



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

CARACTERIZACION DE LA CORRIENTE INDUCIDA POR MAITOTOXINA EN FIBROBLASTOS DE PIEL DE HUMANO

288764

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE: LICENCIADO EN: INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA PRESENTA: JUAN RAMON MARTINEZ FRANCOIS

ASESOR DE TESIS: DR. LUIS VACA



BIOMEDICAS

MEXICO, D.F.

2001



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Vaca por todo lo que me ha enseñado, su amistad y, sobre todo, por su enorme y constante apoyo que han sido muy valiosos en mi formación.

A los tutores que han contribuido en mi formación de manera muy importante: Dr. Miguel A. Morales, Dra. Julieta Rubio y a la Dra. Ma. Teresa Tusié.

A Verónica Morales por toda su ayuda en la realización de esta tesis y por su gran amistad.

A Cristina por hacer mi vida más feliz.

A mis compañeros y amigos que siempre me han apoyado y han hecho de esta experiencia algo inolvidable: Alejandro Verdín, Cei, Ivan, Lenin, Oscar, Alex, Paula, Roberto, Ileana, Miguel, Héctor, Mariana, Adriana, Luis y Erick.

A Alicia Sampieri por su experta asistencia técnica.

A mis compañeros de laboratorio por toda su ayuda: Claudia Sánchez, Gloria Salgado, Anaid Antaramián y Guadalupe Reyes.

A los miembros de mi jurado de tesis por sus valiosas críticas y comentarios a la tesis: Dr. José Bargas, Dr. David Naranjo, Dr. Luis Vaca, Dra. Laura Escobar y Dr. David García.

A mi papá por su gran interés, apoyo, amistad y contribuciones críticas a mi trabajo.

A toda mi familia.

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	5
1. Maitotoxina	5
1.1 Estructura	5
1.2 Posibles mecanismos de acción	6
1.2.1 Efecto sobre el Ca^{2+} intracelular	6
1.2.2 Hidrólisis de fosfoinosítidos	8
1.2.3 Liberación de hormonas y neurotransmisores	9
1.2.4 Contracción muscular	10
1.2.5 Canales catiónicos no selectivos	11
2. <i>Gambierdiscus Toxicus</i>	12
2.1 Distribución	12
2.2 Ciclo de vida	13
3. Ciguatera	14
3.1 Definición	14
3.2 Células ciguatóxicas	16
3.3 Problemas de salud pública	16
4. Planteamiento del Problema	17
OBJETIVOS	19
HIPÓTESIS	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
1. Cultivos celulares	21
2. Soluciones y reactivos	21
3. Preparación de las células para registros de fijación de voltaje en configuración de célula entera	22
4. Registros electrofisiológicos	22
5. Medición de concentración de Ca^{2+} intracelular	23
6. Medición de concentración de Na^{+} intracelular	24
RESULTADOS	25
1. Los fibroblastos de piel de humano poseen corrientes basales de K^{+}	25
2. La MTX activa una corriente catiónica permeable a K^{+} , Na^{+} y Ca^{2+}	27
3. El Ca^{2+} extracelular es requerido para la activación de la corriente catiónica	32
4. El Ca^{2+} extracelular no puede ser reemplazado por otros cationes divalentes	35
5. El Ca^{2+} intracelular también se requiere para la activación de la I_{MTX}	38
6. El Ca^{2+} intracelular puede ser reemplazado por Ba^{2+} pero no por Mg^{2+}	40
7. La I_{mtx} es inhibida por difenoxilato	41

ABREVIATURAS

[ión] Concentración(es) del ión
 [ión]_i Concentración(es) intracelular(es) del ión
 [ión]_e Concentración(es) extracelular(es) del ión
 ASCII Código Americano Estándar para el intercambio de información
 BAPTA Ácido 1,2-bis(2-Aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético
 BSA Albúmina de suero bovino
 COP Poros citolíticos/oncóticos
 CTX Ciguatoxina
 Da Daltones
 DAG Diacilglicerol
 DMEM Medio Eagle modificado por Dulbecco
 DPN Difenoxilato
 EDTA Ácido Etilendiamintetraacético
 EGTA Ácido Etilen Glicol-bis(β-aminoetil Eter) N,N,N',N'-Tetraacético
 FBS Suero fetal bovino
 GABA Ácido γ-aminobutírico
 GHK Ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz
 HBSS Solución salina balanceada de Hank
 HEPES Ácido N-(2-Hidroxietil)piperazin-N'-(2-Etanosulfónico)
 I Corriente eléctrica
 I_{mtx} Corriente activada por la Maitotoxina
 IP₃ Inositol-1,4,5-trifosfato
 MTX Maitotoxina
 NE Norepinefrina
 NMDG N-Metil-D-Glucamina
 NSCC Canales catiónicos no selectivos
 P_{ión} Permeabilidad relativa del ión
 PKC Proteína cinasa C
 PLC Fosfolipasa C
 TEA Tetraetilamonio
 V Voltaje
 VDCC Canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje

INTRODUCCIÓN

1. Maitotoxina

1.1 Estructura

La maitotoxina (MTX) es un poliéter de gran peso molecular (PM = 3422 Da) y es considerada la toxina marina más potente conocida a la fecha (Yasumoto et al., 1979). Es una de las toxinas implicadas en la ciguatera, una enfermedad causada por la ingesta de una gran variedad de peces que habitan y se alimentan en arrecifes de coral.

Debido a que fue inicialmente encontrada en las vísceras del pescado *Ctenochaetus striatus*, la MTX tiene el nombre tahitiano del pez, maito (Yasumoto et al., 1976). Más tarde se demostró que el dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus* es el organismo responsable de la producción de MTX y otra toxina relacionada, la ciguatoxina (CTX) (Yasumoto et al., 1977).

Estudios posteriores permitieron la extracción de MTX en forma pura como un sólido incoloro amorfo, determinándose su gran letalidad en ratones: 0.13 µg/kg con inyección intraperitoneal (Yokoyama et al., 1988).

La MTX ha atraído mucha atención en el campo de los productos naturales debido a que tiene el mayor peso molecular comparado con cualquier producto natural conocido hasta ahora, sin tomar en cuenta a los biopolímeros como proteínas o polisacáridos. Su estructura química fue recientemente determinada por métodos espectroscópicos (Murata et al., 1994) y por síntesis química (Sasaki et al., 1996; Zheng et al., 1996).

Los estudios para determinar la estructura completa de la MTX han revelado una composición de dos ésteres de sulfato, 28 hidroxilos, 32 éteres en forma de anillo y cuatro dobles enlaces (Murata et al., 1994). Los grupos hidroxilo y los grupos sulfato ionizados hacen a la MTX una sustancia altamente polar pero la presencia de una gran porción hidrofóbica le confiere a la molécula una naturaleza anfifílica (Escobar et al., 1998).

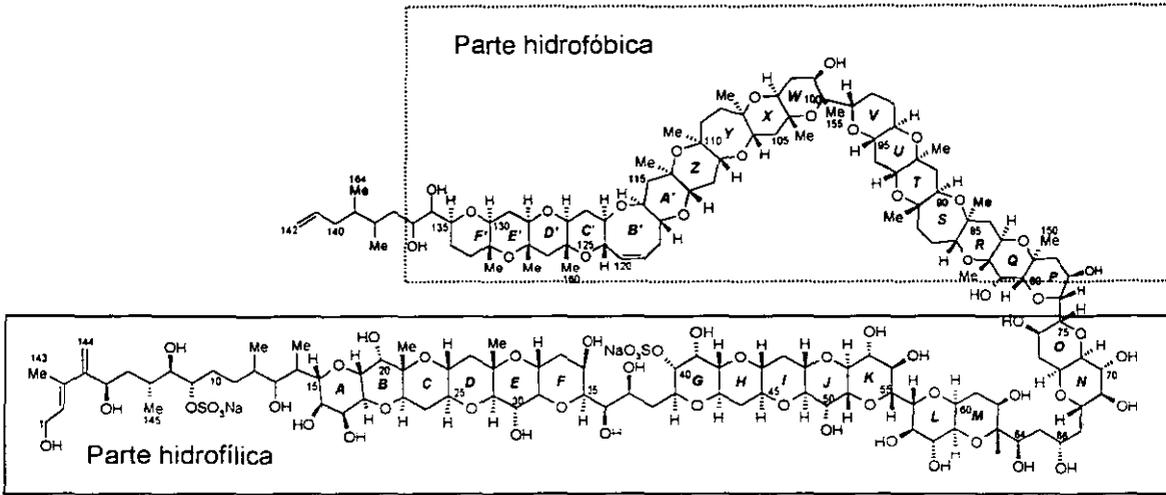


Figura 1. Estructura de la Maitotoxina obtenida por métodos espectroscópicos (Murata et al., 1994). Se propone que la parte hidrofóbica puede incluirse en la membrana plasmática mientras que la parte hidrofílica permanece en el exterior de las células por comparación con la estructura del gangliósido GM1 (Konoki et al., 1999).

1.2 Posibles mecanismos de acción

1.2.1 Efecto sobre el Ca^{2+} intracelular

La MTX provoca un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en prácticamente todas las células y tejidos probados a la fecha (Gusovsky y Daly, 1990). Este efecto es logrado con concentraciones de la toxina que van de 100 pM a 30 nM. La elevación en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provoca diversos efectos secundarios que se discutirán posteriormente. El mecanismo de acción de la MTX ha sido tema de gran controversia y permanece desconocido hasta ahora.

La MTX carece de actividad ionofórica en estudios con liposomas y mitocondrias (Takahashi et al., 1983). La entrada de Ca^{2+} inducida por MTX ocurre lentamente ($t_{1/2} > 1 \text{ min}$) y es sostenida; en contraste con los ionóforos de Ca^{2+} que causan una elevación casi instantánea del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Gusovsky y Daly, 1990). En estudios

con fibroblastos de piel de humano la MTX no produce un aumento en $[Ca^{2+}]_i$; cuando las células fueron pretratadas con tripsina (Gutierrez et al., 1997), lo cual sugiere que el sitio de acción de la MTX es una proteína de membrana plasmática sensible a esta enzima. En estudios de patch clamp en la configuración de "inside out" de células MDCK del epitelio renal, la MTX aplicada en la solución del baño (intracelular) no tuvo ningún efecto en contraste con la activación de una corriente de entrada dependiente de Ca^{2+} cuando el parche estaba en la configuración de "outside out" (Dietl y Volkl, 1994). Por consiguiente, la MTX solo puede ejercer su efecto a nivel extracelular. Además, la MTX induce la activación de solamente uno o dos canales dentro de una gran gama de concentraciones de la toxina en estudios realizados en parches provenientes de miocitos ventriculares de cobayo (Nishio et al., 1996). Todos estos resultados sugieren fuertemente que la MTX no es un ionóforo y que actúa mediante una proteína o canal iónico ubicado en la membrana de las células. Ya que la MTX tiene efecto en células obtenidas de organismos que divergieron hace millones de años, desde el insecto al humano, se puede especular que dicha proteína membranal se ha mantenido altamente conservada a lo largo de la evolución.

Se han realizado varios intentos por determinar la farmacología de los canales iónicos activados por MTX. En células híbridas de neuroblastoma-glioma y algunas células tumorales de la hipófisis, las dihidropiridinas bloquean la entrada de $^{45}Ca^{2+}$ causada por MTX, mientras que en células BC_3H_1 de músculo liso, miocitos y sinaptosomas, estos bloqueadores de canales de Ca^{2+} tipo L no tienen efecto en el influjo de Ca^{2+} inducido por MTX. Otros bloqueadores orgánicos de canales de Ca^{2+} como el verapamil, diltiazem y algunos anestésicos locales, inhiben el aumento en el Ca^{2+} intracelular causado por MTX en algunos, pero no en todos los sistemas. Bloqueadores inorgánicos de canales de Ca^{2+} como el Co^{2+} , Mn^{2+} y La^{3+} bloquean el flujo de Ca^{2+} provocado por MTX en varias preparaciones (Escobar et al., 1998).

En fibroblastos 3T3, la MTX, a concentraciones de 15-30 nM, no tiene efecto en el influjo de $^{45}Ca^{2+}$ (Freedman et al., 1984). Este es el único reporte en un sistema con células donde la MTX no incrementa el influjo de Ca^{2+} .

La MTX es un activador general del influjo de Ca^{2+} a las células, probablemente por interacción con sitios extracelulares de alta afinidad asociados con canales iónicos.

Si tales sitios están asociados con todo tipo de canales de Ca^{2+} o solo con algunos, no se sabe. Es posible que canales de Ca^{2+} tipo L y otros canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC) no sean activados directamente por la MTX, sino que se abran solo como resultado de una despolarización causada por la entrada de Ca^{2+} a través de otro tipo de canal ubicuo que es sensible a la MTX (Gusovsky y Daly, 1990).

La acumulación de Ca^{2+} en el interior de las células inducido por el tratamiento con MTX produce diversos efectos a nivel celular como ya se mencionó. A continuación se detallan algunos de estos efectos.

1.2.2 Hidrólisis de fosfoinosítidos

Se ha reportado que la MTX causa una estimulación dramática de la hidrólisis de fosfoinosítidos en una gran variedad de preparaciones (Gusovsky y Daly, 1990). Este efecto genera dos segundos mensajeros muy importantes: el inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3), que induce la liberación de Ca^{2+} de pozas intracelulares (como el retículo endoplásmico), y el diacilglicerol (DAG), que activa a la proteína cinasa C (PKC). La MTX provoca la formación de fosfatos de inositol en miocitos aórticos de rata (Berta et al., 1986), células híbridas de neuroblastoma NCB-20, células de feocromocitoma de rata PC12 y una gran variedad de otros tipos celulares (Gusovsky et al., 1989).

Los efectos estimulatorios de la MTX en la hidrólisis de fosfoinosítidos son abolidos en la ausencia de Ca^{2+} extracelular. Sin embargo, la hidrólisis de fosfoinosítidos inducida por MTX en casi todos los casos no es afectada por bloqueadores de canales de Ca^{2+} , tanto orgánicos como inorgánicos. Lo anterior sugiere que los efectos directos de la MTX sobre los canales de Ca^{2+} no son los mismos que median el efecto de la MTX sobre la hidrólisis de los fosfoinosítidos, o bien sólo un pequeño influjo de Ca^{2+} a través de la vía activada por la MTX es necesario para que se estimule dicha hidrólisis.

En células HL-60 la activación de la hidrólisis de fosfoinosítidos por MTX requiere de Ca^{2+} extracelular, no siendo así el caso para la activación del mismo proceso por un péptido quimiotáctico. Además, la activación de la hidrólisis de fosfoinosítidos por MTX no es sensible a la toxina pertussis, mientras que la activación

de la hidrólisis de fosfoinosítidos producida por el péptido quimiotáctico es inhibida por dicha toxina (Gusovsky et al., 1989). Así, por lo menos en esta línea celular, la MTX claramente afecta la hidrólisis de fosfoinosítidos a través de un mecanismo diferente a los mecanismos basados en receptores.

Como la MTX induce hidrólisis de fosfoinosítidos en cada sistema probado (Sladeczek et al., 1988) y en cada caso las respuestas son dependientes de Ca^{2+} extracelular, es probable que la formación de fosfatos de inositol sea secundaria a la entrada de Ca^{2+} a la célula (Gusovsky y Daly, 1990).

Puede ser que la MTX interactúe con alta afinidad con componentes de la membrana que son parte de mecanismos de acumulación de Ca^{2+} . Estos sistemas de acumulación de Ca^{2+} en las membranas de todas las células deben de estar muy estrechamente relacionados con la fosfolipasa C (PLC), la enzima responsable de la formación de fosfatos de inositol, y no parecen ser sensibles al bloqueo por antagonistas de canales de Ca^{2+} de cualquier tipo (Gusovsky y Daly, 1990).

Bernard y colaboradores demostraron en 1988 que en ovocitos de *Xenopus laevis* la MTX activa la hidrólisis de fosfoinosítidos de una manera dependiente de Ca^{2+} . Sin embargo, si los ovocitos son microinyectados con EGTA, un quelante de Ca^{2+} , la respuesta persiste, sugiriendo que en este sistema el Ca^{2+} es un requerimiento en el medio extracelular pero no en el intracelular para la activación de la hidrólisis de fosfoinosítidos provocada por MTX. Este resultado indica la posibilidad de que la MTX requiera de Ca^{2+} en el medio extracelular para unirse al sitio extracelular y ejercer su acción (Choi et al., 1989).

1.2.3 Liberación de hormonas y neurotransmisores

El incremento en la entrada de Ca^{2+} provocado por la MTX en células PC12, neuronas del estriado e islotes pancreáticos está acompañado por un incremento en la liberación de hormonas y neurotransmisores (Takahashi et al., 1982; 1983; Lebrun et al., 1987; Shalaby et al., 1986).

La liberación de norepinefrina (NE) por MTX en células PC12 es sensible al bloqueo por dihidropiridinas (Takahashi et al., 1982). En contraste con la gran estimulación de la MTX de la liberación de NE, un ionóforo de Ca^{2+} tiene solo efectos

mínimos sobre dicha liberación. Lo cual sugiere que es la toxina el agente involucrado en provocar dicha liberación y no el Ca^{2+} por sí mismo.

En neuronas del estriado, el Co^{2+} bloquea por completo la entrada de Ca^{2+} activada por MTX mientras que solo reduce parcialmente la liberación de ácido γ -aminobutírico (GABA) provocada por la toxina, sugiriendo que el aumento en la entrada de Ca^{2+} no es necesario para los efectos de la MTX en la liberación de neurotransmisor en este sistema (Pin et al., 1988).

Los efectos de la MTX en la liberación de ácido araquidónico de fosfolípidos marcados con ^3H araquidonato también han sido investigados en células PC12 (Choi et al., 1989). La MTX parece activar con mayor potencia la liberación de araquidonato que estimula la hidrólisis de fosfoinosítidos. El efecto de la MTX en la liberación de araquidonato es bloqueado por Co^{2+} , Mn^{2+} y Cd^{2+} .

La liberación de hormonas y neurotransmisores provocada por MTX en todos los sistemas probados depende de la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular.

También existe evidencia que indica que dicha liberación producida por la MTX depende de Na^+ en el medio extracelular; en medio con bajo Na^+ , la activación de la liberación de NE por MTX en células PC12 o de GABA en neuronas del estriado se reduce considerablemente. El mecanismo subyacente de esta dependencia de Na^+ extracelular no se conoce, pero puede reflejar una reducción en la habilidad de las células para disminuir los niveles intracelulares de Ca^{2+} a través de la vía de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en medio con bajo Na^+ (Gusovsky y Daly, 1990) o de la participación de un canal de Na^+ en el mecanismo de liberación.

1.2.4 Contracción muscular

La MTX induce contracción, de forma dosis dependiente, en una gran variedad de preparaciones de músculo aislado incluyendo aorta de conejo (Ohizumi y Yasumoto, 1983a), músculo liso intestinal (Ohizumi y Yasumoto, 1983b), duodeno de conejo (Legrand y Bagnis, 1984), *vas deferens* de cobayo (Ohizumi et al., 1983) y músculo cardíaco de cerdo y rata (Kobayashi et al., 1987a). También se ha demostrado que la MTX aumenta la actividad contráctil en estudios con células cardíacas aisladas (Kobayashi et al., 1985).

Los efectos de la MTX en músculo son suprimidos al eliminar el Ca^{2+} extracelular o por medio de la acción de antagonistas de canales de Ca^{2+} .

En el caso de la contracción de aorta de conejo, en solución libre de Ca^{2+} extracelular, las respuestas contráctiles producidas por la reintroducción de Ca^{2+} , Sr^{2+} o Ba^{2+} fueron potenciadas después del tratamiento con MTX y fueron bloqueadas por verapamil. El mismo efecto obtenido con la toxina fue reproducido con altas concentraciones de KCl extracelular, una manera de activar canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en este tejido. También se demostró que el mecanismo de acción de la MTX es diferente que el del ionóforo de Ca^{2+} A23187. De tal forma que la entrada de Ca^{2+} parece ser necesaria para los efectos de la MTX sobre la contracción muscular.

1.2.5 Activación de canales catiónicos no selectivos

La mayor parte de los estudios en la literatura que describen los efectos de la MTX han usado técnicas bioquímicas. Mediante la utilización de técnicas electrofisiológicas se ha mostrado que dicha toxina activa una gran diversidad de canales catiónicos no selectivos (NSCC) en diferentes tipos celulares. Las corrientes macroscópicas en la célula entera han sido registradas en cinco tipos de células: neuroblastomas (Yoshii et al., 1987), miocitos de cobayo y rata (Kobayashi et al., 1987b; Nishio et al., 1996; Faivre et al., 1990), células epiteliales de riñón MDCK (Dietl y Volkl, 1994), células β pancreáticas (Worley et al., 1994; Leech y Habener, 1997) y de hipófisis de rata GH4C1 (Young et al., 1995). En todos estos casos la MTX aplicada en el rango de 1 pM a 30 nM indujo grandes corrientes entrantes que no dependen del voltaje.

Más aún, en un estudio reciente se describe que el canal catiónico activado por la MTX en células β pancreáticas corresponde a una corriente catiónica no selectiva, voltaje independiente, activada por hormonas como el péptido GLP-1, el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la hipófisis (PACAP) y el AMP cíclico (Leech y Habener, 1997). Este canal está involucrado en la secreción de insulina. Este es el primer papel fisiológico asignado a un canal activado por la MTX.

De estos últimos datos se puede concluir que la MTX activa NSCC en vez de a una vía selectiva de Ca^{2+} como se sugería en los ensayos bioquímicos. En consecuencia, las corrientes entrantes producidas por la MTX pueden ser el resultado de la entrada de Na^+ y/o Ca^{2+} a la célula, lo cual puede provocar una despolarización y la consecuente activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC) en tejidos donde dichos canales están presentes.

2. *Gambierdiscus toxicus*

2.1 Distribución

G. toxicus recibe su nombre gracias a su identificación en peces colectados en las islas Gambier en la polinesia francesa (Yasumoto et al., 1979).

G. toxicus y otros organismos ciguatéricos habitan aguas tropicales y subtropicales de los océanos Pacífico y Atlántico. Su distribución es muy heterogénea tanto espacial como temporalmente. Los organismos pueden aparecer en un lado de una isla, por ejemplo, pero no en el otro. Su abundancia varía con la estación, profundidad del agua, substrato marino y factores ambientales como temperatura y salinidad.

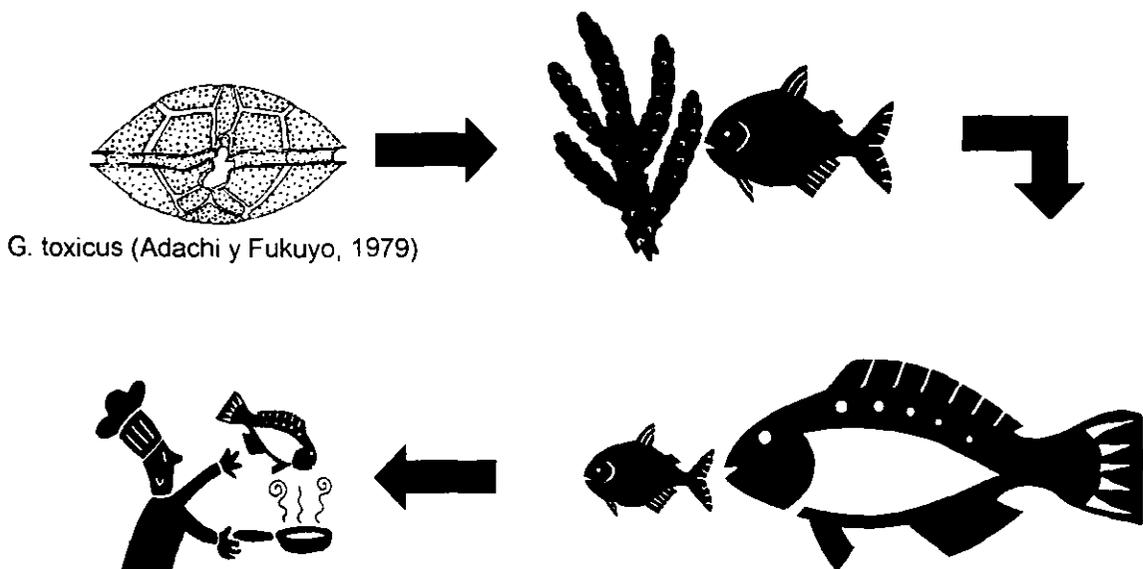
Los hábitats preferidos de estos organismos son las áreas protegidas de la acción de las olas con poco flujo de agua dulce. Las células vivas son frecuentemente encontradas en aguas de hasta 30 metros de profundidad. Usualmente se encuentran asociadas a algas más grandes, arrecifes de coral u otras superficies duras, como pecios. Los organismos parecen multiplicarse después de una gran perturbación en un arrecife. Por ejemplo, aumentos dramáticos en la incidencia de ciguatera han sido asociados con la construcción de muelles o el dragado en arrecifes (Batchelor, 1982). Perturbaciones naturales, como tormentas severas, pueden también destruir comunidades en el arrecife y los organismos ciguatéricos pueden incrementar. En cualquiera de los casos, las superficies duras que quedan libres son colonizadas primero por macroalgas, que se convierten en substrato para dinoflagelados y otros microorganismos.

G. toxicus colectado de su ambiente natural produce CTX y MTX, pero cuando se cultiva en el laboratorio, produce principalmente MTX (Yasumoto et al., 1979; Bagnis et al., 1980).

2.2 Ciclo de vida

G. toxicus se reproduce asexualmente por división celular. Sin embargo, probablemente tiene una fase de reproducción sexual como muchos otros dinoflagelados de la costa (Ville et al., 1992).

Los dinoflagelados son alimento de muchos organismos marinos pequeños que se encuentran en comunidades de algas y arrecifes de coral. Dichos organismos pequeños son comidos por peces y crustáceos más grandes, continuando así la cadena alimenticia. Los depredadores más grandes acumulan la toxina y aparentemente no les causa ningún daño. Conforme ingieren más presas con la toxina, más acumulan la toxina en su cuerpo. Si dichos animales son ingeridos por humanos, las toxinas en la carne y órganos de los pescados contaminados producen una intoxicación denominada ciguatera (Figura 2).



G. toxicus (Adachi y Fukuyo, 1979)

Figura 2. Cadena alimenticia mostrando el paso de la maitotoxina desde el dinoflagelado que la produce hasta el consumo por el humano causando la ciguatera. El dinoflagelado *G. toxicus* se asocia a algas que son consumidas por varias especies de peces que, a su vez, son comidos por peces más grandes quienes acumulan dinoflagelados y toxina en sus músculos y vísceras. El consumo humano de estos peces provoca la intoxicación denominada ciguatera.

3. Ciguatera

3.1 Definición

La ciguatera es una enfermedad humana que es provocada por el consumo de carne de varias especies de pescado contaminada con MTX y/o CTX.

El envenenamiento de la ciguatera fue descrito desde 1606 en una cadena de islas del Pacífico. Una erupción de la intoxicación similar ahí y cerca de Nueva Caledonia fue reportada en 1774 por el Capitán James Cook.

El término ciguatera se originó en el área del Caribe para designar a la intoxicación inducida por la ingestión del caracol marino *Turbo pica* (llamado cigua), descrito por un ictiólogo cubano. Ahora, el término es ampliamente aceptado para denotar un tipo particular de envenenamiento que resulta de la ingestión de ciertos

pescados (principalmente peces de arrecife) encontrados alrededor de las islas del Caribe y el Pacífico (Figura 3).

Las toxinas que causan la ciguatera son poliéteres, como la CTX y compuestos relacionados, que son estructuralmente similares al ácido okadaico. Las toxinas se originan de algas unicelulares llamadas dinoflagelados, principalmente *G. toxicus* y otras especies bénticas que pasan a través de la cadena trófica a los peces (Ohizumi et al., 1985). Estas toxinas tienden a concentrarse en los animales más grandes que se encuentran en la parte más alta de la cadena alimenticia.

Cerca de 400 especies de peces y unos cuantos invertebrados del trópico han sido implicados en la intoxicación de la ciguatera.



Figura 3. Distribución mundial de la ciguatera. La ciguatera está diseminada alrededor de los trópicos (área gris representada en la figura) y globalmente alrededor de 20,000 casos anuales de esta intoxicación son reportados (Lewis, 1992; Yasumoto y Satake, 1996). La distribución geográfica de la ciguatera está principalmente confinada a un cinturón alrededor del planeta de latitud 35°N-35°S. Las áreas principalmente afectadas son el Caribe y los Océanos Pacífico e Índico. No obstante, aún dentro de estas áreas existe una gran variabilidad en su ocurrencia espacial y temporal. Datos tomados de Lewis, 1992.

3.2 Células ciguatóxicas

Una de las primeras fuentes de poliéteres tóxicos involucrados en la ciguatera en los océanos Pacífico y Atlántico fue identificada en el pescado *C. striatus* en 1976 (Yasumoto et al., 1976).

Recientemente, otros dinoflagelados, bacterias, algas y plancton, en arrecifes de coral o aguas someras, se han reconocido como productores de otras toxinas relacionadas a la CTX dentro del grupo de los poliéteres. Entre los organismos identificados como células productoras de éste tipo de toxinas están *Prorocentrum concavum* y *P. mexicanum*.

3.3 Problemas de salud pública

Cada año, el número de pacientes con ciguatera en regiones tropicales y subtropicales en todo el mundo están estimados en alrededor de 20 000, con una tasa de mortalidad del 1% en personas que sufren la intoxicación, haciéndola una de las intoxicaciones más extensamente distribuidas causadas por toxinas naturales. En zonas endémicas, como las Islas Vírgenes, donde la gente está familiarizada con la enfermedad, los episodios de la enfermedad no son siempre reportados a los servicios de salud. Como resultado, los casos reportados por médicos y hospitales están subestimados.

La ciguatera es una intoxicación diferente y separada de enfermedades en humanos debidas a la contaminación con bacterias de comida marina mal manejada.

Las toxinas de la ciguatera son termoestables e hidrofóbicas. Cocinar, congelar o ahumar el pescado no destruye a las toxinas. Desgraciadamente las toxinas no pueden ser detectadas en la carne del pescado por su apariencia o sabor.

Los síntomas de la ciguatera usualmente aparecen de 10 minutos a 12 horas después de la ingesta de alimentos contaminados, pero también pueden ocurrir hasta 36 horas después. La mayoría de las víctimas sufren de náusea, vómito, diarrea, entumecimiento y hormigueo en la zona de la boca y las extremidades. En casos más severos los pacientes pueden sufrir dolores musculares, mareo y sensaciones de temperatura revertidas (lo caliente se siente frío y lo frío se siente caliente al tacto). Los síntomas presentados por la ciguatera se pueden confundir fácilmente con la

enfermedad de descompresión que afecta a los buzos, de tal forma que muchas veces se confunde una intoxicación de ciguatera con enfermedad de descompresión, sobre todo en regiones del caribe donde la práctica del buceo es generalizada. La recuperación normal usualmente requiere de varios días a varias semanas. En casos severos es necesaria la hospitalización y cuidado intensivo del paciente.

El análisis de los síntomas clínicos en pacientes de envenenamientos con pez globo, mariscos (marea roja debida a dinoflagelados) y toxinas poliéteres (MTX, CTX, ácido okadaico, brevetoxina y otros poliéteres) muestra que los síntomas se traslapan y que las toxinas causantes de la intoxicación no pueden distinguirse clínicamente. En otras palabras, no hay un rasgo distintivo que separe la sintomatología. La reversión de la temperatura supuestamente era única para la CTX, este ya no es el caso pues muchos otros compuestos pueden producir el mismo sintoma.

Actualmente, el tratamiento es usualmente sintomático, disminuyendo el malestar causado por la náusea, diarrea y dolor.

En 1988 un reporte documentó el uso de manitol intravenoso para el tratamiento en casos muy severos de la intoxicación (Palafox et al., 1988). El manitol intravenoso es el único tratamiento funcional con el que se cuenta actualmente y se desconoce su mecanismo de acción.

4. Planteamiento del Problema

Dado el impacto de la ciguatera en el mundo y la potencia con que la MTX ejerce sus efectos, resulta muy interesante conocer el mecanismo de acción de dicha toxina.

Hasta ahora no se ha realizado ningún estudio detallado que describa y caracterice los efectos de la MTX para poder vislumbrar claramente cuál podría ser el mecanismo molecular subyacente a la acción de la toxina.

Aquí se realizaron experimentos con la finalidad de caracterizar detalladamente aspectos importantes de la acción de la MTX, como la naturaleza de la corriente activada, dependencia de cationes divalentes intra y extracelulares y el bloqueo de la corriente. Estos estudios se realizaron en fibroblastos de piel de humano debido a que

tienen la mayor sensibilidad a la toxina de todos los tipos celulares reportados en la literatura y, por lo tanto, resultan un buen modelo de estudio.

Los resultados aquí mostrados permiten realizar inferencias importantes sobre el mecanismo de acción de la MTX y proponer nuevas perspectivas para un mejor entendimiento de los mecanismos subyacentes a la acción de la MTX.

OBJETIVOS

- Caracterizar las corrientes iónicas basales presentes en los fibroblastos de piel de humano.
- Caracterizar la corriente iónica producida por la MTX (I_{mtx}).
- Determinar la selectividad iónica de la I_{mtx} .
- Evaluar la dependencia de Ca^{2+} y otros cationes divalentes (Ba^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+}) intra y extracelulares en la activación de la I_{mtx} .
- Estudiar el efecto de varios agentes bloqueadores de canales catiónicos (La^{3+} , Gd^{3+}), manitol y difenoxilato sobre la I_{mtx} .

HIPÓTESIS

- La corriente iónica producida por la MTX (I_{mtx}) es catiónica no selectiva, permea K^+ , Na^+ y Ca^{2+} , y no depende de voltaje.
- La activación de la I_{mtx} requiere de la presencia de Ca^{2+} en los medios intra y extracelulares.
- El Ca^{2+} requerido para la activación de la I_{mtx} no puede ser reemplazado por otros cationes divalentes (Ba^{2+} y Mg^{2+}).
- La I_{mtx} puede ser inhibida por bloqueadores de canales catiónicos no selectivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

Los fibroblastos de piel de humano adulto fueron obtenidos de biopsias de individuos sanos sometidos a cirugías por procedimientos previamente publicados (Soto et al., 1996). Los cultivos primarios de células se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco), 2 mM de glutamina (Gibco), 100 µg/ml de estreptomycin y 25 ng/ml de anfotericina B. Las células se conservaron a una humedad controlada en una incubadora (Nuair) a 37° C. en una atmósfera con 5% de CO₂ y se crecieron en cajas de Petri de cultivo de 35 mm (Costar). Las células utilizadas en los experimentos estuvieron entre los pasajes 8 y 11.

2. Soluciones y reactivos

Para los registros de patch clamp se utilizó como solución en la pipeta (mM): 145 Aspartato de K⁺, 5 NaCl, 10 HEPES, 1 MgCl₂ y 2 EGTA; el pH fue ajustado a un valor de 7.2 con NaOH. En los experimentos realizados bajo condiciones de bajo Ca²⁺ intracelular el EGTA se reemplazó con 5 mM de BAPTA. La solución extracelular fue (mM): 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 5 Glucosa y 1.8 CaCl₂; el pH fue ajustado a un valor de 7.4 con NaOH. En los estudios de dependencia de cationes divalentes se reemplazó el CaCl₂ por el catión correspondiente. Para las mediciones de concentración intracelular de Ca²⁺ y Na⁺ la solución extracelular fue (mM): 120 NaCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 4.75 KCl, 10 Glucosa, 20 HEPES, 1.8 CaCl₂ y 0.05% BSA; pH = 7.2-7.4. En experimentos de bajo Na⁺ extracelular, éste catión fue reemplazado con N-metil-D-glucamina (NMDG). La Maitotoxina (Calbiochem) se disolvió en una solución de MES 5 mM, pH = 5.6.

La solución de Verseno contiene:

KCl	5 mM
NaCl	140 mM
EDTA	0.5 mM
HEPES	10 mM

Y la solución salina balanceada de Hank (HBSS):

KCl	5.4 mM
Na ₂ HPO ₄	0.3 mM
KH ₂ PO ₄	0.4 mM
NaHCO ₃	4.2 mM
CaCl ₂	1.3 mM
MgCl ₂	0.5 mM
MgSO ₄	0.6 mM
NaCl	137 mM
Glucosa	5.6 mM

3. Preparación de las células para registros de fijación de voltaje en configuración de célula entera

Las células se lavaron 3 veces y se incubaron durante 10 minutos en la misma caja de cultivo con verseno a temperatura ambiente (22-25 °C). Después se substituyó el verseno con 3 ml de solución extracelular y se despegaron las células mecánicamente para luego ser transferidas a otra caja de Petri de 35 mm donde se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir que se pegaran al plato. Una vez que las células se encontraban adheridas a la caja se procedió a realizar los registros electrofisiológicos.

4. Registros electrofisiológicos en configuración de célula entera

Se utilizó el método de fijación de voltaje (patch clamp) en configuración de célula entera ya descrito (Hamill et al., 1981) para registrar las corrientes iónicas mediante experimentos de fijación de voltaje. Las células después de procesarse como ya se describió anteriormente, fueron montadas en la platina de un microscopio invertido (Nikon). Las micropipetas fueron fabricadas con capilares de vidrio de alto punto de fusión 8161 (World Precision Instruments, Inc.) mediante un jalador de pipetas (Narishige Co. PP83). Las micropipetas tuvieron una resistencia en la solución extracelular de 2-5 MΩ. Se utilizó el AxoPatch 200A (Axon Instruments Inc.) como

amplificador. El electrodo de referencia se conectó al baño por medio de un electrodo de Ag/AgCl. Los datos de los experimentos de fijación de voltaje se almacenaron en cinta utilizando una video casetera (JVC) y se digitalizaron más tarde para su análisis utilizando la interfase analógica-digital Digidata 1200 (Axon Instruments) y el software pClamp 6.0.4 (Axon Instruments). La señal fue filtrada a 10 KHz usando un filtro de 4 polos tipo Besell (Axon Instruments) y se digitalizó a 100 Hz. La información binaria se convirtió a ASCII y experimentos múltiples se combinaron para obtener la media y el error estándar usando el software SigmaPlot 2.0 (Jandel Corporation). El potencial de mantenimiento en todos los experimentos fue de 0 mV. Los pulsos de voltaje para la medición de corrientes se describen en los pies de figura para cada condición experimental. En todos los experimentos que se describen n = número de experimentos realizados para cada condición. Cada experimento se realizó en una sola célula a temperatura ambiente (22-25 °C). La capacitancia de las células fue de 8–12 pF.

5. Medición de la concentración de Ca^{2+} intracelular

Las células confluentes se dispersaron mecánicamente con una pipeta de plástico después de haber sido incubadas por 2 minutos con una solución de tripsina al 0.01%. Se colocaron en la solución extracelular para llegar a una concentración final de $1.5\text{--}2 \times 10^6$ células/ml y se incubaron con Fura-2/AM $5 \mu\text{M}$ por 45 min. Después de esto, las células se lavaron 2 veces y se incubaron por 30 minutos en una solución sin Fura-2/AM. Luego las células se lavaron de 3 a 4 veces y se colocaron en la celda de un espectrofluorómetro de luminiscencia Aminco-Bowman serie 2. La longitud de onda de excitación alternó entre 340 y 380 nm cada 2 segundos y la emisión se colectó a 510 nm. Cada experimento se calibró individualmente para obtener la fluorescencia máxima después de lisar a las células con Triton X-100 al 0.1% y la fluorescencia mínima se obtuvo después de quelar el Ca^{2+} en la solución con EGTA 20 mM. Los valores obtenidos mediante este procedimiento se usaron para calcular la concentración intracelular de Ca^{2+} de acuerdo a ecuaciones previamente publicadas (Grynkiewicz et al., 1985). La auto-fluorescencia de las células no cargadas con Fura-2/AM se sustrajo de cada experimento.

6. Medición de la concentración de Na^+ intracelular

Las células confluentes se lavaron con solución salina balanceada de Hank (HBSS) y se incubaron por 2 minutos en una solución de tripsina (Sigma) al 0.01%. Después las células se lavaron dos veces con la solución extracelular y se incubaron por 45 minutos con solución extracelular adicionada con ácido plurónico 1% y $25 \mu\text{M}$ del indicador fluorescente de Na^+ SBF1/AM (Molecular probes). Luego las células se lavaron y se mantuvieron en una solución sin SBF1/AM por 15 minutos. Las células se colocaron posteriormente en la celda de un espectrofluorómetro de luminiscencia Aminco-Bowman serie 2. La longitud de onda de excitación usada fue 358 nm y la emisión se colectó a 500 nm cada 2 segundos. Las curvas de calibración de Na^+ se realizaron conforme a procedimientos previamente publicados (Harootunian et al., 1989; Zhao et al., 1995).

RESULTADOS

1. Los fibroblastos de piel de humano poseen corrientes basales de K^+

Primeramente se exploraron las corrientes iónicas presentes en los fibroblastos de piel de humano bajo condiciones basales. En la figura 4A se muestra la corriente rectificante saliente observada en los fibroblastos estudiados bajo la configuración de célula entera de la técnica de fijación de voltaje (patch clamp). Se realizó un protocolo de pulsos cuadrados de voltaje desde -100 hasta 100 mV en escalones de 20 mV para observar las curvas de relación corriente-voltaje ($I-V$). La corriente producida mostró un potencial de reversión de -85 ± 4 mV ($n = 12$).

Para determinar la participación del K^+ en dicha corriente, se aumentó la $[K^+]_o$ de 5 a 25 mM. Después de la adición del K^+ en el medio extracelular se observó un cambio en el potencial de reversión hacia valores más positivos. Bajo la condición de $[K^+]_o$ alto, el potencial de reversión observado fue de -40 ± 5 mV ($n = 5$), que está cercano al potencial de equilibrio calculado con la ecuación de Nernst para un electrodo de K^+ en estas condiciones (-44.27 mV) (Figura 4B).

Esta corriente de K^+ es sensible al bloqueador de canales de K^+ tetraetilamonio (TEA) cuando se agrega en el medio extracelular. La corriente rectificante saliente es inhibida completamente con 1 mM de TEA como se ilustra en la figura 4C.

La figura 4D muestra las curvas $I-V$ de los registros mostrados en las figuras anteriores (4A-C) obtenidas en condiciones basales (\bullet), después de incrementar la concentración extracelular de K^+ a 25 mM (\square) y después de la adición de TEA 1 mM (\triangle). Aquí se aprecia de mejor manera el cambio tanto en el potencial de reversión como en la magnitud de la conductancia de K^+ de los experimentos descritos anteriormente.

Estos resultados demuestran que bajo condiciones basales, la corriente mayoritaria que presentan los fibroblastos de piel de humano es producida por un canal rectificante saliente de K^+ sensible a TEA.

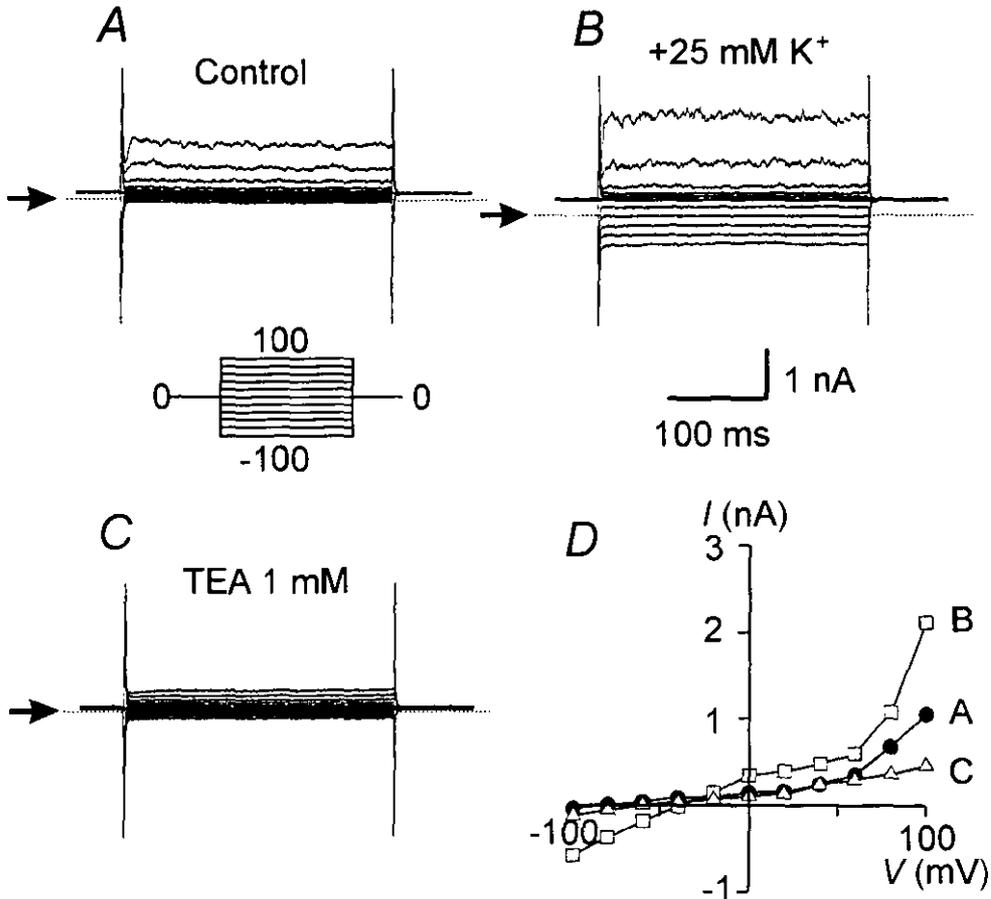


FIGURA 4

Corrientes de K⁺ en fibroblastos de piel de humano.

En condiciones basales (ausencia de MTX), la corriente mayoritaria observada es producida por un canal rectificante saliente de K⁺ (A, ●). Al incrementar la concentración extracelular de K⁺ de 5 a 25 mM, el potencial de reversión cambió de -85 a -40 mV, como lo predice la ecuación de Nernst para un electrodo de K⁺ (B, □). Esta corriente es bloqueada con TEA 1 mM (C, △). Curvas *I-V* para las tres condiciones anteriores (D). Se realizó un protocolo de fijación de voltaje con la técnica de patch clamp en configuración de célula entera. Se hicieron pulsos cuadrados de voltaje en escalones de 20 mV entre -100 y 100 mV con un potencial de mantenimiento de 0 mV como se indica en la figura. Las flechas y líneas punteadas indican el nivel de cero corriente.

2. La MTX activa una corriente catiónica permeable a K^+ , Na^+ y Ca^{2+}

Posteriormente se procedió a explorar los efectos de la MTX en las propiedades eléctricas de la célula. Se utilizó una concentración saturante de toxina, es decir, la concentración para la cual ya no se observa un mayor efecto de la toxina aún cuando se administre a dosis más elevadas (Gutierrez et al., 1997). Se aplicó toxina en repetidas ocasiones (cada aplicación de 500 pM cada una) hasta tener una concentración final en la solución del baño de hasta 2 nM que no produjo más cambios en la amplitud de la corriente activada por la MTX en comparación con una sola aplicación de MTX de 500 pM. Por lo tanto, la concentración de MTX utilizada en todos los experimentos de este estudio es de 500 pM.

Después de la adición de MTX al medio extracelular, se observó la activación de una corriente óhmica cuando se aplicaron rampas repetidas de voltaje (de -100 a 100 mV) durante experimentos de patch clamp en la configuración de célula entera (Figura 6A). La corriente lineal activada por MTX (I_{mtx}) mostró un potencial de reversión de -10 ± 6 mV ($n = 10$, Figura 5B). La figura 5C compara la corriente control (antes de la aplicación de MTX, Figura 5A, ●) con la corriente provocada por la MTX (Figura 5B, □). La corriente neta activada por la MTX se puede calcular sustrayendo la corriente control de la I_{mtx} total. La relación I - V resultante (Figura 5C, ▲) es muy similar a la de la I_{mtx} total (I_{mtx} neta + corriente basal control), con un potencial de reversión ligeramente más positivo (-7.1 mV). Esto indica que la MTX activa una corriente de mucho mayor magnitud que la corriente basal de K^+ en estas células, la cual minimiza la contribución de la corriente de K^+ en la corriente total.

Se reemplazó el Na^+ de la solución extracelular con NMDG, para poder determinar la selectividad iónica de la I_{mtx} . Al reemplazar la solución extracelular con NMDG-Cl se observó un cambio en el potencial de reversión de la I_{mtx} a un valor más negativo que -100 mV, lo cual indica que la I_{mtx} permea cationes pero no NMDG, ni Cl⁻ o Aspartato (Figura 5D). ya que el potencial de equilibrio calculado con la ecuación de Nernst para una corriente aniónica en estas condiciones es muy cercano a cero.

Se calculó la permeabilidad relativa del Ca^{2+} con respecto a la del K^+ (P_{Ca}/P_K) en la I_{mtx} con los datos obtenidos y utilizando una solución extracelular con NMDG. Suponiendo que el paso de iones a través de la membrana es independiente, que el

flujo de NMDG a través de la I_{mix} es despreciable como ya se demostró, y que tampoco permean aniones a través de la I_{mix} como ya se mencionó. Bajo estas condiciones las permeabilidades relativas de los otros dos iones permeantes (P_K y P_{Ca}) se pueden calcular usando la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK), conociendo el potencial de reversión de la corriente en estas condiciones (-125 mV) obtenido experimentalmente:

$$E_{rev} = \frac{RT}{2F} \ln \frac{4P_{Ca}[Ca]_o}{P_K[K]_i}$$

Despejando y resolviendo la ecuación GHK anterior donde $E_{rev} = -125$ mV, $R =$ constante de los gases, $T =$ temperatura absoluta en grados Kelvin, $F =$ constante de Faraday, $[Ca]_o = 2$ mM y $[K]_i = 145$ mM, se obtiene que $P_{Ca}/P_K = 0.001$. Lo cual quiere decir que a través de la I_{mix} permean 1000 iones de K^+ por cada ión de Ca^{2+} .

De los datos anteriores se puede asumir que la contribución del Ca^{2+} a la I_{mix} total es muy pequeña como se puede ver en la Figura 5D (■), donde la corriente de entrada producida por el Ca^{2+} es muy reducida comparada con la corriente de salida de K^+ . Tomando esto en cuenta, se puede calcular la permeabilidad relativa del K^+ con respecto a la del Na^+ (P_K/P_{Na}) asumiendo que la permeabilidad relativa $P_K/P_{Ca} = 1000$, por medio de la ecuación:

$$E_{rev} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Na]_o + (P_K/P_{Na}) [K]_o}{[Na]_i + (P_K/P_{Na}) [K]_i}$$

Resolviendo esta ecuación donde todas las constantes son las mismas que en el caso anterior, $E_{rev} = -10.1$ mV, $[Na]_o = 140$ mM, $[Na]_i = 5$ mM, $[K]_o = 5$ mM y $[K]_i = 145$ mM, se obtiene que $P_K/P_{Na} = 1.49$. Esto significa por cada 3 iones de K^+ que pasan a través de la I_{mix} también permean 2 de Na^+ .

Si se asume que la permeabilidad del K^+ (P_K) es igual a 1 entonces: $P_{Na} = 0.67$ y $P_{Ca} = 0.001$ aproximadamente. De estos resultados se obtiene el orden de permeabilidades relativas de la I_{mix} : $K^+ > Na^+ \gg Ca^{2+}$.

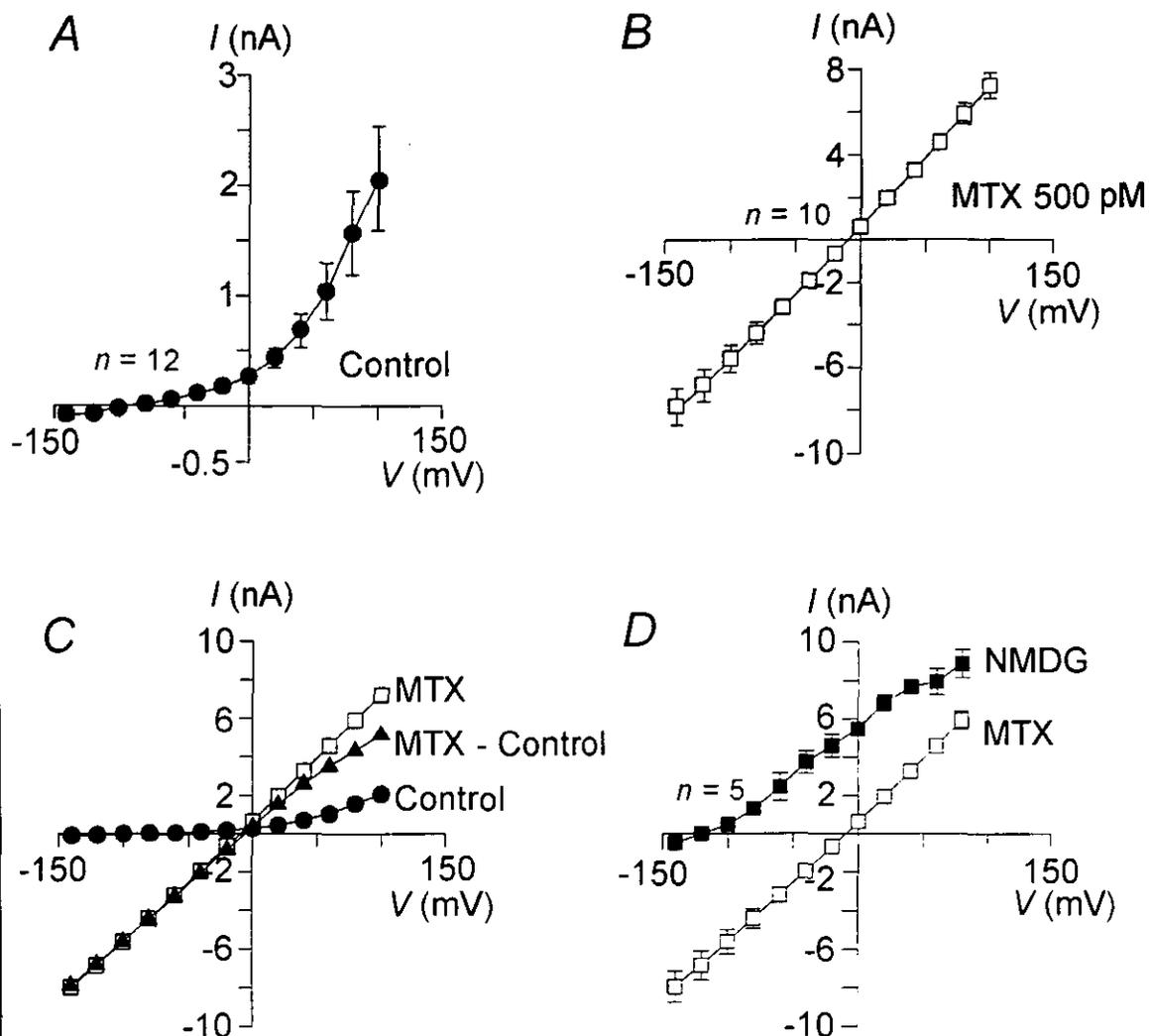


FIGURA 5

Curvas corriente-voltaje de la corriente basal y la activada por MTX.

El panel A muestra la media y desviación estándar de la curva *I-V* de K^+ encontrada en condiciones basales (control, ●). El panel B muestra la curva *I-V* de la corriente activada por MTX 500 pM (□). La corriente fue medida cuando alcanzó el estado estacionario. El panel C ilustra las curvas *I-V* de las corrientes control (de K^+), la corriente total (control + activada por MTX) y la corriente neta activada por MTX (total control, ▲). El panel D muestra la curva *I-V* de la I_{Na} cuando se reemplaza el Na^+ en el medio extracelular con NMDG (■) en comparación con la I_{Na} en condiciones control (□). En todos los casos se muestran la media y desviación estándar de n número de observaciones. La corriente se muestra en nanoamperios (nA) y el voltaje en milivoltios (mV). Donde no aparecen, las desviaciones estándar son más pequeñas que el símbolo.

La figura 6 muestra el curso temporal de la activación de la I_{mtx} en respuesta a 500 pM de MTX (Figura 6A) alineado con los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular [Ca^{2+}]_i (6B) y la concentración de Na^{+} intracelular [Na^{+}]_i (6C) monitoreados con los indicadores fluorescentes Fura-2 y SBFI respectivamente. Como se muestra en esta figura el curso temporal de la activación de la I_{mtx} concuerda con el incremento en la [Ca^{2+}]_i y la [Na^{+}]_i inducidos por la toxina, sugiriendo fuertemente que los cambios en Ca^{2+} y Na^{+} intracelulares son el resultado de la entrada de estos cationes a través de la I_{mtx} , lo cual apoya los datos de permeabilidad obtenidos. Como ya se ha demostrado anteriormente, la MTX no induce la liberación de Ca^{2+} de compartimientos intracelulares en estas células (Gutierrez et al., 1997), por consiguiente, los cambios en la [Ca^{2+}]_i observados después de la aplicación de MTX deben ser producidos por la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular a través de la I_{mtx} como consecuencia de la despolarización.

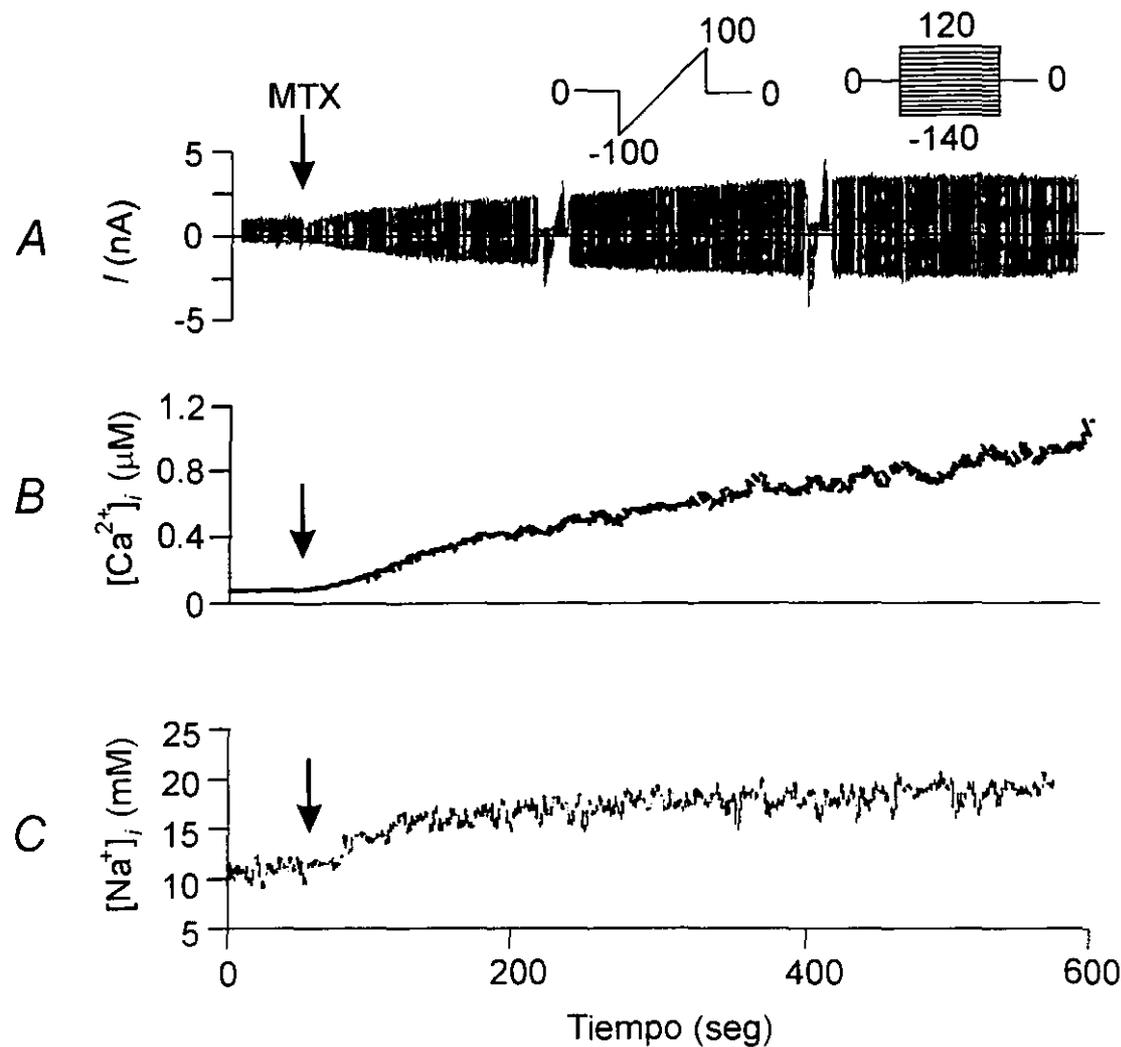


FIGURA 6

Cambios en conductancia, Ca^{2+} y Na^+ intracelulares en respuesta a MTX.

En el panel A se muestra un experimento típico con MTX. La corriente se evocó con una rampa de -100 a $+100$ mV. Las rampas fueron interrumpidas para realizar pulsos escalonados desde -140 a 120 mV en escalones de 20 mV con el fin de obtener curvas corriente-voltaje ($I-V$). La flecha indica el momento de la aplicación de la MTX (500 pM). El panel B muestra el curso temporal del cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a MTX, medida con el indicador fluorescente Fura-2, tal y como se indica en material y métodos. El panel C muestra el curso temporal del cambio en la $[Na^+]_i$, medida con el indicador fluorescente SBFI. La escala de tiempo es la misma en todos los paneles.

3. El Ca^{2+} extracelular es requerido para la activación de la corriente catiónica

Dado que los efectos de la MTX han demostrado depender fuertemente de la presencia de Ca^{2+} extracelular en muchos sistemas (Gusovsky y Daly, 1990; Escobar et al., 1998; Weber et al., 2000) se realizaron experimentos en los cuales la concentración de Ca^{2+} extracelular $[\text{Ca}^{2+}]_o$ se varió para investigar la dependencia de Ca^{2+} extracelular en la activación de la I_{mtx} .

Cuando se agregó MTX en presencia de concentraciones micromolares de $[\text{Ca}^{2+}]_o$, no se observó activación de la corriente I_{mtx} , sin embargo, al incrementar la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ a 2 mM en la misma célula, se observó la activación de la I_{mtx} siguiendo un curso temporal muy parecido al de los experimentos control ($n = 5$) (Figura 7A).

Para descartar la posibilidad de que el resultado de los experimentos anteriores fuera provocado por el incremento abrupto en la concentración de Ca^{2+} per se, a una célula en medio extracelular con bajo Ca^{2+} (μM), se le añadió 2 mM de este catión en ausencia de MTX, después de lo cual no se observaron cambios en la corriente basal de la célula, sino hasta después de la adición de MTX, cuando la activación de la I_{mtx} se indujo normalmente (Figura 7B; $n = 5$).

Con esto queda demostrado que la I_{mtx} es activada por la acción de la MTX y que el Ca^{2+} extracelular es requerido a concentraciones milimolares para esto, además de que el Ca^{2+} por sí mismo no produce ningún efecto a nivel de las corrientes basales en estas células.

El Ca^{2+} en el medio extracelular parece ser requerido únicamente durante la fase inicial de activación de la I_{mtx} , ya que después de la activación de la I_{mtx} , el agregar el quelante de Ca^{2+} (EGTA 5 mM) repetidamente, con lo cual se reduciría la concentración de Ca^{2+} hasta niveles nanomolares, no alteró la corriente I_{mtx} . Lo anterior indica que una vez activada la I_{mtx} , la presencia de Ca^{2+} extracelular es irrelevante para el mantenimiento de dicha corriente (Figura 7C). Es posible que el Ca^{2+} extracelular se requiera para la unión de la MTX a su receptor, sin embargo esto no ha sido probado debido a que no es posible a la fecha realizar experimentos de pegado específico (binding) con MTX.

Para comprobar que la entrada de Na^+ a la célula por acción de la MTX también requiere de la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular y tener mayor evidencia por métodos no electrofisiológicos de la acción de la toxina, la $[\text{Na}^+]_i$ se monitoreó por métodos espectrométricos usando el indicador selectivo para Na^+ SBFI. Cuando las células se suspendieron en un medio extracelular con bajo Ca^{2+} y 5 mM de EGTA, para tener virtualmente cero Ca^{2+} en el medio, no se produjo ningún aumento en la $[\text{Na}^+]_i$ inducido por toxina comparado con los experimentos control en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular (Figura 7D; $n = 7$). Estos experimentos indican que el Ca^{2+} en el medio extracelular también es necesario para que la MTX promueva la entrada de Na^+ a las células, confirmando de esta forma los experimentos electrofisiológicos descritos anteriormente. Este resultado sugiere nuevamente que el aumento en el Na^+ intracelular promovido por MTX es a través de la I_{mtx} , ya que no solo tienen el mismo curso temporal, sino además la misma dependencia al Ca^{2+} extracelular.

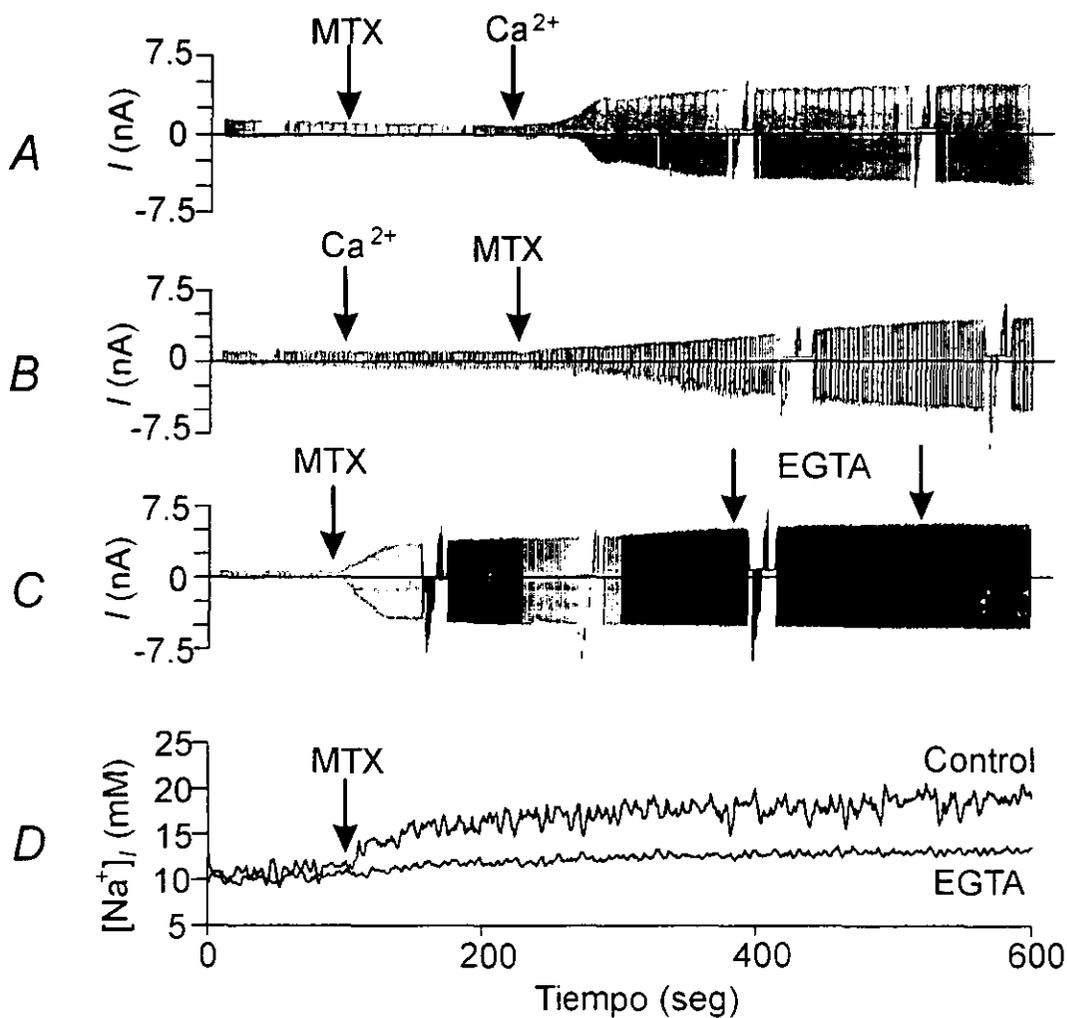


FIGURA 7

El Ca^{2+} extracelular es necesario para la activación de la I_{mtx} .

La aplicación de MTX al medio extracelular (en la ausencia de Ca^{2+}) no indujo la activación de la I_{mtx} . La subsecuente adición de Ca^{2+} 2 mM resultó en una activación normal de la I_{mtx} (A). Si el Ca^{2+} se añade antes de la MTX no se observa la activación de la corriente, solo hasta la aplicación de la toxina (B). La acción del Ca^{2+} extracelular parece ser un proceso irreversible, la adición repetida de EGTA 5 mM después de la activación de la I_{mtx} no tiene efecto sobre la corriente (C). El aumento en la $[\text{Na}^+]_i$ no se observa si el Ca^{2+} extracelular es quelado con EGTA 5 mM antes de la adición de la MTX (D). El protocolo de estimulación en los experimentos de patch clamp es el mismo que en la figura 6.

4. El Ca^{2+} extracelular no puede ser reemplazado por otros cationes divalentes

Las acciones del Ca^{2+} en muy diversos sistemas experimentales pueden ser reemplazadas al cambiar el Ca^{2+} con otros cationes divalentes como el Ba^{2+} y el Mg^{2+} . Estos cationes divalentes, inclusive pueden permear a través de canales de Ca^{2+} igual o mejor que el mismo Ca^{2+} (Tsien et al., 1988).

Por esta razón, en nuestros experimentos de dependencia de Ca^{2+} extracelular se probaron otros cationes divalentes además del Ca^{2+} para determinar si dichos cationes pueden reemplazar la acción del Ca^{2+} extracelular en la activación de la I_{mtx} .

Se probaron varias concentraciones extracelulares de los cationes divalentes Ba^{2+} y Mg^{2+} y se añadió MTX a la célula. Después de realizar esto, se añadió 2 mM de Ca^{2+} como control para observar la activación completa de la I_{mtx} . Esta activación máxima lograda con el Ca^{2+} se tomó como el 100% de la respuesta a la toxina (Figura 8). La corriente de las células fue registrada por métodos electrofisiológicos aplicando rampas de voltaje repetidamente en la configuración de célula entera del método de patch clamp, tal y como se ha descrito en experimentos anteriores.

El Mg^{2+} resultó incapaz de reemplazar la acción del Ca^{2+} a nivel extracelular a concentraciones de hasta 10 mM ($n = 5$). Con este catión, justo después de la adición de la MTX, se observó un decremento pequeño y transitorio de la corriente. Cuando el Ca^{2+} se añadió al medio extracelular, una hiperpolarización momentánea de la corriente se observó en algunos casos, al tiempo de empezarse a activar la I_{mtx} (Figura 8A). La hiperpolarización transitoria, aunque se llegó a observar también con Ca^{2+} al momento de la activación de la I_{mtx} , fue muy superior con $[\text{Mg}^{2+}]_o$ alto.

De todos los cationes probados (Ba^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+}), el Ba^{2+} fue el único catión divalente que pudo reemplazar la acción del Ca^{2+} a nivel extracelular, aunque se requirieron concentraciones mucho mayores que las de Ca^{2+} . Se probaron varias concentraciones extracelulares de Ba^{2+} (en mM): 0.1 ($n = 4$), 1 ($n = 4$), 5 ($n = 5$) y 10 ($n = 5$) (Figura 8B). Cuando la $[\text{Ba}^{2+}]_o$ es de 10 mM, se puede activar el 50% de la respuesta máxima de la I_{mtx} obtenida con 2 mM de Ca^{2+} (100% de la respuesta), es decir, se requieren 10 veces más de Ba^{2+} para activar la misma cantidad de corriente activada con Ca^{2+} .

Estas observaciones muestran que el Ca^{2+} extracelular tiene un papel único y muy importante en el mecanismo de acción de la MTX. El Ca^{2+} se involucra en la acción de la MTX de manera diferente y específica de otros cationes divalentes que comúnmente son utilizados para sustituir al mismo.

Al obtener los resultados anteriores con respecto al papel fundamental y único del Ca^{2+} extracelular para que la MTX ejerza sus efectos, resultó interesante estudiar como se ve afectada la acción de la MTX con respecto a la variación en la $[\text{Ca}^{2+}]_o$.

Para determinar si la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ modula la magnitud de la I_{mtx} se realizaron experimentos en donde se probaron las siguientes $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (en mM): 0.1 ($n = 4$), 1 ($n = 5$), 1.5 ($n = 6$), 1.8 ($n = 10$) y 2 ($n = 5$). Aquí se monitoreó la corriente iónica de las células por medio de rampas de voltaje. Después de añadir la MTX y observar su efecto en las corrientes iónicas de la célula, se incrementó la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ a 2 mM como control (Figura 8C). La corriente obtenida en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular fue tomada como el 100% de respuesta a la MTX para el análisis de los resultados.

Únicamente a concentraciones de 1.8 mM y mayores fue posible activar a la I_{mtx} en respuesta a la adición de toxina.

Cuando lo que se varía es la $[\text{Ba}^{2+}]_o$, se observa que la activación de la I_{mtx} con respecto a la variación en la $[\text{Ba}^{2+}]_o$ es gradual, conforme va aumentando la $[\text{Ba}^{2+}]_o$ también aumenta progresivamente el porcentaje de respuesta a la toxina (Figura 8D). Con estos experimentos queda demostrado que se requiere que la concentración de Ca^{2+} extracelular sea de 1.8 mM o más para que la MTX active a la I_{mtx} . El efecto del Ca^{2+} extracelular es altamente específico, ya que de todos los cationes divalentes probados, únicamente el Ba^{2+} pudo reemplazar pobremente la acción del Ca^{2+} extracelular.

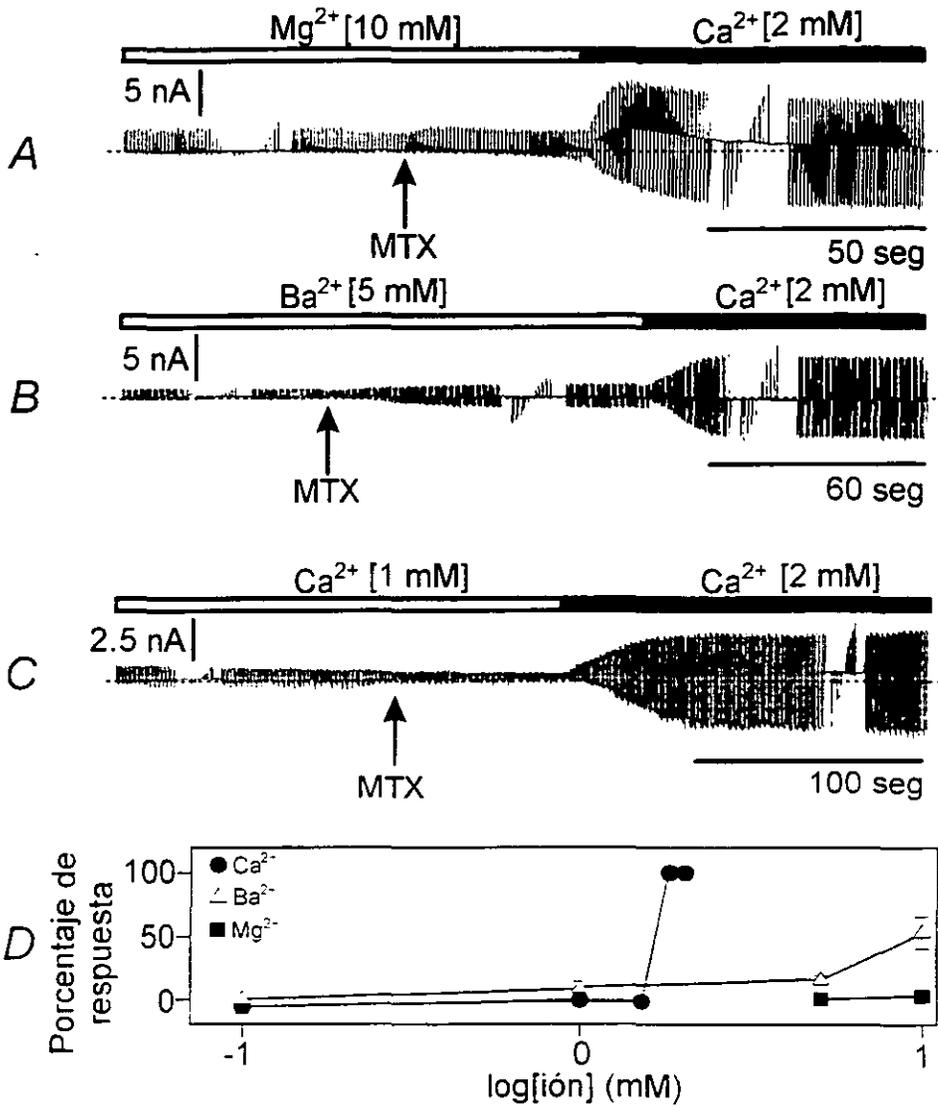


FIGURA 8

Efecto de cationes divalentes en el medio extracelular sobre la activación de la I_{max} .

En ausencia de Ca^{2+} extracelular, el Mg^{2+} no puede reemplazar al Ca^{2+} para la activación de la I_{max} (A), sin embargo, el Ba^{2+} fue efectivo para reemplazar al Ca^{2+} en la activación de la I_{max} (B). El panel C muestra dos concentraciones de Ca^{2+} (1 y 2 mM). Se observa activación de la I_{max} solo con 2 mM del catión. El panel D muestra el concentrado de datos obtenidos de experimentos como los mostrados arriba (A-C). Se consideró 100% de la respuesta a la cantidad de corriente activada con 2 mM de Ca^{2+} . Los símbolos indican la media y desviación estándar del siguiente número de experimentos, para Ca^{2+} ($n = 25$), para Ba^{2+} ($n = 17$) y para Mg^{2+} ($n = 10$). Como se observa solo el Ba^{2+} puede reemplazar pobremente al Ca^{2+} para la activación de la I_{max} . El protocolo de estimulación es el mismo que en la figura 6. Donde no aparecen, las desviaciones estándar son más pequeñas que el símbolo

5. El Ca^{2+} intracelular también se requiere para la activación de la I_{mtx}

Habiendo comprobado y caracterizado el requerimiento de Ca^{2+} extracelular para la acción de la MTX, se decidió investigar también el papel del Ca^{2+} intracelular en la activación de I_{mtx} .

En dichos experimentos se añadió BAPTA 5 mM a la solución de la pipeta para quelar el Ca^{2+} disponible en el medio intracelular. La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se mantuvo en 2 mM durante la realización de estos experimentos.

Bajo estas condiciones experimentales la MTX no indujo activación de la I_{mtx} , indicando que la presencia de Ca^{2+} libre en el rango nanomolar en el medio intracelular también es necesaria para la acción de la toxina (Figura 9A). Cuando el Ca^{2+} intracelular es quelado con BAPTA 5 mM, dejando una concentración libre de dicho catión en el orden fM, la MTX activa solamente el 4.57 % ($n = 6$) de la corriente, 0.048 ± 0.009 nA/pF, con respecto al control (1.05 ± 0.31 nA/pF con 10 nM de Ca^{2+} libre intracelular) (Figura 9B).

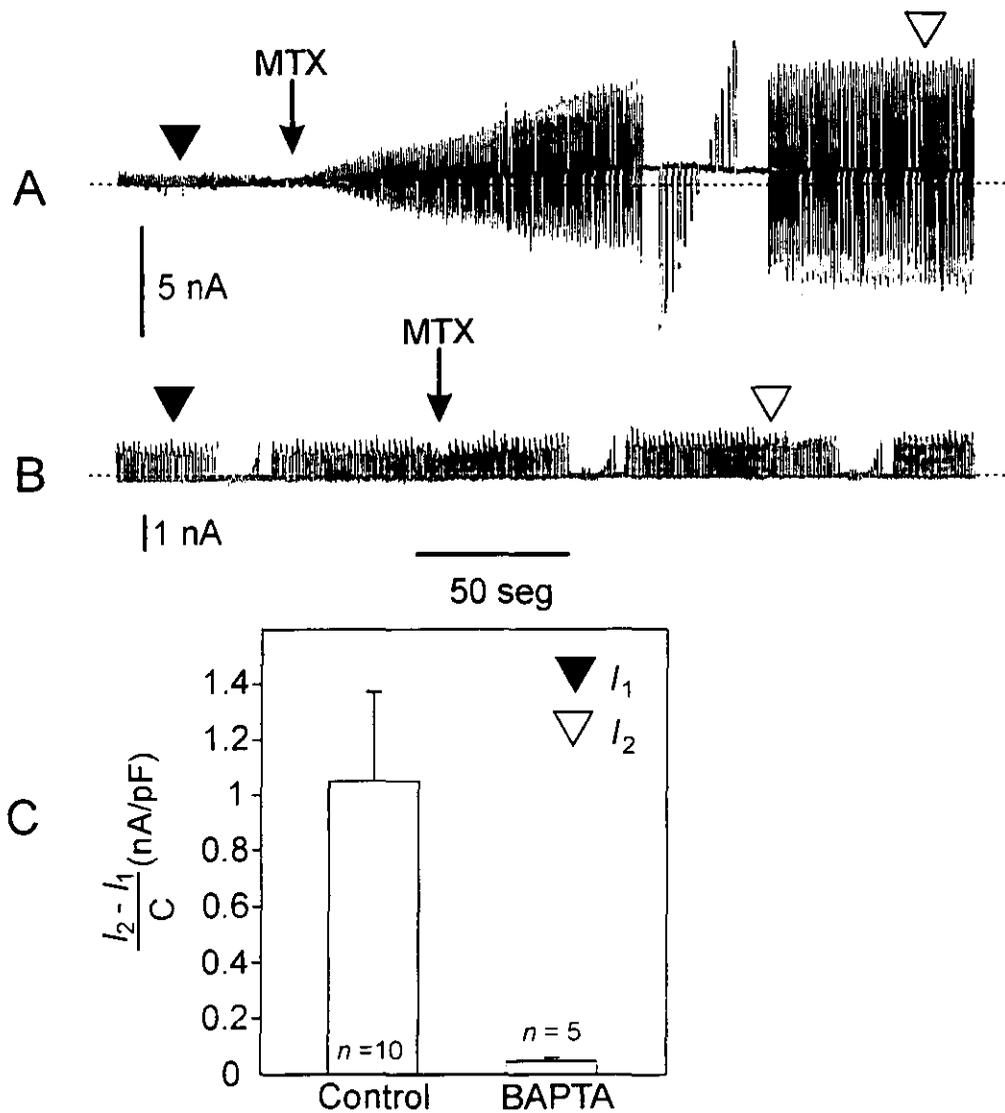


FIGURA 9

El Ca^{2+} intracelular también es requerido para la activación de la I_{MTX} .

En el panel A se muestra un registro control de la activación de la I_{MTX} . El panel B muestra la activación de la I_{MTX} en un experimento con una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 2 mM y con una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cercana a cero, de acuerdo a lo calculado por el programa Bound and Determined v4.35 (usando las ecuaciones descritas en Brooks y Storey, 1992). El panel C muestra el efecto de BAPTA 5 mM intracelular en la I_{MTX} . Con BAPTA en la pipeta se activó únicamente el 4.57 % de la corriente obtenida en condiciones control. Los valores de la corriente I_{MTX} fueron obtenidos al restar la corriente basal de K^+ (I_1 , \blacktriangledown) de la corriente activada por MTX (I_2 , \triangledown). Los valores muestran la corriente corregida por capacitancia ($(I_2 - I_1)/C$). Las barras muestran la media y desviación estándar del número de experimentos independientes (n) mostrado dentro de las barras. El protocolo de estimulación es el mismo que en la figura 6. La capacitancia de las células varió entre 8 y 12 pF.

6. El Ca^{2+} intracelular puede ser reemplazado por Ba^{2+} pero no por Mg^{2+}

Así como en el caso del Ca^{2+} extracelular, se hicieron experimentos para probar si el requerimiento de Ca^{2+} intracelular para activar la I_{mtx} pudiera ser reemplazado por otros cationes divalentes (Mg^{2+} y Ba^{2+}). Para estos experimentos se usó BAPTA 5 mM en la solución de la pipeta junto con una concentración fija de Mg^{2+} o Ba^{2+} . La solución extracelular contuvo 2 mM de Ca^{2+} .

Dado que el BAPTA no solo es capaz de quelar Ca^{2+} en la solución, sino que también se une a otros cationes divalentes, aunque con menor afinidad, se utilizó el programa Bound and Determined v4.35 (Brooks y Storey, 1992) para calcular las $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $[\text{Mg}^{2+}]_i$ y $[\text{Ba}^{2+}]_i$ libres en estos experimentos.

En dichas condiciones se añadió MTX al medio extracelular para monitorear la activación de la I_{mtx} .

El Ba^{2+} pudo reemplazar al Ca^{2+} intracelular. A una $[\text{Ba}^{2+}]_i$ libre de 8.5 μM , se obtuvo una activación de I_{mtx} similar a la obtenida con 100 nM de Ca^{2+} ($n = 4$). Por otro lado, el Mg^{2+} fue incapaz de reemplazar al Ca^{2+} intracelular aún a una $[\text{Mg}^{2+}]_i$ libre en la solución de 7.4 mM ($n = 5$). En estos experimentos la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre esperada debe de estar cercana a cero, así que, los efectos obtenidos muy posiblemente fueron producidos exclusivamente por el catión divalente con el que se experimentó (Ba^{2+} o Mg^{2+}).

En estos experimentos quedó demostrado que el Ca^{2+} intracelular también es esencial para la activación de la I_{mtx} . sin embargo, debido a que resulta extraordinariamente difícil reemplazar la solución intracelular, no se pudo determinar si dicho catión únicamente se necesita durante la fase inicial de activación de la I_{mtx} , como en el caso del Ca^{2+} extracelular. El Ba^{2+} intracelular también puede reemplazar al Ca^{2+} , pero aparentemente con menor eficiencia de como lo hace a nivel extracelular. En el medio extracelular se requiere 10 veces mas Ba^{2+} para activar la misma cantidad de corriente que con Ca^{2+} . sin embargo, a nivel intracelular se requiere más de mil veces la concentración de Ba^{2+} para activar el mismo nivel de corriente que con el Ca^{2+} . Cabe mencionar que por limitaciones técnicas no se pudieron probar $[\text{Ba}^{2+}]_i$ libre menores a las reportadas en los experimentos mencionados arriba.

7. La I_{mtx} es inhibida por difenoxilato

Finalmente como parte de la caracterización de la I_{mtx} , se realizaron experimentos en búsqueda de un inhibidor para esta corriente. En primer lugar se utilizaron bloqueadores inorgánicos de canales de Ca^{2+} , los cuales han demostrado inhibir la actividad de canales inducida por la MTX (Escobar et al., 1998). Tanto el Gd^{3+} , el La^{3+} como el Ni^{2+} a concentraciones de hasta 200 μM no tuvieron ningún efecto sobre I_{mtx} . Solo un bloqueo pequeño y transitorio fue observado con algunos de estos agentes.

En 1988, el uso de manitol intravenoso fue reportado como un tratamiento efectivo de la ciguatera (Palafox et al., 1988). este tratamiento sigue siendo hasta la fecha la única manera efectiva de tratar casos severos de la intoxicación causada por MTX. Debido a esto, se probó el efecto del manitol sobre la I_{mtx} . El manitol tampoco tuvo ningún efecto estadísticamente significativo sobre esta corriente, aún a concentraciones de hasta 100 mM.

Finalmente, se encontró que el difenoxilato (DPN) inhibió a la I_{mtx} (Figura 10). Este compuesto, comúnmente utilizado como antidiarreico, es un agonista del receptor a opioides subtipo μ y disminuye el tránsito gastrointestinal por sus efectos en el músculo intestinal (Corazziari, 1999). Al momento de añadir 10 μM de DPN al medio extracelular cuando la I_{mtx} estaba totalmente activada se observó una reducción considerable de la corriente, de 1.20 ± 0.50 nA/pF en condiciones control a un valor de 0.20 ± 0.19 nA/pF después de la adición del DPN ($n = 5$) (Figura 10A). Lo anterior indica que 10 μM de DPN inhibió aproximadamente el 85% de la I_{mtx} .

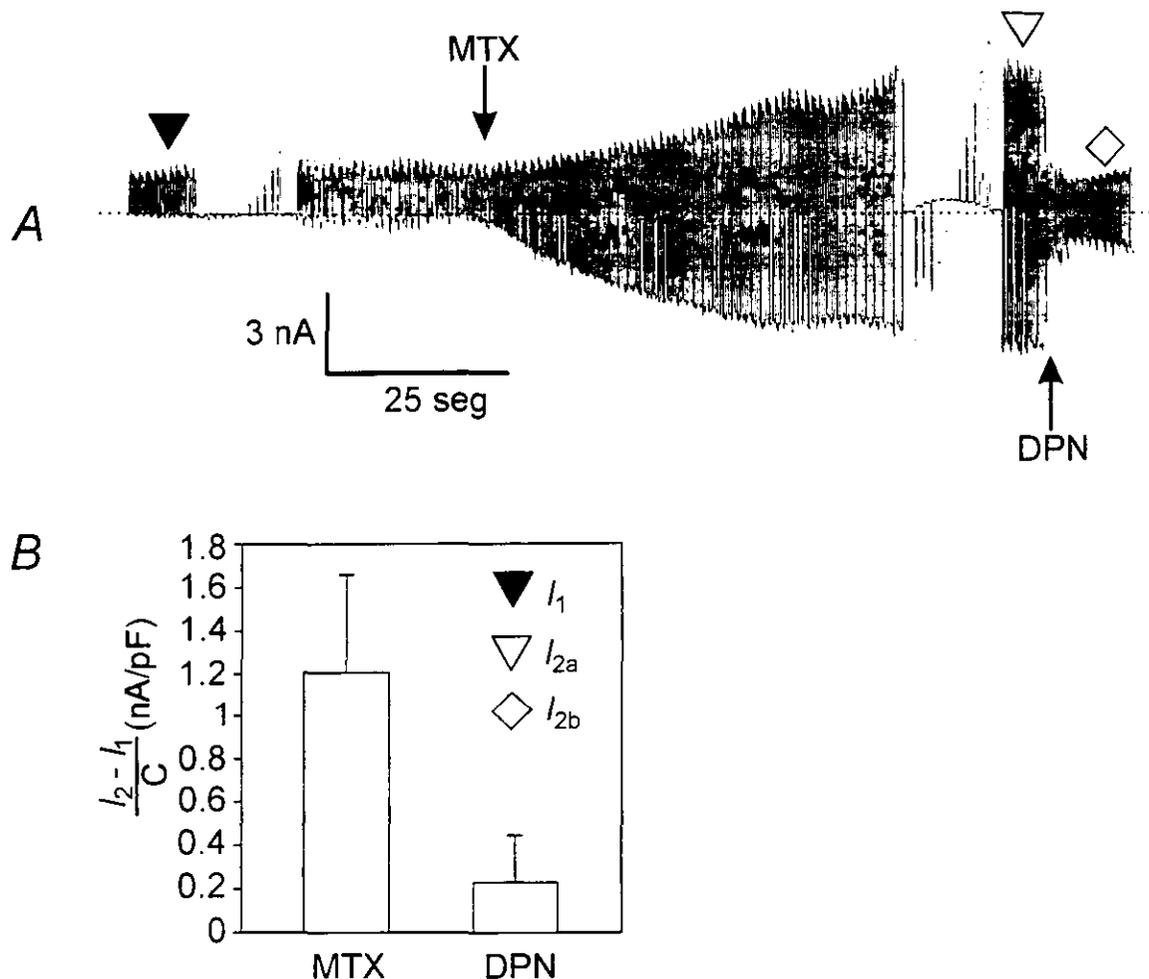


FIGURA 10

La I_{mtx} es parcialmente inhibida por el DPN.

El panel A muestra un ejemplo representativo de la activación de la I_{mtx} por 500 pM de MTX (flecha MTX). En el punto indicado por la segunda flecha (DPN) se añadió 10 μM de DPN. El valor de la corriente control (MTX) fue obtenido al restar la corriente basal (I_1 , \blacktriangledown) de la corriente máxima obtenida al añadir MTX (I_{2a} , \triangledown) y tuvo un valor de 1.2 nA/pF, el valor de la corriente en presencia de DPN fue obtenido al restar la corriente basal (I_1 , \blacktriangledown) de la corriente máxima obtenida al añadir MTX y posteriormente DPN (I_{2b} , \diamond) y tuvo un valor de 0.2 nA/pF. El panel B muestra la media y desviación estándar ($n = 4$) del efecto de DPN sobre la corriente control corregida por capacitancia (nA/pF). La corriente iónica presente después de la adición del DPN es un 16.66 % de la I_{mtx} obtenida previamente. El protocolo de estimulación es el mismo que en la figura 6. La línea punteada en A indica el nivel de cero corriente. La capacitancia de las células varió entre 8 y 12 pF.

DISCUSIÓN

1. Efectos de la MTX en los fibroblastos de piel de humano

Los resultados aquí presentados muestran la activación de una corriente catiónica no selectiva en respuesta a la adición de MTX. Corrientes macroscópicas y de canal único han sido registradas en diferentes tipos celulares (Escobar et al., 1998; Schilling et al., 1999a), en todas ellas cuando se aplica MTX en un rango de 1 pM a 30 nM, se inducen grandes corrientes que son independientes del voltaje, como en nuestro caso.

Como ya se reportó, la constante de activación media para inducir entrada de Ca^{2+} en las células utilizadas en este estudio es de 450 fM (Gutierrez et al., 1997). Con el fin de trabajar con una dosis saturante, en el presente estudio utilizamos 500 pM de MTX. Los fibroblastos de piel de humano tienen la mayor sensibilidad a MTX de todos los tipos celulares reportados en la literatura.

Particularmente, en un estudio realizado con la línea celular SK45 de fibroblastos de piel de humano, se reportan corrientes iónicas producidas con 1nM de MTX, muy similares a las reportadas aquí (Schilling et al., 1999a). En ese mismo reporte, al sustituir la solución extracelular fisiológica con NMDG-Ringer, en donde el principal catión en la solución del baño es el NMDG, se produjo un corrimiento hacia la izquierda en el potencial de reversión de +7 a -35 mV. Este mismo fenómeno es observado en los experimentos reportados aquí, no obstante, cuando sustituimos el Na^+ de la solución extracelular por NMDG, el cambio que vemos en el potencial de reversión es mucho mayor (de -10 a -125 mV). Este cambio en el valor del potencial de reversión de la I_{mtx} es más drástico que el reportado anteriormente (Schilling et al., 1999a) debido a que al momento de sustituir con el NMDG se quita el Na^+ del medio extracelular y la permeabilidad relativa del Ca^{2+} es mucho menor aquí que en el reporte mencionado.

Las permeabilidades relativas calculadas para el K^+ , Na^+ y Ca^{2+} en este estudio concuerdan en general con las permeabilidades ya calculadas en otros sistemas. La I_{mtx} discrimina pobremente entre K^+ y Na^+ (por cada 3 iones de K^+ que salen de la célula entran 2 de Na^+ aproximadamente), permea Ca^{2+} y no permea Cl^- . En la mayor parte

de los casos donde la permeabilidad de la corriente activada por la toxina es explorada, las características generales de permeabilidad descritas anteriormente se cumplen, aunque en algunos casos se obtienen observaciones que no concuerdan con el esquema general obtenido hasta ahora, se encuentra por ejemplo un caso donde el Ca^{2+} permea mejor que el Na^+ en células cardíacas de cobayo (Kobayashi et al., 1987), resultado que además se contrapone con lo que nosotros encontramos.

La permeabilidad del Ca^{2+} es el punto de mayor desacuerdo reportado hasta el momento en la literatura concerniente a la corriente activada por MTX, no existe una tendencia clara que indique la manera como permea el Ca^{2+} con relación a otros iones en las corrientes iónicas activadas por MTX en muy diversos sistemas. Lo que sí es muy claro es que en todos los sistemas pasa a través de la membrana celular provocando aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Al parecer la activación de canales catiónicos no selectivos (NSCC) precede a la aparición de otros efectos producidos por la MTX. Schilling y colaboradores reportan la activación de un poro que permite el paso de grandes moléculas (375 Da) a través de la membrana celular después de la activación de canales catiónicos permeables a Ca^{2+} (Schilling et al. 1999a). Aquí no observamos la activación del mencionado poro que permite el paso de grandes moléculas a través de la membrana, incluyendo al Fura-2, debido a que las concentraciones de toxina utilizadas en nuestro estudio son hasta cuatro veces menores a las reportadas, por lo cual es muy posible que solamente estemos activando a los NSCC y que para activar las otras vías de permeación ya mencionadas se necesite una concentración mayor de toxina. Además el curso temporal utilizado en este estudio (aproximadamente 5 min.) es menor al reportado para la activación de poros que permiten el paso de moléculas de alto peso molecular (> 5 min.), por lo cual muy posiblemente estemos observando fenómenos previos a la activación de dichos poros, o sea la activación de los NSCC. Como es mencionado por Schilling y colaboradores es posible suponer que se estén viendo dos procesos en dos cursos temporales distintos, primero la activación de canales iónicos permeables a Ca^{2+} , Na^+ y K^+ y posteriormente la activación de poros citolíticos/oncóticos (COP) en la membrana (Schilling et al., 1999b). La activación de los poros COP además requiere de algún tipo de acoplamiento con los primeros NSCC activados por la toxina. Aquí

probablemente solo estamos observando la primera etapa de activación de NSCC pero debido a la concentración de toxina y/o del curso temporal utilizados es posible que no observemos la activación de poros tipo COP, lo que concuerda con nuestras observaciones en donde el NMDG no permea al interior de la célula. Los registros de la $[Ca^{2+}]_i$ obtenidos aquí utilizando el indicador fluorescente Fura-2 se saturan, lo cual indica que muy posiblemente el indicador no se está saliendo de la célula, lo cual es similar a lo reportado previamente (Gutierrez et al., 1997; Schilling et al., 1999a; Konoki et al., 1999).

2. Mecanismo de acción de la MTX

Desde el descubrimiento de que la MTX es una de las entidades responsables por la intoxicación conocida como ciguatera, se han realizado muchos intentos para elucidar el mecanismo molecular por el cual esta toxina ejerce su acción. Se ha acumulado evidencia en años recientes que indica que la MTX es un activador muy poderoso de la entrada de Ca^{2+} en prácticamente todas las células donde se ha estudiado. Esta entrada de Ca^{2+} probablemente se dé a través de una corriente catiónica no selectiva como la mostrada en este estudio y no necesariamente a través de canales de Ca^{2+} activados por voltaje.

La MTX es usada comúnmente como una herramienta efectiva para el estudio de la homeostasis de Ca^{2+} en una gran variedad de células. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a los efectos de la MTX son todavía desconocidos.

Debido a que la MTX puede activar el influjo de Ca^{2+} en una gran variedad de células de diferentes organismos, se propuso originalmente que la MTX pudiera estar actuando como un ionóforo (Gusovsky y Daly, 1990). No obstante, la incapacidad de la MTX para ejercer su efecto en liposomas y mitocondrias (Takahashi et al., 1983) sugirió fuertemente que la hipótesis anterior probablemente era falsa. En otros estudios (Gutierrez et al., 1997) la MTX no vació los reservorios intracelulares de Ca^{2+} y además se encontró que al tratar a las células con tripsina previamente a la aplicación de la toxina, se atenúa fuertemente la respuesta a la misma, estos hallazgos también sugieren fuertemente que el mecanismo de acción de la MTX no es ionofórico. También en estudios con la técnica de patch clamp, en registros de canal único en

configuración de "inside out" con células MDCK, la MTX aplicada a la solución del baño (intracelular) no produjo ningún efecto en contraste con la activación de una corriente de entrada dependiente de Ca^{2+} que se desarrolla cuando el parche está en la configuración de "outside out" (Dietl y Völkl, 1994). Este resultado indica que la MTX puede activar a la corriente solo cuando es aplicada en la superficie extracelular de la membrana. Más aún, la MTX induce solo uno o dos canales unitarios dentro de un gran rango de concentraciones en parches de miocitos de cobayo (Nishio et al., 1996).

Todos los resultados comentados anteriormente sugieren que la MTX no actúa como un ionóforo. En este estudio, el hecho de que la respuesta a la MTX se satura y que se produzcan los efectos máximos con concentraciones picomolares de la toxina también indica que la MTX no es un ionóforo.

Estos resultados abren la posibilidad de que la MTX pudiera estar actuando mediante una proteína en la membrana ampliamente distribuida en muchos tipos celulares.

3. El Receptor de la MTX

El aumento en las concentraciones intracelulares tanto de Na^+ como de Ca^{2+} y también la activación de la I_{mtx} , efectos aquí producidos con la MTX, son de alta afinidad y saturables, lo cual sugiere que esta toxina está reconociendo selectivamente un sitio de unión en la membrana celular.

La entidad molecular del receptor a la MTX todavía tiene que ser establecida, sin embargo, ya sea que la MTX está actuando mediante una nueva proteína o activando a una proteína conocida, el receptor a la MTX tiene que estar altamente conservado a través de la evolución, debido a que las células donde la MTX tiene efecto provienen de organismos que divergieron hace millones de años. Si la MTX actúa mediante una nueva proteína o canal iónico, se abren nuevas líneas de investigación para intentar responder preguntas como: ¿cuál es el papel fisiológico del receptor a la MTX en todos estos organismos?, y si el blanco de la MTX es un nuevo receptor entonces, ¿cuál es el agonista endógeno para este receptor tan ampliamente distribuido?

Como el común denominador en los efectos de la MTX es la activación de la entrada de Ca^{2+} a la célula, es posible postular que el receptor a la MTX pudiera ser

una proteína membranal que activa el influjo de Ca^{2+} interactuando con canales catiónicos o de Ca^{2+} o que el receptor fuera el canal iónico por sí mismo. Elucidar esta cuestión ha resultado muy difícil dada la falta de antagonistas específicos o bloqueadores del efecto de la MTX. Nosotros probamos una amplia gama de bloqueadores de canales de Ca^{2+} y NSCC, además de manitol, y encontramos que solo el difenoxilato (DPN) inhibe parcialmente los efectos de la toxina en este tipo de células, como ha sido reportado previamente (Daly et al., 1995; Gutierrez et al., 1997). Este hallazgo resulta importante dado que actualmente no se cuenta con un tratamiento efectivo contra la ciguatera (Palafox, 1988). Desde su descubrimiento en los 1950's el DPN fue utilizado como antidiarreico hasta que fue reemplazado en la actualidad por la loperamida (Daly y Harper, 2000), nuestros resultados muestran que este tipo de opioides podrían ser buenos candidatos para el tratamiento de la ciguatera.

Existe evidencia en la literatura que indica que la MTX modula canales iónicos. En algunos tipos celulares, la MTX parece activar a canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Freedman et al., 1984; Meucci et al., 1992). En células que no poseen esta familia de canales iónicos, se ha demostrado que la MTX activa NSCC (Dietl y Völkl, 1994; Musgrave et al., 1994). En los resultados aquí presentados se sugiere que la entrada tanto de Ca^{2+} como de Na^+ a las células se lleva a cabo a través de uno o más tipos de NSCC que permean estos iones. La activación de este(os) canal(es) por la MTX depende de Ca^{2+} tanto en el medio extracelular como en el intracelular.

4. Dependencia de Ca^{2+}

La dependencia de Ca^{2+} extracelular para que la MTX produzca sus efectos es un fenómeno ampliamente reportado en la literatura y que se ha observado en muy diversos sistemas (Gusovsky y Daly, 1990; Escobar et al., 1998; Weber et al., 2000).

Aquí se demostró que la entrada de Na^+ a la célula requiere de la presencia de Ca^{2+} en la solución extracelular, lo cual difiere con un reporte donde se ve que la MTX induce canales únicos que permean Na^+ en miocitos ventriculares de cobayo (Nishio et al., 1996). Estos canales caracterizados por Nishio y colaboradores no requieren de Ca^{2+} presente en alguna de las dos caras de la membrana. Muy posiblemente los canales encargados de permitir el paso del Na^+ al interior de la célula en nuestro caso

son distintos a los encontrados por Nishio y colaboradores dado el requerimiento de Ca^{2+} para la activación de la I_{mtx} . Desafortunadamente no es posible una mejor comparación en ambos casos debido a que aquí solo estudiamos corrientes de célula entera y mediciones de la $[\text{Na}^{2+}]_i$ utilizando un indicador fluorescente (SBFI) y en la literatura solo se muestran registros de canal único.

Para que la MTX active a la I_{mtx} en las células aquí utilizadas, se requiere que la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ sea de 1.8 mM o mayor, observación que concuerda con lo ya reportado (Faivre et al., 1990; Dietl y Völkl, 1994; Leech y Habener, 1997). Sin embargo aquí es la primera vez que se hace una caracterización de la dependencia de Ca^{2+} en el medio extracelular con diferentes $[\text{Ca}^{2+}]_o$. en todos los estudios publicados solo $[\text{Ca}^{2+}]_o$ fisiológicas ($> 1.8 \text{ mM}$) son probadas. La extrema dependencia al Ca^{2+} extracelular, es decir, que a $[\text{Ca}^{2+}]_o$ menores a 1.8 mM no se active la corriente y a $[\text{Ca}^{2+}]_o$ de 1.8 mM o mayores se active totalmente la corriente, es un fenómeno muy extraño, que no se ha reportado en otros casos hasta ahora, y del que no se tiene explicación. Sin embargo es posible especular que solo se necesite la unión de una molécula de Ca^{2+} al complejo formado por la toxina y su receptor, y que por tal motivo la curva de dependencia al Ca^{2+} cambie tan drásticamente en un rango de $[\text{Ca}^{2+}]_o$ tan pequeño.

Esta dependencia de Ca^{2+} extracelular parece ser muy específica. Aquí se mostró por primera vez que otros cationes divalentes comúnmente utilizados para reemplazar la acción del Ca^{2+} como el Mg^{2+} y el Mn^{2+} , son incapaces de sustituir el efecto del Ca^{2+} en nuestro sistema, sin embargo, el Ba^{2+} puede reemplazar pobremente la acción del Ca^{2+} . Además la acción del Ca^{2+} a nivel extracelular no es reversible, una vez que se activa la I_{mtx} , aunque se quele con EGTA el Ca^{2+} extracelular, la corriente permanece activada. Esto sugiere que el Ca^{2+} no necesita pasar a través de la vía de permeación activada por la toxina, sino que podría unirse irreversiblemente a algún sitio en la membrana para permitir que la MTX ejerza su acción. Más aún, dicha unión del Ca^{2+} extracelular a alguna región externa de la membrana, probablemente una proteína, debiera ser altamente específica puesto que otros cationes divalentes no son capaces de reemplazar su acción. También existe la posibilidad de que el Ca^{2+} en el medio extracelular se una primero a la toxina para que ésta produzca su efecto en la membrana. Este es el primer estudio en donde se realiza

una caracterización tan detallada de la dependencia del Ca^{2+} extracelular en el efecto de la MTX.

También se exploró la dependencia de Ca^{2+} a nivel intracelular en la activación de la I_{mtx} . La dependencia de Ca^{2+} intracelular en fenómenos relacionados con la MTX ha sido una cuestión muy poco explorada hasta la fecha, ya que la mayoría de los estudios realizados con la toxina hacen uso de técnicas bioquímicas en donde es muy difícil la manipulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Con la técnica de patch clamp aquí utilizada, la manipulación de los niveles de Ca^{2+} intracelular se puede llevar a cabo con relativa facilidad. Hasta el momento esta es una cuestión muy debatida, de seis estudios reportados, en dos se menciona el requerimiento de Ca^{2+} a nivel intracelular (Worley et al., 1994; Leech y Habener, 1997) y en los otros cuatro se muestra que el efecto de la toxina no depende de la presencia de Ca^{2+} intracelular (Kobayashi et al., 1987; Faivre et al., 1990; Dietl y Völkl, 1994; Nishio et al., 1996). Con este panorama es difícil proponer un modelo que explique el mecanismo de acción del Ca^{2+} intracelular en la activación de la I_{mtx} .

Esta dependencia de Ca^{2+} libre a nivel intracelular es posible que sea debido a un mecanismo molecular distinto al del requerimiento de Ca^{2+} en el medio extracelular, ya que al parecer la MTX no tiene efecto cuando es aplicada en la parte interna de la membrana celular (Dietl y Völkl, 1994), esto no es muy claro, dada la posibilidad de que la toxina reconozca alguna región en la parte extracelular de su receptor y al aplicarse en la parte intracelular no sea el Ca^{2+} el factor determinante por el cual no causa un efecto, sino el reconocimiento a su blanco en la membrana. El Ca^{2+} intracelular podría pasar a través de la membrana por medio de un canal y jugar algún papel en la unión o el reconocimiento de la MTX a su receptor en la región extracelular, aunque esto no es muy probable dado que se necesitan concentraciones nanomolares de Ca^{2+} libre en el medio intracelular, como se demostró aquí, y esta cantidad del catión divalente no produciría una corriente significativa, además de que ya se cuenta con Ca^{2+} en el medio extracelular y la permeabilidad relativa del Ca^{2+} a través de la I_{mtx} es muy baja.

Se evaluó el posible reemplazo del Ca^{2+} intracelular por otros cationes divalentes. Hasta el momento no se ha reportado en la literatura ningún otro estudio al respecto. La MTX falló en activar la I_{mtx} con altas $[\text{Mg}^{2+}]_i$ libre. Sin embargo, con $[\text{Ba}^{2+}]_i$,

ESTA TESIS NO PUEDE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

libre aproximadamente 1000 veces mayores que en condiciones control se obtuvo el mismo efecto de la toxina. No se probaron $[Ba^{2+}]_i$ menores por limitaciones técnicas; el BAPTA es capaz de quelar tanto Ca^{2+} como Ba^{2+} , sin embargo su afinidad por el Ca^{2+} es mayor. Para poder quelar prácticamente todo el Ca^{2+} en el medio intracelular y además tener una $[Ba^{2+}]_i$ libre menor a la utilizada, se requieren concentraciones de BAPTA, Ca^{2+} y Ba^{2+} que provocan la muerte de las células debido a la alta osmolaridad de la solución intracelular resultante. Así que no es posible concluir si el Ba^{2+} intracelular pudiera ser o no un buen reemplazo en la acción del Ca^{2+} para que la toxina actúe. Sin embargo, dado que el Mg^{2+} no puede reemplazar al Ca^{2+} en el medio intracelular podría suponerse que el Ba^{2+} tal vez tampoco lo hiciera muy eficientemente, como se vió en el caso de la dependencia de cationes divalentes extracelulares.

Si se descarta la posibilidad de que el Ca^{2+} en el medio interno de la célula esté pasando al medio externo para jugar algún papel en el mecanismo de acción de la MTX, entonces se pueden proponer diversas posibilidades en las cuales el Ca^{2+} libre en el medio intracelular tenga que participar para inducir la acción de la toxina.

Por ejemplo, la toxina podría insertarse en la membrana como ha sido propuesto por Konoki et al., 1999 y la porción de la toxina que queda expuesta al medio intracelular estar interactuando con el Ca^{2+} disponible ahí para formar multímeros o agregados, que en realidad, sean los que provocan la activación de la I_{mtx} . Otra posibilidad es que el Ca^{2+} en el interior de la célula provea alguna interacción que facilite el reconocimiento y/o unión de la toxina con su receptor. También es posible que la MTX active procesos celulares dependientes del aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, como ya se ha demostrado (Worley et. al., 1994), y que sean los responsables de desencadenar los efectos de la toxina. Posiblemente en nuestro caso la activación del canal o canales que dan lugar a la I_{mtx} sean regulados por la $[Ca^{2+}]_i$, directa o indirectamente.

En cualquier caso, para entender mejor el mecanismo de acción de la MTX, se requiere la identificación del blanco de esta toxina en la membrana celular. Actualmente estamos trabajando en varias estrategias que nos permitan aislar al receptor de la MTX.

BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, R. y Fukuyo, Y. (1979). The thecal structure of a marine, toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* gen. et sp. nov collected in a ciguatera-endemic area. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 45, 67-71.
- Bagnis, R., Chanteau, S., Chungue, E., Hurtel, J. M., Yasumoto, T. e Inoui, A. (1980). Origins of ciguatera fish poisoning: a new dinoflagellate, *Gambierdiscus toxicus* Adachi and Fukuyo, definitely involved as a causal agent. *Toxicon* 18, 199-208.
- Batchelor, G. (1982). Ciguatera Fish Poisoning. *Oceans.* 15(2), 6.
- Bernard, V., Laurent, A., Derancourt, J., Clément-Durand, M., Picard, A., Le Peuch, C., Berta, P. y Dorée, M. (1988). Maitotoxin triggers the cortical reaction and phosphatidylinositol-4,5-biphosphate breakdown in amphibian oocytes. *Eur. J. Biochem.* 174, 655-662.
- Berta, P., Sladeczek, F., Derancourt, J., Durand, M., Travo, P. y Haiech, J. (1986). Maitotoxin stimulates the formation of inositol phosphates in rat aortic myocytes. *FEBS Letters.* 197, 349-352.
- Bielfeld-Ackermann, A., Range, C. y Korbmacher, C. (1998). Maitotoxin (MTX) activates a non-selective cation channel in *Xenopus laevis* oocytes. *Pflügers Arch.* 436, 329-337.
- Brooks, S. P. J. y Storey, K. B. (1992). Bound and Determined: A computer programme for making buffers of defined ion concentrations. *Anal. Biochem.* 201, 119-126.
- Choi, O. H., Padgett, W. L., Nishizawa, Y., Gusovsky, F., Yasumoto, T. y Daly, J. (1989). Maitotoxin: effects on calcium channels, phosphoinositide breakdown, and arachinodate release in pheochromocytoma PC12 cells. *Mol. Pharmacol.* 37, 220-230.
- Corazziari, E. (1999). Role of opioid ligands in the irritable bowel syndrome. *Can. J. Gastroenterol.* 13, Suppl A:71A-75A.
- Daly, J. W. y Harper, J. (2000). Loperamide: novel effects on capacitative calcium influx. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 149-157.
- Daly, J. W., Lueders, J., Padgett, W. L., Shin Y. y Gusovsky, F. (1995). Maitotoxin-elicited calcium influx in cultured cells. *Biochem. Pharmacol.* 50, 1187-1197.
- Dietl, P. y Völkl, H. (1994). Maitotoxin activates a nonselective cation channel and stimulates Ca^{2+} entry in MDCK renal epithelial cells. *Mol. Pharmacol.* 45, 300-305.
- Escobar, L.I., Salvador, C., Martínez, M y Vaca, L (1998). Maitotoxin, a cationic channel activator. *Neurobiology.* 6(1), 59-74.

- Estacion, M., Nguyen, H. B. y Gargus J. J. (1996). Calcium is permeable through a maitotoxin-activated nonselective cation channel in mouse L cells. *Am. J. Physiol.* 270 (*Cell Physiol.* 39), C1145-C1152.
- Faivre, J. F., Deroubaix, E., Coulombe, A., Legrand, A. M. y Coraboeuf, E. (1990). Effect of maitotoxin on calcium current and background inward current in isolated ventricular rat myocytes. *Toxicon.* 28, 925-937.
- Freedman, S.B., Miller, R.J., Miller, D.M. y Tindall D.R. (1984). Interactions of maitotoxin with voltage-sensitive calcium channels in cultured neuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4582-4585.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. y Tsien, R. Y. (1985). A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.
- Gusovsky, F., Yasumoto, T. y Daly, J. (1989). Maitotoxin, a potent, general activator of phosphoinositide breakdown. *FEBS Letters.* 243(2), 307-312.
- Gusovsky, F. y Daly, J. (1990). Maitotoxin: a unique pharmacological tool for research on calcium-dependent mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* 39(11), 1633-1639.
- Gutierrez, D., Díaz de León, L. y Vaca, L. (1997). Characterization of the maitotoxin-induced calcium influx pathway from human skin fibroblasts. *Cell Calcium.* 22(1), 31-38.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. y Sigworth F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv.* 391, 85-100
- Harootunian, A. T., Kao, J. P., Eckert, B. Y. y Tsien, R. Y. (1989). Fluorescence ratio imaging of cytosolic free Na^+ in individual fibroblasts and lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 264, 19458-19467.
- Kobayashi, M., Miyacoda, G., Nakamura, T. y Ohizumi, Y. (1985). Ca-dependent arrhythmogenic effects of maitotoxin, the most potent marine toxin known, on isolated rat cardiac muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 111, 121-123.
- Kobayashi, M., Goshima, K., Ochi, R. y Ohizumi, Y. (1987a). Arrhythmogenic action of maitotoxin in guinea pig and rat cardiac muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 142, 1-8.
- Kobayashi, M., Ochi, R. y Ohizumi, Y. (1987b). Maitotoxin-activated single calcium channels in guinea pig and rat cardiac cells. *Br. J. Pharmacol.* 92, 665-671.
- Konoki, K., Hashimoto, M., Murata, M. y Tachibana, K. (1999). Maitotoxin-induced calcium influx in erythrocyte ghosts and rat glioma C6 cells, and blockade by gangliosides and other membrane lipids. *Chem Res. Toxicol.* 12(10), 993-1001.

- Lawrence, D. N., Enriquez, M., Lumish, R. y Maceo, A. (1980). Ciguatera fish poisoning in Miami. *J. Am. Medical Assoc.* 244(3), 254-258.
- Lebrun, P., Hermann, M., Yasumoto, T. y Herchuelz, A. (1987). Effects of maitotoxin on ionic and secretory events in rat pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144, 172-177.
- Leech, C. A. y Habener, J. F. (1997). Insulinotropic glucagon-like peptide-1-mediated activation of non-selective cation currents in insulinoma cells is mimicked by maitotoxin. *J. Biol. Chem.* 272, 17987-17993.
- Legrand, A. M. y Bagnis, R. (1984). Effects of ciguatoxin and maitotoxin on isolated rat atria and rabbit duodenum. *Toxicon.* 22, 471-475.
- Meucci, O., Grimaldi, M., Scorziello, A., Govoni, S., Bergamaschi, S., Yasumoto, T. y Schettini, G. (1992). Maitotoxin-induced intracellular calcium rise in PC12 cells: Involvement of dihydropyridine-sensitive and ω -conotoxin-sensitive calcium channels and phosphoinositide breakdown. *J. Neurochem.* 59, 679-688.
- Murata, M., Gusovsky, F. y Daly, J. W. (1992). Selective stimulation of Ca^{2+} flux in cells by maitotoxin. *Eur. J. Pharmacol.* 227, 43-49.
- Murata, M., Naoki, H., Matsunaga, S., Satake, M. y Yasumoto, T. (1994). Structure and partial stereochemical assignments for maitotoxin, the most toxic and largest natural non-biopolymer. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 7098-7107.
- Musgrave, F., Seifert, R. y Schultz, G. (1994). Maitotoxin activates cation channels distinct from the receptor-activated non-selective channels of HL-60 cells. *Biochem. J.* 301, 437-441.
- Nishio, M., Muramatsu, I. y Yasumoto, T. (1996). Na^{+} -permeable channels induced by maitotoxin in guinea-pig single ventricular cells. *Eur. J. Pharmacol.* 297, 293-298.
- Ohizumi, Y. y Yasumoto, T. (1983a). Contractile response of the rabbit aorta to maitotoxin, the most potent marine toxin. *J. Physiol. (London).* 337, 711-721.
- Ohizumi, Y. y Yasumoto, T. (1983b). Contraction and increase in tissue calcium content induced by maitotoxin, the most potent known marine toxin, in intestinal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 79, 3-5.
- Ohizumi, Y., Kajiwara, A. y Yasumoto, T. (1983). Excitatory effect of the most potent marine toxin, maitotoxin, on the guinea pig vas deferens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 227, 199-204.

Ohizumi, Y., Kobayashi, M., Kajiwara, A. y Yasumoto, T. (1985) En: Toxic Dinoflagellates, eds. Anderson, D. y White, A. W. pp. 369-374, Elsevier, New York.

Palafox, N. A., Jain, J. G., Pinano, A. Z., Gulick, T. M., Williams, R. K. y Schatz, I. J. (1988). Successful treatment of ciguatera fish poisoning with intravenous mannitol. *J. Am. Med. Assoc.* 259(18), 2740-2742.

Pin, J-P., Yasumoto, T. y Bockaert, J. (1988). Maitotoxin-evoked γ -aminobutyric acid release is due not only to the opening of calcium channels. *J. Neurochem.* 50, 1227-1232.

Sasaki, M., Matsumori, N., Maruyama, T., Nonomura, T., Murata, M., Tachibana, K., y Yasumoto, T. (1996). The complete structure of maitotoxin, part I: Configuration of the C1-C14 side chain. *Angew. Chem., Int. Ed.* 35, 1672-1675.

Schilling, W. P., Sinkins, W. G. y Estacion M. (1999a). Maitotoxin activates a nonselective cation channel and a P2Z/P2X₇-like cytolytic pore in human skin fibroblasts. *Am. J. Physiol.* 277 (Cell Physiol. 46), C755-C765.

Schilling, W. P., Wasyllyna, T., Dubyak, G. R., Humphreys, B. D. y Sinkins, W. G. (1999b). Maitotoxin and P2Z/P2X₇ purinergic receptor stimulation activate a common cytolytic pore. *Am. J. Physiol.* 277 (Cell Physiol. 46), C766-C776.

Shalaby, I. A., Kongsamut, S. y Miller, R. J. (1986). Maitotoxin-induced release of γ -[³H]aminobutyric acid from cultures of striatal neurons. *J. Neurochem.* 46, 1161-1165.

Sladeczek, F., Schimidt, B., Alonso, R., Vian, L., Tep, A., Yasumoto, T., Cory, R. y Bockaert, J. (1988). New insights into maitotoxin action. *Eur. J. Biochem.* 174, 663-670.

Soto, H., Massó, F., Cano, S. y Díaz de León, L. (1996). Effects of Mebendazole on protein biosynthesis and secretion in human-derived fibroblast cultures. *Biochem. Pharmacol.* 52, 289-299.

Takahashi, M., Ohizumi, Y. y Yasumoto, T. (1982). Maitotoxin, a Ca²⁺ channel activator candidate. *J. Biol. Chem.* 257, 7287-7289.

Takahashi, M., Tatsumi, M., Ohizumi, Y. y Yasumoto, T. (1983). Ca²⁺ channel activating function of maitotoxin, the most potent marine toxin known, in clonal rat pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* 258, 10944-10949.

Tsien, R. W., Lipscombe, D., Madison, D. V., Bley, K. R. y Fox, A. P. (1988). Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *TINS.* 11, 431-438.

Villee, C. A., Solomon, E. P., Martin, C. E., Martin, D. W., Berg, L. R. y Davis, P. W. (1992) Biología, pp. 532-533. Nueva Editorial Interamericana, S. A. de C. V., México D. F.

- Weber, W. M., Popp, C., Clauss, W. y Driessche, W. V. (2000). Maitotoxin induces insertion of different ion channels into the *Xenopus* oocyte plasma membrane via Ca^{2+} -stimulated exocytosis. *Pflügers Arch.-Eur. J. Physiol.* 439, 363-369.
- Worley, F. J., McIntyre, M. S., Spencer, B. y Dukes, I. D. (1994). Depletion of intracellular Ca^{2+} stores activates a maitotoxin-sensitive nonselective cationic current in β -cells. *J. Biol. Chem.* 269, 32055-32058.
- Yasumoto, T., Bagnis, R. y Vernoux, J. P. (1976). Toxicity study of surgeon fishes-II. Properties of the principal water-soluble toxin. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 42, 359-365.
- Yasumoto, T., Nakajima, I., Bagnis, R. y Adachi, R. (1977) Finding of a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 43, 1021-1025.
- Yasumoto, T., Nakajima, I., Oshima, Y., y Bagnis, R. (1979). A new toxic dinoflagellate found in association with ciguatera, En: Toxic Dinoflagellate Blooms, eds. Taylor, D. L. y Seliger, H. pp. 65. Elsevier North Holland Inc., New York.
- Yasumoto, T. y Satake, M. (1996). Chemistry, etiology and determination of methods of ciguatera toxins. *J. Toxicol. Toxin Review.* 15, 91-107.
- Yokoyama, A., Murata, Y., Oshima, Y., Iwashita, T. y Yasumoto, T. (1988). Some chemical properties of maitotoxin, a putative calcium channel agonist isolated from a marine dinoflagellate. *J. Biochem.* 104, 184-187.
- Yoshii, M., Tsunoo, A., Kuroda, Y., Wu, C. H. y Narahashi, T. (1987). Maitotoxin-induced membrane current in neuroblastoma cells. *Brain Research.* 424, 119-125.
- Young, R. C., McLaren, M. y Ramsdell, J. S. (1995). Maitotoxin increases voltage independent chloride and sodium currents in GH4C1 rat pituitary cells. *Natural Toxins.* 3, 419-427.
- Zhao, H., Xu, X., Diaz, J. y Muallem, S. (1995). Na^+ , K^+ , and $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ transport in submandibular salivary ducts. Membrane localization of transporters. *J. Biol. Chem.* 270, 19599-19605.
- Zheng, W., DeMattei, J. A., Wu, J. P., Duan, J. J.-W., Cook, L. R., Oinuma, H., y Kishi, Y. (1996) Complete relative stereochemistry of maitotoxin. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 7946-7968.