hearst N.  
Diseño de la investigación clínica. Un enfoque epidemiológico.  
Barcelona: Doyma S.A. ; 1993: 153 – 165.
32. Floto RA, Mahaut-Smith MP, Allen JM, Somasundaram. Differentiation of

- the human monocytic cell line U937 results in an upregulation of the calcium release-activated current,  $I_{CRAC}$ . *J Physiol* 1996; 495.2: 331- 8
33. Cejka JC, Bidet M, Tauc M, Poujeol P. Nucleotides mobilize intracellular calcium stores of renal proximal cells in primary culture: existence of a suramin sensitive mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1176: 7 - 12.
34. Ventura MA, Thomopoulos P. ADP and ATP activate distinct signaling pathways in human promonocytic U-937 cells differentiated with 1,25-dihydroxy-vitamin  $D_3$ . *Molecular Pharmacology* 1995; 47: 104 - 14
35. Freyer DR, Boxer LA, Axtell RA, Todd RF. Stimulation of human neutrophil adhesive properties by adenine nucleotides. *J Immunol* 1988; 141: 580 - 6.
36. Philipson KD, Nicoll DA. Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annu Rev Physiol* 2000; 62: 111 - 3.
37. Matainaho EJ, Cragoe Jr. SW, Manley GJ, Huxham JV. Inhibitory effects of amiloride and its analogues on prostaglandin  $E_2$ -stimulated fluid transport by cultured porcine thyroid cells: evidence for apical membrane  $Na^+$  channels. *J. Endocrinol* 123: 93 - 7
38. Bond GH, Hudgins PM. Inhibition of red cell  $Ca^{2+}$ -ATPase by vanadate. *Biochim Biophys Acta* 1980; 600: 781-790
39. Clough DL. Greater sensitivity to vanadate of rat renal relative to cardiac  $(Na^+ + K^+) - ATPase$ . *Life Sci* 1984; 35: 1937-1946.
40. Clough DL. Inhibition of rat cardiac and renal  $Na^+, K^+$  ATPase by high sodium concentrations and vanadate. *Life Sci.* 1985; 37: 799 - 807.
41. Balasubramanyam M, Rohowsky-Kochan C, Reeves JP, Gardner JP.  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange mediated calcium entry in human lymphocytes. *J Clin Invest* 1994; 94: 2002 - 8.



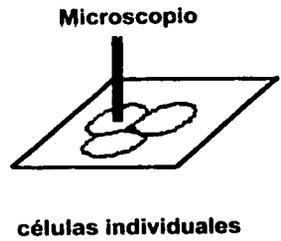
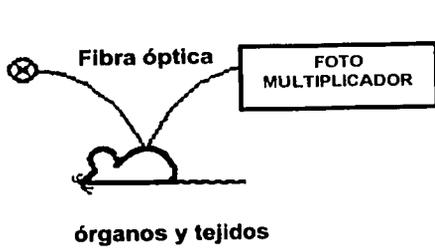
**Figura 1. Esquema simplificado del proceso de medición de la fluorescencia.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 2. Esquema básico de un espectrofluorómetro estándar.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 3. Procedimientos para medir fluorescencia en células vivas.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 4. Microfotografía de monocitos línea celular U – 937 en cultivo en microscopía de contraste de fases.**

**Aumento 10x**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 5. Monocitos Línea celular U – 937**

Panel A. Se muestra una microfotografía de los monocitos en cultivo, en microscopía de contraste de fases.

Panel B. Se ilustra el mismo campo que en el panel A, con imagen de fluorescencia de los monocitos cargados con Fura2 AM (5  $\mu$ M).

Aumento 40x

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 6. Monocitos Línea celular U – 937**

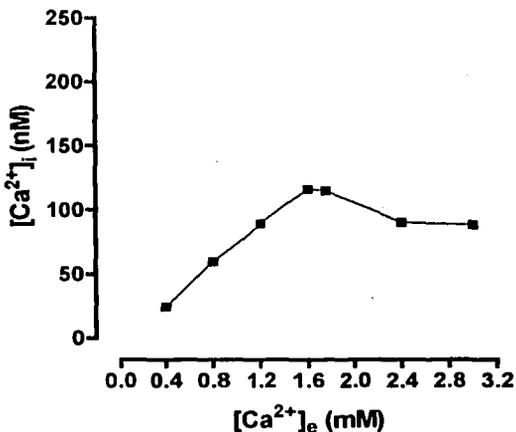
Panel A. Se muestra una microfotografía de los monocitos en cultivo, en microscopía de contraste de fases.

Panel B. Se ilustra el mismo campo que en el panel A, con Imagen de fluorescencia de los monocitos cargados Con Fura2 AM (5  $\mu$ M).

Aumento 100x

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

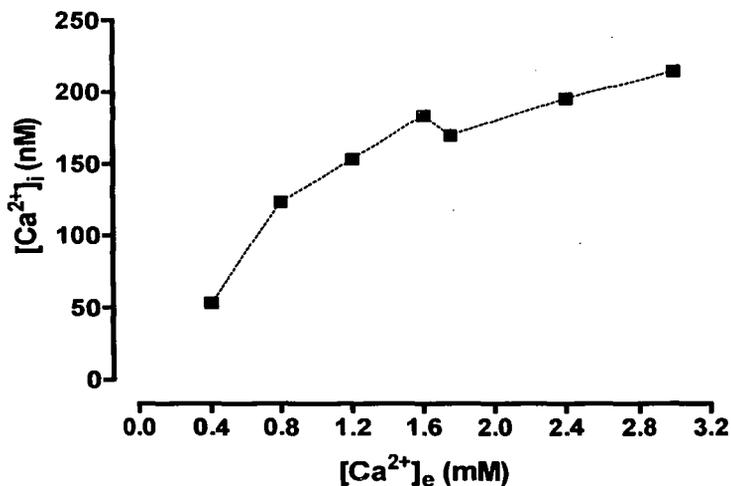
**Efecto de la  $[Ca^{2+}]_e$  sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  en monocitos U-937**



**Figura 7. Efecto de la concentración de calcio extracelular sobre el calcio citosólico en monocitos U-937.** Se realizó medición de calcio citosólico a diferentes concentraciones de calcio extracelular. Cada punto representa la media de mediciones realizadas por duplicado.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

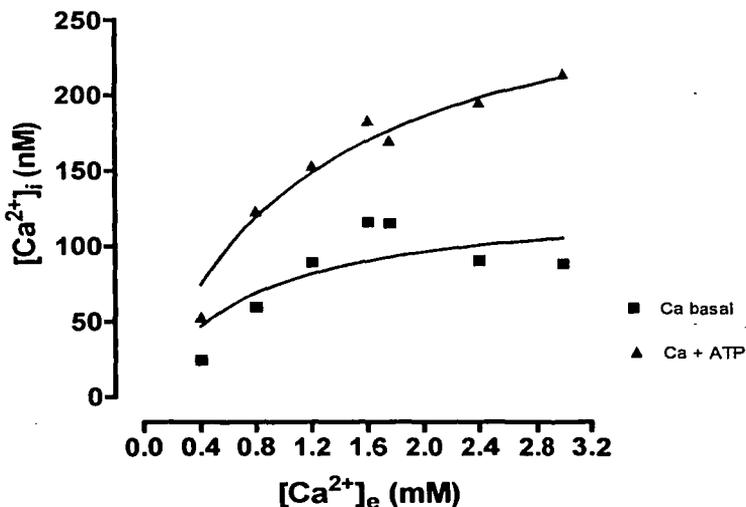
**Efecto de la  $[Ca^{2+}]_e$  sobre la respuesta a ATP  
en monocitos U - 937.**



**Figura 8. Efecto de la concentración de calcio externo sobre la respuesta a ATP en monocitos U-937.** Se adicionaron 2  $\mu$ l de ATP 50  $\mu$ M para evaluar su efecto sobre el calcio citosólico. Cada punto representa la media de mediciones realizadas por duplicado.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

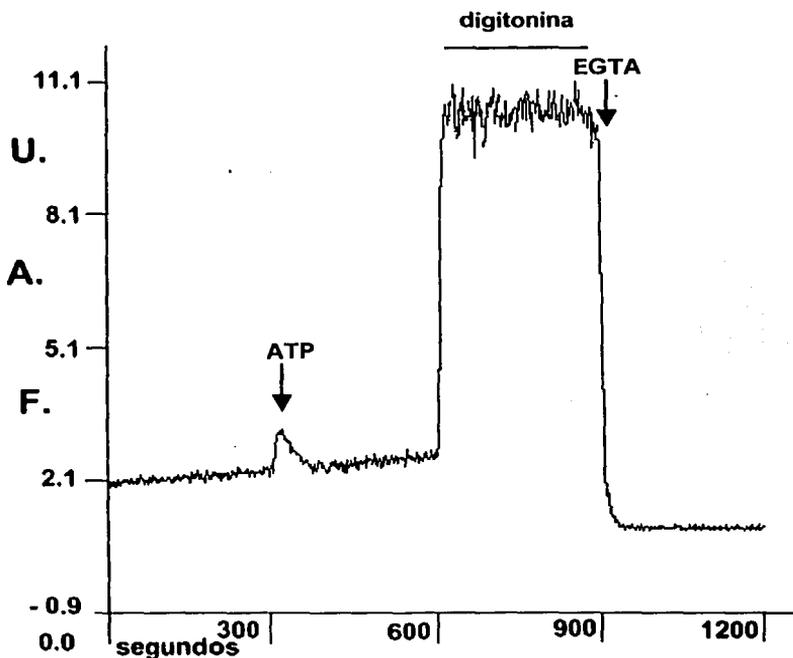
**Análisis de la relación entre calcio externo y calcio citosólico basal y bajo estimulación con ATP.**



**Figura 9. Análisis de la relación entre calcio externo y calcio citosólico basal y bajo estimulación con ATP.** Se incubaron los monocitos U-937, en presencia de medio con una concentración variable de calcio. Las concentraciones fueron ajustadas por medio de cantidades variables de EGTA, de acuerdo a un programa de computación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Respuesta a ATP y calibración en monocitos humanos,  
con  $[Ca^{2+}]_i$  2.4mM y  $[Na^+]_i$  140 mM**



**Figura 10. Respuesta a ATP y calibración en monocitos humanos, con  $[Ca^{2+}]_i$  2.4mM y  $[Na^+]_i$  140 mM. Registro fluorométrico de la señal (basal y en presencia de ATP (50  $\mu$ M) en monocitos U - 937 cargados con Fura-2AM (5  $\mu$ M). U.A.F. Unidades arbitrarias de fluorescencia (cociente de la fluorescencia medida a 340 y 380 nm)**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Variación en la  $[Ca^{2+}]_i$  a diferentes  $[Ca^{2+}]_e$   
en monocitos U-937

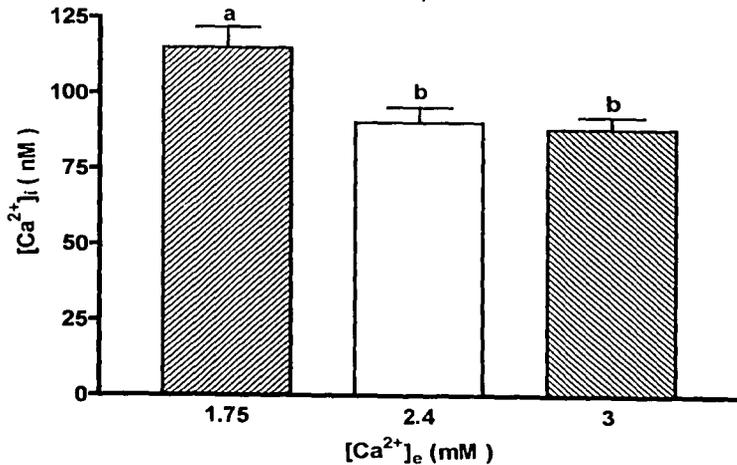
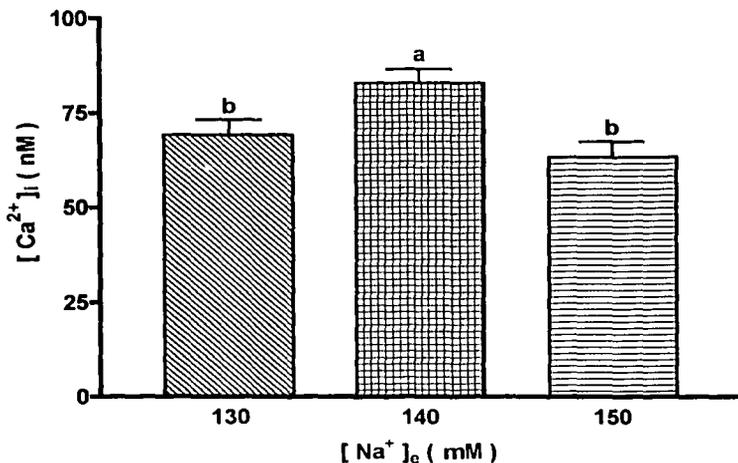


Figura 11. Variación en la  $[Ca^{2+}]_i$  a diferentes  $[Ca^{2+}]_e$  en monocitos U-937. Literales diferentes señalan diferencias significativas entre los grupos. Se muestra media  $\pm$  D.S. (n = 24)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

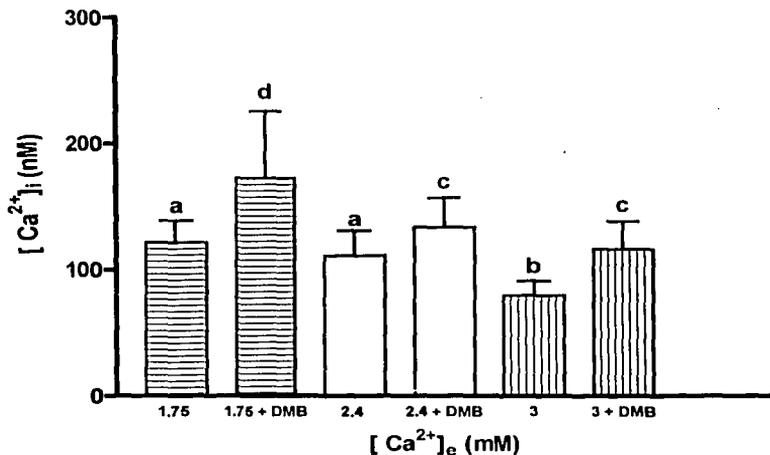
**Efecto de las variaciones en la concentración del sodio extracelular sobre el  $[Ca^{2+}]_i$  basal en monocitos U - 937 con  $[Ca^{2+}]_e$  2.4 mM**



**Figura 12 . Efecto de las variaciones en la concentración del sodio extracelular sobre el  $[Ca^{2+}]_i$  basal en monocitos U - 937 con  $[Ca^{2+}]_e$  2.4 mM.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

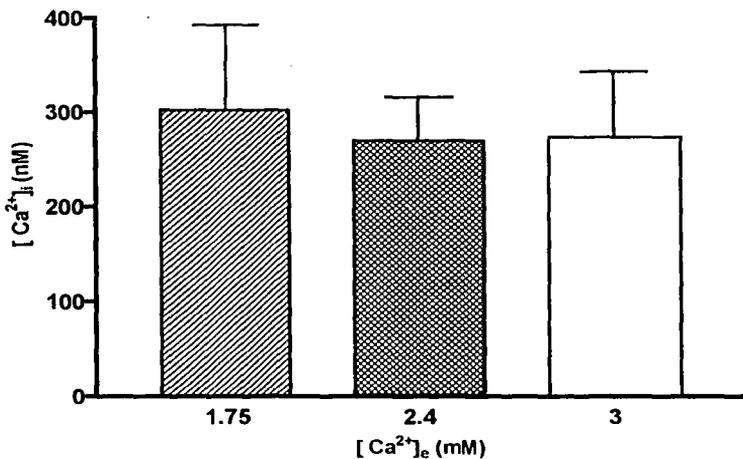
**Efecto del 2,4 dimetilbenzamil y las variaciones  
en la  $[Ca^{2+}]_e$  sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  en monocitos U - 937.**



**Figura 13 . Efecto del 2,4 dimetilbenzamil y la  $[Ca^{2+}]_e$  sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  basal en monocitos U - 937.**  
Las literales a y b señalan diferencias entre las concentraciones basales de calcio; las literales c y d señalan diferencias entre el valor inicial y la adición de dimetilbenzamil 10 $\mu$ M.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

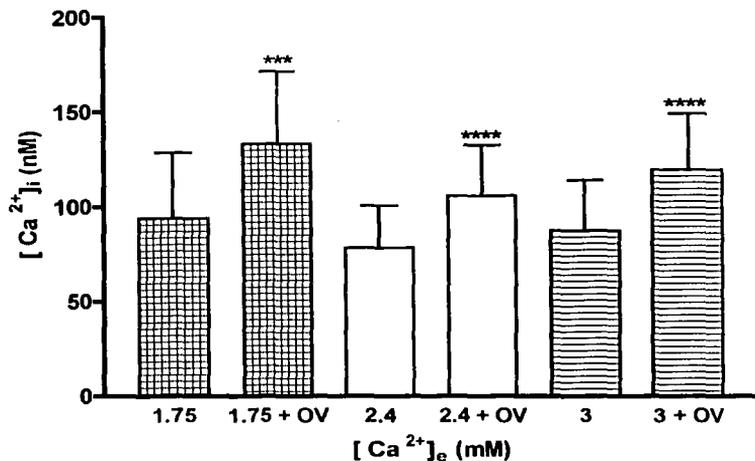
**Efecto de las variaciones en la  $[Ca^{2+}]_e$  sobre la respuesta a ATP en monocitos adicionados con 2, 4 dimetilbenzamil**



**Figura 14. Efecto de las variaciones en la  $[Ca^{2+}]_e$  sobre la respuesta a ATP en monocitos adicionados con 2, 4 dimetilbenzamil.** Se observa que a pesar de existir diferencias significativas en las concentraciones basales de  $[Ca^{2+}]_i$ , la respuesta a ATP no cambi6.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Efecto del o-vanadato de sodio y las variaciones en la  $[Ca^{2+}]_e$  sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  en monocitos U - 937.**

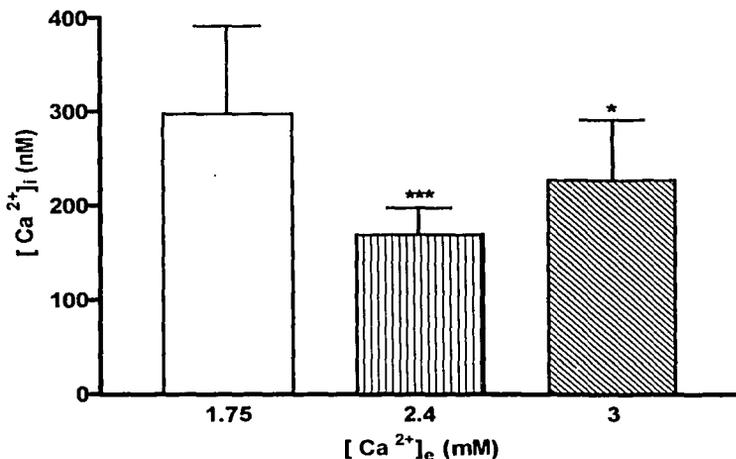


**Figura 15. Efecto del o-vanadato de sodio y las variaciones en la  $[Ca^{2+}]_e$  sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  en monocitos U - 937.**  
 La presencia del o-vanadato, inhibidor de la ATPasa dependiente de  $Ca^{++}$ , aumentó la concentración basal de  $[Ca^{2+}]_i$ .

\*\*\*  $p < 0.001$   
 \*\*\*\*  $p < 0.0001$

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

**Efecto de las variaciones en  $[Ca^{2+}]_e$  sobre la respuesta a ATP en monocitos U – 937 adicionados con ortovanadato de sodio**



**Figura 16. Efecto de las variaciones en  $[Ca^{2+}]_e$  sobre la respuesta a ATP en monocitos U – 937 adicionados con ortovanadato de sodio. Se aprecian cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  como respuesta al ATP, en relación a la concentración de calcio externo (\*  $p < 0.05$  y \*\*\*  $p < 0.001$ ) en comparación con el valor en presencia de de 1.75 mM de calcio externo.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Efecto de la ouabaina sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  en monocitos U- 937

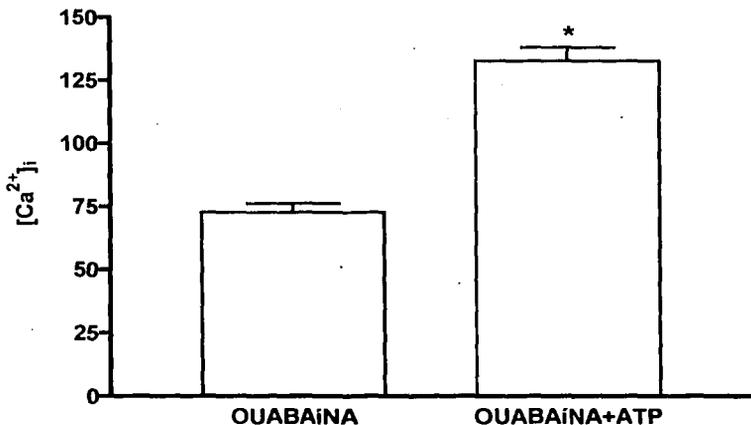


Figura 17. Efecto de la ouabaina sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  en monocitos U- 937. Se incubaron los monocitos en presencia de Fura2 AM (5  $\mu$ M), ácido plurónico (0.01 %) y ouabaina (20  $\mu$ M) durante 30 minutos; posteriormente se mide la fluorescencia basal y a continuación se agrega ATP (50  $\mu$ M)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Efecto de la amilorida y las variaciones  
en la  $[Na^+]_e$  sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  en monocitos U - 937

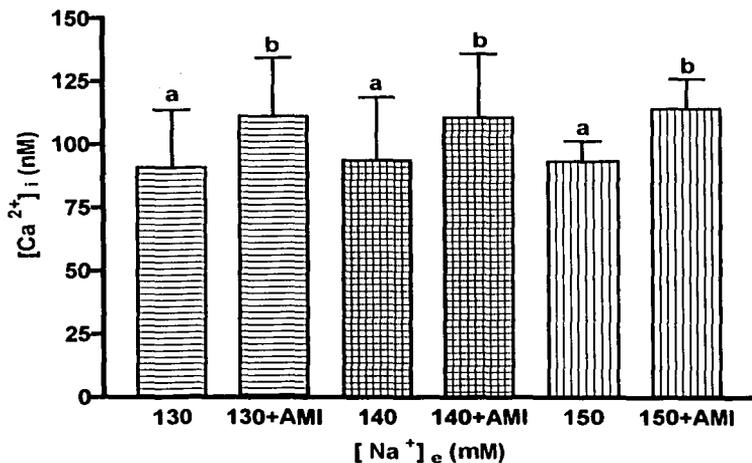
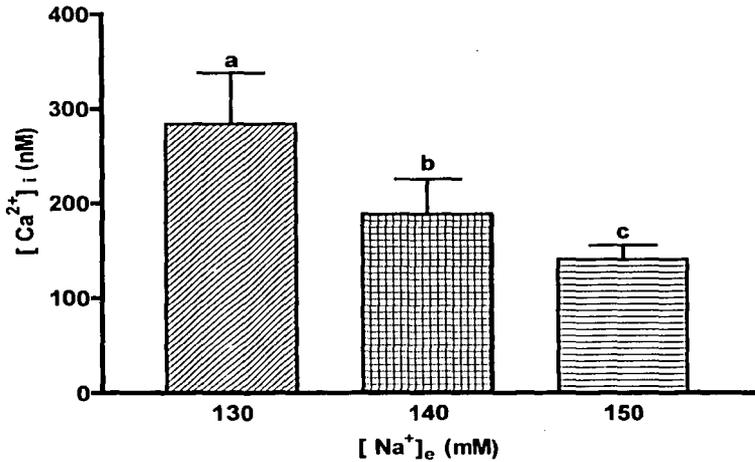


Figura 18. Efecto de la amilorida y las variaciones en la  $[Na^+]_e$  sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  en monocitos U - 937.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SE HA

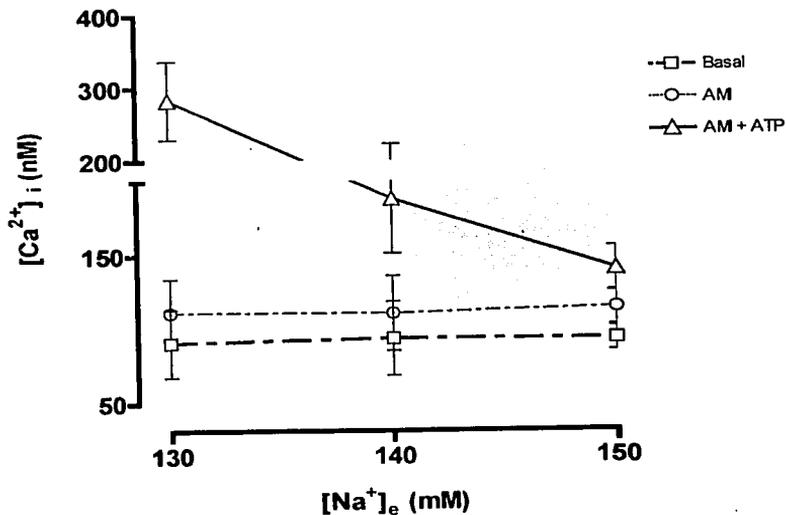
**Efecto de la  $[Na^+]_e$  sobre la respuesta a ATP en monocitos U - 937 adicionados con amilorida**



**Figura 19. Efecto de la  $[Na^+]_e$  sobre la respuesta a ATP en monocitos U - 937 adicionados con amilorida.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

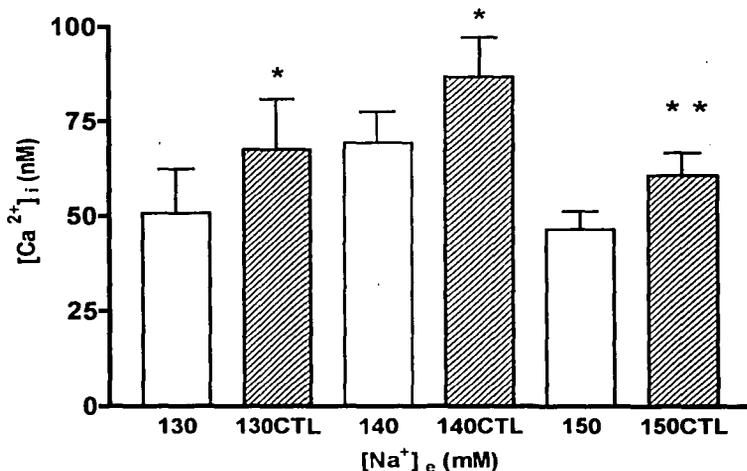
**Efecto del sodio externo sobre la respuesta a ATP,  
en presencia de amilorida.**



**Figura 20. Efecto del sodio externo sobre la respuesta a ATP.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

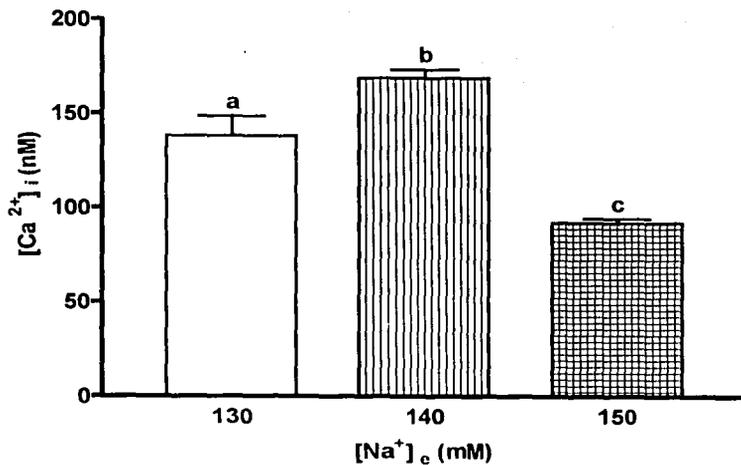
**Efecto de la clortalidona y las variaciones en la  $[Na^+]_e$  sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  en monocitos U - 937**



**Figura 21. Efecto de la clortalidona y las variaciones en la  $[Na^+]_e$  sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  en monocitos U - 937.** Se midió la fluorescencia basal (barras claras). Se agregó clortalidona 100  $\mu$ M y se midió el cambio en fluorescencia (barras sombreadas).  
 \*  $p < 0.05$ , comparado con su propio valor basal;  
 \*\*  $p < 0.01$  comparado con su propio valor basal.  
 Se representan media  $\pm$  desviación estándar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

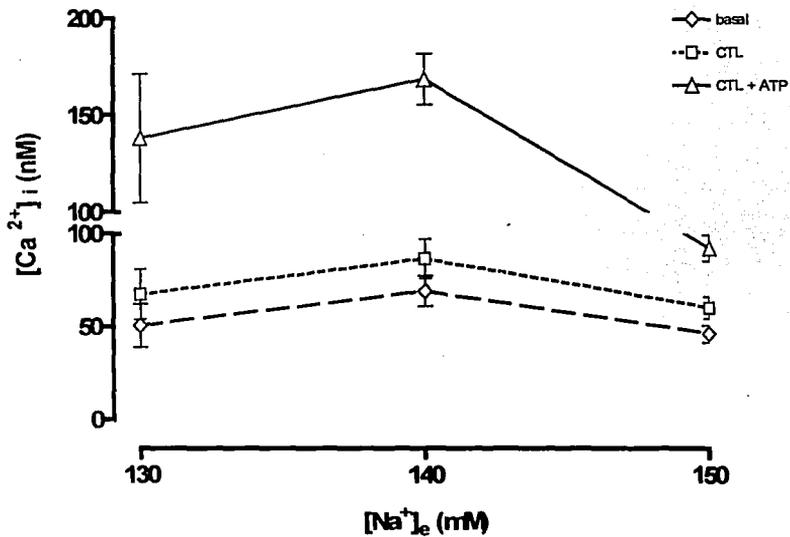
**Efecto de la  $[Na^+]_e$  sobre la respuesta a ATP en monocitos U - 937 adicionados con clortalidona**



**Figura 22. Efecto de la  $[Na^+]_e$  sobre la respuesta a ATP en monocitos U - 937 adicionados con clortalidona**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

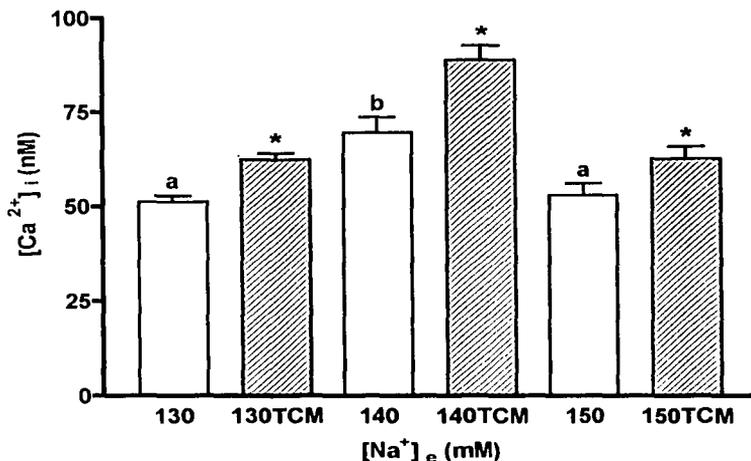
**Efecto del sodio externo sobre la respuesta a ATP  
en monocitos humanos en presencia de clortalidona.**



**Figura 23. Efecto del sodio externo sobre la respuesta a ATP  
en monocitos humanos en presencia de clortalidona.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Efecto de la triclorometiazida y las variaciones en la  $[Na^+]_e$  sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  en monocitos U - 937**



**Figura 24. Efecto de la triclorometiazida y las variaciones en la  $[Na^+]_e$  sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  en monocitos U - 937**

Se midió la fluorescencia basal (barras claras). Se agregó triclorometiazida 100  $\mu$ M y se midió el cambio en fluorescencia (barras sombreadas). Las literales diferentes señalan diferencia entre las cifras basales ( $p < 0.006$ ).

\*  $p < 0.0001$  comparado con su propio valor basal. Se representan media  $\pm$  desviación estándar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Efecto de la  $[Na^+]_e$  sobre la respuesta a ATP en monocitos U - 937 en presencia de triclorometiazida.

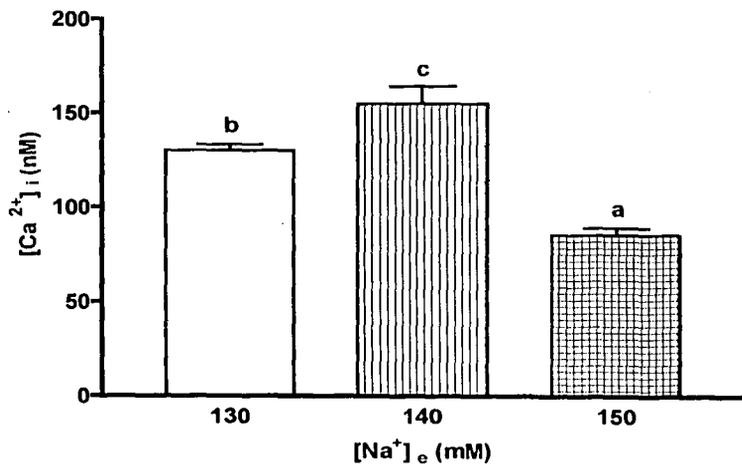
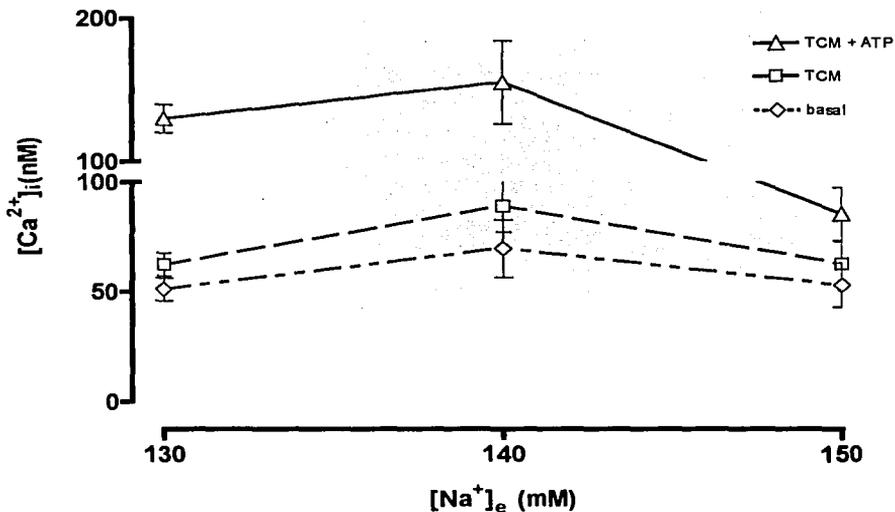


Figura 25. Efecto de la  $[Na^+]_e$  sobre la respuesta a ATP en monocitos U - 937 en presencia de triclorometiazida.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Efecto del sodio externo sobre la respuesta a ATP  
en monocitos U-937 en presencia de triclorometiazida.**



**Figura 26. Efecto del sodio externo sobre la respuesta a ATP  
en monocitos U-937 en presencia de triclorometiazida.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**" El estudio de la naturaleza os enseñará como ha llenado Dios de cosas maravillosas este mundo, para que lo podáis gozar. Estad satisfechos con lo que os haya tocado y sacad de ello el mejor partido posible. Ved siempre el lado bueno de las cosas y no el malo. Tratad de dejar este mundo en mejores condiciones de cómo lo encontrasteis; de esta manera, cuando os llegue la hora de morir, podréis hacerlo felices, porque, por lo menos, no perdisteis el tiempo e hicisteis cuanto os fue posible por hacer el bien".**

**B. P.**