



11281
34

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

**CARACTERIZACION DE LAS VIAS ACTIVADAS
POR LA MAITOTOXINA EN CELULAS DE
MAMIFERO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
P R E S E N T A
VERONICA MORALES TLALPAN

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS VACA DOMINGUEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, D.F. 2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**Este trabajo se realizó en el Instituto de Fisiología
Celular de la U.N.A.M.,
bajo la asesoría del Dr. Luis Vaca Domínguez**

**A MARGARITA Y PABLO,
ALE, PABLO, MAGO, DAVID Y OSWALDO
A DENY, WENDY Y MARTIN
A FRANCISCA Y DAVID
A CARLOS**

Gracias por siempre.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Vaca. Por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio.

A los Doctores Alejandro Zentella Dehesa, Edgar P. Heimer y Lino Díaz de León (Q.E.P.D.). Quienes junto con el Dr. Luis Vaca formaron mi comité tutorial. Agradezco el haberme permitido discutir con ustedes los resultados de este trabajo. Gracias por todas las sugerencias y por todo su apoyo.

A los doctores que amablemente revisaron esta tesis

Dr. Roberto Coria.

Dra. Laura Escobar.

Dr. Arturo Hernández Cruz.

Dr. Diego González Halphen.

Dr. Antonio Peña.

Dr. Lourival Possani.

Dr. Luis Vaca.

Muchas gracias por el tiempo que dedicaron a la lectura de este manuscrito, sus comentarios y sugerencias enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Julio Moran y a Ma. Eugenia Araiza. Por su disposición y paciencia que tuvieron conmigo

Al Dr. Juan Ramón Paniagua y al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por su apoyo durante la realización de mis estudios de posgrado.

Al Lic. en IBB Juan Ramón Martínez por la ayuda en la realización de esta tesis.

A la M en C. Alicia Sampieri por su excelente apoyo técnico.

A la Sra. Gloria Salgado Cortés. Por su trabajo que nos permite realizar el nuestro.

A Javier Gallegos y a Raúl Zarate. Por su excelente apoyo en la biblioteca.

A Ivett Rosas y Juan Manuel Barbosa. Ambos de la unidad de computo. Por ayuda y disposición.

Este trabajo se realizó con el apoyo de CONACYT y D. G. A. P. A

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A Luis Vaca. Muchas gracias por ser mi amigo además de mi maestro.

A mis amigos:

Anaid y Claudia.

Male y José.

Lupita.

Simón.

Juan R.

Velia, Benito, Noventio y Ricardo.

Jorge Ramírez y Pedro Ostoa.

Jania y Angélica Z.

Alicia y Gloria.

Fernando R. y Juan F.

Beto, Luis R., Ariosto y J. David

Jacqueline, Marina, Alicia y Angélica.

A todos mis compañeros del laboratorio.

Alfonso. Gracias por todo.

A mis Tios, primos y Abuelitos.

A Graciela, Felipe, Rosa, Martha, Sergio, Graciela, Mayra, Alfonso, Yolanda, Rebeca y Alberto.

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
LA CIGUATERA	5
Breviario de la Ciguatera	5
Peces Ciguatóxicos	6
Sintomatología y Tratamiento	6
La fuente de ciguatoxinas: el dinoflagelado <i>Gambierdiscus toxicus</i>	7
El uso de las toxinas marinas como una herramienta farmacológica	10
MAITOTOXINA	10
Estructura	11
Naturaleza del receptor a la Maitotoxina	13
Un receptor de naturaleza no proteica	13
Un receptor de naturaleza proteica	14
POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MTX	15
Efecto sobre el Ca^{2+} intracelular	15
Inhibidores de la respuesta a MTX	16
La MTX activa una corriente catiónica no selectiva	16
Regulación del canal catiónico no selectivo activado por la Maitotoxina	18
EFFECTOS SECUNDARIOS	19
Hidrólisis de fosfoinosítidos	19
Liberación de hormonas y neurotransmisores	20
Contracción muscular	21
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES	24
METODOLOGÍA	25
Cultivo Celular	25
Mediciones de $[Ca^{2+}]_i$ y $[Na^+]_i$.	25
Mediciones de la actividad de Lactato Deshidrogenasa (EC 1.1.27)	26
Clonación de <i>src</i> activa e inactiva en el vector de expresión pCDNA3	27
Transfección de Células.	27
RESULTADOS	28
Sección I "Modulation of the Maitotoxin response by intracellular and extracellular cations"	29
Abstract	31
Introduction	31
Material and Methods	32

Results	33
Discussion	36
References	37
Sección II "Efecto de los inhibidores de cinasas de tirosina y la sobreexpresión protefna <i>src</i> en la entrada de Ca ²⁺ inducida por la Maitotoxina"	39
Cinasas con especificidad en residuos de tirosina	40
Inhibidores con especificidad en residuos de tirosina	43
Efecto de la genisteína y la tirfostina	44
El papel de la <i>src</i> en la respuesta a la Maitotoxina	48
ARTICULOS ANEXOS	50
"Characterization of the Maitotoxin-activated cationic current from human skin fibroblast."	51
Summary	51
Introduction	51
Methods	52
Results	53
Discussion	56
References	58
DISCUSIÓN	59
PERSPECTIVAS	65
BIBLIOGRAFÍA	66

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
A23187	Ionóforo de Ca^{2+} ; ácido monocarboxílico de <i>Streptomyces chartreusensis</i>
AMPc	Adenosina 3' 5' monofosfato cíclico
APC	Poros apical característico
ATP	Adenosina trifosfatada
[ion]	Concentración(es) del ión
[ion] _i	Concentración(es) intracelular(es) del ión
[ion] _e	Concentración(es) extracelular(es) del ión
ASCI	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
CIP	Fosfatasa alcalina
COP	Poros citofríticos/oncóticos
CTX	Ciguatoxina
Da	Daltones
DAG	Diacilglicerol
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DPN	Difenoxilato
DTT	Ditiotreitrol
EDTA	Acido Etilendiamintetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGTA	Acido Etilen Glicol-bis(β-aminoetil Eter) N,N,N',N'-Tetraacético
ER	Endonucleasa de Restricción
FBS	Suero fetal bovino
FMLP	fMet-Leu-Phe
GABA	Acido γ-aminobutírico
GHK	Ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz
GLP-1	glucagon-like-peptide-1; péptido 1 parecido al glucagón
HBSS	Solución salina balanceada de Hank
HEPES	Ácido N-(2-Hidroxi)etil)piperazin-N'-(2-Etanosulfónico)
I	Corriente eléctrica
I _{mix}	Corriente activada por la Maitotoxina
IP ₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
LDH	Lactato Deshidrogenasa
MTX	Maitotoxina
NADH	Forma reducida del Nicotina adenina dinucleótido
NE	Norepinefrina
NMDG	N-Metil-D-Glucamina
NSCC	Canales catiónicos no selectivos
NSCC-MTX	Canal catiónico activado por MTX
P _{ion}	Permeabilidad relativa del ión
PACAP	Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Pituitaria
PDBu	forbol 12, 13-dibutirato
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SBF1	Indicador Fluorescente de Na ⁺
SF	Solución fisiológica
src	gene humano homologo al gene virus del sarcoma de Rous
TEA	Tetraetilamonio
TRP	Receptor del potencial transitorio
V	Voltaje
VDCC	Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje

RESUMEN

La ciguatera es una intoxicación en humanos producida por la ingestión de pescado contaminado con toxinas del dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus*. Este dinoflagelado produce dos toxinas que han sido involucradas en la ciguatera: la ciguatoxina (CTX) y la Maitotoxina (MTX). La actividad farmacológica de esta última se ha analizado en diversas células, y se ha demostrado que activa una entrada de Ca^{2+} .

El presente trabajo se enfoca al estudio de las vías activadas por la MTX en células de mamífero.

Encontramos que la MTX activa una entrada de Ca^{2+} y de Na^+ en fibroblastos de piel de humano y en células CHO. La respuesta a la MTX en ambos tipos celulares depende de la concentración de toxina utilizada. La respuesta es modulada por el Na^+ y el Ca^{2+} extracelular y por el Ca^{2+} intracelular. La elevación del Ca^{2+} intracelular potencia la entrada de Ca^{2+} inducida por la MTX. En ausencia de Ca^{2+} extracelular, la elevación del Ca^{2+} intracelular es suficiente para reestablecer parcialmente la entrada del Na^+ inducida por la MTX.

La entrada de Ca^{2+} y Na^+ inducida por la MTX disminuye parcialmente con inhibidores de cinasas de tirosina. La expresión de una forma constitutivamente activa de *src* (proteína cinasa de tirosina) potencia la entrada de Ca^{2+} inducida por la MTX.

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis apuntan fuertemente a que la MTX puede activar una cascada de señalización mediante la activación de un receptor de membrana plasmática.

ABSTRACT

Ciguatera is a human poisoning caused by consumption of seafood contaminated with toxin from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. This dinoflagellate produces two types of toxins involved in the ciguatera poisoning: ciguatoxin (CTX) and maitotoxin (MTX). The pharmacological activities of this last toxin are analyzed in different cells, and elicit Ca^{2+} influx in all the cells and tissues tested.

The present work focuses at the study of the pathways activated by MTX in mammalian cells.

We found that the MTX activates Ca^{2+} and Na^{+} influx in human skin fibroblasts and CHO cells. The MTX response in both cell types is dose-dependent. Extracellular Ca^{2+} and Na^{+} , and intracellular Ca^{2+} modulate the MTX response. The intracellular Ca^{2+} potentiates the MTX response. In the absence of extracellular calcium, the intracellular Ca^{2+} increment is sufficient to partially reestablish the Na^{+} influx induced by MTX.

Protein tyrosine kinase inhibitors decreased the Ca^{2+} and Na^{+} influx induced by MTX. The overexpression of a constitutively active mutant of *src*, a protein tyrosine kinase, enhances the MTX response.

All the results presented here strongly suggest the presence of a MTX receptor at the plasma membrane, responsible for mediating the MTX effects on calcium influx and activation of tyrosine kinases.

INTRODUCCIÓN

Las algas microscópicas desempeñan un papel muy importante en los ecosistemas marinos por su actividad fotosintética, ya que son las principales productoras de biomasa y de compuestos orgánicos, además de formar parte importante de la cadena alimenticia marina.

La proliferación de estas algas es un fenómeno natural, que ha ocurrido desde hace millones de años. El aumento de estos microorganismos marinos (la tasa normal es de 1×10^6 células/ml de agua) es benéfico para la acuicultura, pero en algunas circunstancias tiene efectos negativos sobre los ecosistemas. Por ejemplo, en las últimas décadas, la proliferación de microalgas se ha convertido en un serio problema a nivel mundial, porque causa un gran impacto ambiental que se traduce en enormes pérdidas económicas y serios problemas de salud para el hombre (Daranas y cols., 2001)

Aunque se conocen alrededor de 5000 especies de algas microscópicas marinas, solo 300 pueden proliferar, y de estas algunas pueden ser identificadas a simple vista por el hombre, como las algas causantes de las mareas rojas y cafés. Alrededor de 40 especies tienen la capacidad de producir toxinas que afectan al hombre.

La proliferación masiva de algas se ha clasificado en 3 grupos principales, de acuerdo con el tipo de problema que causa. El primer grupo está formado por especies no tóxicas; al segundo grupo pertenecen las algas productoras de toxinas que no afectan al hombre, y el tercer grupo está integrado por especies que producen potentes toxinas que afectan al hombre, como el caso de la ciguatera.

LA CIGUATERA

La ciguatera es un envenenamiento en humanos causado por la ingestión de pescado contaminado proveniente de zonas tropicales. Esta es la intoxicación en humanos más común causada por el consumo de productos marinos. En regiones tropicales tales como el Océano Pacífico y el Caribe, es la intoxicación que afecta a más personas. Sin embargo, la intoxicación no se restringe sólo a las zonas tropicales, pues se han descrito brotes de ciguatera en regiones alejadas de estas zonas; esto se debe a que ha aumentado la exportación de pescado proveniente de arrecifes, por lo que la ciguatera se ha convertido en un serio problema de salud a nivel mundial. Por otro lado, el cuadro clínico de esta intoxicación es muy complejo, lo que impide una estimación real del número de casos, ya que suele no ser diagnosticada adecuadamente.

BREVIARIO DE LA CIGUATERA.

La identificación de la ciguatera fue el resultado de una intensa búsqueda experimental, lo que permitió una mayor comprensión de la etiología de esta intoxicación. Entre los hallazgos más importantes podemos mencionar los siguientes:

- ❖ Randall (1958) propuso que las toxinas son introducidas en la cadena alimenticia a través de peces herbívoros que se alimentan de macroalgas.
- ❖ Helfrich y Banner (1963), demostraron que había poblaciones de peces tóxicos y no tóxicos, y que las toxinas podían pasar a través de la cadena alimenticia sin dañar aparentemente al portador.
- ❖ Scheuer (1967) aisló por primera vez a la ciguatoxina (CTX) de la carne de morena.
- ❖ Yasumoto (1977) logró identificar al dinoflagelado que produce las ciguatoxinas.

- ❖ Murata (1989) describió la estructura química de las principales ciguatoxinas y de los precursores de éstas.
- ❖ Recientemente se han identificado toxinas parecidas a las ciguatoxinas. Sin embargo, existe muy poca información acerca de su mecanismo de acción, debido a que los efectos fisiológicos son muy variados.

PECES CIGUATÓXICOS

Halstead (1967) sugirió que pueden considerarse al menos 400 especies de peces como potencialmente ciguatóxicos; sin embargo, no todas las especies son comestibles. Como ya se ha mencionado, los peces intoxicados muestran una apariencia normal, excepto cuando los niveles de toxinas son muy elevados, en cuyo caso pueden presentar cambios en su conducta de nado.

También se ha encontrado que los peces muestran diversos grados de toxicidad, que depende básicamente del hábitat y del tipo de alimentación. Los peces más venenosos suelen habitar en zonas muy cercanas a los arrecifes; por otra parte, los peces de arrecifes cercanos pueden no estar contaminados, y esto se debe principalmente a que no hay migración de peces entre arrecifes vecinos. Algunos peces pueden presentar un bajo nivel de ciguatoxinas; sin embargo, este nivel puede aumentar después de una proliferación masiva de dinoflagelados tóxicos (Lehane y cols., 2000)

Esta capacidad de los peces como portadores asintomáticos complica enormemente la implantación de medidas preventivas durante la pesca, lo que hace muy difícil contender con esta enfermedad.

SINTOMATOLOGÍA Y TRATAMIENTO

Existe muy poca información acerca de la sintomatología de la ciguatera en los humanos y otros mamíferos. Los síntomas se desencadenan entre 1 y 30 horas después del consumo; generalmente son gastrointestinales (náuseas,

vómito, dolores abdominales y diarrea), neurológicos (mareo, convulsiones), y cardiovasculares (Lehane 2000).

Algunos de estos síntomas pueden persistir por meses, años o recurrir periódicamente. Sin embargo, en casos extremadamente severos se puede presentar el coma y la muerte. En las islas del Pacífico se han utilizado tratamientos tradicionales para combatir esta intoxicación. Existen alrededor de 64 especies de plantas que se cree previenen o curan la ciguatera, algunas de ellas con propiedades antidiarréicas. La eficiencia real de este tratamiento y el posible mecanismo de acción de los principios activos permanecen desconocidos a la fecha.

El tratamiento más utilizado en la mayoría de los países es el manitol por vía intravenosa, que es un agente diurético que induce el movimiento de agua intracelular hacia el espacio extracelular, reduce la entrada de Na^+ y aumenta la salida de agua de la célula. Sin embargo el mecanismo mediante el cual el manitol ejerce su efecto es desconocido.

Recientemente se ha utilizado la gabapentina para el tratamiento de la ciguatera (Pérez C. M. y cols., 2001). Este fármaco es anticonvulsivo, con un mecanismo de acción similar al de los agentes antiepilépticos; además se sabe que se une a la subunidad $\alpha 2$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje (Gee y cols., 1999). El mecanismo por el cual alivia los síntomas de la ciguatera se desconoce.

LA FUENTE DE CIGUATOXINAS: EL DINOFLAGELADO *Gambierdiscus toxicus*.

La hipótesis de que el organismo responsable de la ciguatera es una alga marina fue postulada originalmente por Randall (1958). Este investigador basó su hipótesis en las siguientes observaciones:

1. Los peces se envenenan debido a un factor en el ambiente.

2. El envenenamiento está asociado a la fuente alimenticia
3. El organismo que produce las ciguatoxinas es de vida libre y posiblemente sea un alga.
4. La toxina se transmite a través de la cadena alimenticia a los peces y de éstos al humano.

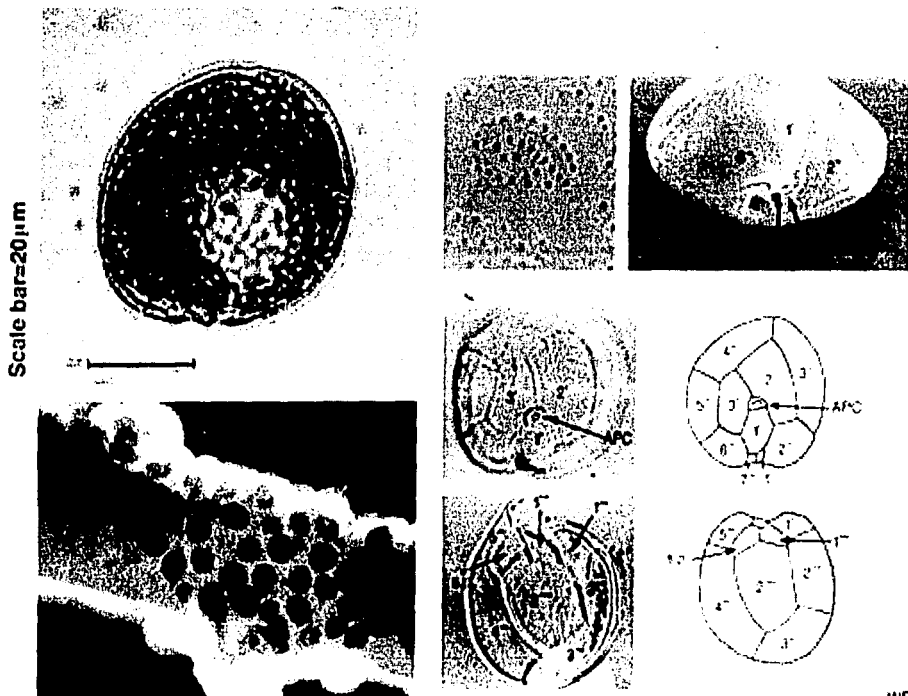
En 1977 Yasumoto y cols., reportaron que el dinoflagelado *Diplopsalis sp.* era el responsable de la ciguatera. Este dinoflagelado se encontró en muestras de detritus colectadas de la superficie de los corales muertos en las Islas Gambier en la Polinesia Francesa. De las muestras colectadas se logró extraer dos fracciones, una soluble en éter, y la otra soluble en agua. Ambas muestras se compararon tomando como referencia las ciguatoxinas extraídas de hígado de la morena. La primera fracción era indistinguible de las ciguatoxinas encontradas en las morenas y la segunda fracción se identificó como la Maitotoxina (MTX), la cual ya había sido aislada del pez vela (Murata y cols., 2000).

Posteriormente el *diplopsalis sp.* fue renombrado *Gambierdiscus toxicus* por Adachi y Fukoyo en 1979. Las características principales de *G. toxicus* son las siguientes: mide alrededor de 80 micras, es una especie fotosintética, su tasa de crecimiento es lenta (ocurre una división aproximadamente cada 3 días), habita en los arrecifes de coral, aunque suele encontrarse asociada a las macroalgas del arrecife y de la arena.

Se han reportado al menos 30 especies de dinoflagelados que pueden producir compuestos bioactivos; que incluyen a las toxinas que están consideradas como las más potentes conocidas hasta la fecha (Lehane 2000).

Muy probablemente, la sintomatología de la ciguatera se deba a la combinación de diferentes tipos de toxinas o metabolitos que pueden ser producidos por uno o más dinoflagelados; sin embargo, el organismo que se encuentra en mayor abundancia en la mayoría de las algas (que sirven de alimento para los peces herbívoros) es *G. toxicus*; esto sugiere fuertemente que

este dinoflagelado es el principal agente causante de la ciguatera (Lehane y cols., 2000).



Gambierdiscus toxicus Adachi et Fukuyo

WESTPAC-HAB
IOC Harmful Algal Bloom Programme

T0002

Photomicrograph by Yasuwo Fukuyo

Figura 1: *Gambierdiscus toxicus*, el agente causante de la ciguatera. *G. toxicus* es un organismo unicelular (ver el recuadro superior de la izquierda) que normalmente se encuentra asociado con algas (ver el recuadro inferior a la izquierda).

G. toxicus, presenta un poro apical característico (APC), además de pequeños poros distribuidos uniformemente en la superficie de la célula y una cavidad profunda como se puede observar en la figura superior derecha.

La pared celular de estos organismos está dividida en placas de celulosa, conocidas como tecas. La clasificación se realiza tomando en cuenta la distribución geométrica y topológica de estas estructuras (ver recuadros inferiores a la derecha).

EL USO DE LAS TOXINAS MARINAS COMO UNA HERRAMIENTA FARMACOLÓGICA.

De los organismos marinos se ha aislado un gran número de sustancias fisiológicamente activas, entre las cuales se pueden mencionar a algunas neurotoxinas, como la tetrodotoxina, la saxitoxina, y las toxinas de las anémonas. Algunas de ellas se han caracterizado farmacológica y fisiológicamente, y se han encontrado sus moléculas blanco. Esta información ha permitido realizar estudios bioquímicos, fisiológicos y electrofisiológicos.

Las toxinas marinas pueden ser de origen proteico y no proteico. La gran mayoría de los organismos producen toxinas polipeptídicas; sin embargo, también existen toxinas de origen no peptídico y usualmente los organismos que las producen son los dinoflagelados. Las toxinas marinas como el ácido okadaico, las brevetoxinas, ciguatoxinas, palitoxinas, y la maitotoxina han atraído la atención por sus complicadas estructuras, así como su gran potencia biológica. Estos compuestos son policíclicos, mediante enlaces de tipo éter, y múltiples grupos hidroxílicos (Mebs 2001). Variando considerablemente en estructura y función entre especies, familias y géneros. Los mecanismos por los cuales actúan estas toxinas no han sido bien estudiados.

MAITOTOXINA

La maitoxina es una de las toxinas marinas más potentes conocidas a la fecha; se detectó y aisló por primera vez en el pez Maito (de ahí su nombre); es una de las toxinas involucradas en la ciguatera. Una de sus características más importantes es su alta actividad biológica; se ha reportado que la toxicidad en ratones por inyección intraperitoneal es de 50ng/kg, lo cual implica que un 1 mg de MTX puede matar a 200,000 de ratones (de aproximadamente 100 g de peso). Además de su alta potencia, esta toxina puede inducir diversas respuestas fisiológicas, como resultado de la elevación del Ca^{2+} citoplasmático.

La elevación del Ca^{2+} intracelular en prácticamente todas las células estudiadas por la MTX, ha permitido utilizarla como una potente herramienta en el estudio de procesos celulares en donde se desea manipular la concentración de Ca^{2+} intracelular; de aquí se desprende su relevancia como una herramienta farmacológica de gran utilidad.

ESTRUCTURA

Para llegar a determinar la estructura completa de esta toxina, se realizaron cultivos a gran escala durante 10 años con una cepa de *G. toxicus* asilada de las islas Gambier. Después de exhaustivos análisis se logró proponer un esquema de purificación. Sin embargo, cabe destacar que de 4000 l de cultivo se logró aislar apenas 20 mg de toxina (Murata y cols., 2000).

La estructura química de la MTX fue determinada por métodos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear (RMN) (Murata y cols., 1994) y por síntesis química (Sasaki y cols., 1996; Zheng y cols., 1998). Estos estudios han permitido estimar el peso molecular, la composición y la naturaleza de la toxina.

La MTX es un poliéter de 3422 Da; excede a la palitoxina por más de 758 Da, y es el biopolímero no peptídico más grande hasta ahora descrito. Como se puede observar en la figura 2, la estructura química comprende una cadena carbonada de 142 C, 32 éteres cíclicos, 28 grupos hidroxilo y 2 éteres sulfatados. La presencia de grupos hidroxilo y los grupos sulfato ionizados proporciona a la molécula características hidrofílicas o polares, pero la presencia de una porción hidrofóbica le confiere una naturaleza anfifílica (Escobar y cols., 1998).

La distribución de la polaridad de esta molécula sugiere que la MTX puede ensamblarse en la membrana y formar una estructura semejante a un poro, como se ha sugerido para la primesina (Murata y cols., 2000).

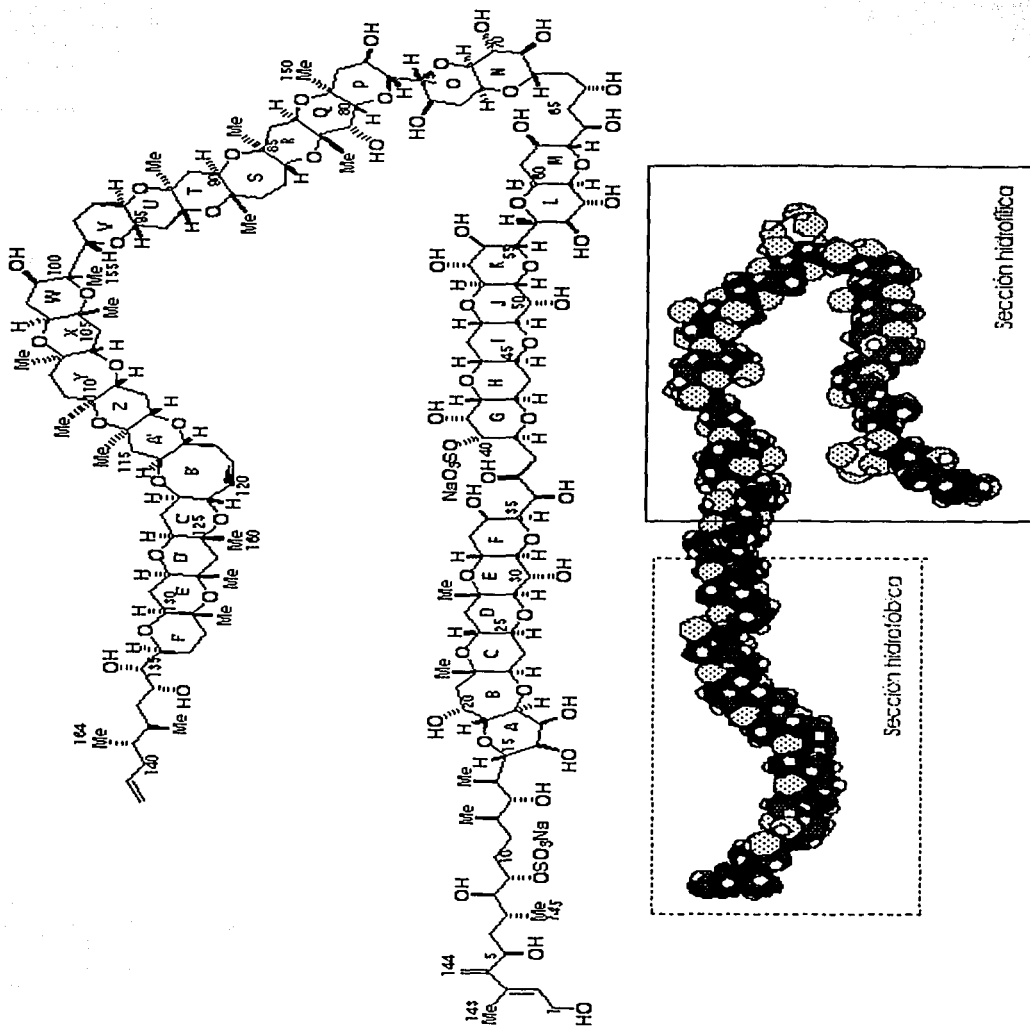


Figura 3: Estructura de la maitotoxina (MTX), reportada en 1993 por Murata. La estructura química comprende una cadena carbonada de 142 C, 32 éteres cíclicos, 28 grupos hidroxilo y 2 éteres sulfatados, con un peso molecular de 3422 Da. La determinación de la estructura ha sido uno de los más grandes logros en el campo de los productos químicos naturales, debido a su complejidad. En la parte inferior se muestra una de las posibles conformaciones de la MTX, la cual se obtuvo mediante cálculos por computadora (Murata y cols., 2000).

NATURALEZA DEL RECEPTOR A LA MAITOTOXINA

Muchos experimentos se han encaminado a la identificación de un posible receptor a la MTX. Bien podría suponerse que las características físicas de este receptor fueran comunes en todos los tipos celulares; esta observación se fundamenta en la respuesta universal a la MTX: la elevación del Ca^{2+} intracelular.

La acción biológica de esta toxina se ha estudiado por más de 2 décadas en células en cultivo provenientes de tejidos excitables y no excitables (Gusovsky y cols., 1990). En todos estos sistemas la MTX estimula una entrada de Ca^{2+} ; es decir, la respuesta universal a la MTX es la elevación de Ca^{2+} intracelular.

En experimentos utilizando mitocondrias y sinaptosomas se ha demostrado que la MTX no posee actividad ionofórica, lo que ha permitido suponer que debe estar reconociendo algún receptor en la membrana plasmática. El hecho de que la MTX tenga actividad biológica en prácticamente todas las células estudiadas, sugiere que el receptor de esta toxina y sus vías de señalización deben estar ampliamente distribuidos, o conservados.

A la fecha se han postulado dos hipótesis sobre la posible naturaleza del receptor a la MTX.

UN RECEPTOR DE NATURALEZA NO-PROTEICA

Uno de los componentes más abundantes en las membranas celulares son los glicolípidos, compuestos con cadenas de carbohidratos de longitud variable que están unidos de manera covalente a los lípidos (Darnell, 1990).

Los gangliósidos son los esfingo-glicolípidos más complejos; están constituidos por una cadena de oligosacáridos con al menos un residuo de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) unido a la ceramida (Stryer 1995). Los gangliósidos forman parte del grupo más complejo de los esfingo-glicolípidos. Estas moléculas son parte fundamental en el reconocimiento célula-célula;

probablemente juegan un papel de gran importancia en el crecimiento y diferenciación de los tejidos (Voet, 1995)

Los gangliósidos pueden autoagregarse, y este fenómeno puede inducir la formación de grupos estables de gangliósidos en las membranas. Se ha sugerido que la MTX se puede incorporar al agregado de gangliósidos (Konoky y cols., 1999). Este mecanismo hipotético propone que la MTX penetra a la membrana por su porción hidrofóbica, mientras que su porción hidrofílica queda expuesta hacia el exterior celular.

UN RECEPTOR DE NATURALEZA PROTEICA.

Esta hipótesis se basa principalmente en los resultados obtenidos por varios grupos independientes, los cuales demostraron que el tratamiento con tripsina, tanto intracelular (Leech y cols., 1998) como extracelular (Gutiérrez y cols., 1997), elimina el efecto de la MTX sobre varios tipos celulares. Además se ha reportado que la digestión con esta proteasa no afecta la liberación de Ca^{2+} de las pozas intracelulares cuando se estimula con tpsigargina (Gutiérrez y cols., 1997).

La teoría del gangliósido no descarta la posible asociación de la MTX con las proteínas de la membrana. La MTX se podría integrar a la membrana y desplazarse a lo largo de la bicapa lipídica hasta asociarse con proteínas específicas; en este caso, la porción hidrofóbica sería el sitio de reconocimiento de su(s) molécula(s) blanco. Sin embargo, se desconoce hasta ahora la entidad molecular del receptor; esto se debe a varios factores, y a la complicada estructura de la toxina, que impide modificarla químicamente para realizar estudios de fijación específica (binding), su tendencia a adherirse al vidrio, y además de la dificultad que presenta su purificación.

POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MTX

EFECTO SOBRE EL Ca^{2+} INTRACELULAR.

La MTX provoca un aumento 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). En todas las preparaciones el margen efectivo de acción de la MTX oscila entre el orden femtomolar y el bajo nanomolar.

En las mitocondrias, sinaptosomas y en membranas lipídicas artificiales se ha demostrado que la MTX carece de actividad ionofórica (Takahashi y cols., 1983). La entrada del Ca^{2+} inducida por la MTX es relativamente lenta ($t_{1/2} > 1$ min) y gradual, en contraste con la respuesta de los ionóforos de Ca^{2+} que causan una elevación inmediata del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Gusovsky y Daly, 1990). En estudios de *patch clamp* en la configuración de "inside out" de células MDCK (células Mardin-Darby de epitelio de riñón de perro), la MTX aplicada intracelularmente no tuvo 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 Volk, 1994). En estudios con fibroblastos de piel de humano la MTX no produce aumento en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cuando las células fueron previamente expuestas a tripsina (Gutiérrez y cols., 1997). Estos datos sugieren fuertemente que la MTX no es un ionóforo, y que parece ejercer sus efectos interactuando con una proteína de la membrana sensible a esta proteasa.

En estudios realizados en miocitos ventriculares de cobayo con la técnica de canal único (en la configuración *inside-out*), la MTX induce la activación de sólo uno o dos canales dentro de un gran margen de concentraciones (Nishio y cols., 1996). Estos datos contrastan claramente con el funcionamiento de un ionóforo, que produciría mayor corriente conforme aumenta la concentración del mismo. 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 o receptor a la MTX debe estar altamente conservada a lo largo de la evolución.

INHIBIDORES DE LA RESPUESTA A LA MTX

Existe una gran cantidad de estudios encaminados a esclarecer la farmacología de los canales iónicos activados por la MTX; sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado ninguna molécula capaz de inhibir selectivamente las respuestas desencadenadas por esta toxina. Por ejemplo, las dihidropiridinas, bloqueadores de canales de Ca^{2+} tipo L, pueden reducir la entrada de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ causada por la MTX en las células híbridas de neuroblastoma-glioma y en algunas células tumorales de la hipófisis. Por otro lado, en las células BC_3H_1 de músculo liso, miocitos y sinaptosomas, estos bloqueadores no tiene ningún efecto en el flujo de Ca^{2+} inducido por la MTX. Otros bloqueadores orgánicos de canales de Ca^{2+} , tales como el verapamil, diltiazem y algunos anestésicos locales, pueden reducir el aumento en el Ca^{2+} intracelular causado por MTX, sin embargo estos bloqueadores no funcionan en todos los tipos celulares en donde se han probado. También se han examinado algunos bloqueadores inorgánicos de los canales de Ca^{2+} como el Co^{2+} , Mn^{2+} y La^{3+} , que bloquean el flujo de Ca^{2+} provocado por la MTX en varias preparaciones, pero no en otras (Escobar y cols., 1998).

La MTX interactúa probablemente con sitios extracelulares de alta afinidad asociados con canales iónicos. Se desconoce si tales sitios están asociados con todo tipo de canales de Ca^{2+} o sólo con algunos. Es muy posible que los 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 sólo como resultado de una despolarización causada por la entrada de Ca^{2+} o de Na^+ a través de otro tipo de canal ubicuo sensible a la MTX (Gusovsky y Daly, 1990). Lo anterior explicaría por qué las dihidropiridinas bloquean parcialmente la entrada de Ca^{2+} inducida por MTX en algunos tipos celulares.

LA MTX ACTIVA UNA CORRIENTE CATIONICA NO-SELECTIVA

Aunque el grupo de Yasumoto (1982) propuso por primera vez que la MTX activaba una corriente catiónica no selectiva, no fueron sino Dietl y Völkl en

1994 quienes finalmente demostraron que en las células MDCK la MTX activa a este tipo de canales (Dietl 1994).

Mediante el uso de técnicas electrofisiológicas, varios autores han reportado que la MTX activa canales catiónicos no selectivos (NSCC), y que éstos permean iones como Rb^+ , Na^+ , Mn^{2+} y Ba^{2+} . Recientemente en ovocitos de *Xenopus* se demostró que el canal activado por la MTX es independiente del voltaje (Bielfeld-Ackermann y cols., 1998; Weber y cols., 2000; Martínez y cols., 1999).

Se encontró que la toxina activa este mismo tipo de canales en células HL-60 (Musgrave y cols., 1994), en células β pancreáticas (Worley y cols., 1994, Leech y cols., 1997; Leech y cols., 1998), en células L de ratón (Estacion y cols., 1996), en células β transgénicas (Roe y cols., 1998), en ovocitos de *Xenopus* (Bielfeld-Ackermann y cols., 1998), en fibroblastos de piel de humano (Schilling y cols., 1999), neuroblastomas (Yoshii y cols., 1987), miocitos cardiacos de cobayo y rata (Kobayashi y cols., 1987b; Nishio y cols., 1996; Faivre y cols., 1990), y en células de la línea GH4C1 de hipófisis de rata (Young et al., 1995). En todos estos casos la MTX aplicada entre 1 pM y 30 nM, produjo corrientes entrantes que no dependen del voltaje (revisado en Escobar y cols., 1998).

Recientemente se le asignó un papel fisiológico al canal catiónico activado por la MTX en células β -pancreáticas. Se piensa que el canal está involucrado en la secreción de insulina, debido a que la MTX activa la misma corriente catiónica no selectiva, activada por las hormonas como el péptido GLP-1 (Péptido 1 semejante al Glucagón), el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la hipófisis (PACAP) y el AMP cíclico (Leech y cols., 1997). Este mismo grupo propone que el canal activado por la MTX juega un papel trascendental en el mantenimiento del potencial de membrana de las células β -pancreáticas (Leech y cols., 1998).

De estos últimos datos se puede concluir que la MTX activa NSCC en vez de a una vía selectiva a Ca^{2+} como sugerían los ensayos bioquímicos originales.

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 estos canales están presentes.

REGULACIÓN DEL CANAL CATIONICO NO SELECTIVO ACTIVADO POR MTX (NSCC-MTX)

El canal activado por la MTX está modulado de manera directa y/o indirecta, tanto por la cara externa como por la interna, por diferentes factores. Por razones históricas primero se revisará como se da la modulación extracelular.

Que el Ca^{2+} extracelular modula la actividad de NSCC-MTX, o bien la unión de la MTX al canal, ha sido ampliamente documentado por diversos grupos. Se ha demostrado que es necesaria la presencia de Ca^{2+} extracelular para que la MTX active al canal (Gusovsky 1990). Este fenómeno de dependencia se ha encontrado tanto en células excitables como no excitables (Dietl y cols., 1994). Como demostramos durante el desarrollo de este trabajo, en fibroblastos de piel de humano a concentraciones por abajo de 1.8 nM de Ca^{2+} evitan la activación de la corriente NSCC-MTX (Martínez-Francois y cols., 2001), lo cual sugiere fuertemente que se necesitan concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} extracelular para que el canal sensible a la MTX sea activado.

Con respecto a la modulación intracelular, recientemente se ha reportado que la activación del NSCC-MTX está regulada por las concentraciones intracelulares de ATP, por agentes reductores como el DTT, por tripsina (Leech y cols., 1998), y por la genisteína (Leech y cols., 1997; Leech y cols., 1998). Además, la entrada de Ca^{2+} inducida por la MTX también es sensible a la genisteína en células epiteliales de tráquea de conejo (Venant y cols., 1994), en células β -pancreáticas (Leech y cols., 1998) y en insulinomas (Leech y cols., 1997).

En las células β -pancreáticas experimentos con soluciones intracelulares libres de ATP el NSCC-MTX se activa espontáneamente, lo cual sugiere que el

ATP inhibe la actividad del canal; sin embargo, incubaciones prolongadas con soluciones intracelulares libres de ATP inhiben la activación de NSCC-MTX por la toxina (Leech y cols., 1998). Lo anterior representa una fuerte sugerencia de que la activación de este canal depende del ATP, ya sea directamente, o a través de un mecanismo que requiere de ATP, como la fosforilación.

En las células MDCK, la sensibilidad a la toxina aumenta si se utiliza PDBu, un activador de la proteína cinasa C (PKC) (Olivi 2000). Todos estos datos parecen sugerir que la respuesta a la MTX está modulada por una cascada de segundos mensajeros que involucra procesos de fosforilación por varios tipos de cinasas. En el presente trabajo demostraremos el papel que juega una cinasa de la tirosina de la familia *src* en la activación de NSCC-MTX por esta toxina.

EFFECTOS SECUNDARIOS

HIDRÓLISIS DE FOSFOINOSÍTIDOS

Los primeros estudios realizados con la MTX reportaron que esta toxina promueve la hidrólisis de fosfoinosítidos en una gran variedad de preparaciones (Gusovsky y Daly, 1990). Estos datos sugieren que la MTX genera dos segundos mensajeros: el inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3), que induce la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, y el diacilglicerol (DAG), que activa a la proteína cinasa C (PKC). La MTX provoca la formación de IP_3 en miocitos de aorta de rata (Berta y cols., 1986), en células híbridas de neuroblastoma NCB-20, en células de feocromocitoma de rata PC12 y en una gran variedad de otros tipos celulares (Gusovsky y cols., 1989). Sin embargo, esta hidrólisis no se observa en ausencia de Ca^{2+} extracelular. En las células HL-60, la producción de IP_3 inducido por la MTX requiere de Ca^{2+} extracelular, pero este catión no se requiere extracelularmente para la producción de IP_3 por el péptido quimiotáctico fMLP (Musgrave y cols., 1994). Además, la activación de la hidrólisis de los fosfoinosítidos por la MTX no es sensible a la toxina pertussis, mientras que la activación de la hidrólisis de los fosfoinosítidos producida por el péptido

quimiotáctico es inhibida por dicha toxina (Gusovsky y cols., 1989). Así, por lo menos en esta línea celular, la MTX claramente afecta la hidrólisis de los fosfoinosítidos a través de un mecanismo diferente a los mecanismos propuestos para los receptores clásicos acoplados a proteínas G.

Como la MTX induce hidrólisis de fosfoinosítidos en cada sistema probado (Sladeczek y cols., 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 los 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 alguna isoforma de la fosfolipasa C (PLC), la enzima responsable de la formación de fosfatos de inositol, y no parecen ser sensibles al bloqueo por los antagonistas de los canales de Ca^{2+} de cualquier tipo (Gusovsky y Daly, 1990).

LIBERACIÓN DE HORMONAS Y NEUROTRANSMISORES

El aumento en la entrada de Ca^{2+} provocado por la MTX en las células PC12, neuronas del estriado y en islotes pancreáticos se acompaña de un aumento de la liberación de hormonas y neurotransmisores (Takahashi y cols., 1982; 1983; Lebrun y cols., 1987; Shalaby y cols., 1986).

La liberación de norepinefrina (NE) por MTX en células PC12 es sensible al bloqueo por dihidropiridinas (Takahashi y cols., 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.

En las neuronas del estriado, el Co^{2+} bloquea por completo la entrada de Ca^{2+} activada por MTX, mientras que sólo 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 del neurotransmisor en este sistema (Pin y cols., 1988).

También se han investigado los efectos de la MTX en la liberación de ácido araquidónico de fosfolípidos marcados con [^3H]araquidonato en células PC12 (Choi y cols., 1989). La MTX parece activar con mayor potencia la liberación de araquidonato que estimula la hidrólisis de los fosfoinosítidos. El efecto de la MTX en la liberación de araquidonato se bloquea por Co^{2+} , Mn^{2+} y Cd^{2+} .

La liberación de hormonas y neurotransmisores provocada por MTX en la mayor parte de 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 del Na^+ en el medio extracelular; en medio con bajo Na^+ , la liberación de NE por la 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 capacidad 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. Otra posible explicación sería que la MTX requiere Na^+ para producir sus efectos o para interactuar adecuadamente con el canal NSCC-MTX. Como demostraremos en la sección de resultados de la presente tesis, el Na^+ extracelular es un poderoso modulador de la entrada de Ca^{2+} activada por la MTX.

CONTRACCIÓN MUSCULAR

La MTX induce la 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), el conducto deferente del

cobayo (Ohizumi y cols., 1983) y el músculo cardíaco de cerdo y rata (Kobayashi y cols., 1987a). También se ha demostrado que la MTX aumenta la actividad contráctil en estudios con las células cardíacas aisladas (Kobayashi y cols., 1985).

Los efectos de la MTX en el músculo desaparecen 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 la aorta de conejo, en una solución libre de Ca^{2+} extracelular, las respuestas contráctiles producidas por la reintroducción de Ca^{2+} , Sr^{2+} o Ba^{2+} se potenciaron después del tratamiento con MTX y fueron bloqueadas por el 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.

JUSTIFICACIÓN

La MTX moviliza Ca^{2+} en todas las células estudiadas. La explicación más simple de este fenómeno sería que la MTX actúa como un ionóforo de Ca^{2+} ; sin embargo, existe evidencia que indica que la MTX no posee actividad ionofórica, lo cual permitió sugerir la existencia de un receptor para esta toxina altamente conservado a lo largo de la evolución. Cabe resaltar que la respuesta a la MTX se ve disminuida con ginesteína. Todos los datos hacen suponer que además de reconocer selectivamente a un receptor esta molécula es capaz de desencadenar una cascada de señalización.

Con base en los antecedentes expuestos anteriormente, nuestro interés consiste en identificar los mecanismos por medio de los cuales la MTX estimula la movilización de iones a través de la membrana plasmática.

HIPÓTESIS

La MTX se une a una entidad proteica de la membrana plasmática con gran afinidad. La unión estimula una cascada de segundos mensajeros que culminan con la activación de una corriente catiónica no selectiva I_{MTX} responsable del aumento del Na^+ y Ca^{2+} intracelulares.

OBJETIVO GENERAL

Caracterización de las vías activadas por la maitotoxina en células de mamífero.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterización de la corriente iónica inducida por la MTX.
2. Estudiar la modulación de la respuesta a la MTX por los cationes intracelulares y extracelulares.
3. Caracterizar el papel de las cinasas de tirosina en la respuesta a la MTX.

METODOLOGÍA

CULTIVO CELULAR

Las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, SIGMA), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (GIBCO), 100 U/ml de estreptomicina-penicilina y 0.3 mg/ml de L-glutamina. El cultivo se mantuvo en una incubadora (NUAIRE) con una atmósfera controlada a 37 °C y 5 % de CO₂. Para disociar las células del plato de cultivo se incubaron en solución de EDTA (en mM: KCl 5, NaCl 140, EDTA 0.5, HEPES 10; el pH se ajustó a 7.7 con NaOH) por 30 segundos y luego se incubaron por 10 segundos con 0.5 ml de tripsina (SIGMA) al 0.25 %.

MEDICIONES DE [Ca²⁺]_i Y [Na⁺]_i.

Para determinar los niveles de [Ca²⁺]_i y de [Na⁺]_i se usaron indicadores fluorescentes específicos para cada ion. Todas las determinaciones se hicieron con 1.5 ml de células en suspensión y se colocaron en una celda del espectrofluorómetro serie 2 AMINCO-BOWMAN. Todos los experimentos se realizaron con agitación constante.

En los experimentos de medición de la [Ca²⁺]_i se usó el indicador Fura-2AM. En este caso las células se incubaron con 3 μM de Fura-2AM y 0.5 % de ácido plurónico por 1 hr en solución fisiológica (SF) (en mM: NaCl 140, KCl 5, MgCl₂, HEPES 10, Glucosa 5, CaCl₂ 1.8 y BSA 0.1 %; el pH se ajustó a 7.4 con NaOH). Después se lavaron dos veces con SF y se incubaron por 10 minutos en SF sin Ca²⁺. Las células se disociaron como se mencionó anteriormente, se lavaron 3 veces para eliminar la tripsina, y se resuspendieron a una densidad de 1.5-2x10⁶ cel/ml en SF. Se tomaron 1.5 ml de células en una celda del espectrofluorómetro. La longitud de onda de excitación para el indicador Fura-2AM, se alternó entre 340 y 380 nm cada 2 segundos y la emisión se colectó a 510 nm. Cada

experimento fue calibrado individualmente. Para obtener la fluorescencia máxima las células se lisaron con 0.1 % de Tritón X-100. Para obtener la fluorescencia mínima se llevó a cabo la medición en presencia de 20 mM de EGTA. Los valores obtenidos con este procedimiento se usaron para determinar $[Ca^{2+}]_i$ de acuerdo con la ecuación descrita por Grynkiewicz y cols., 1990.

En los experimentos de determinación de $[Na^+]_i$ se usó el indicador SBFI. El método es el siguiente: se disociaron las células del plato de cultivo como ya se mencionó. Las células se lavaron 2 veces con SF sin Na^+ (en la SF se reemplazó el ion Na^+ con 120 mM de N-Metil-D-Glucamina), y se resuspendieron en 1.0 ml de SF sin Na^+ con 10 μ M de SBFI-AM y ácido plurónico al 1%; se incubaron por 1 hr a 37 °C, y se centrifugaron por 10 min. a 1000 x g y se resuspendieron en 1 ml de SF-s/ Na^+ Finalmente se tomaron 0.2 ml de células más 1.3 ml de SF ($4-5 \times 10^6$) y se colocaron en la celda del espectroflúorómetro. La longitud onda de la excitación para el indicador SBFI fue de 358 nm, y la de emisión se registró a 500 nm. Para obtener la fluorescencia mínima se calibró en ausencia de Na^+ , lisando las células con Tritón X-100, y para obtener la fluorescencia máxima agregamos Na^+ al lisado hasta obtener la fluorescencia máxima.

MEDICIONES DE LA ACTIVIDAD DE LACTATO DESHIDROGENASA (EC 1.1.27).

Las células se sembraron en cajas de 12 pozos y se incubaron con diferentes concentraciones de toxina por 10 minutos en SF. Al término de la incubación, se colectó el medio. La actividad de lactato deshidrogenasa se determinó de acuerdo con el método de Vassault (1983). En resumen, se mezclaron 25 μ l del medio de incubación con 1.25 ml de amortiguador A que contiene: Tris 81.3 mM, NaCl 203.3 mM y 244 μ M NADH (pH 7.2). La reacción se llevó a cabo por la adición de 0.25 ml del amortiguador A, que contenía además 9.76 mM de piruvato de Na^+ . La absorbencia se midió a 340 nm en un espectrofotómetro cada

30 seg durante 5 minutos. La actividad de la enzima (nmolas NADH/ml/min) se calculó a partir del cambio de la absorbencia.

CLONACIÓN DE *src* ACTIVA E INACTIVA EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pCDNA3.

El vector pUSE *src*Y529F (*upstate Biotechnology*) se cortó con la endonucleasa de restricción (ER) *EcoRI*; los extremos se rellenaron con dNTPs, utilizando la subunidad grande de la DNA Polimerasa I (Klenow). Nuevamente el plásmido fue cortado con la ER *Not I*. De esta forma se liberó el fragmento que codifica para la proteína *src* activa (1782 pb) del plásmido. El fragmento se clonó en el sitio múltiple de clonación del plásmido pCDNA3 en la orientación *BamHI-NotI*. La preparación del pCDNA3 se realizó de la siguiente manera: el plásmido se cortó con la ER *BamHI*; una vez lineal se procedió a rellenar los extremos. Nuevamente se cortó con la ER *Not I* y posteriormente defosforilamos el extremo 5' del plásmido con la enzima CIP (fosfatasa alcalina de intestino de ternera). El plásmido y el inserto se ligaron a 16 °C toda la noche en presencia de la enzima T4 ligasa. Con la mezcla de ligación se transformaron células de bacterias competentes (cepa DH5 α). Se analizaron 4 colonias transformantes con enzimas de restricción. Las clonas que mostraron el patrón de restricción correcto se secuenciaron con el oligonucleótido universal T7.

TRANFECCIÓN DE LAS CÉLULAS.

Las células se sembraron en cajas de Petri de 100 mm, a una confluencia de 50 %, y se mantuvieron 12 hrs en ausencia de suero. Posteriormente se retiró el medio de las cajas de Petri y se agregó la siguiente mezcla: 75 μ l de lipofectina (GIBCO) y 15 μ g de DNA. Las células con la mezcla se incubaron por 24 horas, como se mencionó en la sección de cultivo. Finalmente, 24 horas después de haber retirado la lipofectina y el DNA se realizaron las mediciones del Ca²⁺ intracelular.

RESULTADOS

Los resultados más relevantes de este trabajo de tesis se encuentran plasmados las siguientes secciones:

PARTE I.

Morales-Tlalpan, V and Vaca L. Modulation of the Maitotoxin response by intracellular and extracellular cations.

Primer Autor.

Aceptado para su publicación en la revista *Toxicon*.

PARTE II

Efecto de inhibidores de cinasas de tirosina y de la sobreexpresión proteína *src* en la entrada de Ca^{2+} inducida por Maitotoxina.

Datos no publicados.

SECCIÓN I

MORALES-TLALPAN, V. AND VACA, L. MODULATION OF THE MAITOTOXIN RESPONSE BY INTRACELLULAR AND EXTRACELLULAR CATIONS.

PRIMER AUTOR.

ACEPTADO PARA SU PUBLICACIÓN EN LA REVISTA TOXICON.

En este trabajo encontramos que la MTX activa una entrada de Ca^{2+} y de Na^{+} en células CHO. La respuesta a la MTX depende de la concentración de toxina utilizada; es decir, la respuesta es dosis dependiente. Esta respuesta se satura a concentraciones cercanas a 1 nM de toxina. Dosis mayores no aumentaron la entrada de Ca^{2+} ni de Na^{+} . Los datos anteriores apoyan la hipótesis de que la MTX podría ejercer sus efectos al interactuar con un receptor específico en la membrana plasmática de estas células.

La respuesta a MTX es modulada por el Na^{+} y el Ca^{2+} extracelular. La entrada de Ca^{2+} en respuesta a MTX no depende de la presencia de Na^{+} extracelular; sin embargo, en ausencia de Na^{+} , la entrada de Ca^{2+} a la célula es más rápida. La entrada de Na^{+} inducida por la MTX depende completamente de la presencia de Ca^{2+} extracelular. Los resultados anteriores sugieren que tanto el Na^{+} como el Ca^{2+} podrían estar entrando a la célula por la misma vía de permeación.

La respuesta a la MTX también está modulada por el Ca^{2+} intracelular. La elevación del Ca^{2+} intracelular potencia la entrada de Ca^{2+} inducida por la MTX. La respuesta se satura y alcanza su grado máximo con concentraciones de Ca^{2+} intracelular cercanas a los 200 nM. En ausencia de Ca^{2+} extracelular, la elevación del Ca^{2+} intracelular es suficiente para reestablecer parcialmente la entrada del Na^{+} inducida por la MTX.

La MTX no altera la permeabilidad de la membrana a macromoléculas; no se encontró actividad de LDH en el sobrenadante de células tratadas hasta con 5

nM de MTX. Esta concentración de MTX es más del doble de la concentración utilizada en los ensayos fisiológicos.



ELSEVIER

TOXCON1664

TOXICON

Toxicol 00 (2001) 000–000

www.elsevier.com/locate/toxicon

Modulation of the maitotoxin response by intracellular and extracellular cations

V. Morales-Tlalpan, L. Vaca*

Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México 04510, México

Received 17 July 2001; accepted 18 September 2001

Abstract

The aim of the present study was to characterize the role played by intracellular and extracellular calcium and sodium on the maitotoxin (MTX) response in Chinese hamster ovary (CHO) cells. The results presented here indicated that: (1) MTX activates calcium and sodium influx in a concentration-dependent manner; (2) extracellular calcium is required for the sodium influx; (3) removal of the extracellular sodium did not prevent the MTX-induced calcium influx; (4) elevation in the intracellular calcium concentration potentiates the MTX response; and (5) MTX, at the concentrations tested, did not compromise cell viability. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Maitotoxin; Calcium influx; Sodium influx; Chinese hamster ovary cells

1. Introduction

Ciguatera is an important form of human poisoning caused by the consumption of seafood contaminated with toxins from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. The disease is characterized by gastrointestinal, neurological and cardiovascular disorders, and in cases of severe intoxication paralysis, coma and death. Symptoms may persist for months or years, or recur periodically (Lehane and Lewis, 2000). Two types of toxins might be involved in Ciguatera poisoning: maitotoxin and ciguatoxin (Yasumoto et al., 1976).

Maitotoxin (MTX) is a water-soluble polyether with a molecular weight of 3422 Da (Gusovsky and Daly, 1990). The complete structure of MTX has been elucidated recently, showing a long C₁₄₂ chain, 32 ether rings, 28 hydroxyl groups and two sulfate esters (Murata et al., 1994). This toxin is relatively stable in alkaline but not acidic conditions (Murata and Yasumoto, 2000).

MTX has attracted considerable attention over the last few years for the following reasons. This toxin is the most potent marine toxin known to date, with a lethal dose of 0.17 µg/kg in mice (Yasumoto et al., 1979). MTX elicits

calcium influx in all the cells and tissues tested (Escobar et al., 1998). The elevation of intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) induced by MTX lead to secondary events including phosphoinositide breakdown (Gusovsky et al., 1989), arachidonic acid release (Choi et al., 1989), muscle contraction (Ohizumi and Yasumoto, 1983) and secretion of dopamine (Tagliatela et al., 1986) norepinephrine (Takahashi et al., 1983) and insulin (Soergel et al., 1990; Leech and Habener, 1997). It is the largest non-biopolymer known. Finally, MTX does not appear to have ionophoretic activity and might produce its effects via a putative receptor (Takahashi et al., 1982). Recent studies provide evidence suggesting that MTX is acting via a plasmalemmal protein, which is modified by extracellular trypsin (Gutierrez et al., 1997) and intracellular trypsin digestion (Leech and Habener, 1998). These results and the fact that MTX activates cationic channels with similar electrophysiological properties in a wide range of tissues, supports the hypothesis of a yet unidentified MTX receptor (Escobar et al., 1998).

A great number of pharmacological, biochemical and electrophysiological studies position MTX as a channel activator (Gusovsky and Daly, 1990). Recent electrophysiological studies have revealed that the channel activated by MTX is voltage-independent (Escobar et al., 1998). This toxin activates a nonselective cation current (*I*_{NSC}) in MDCK cells (Dietl and Volk, 1994), HL-60 cells (Musgrave et al., 1994), human skin fibroblast (Schilling

* Corresponding author. Tel.: +525-622-5654; fax: +525-622-5611.

E-mail address: lvaca@ifisiol.unam.mx (L. Vaca).

et al., 1999), insulinoma cell (Leech and Habener, 1997), β -cells (Worley et al., 1994; Leech and Habener, 1998; Roe et al., 1998), *Xenopus laevis* oocytes (Bielfeld-Ackermann et al., 1998) and mouse L cells (Estacion et al., 1996). In β cells I_{NSC} is indistinguishable from the insulinotropic hormones GLP-1 and PACAP-activated current (Leech and Habener, 1997).

MTX requires the presence of extracellular calcium to exert its effects, and in several studies some of the MTX effects were partially Na^+ -dependent (Sorrentino et al., 1997). For instance, in differentiated neurons, GABA release induced by MTX was dependent on the presence of external sodium (Pin et al., 1988). In hit cells the activation of the MTX-sensitive current is dependent on intracellular calcium (Leech and Habener, 1997). The reasons for the sodium and calcium requirements in the MTX effects remain largely unexplored.

2. Material and methods

2.1. Solutions and reagents

All salts used are analytical grade. Fura-2/AM and SBFI-AM were obtained from molecular probes (Eugene, OR). Trypsin 1:250 (from porcine pancreas, activity 1,300 BAEE units/mg solid), N-[2-hidroxyethyl]-piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES), N-methyl-D-glucamine (NMDG), Thapsigargin (TG), Ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetra acetic acid (EGTA), NADH, Sodium Piruvate, Albumin Bovine (BSA) and other reagents were purchased from SIGMA (St Louis, MO). Maitotoxin was purchased from CALBIOCHEM (La Jolla, CA), and was stored in aliquots in amber-colored glass vials at $-70^{\circ}C$ as an aqueous stock solution ($6 \mu M$) with 0.01% BSA.

Ringer solution contained (mM): 145 NaCl, 5 KCl, 2 $MgCl_2$, 1.8 $CaCl_2$, 10 HEPES, 1.0% BSA, pH 7.4 with HCl. In experiments with low extracellular Na^+ , this cation was replaced with NMDG.

2.2. Cell culture

CHO cells were maintained in DMEM (SIGMA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 25 ng/ml amphotericin B, 100 μg /ml streptomycin, 100 units of penicillin and 2 mM L-glutamine (GIBCO, Grans Island, NY). Cells were grown on 100 mm plastic tissue culture dishes (COSTAR, Cambridge, MA, USA) at $37^{\circ}C$ in a humidified atmosphere (95:5 O_2/CO_2). Only confluent cells were used in this study.

2.3. Intracellular calcium measurements

CHO cells were loaded with $5 \mu M$ Fura-2AM (acetoxymethyl ester) for 1 h. To improve loading, pluronic acid (0.5%) was added to the loading medium. After this,

cells were rinsed twice and incubated for 10 min in Fura-2AM-free solution. The cells were dispersed with trypsin 0.25%, and rinsed twice to eliminate the trypsin and placed in the extracellular solution to a final concentration of $1.5-2.0 \times 10^6$ cells/ml. Cells were placed in the cuvette of an Aminco-Bowman series 2-luminescence spectrometer. The excitation wavelength alternated between 340 and 380 nm every 2.0 s and the emission was collected at 510 nm. Each experiment was individually calibrated to obtain the maximal fluorescence by solubilizing the cells with 0.1% Triton X-100, to release incorporated Fura-2AM. Minimum fluorescence was obtained by quenching Fura-2AM with 20 mM EGTA. The values obtained with this procedure were used to calculate to $[Ca^{2+}]_i$ according to the previously published methods (Grynkiewicz et al., 1985).

2.4. Intracellular sodium measurements

The cells were loaded with $10 \mu M$ SBFI for 1 h. After this incubation period, the cells were rinsed twice and incubated for 30 min in SBFI-free solution. The cells were dispersed as mentioned previously. The excitation wavelength was 358 nm and the emission was collected at 510 nm every 2 s. Each experiment was individually calibrated to obtain the maximal fluorescence with 300 mM NaCl and the minimal fluorescence was obtained with Triton X-100. The values obtained with this procedure were used to calculate to $[Na^+]_i$ according to the method of Harootunian et al. (1989) and Zhao et al. (1995).

2.5. Data fitting

Dose response curves were fitted to a Hill equation of the form:

$$y = V_{max} * x^n / (k^n + x^n)$$

where V_{max} = maximum calcium/sodium value, n = hill number, k = half activation constant and x = time.

Individual sodium and calcium traces were fitted to a sigmoidal equation of the form:

$$y = a / (1 + \exp(-(x - x_0)/b))$$

where a = maximum calcium/sodium value, b = time constant, x_0 = y value at $x = 0$ and x = time.

2.6. Lactate dehydrogenase activity

CHO cells were tested for membrane damage after 10 min of incubation with several MTX concentrations in the extracellular solution. The lactate-dehydrogenase activity (EC 1.1.27) was determined according to Vassault (1983). Briefly, 25 μl of incubation medium was mixed with 1.25 ml of a buffer containing 81.3 mM Tris, 203.3 mM NaCl, and 244 μM NADH (pH 7.2). The reaction was triggered by addition of 0.25 ml of 81.3 mM Tris, 203.3 mM NaCl and 9.76 Sodium Piruvate. Absorbance at

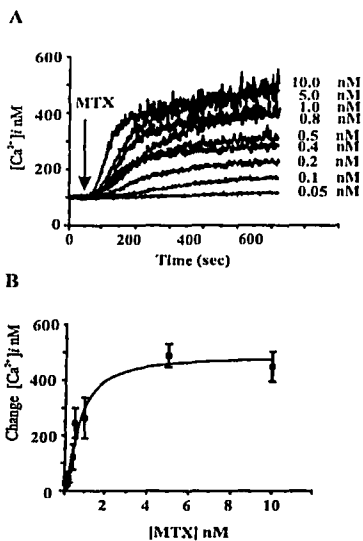


Fig. 1. MTX increases the intracellular calcium in a dose-dependent manner. (a) Representative examples of the time course of changes in $[Ca^{2+}]_i$ induced by several concentrations of MTX (shown in pM at the right of figure). MTX was added at the point indicated by the vertical arrow. (b) Concentration-response curve obtained from four experiments similar to the one illustrated in (a). The values show the mean \pm standard deviation measured 400 s after addition of MTX [indicated by the vertical arrow in (a)]. The solid line shows the fit to a Hill model with half activation constant of 713 pM of MTX.

340 nm was measured in a spectrophotometer every 30 s for 5 min. Enzyme activity (nmoles NADH/ml/min) was calculated from the change in absorbance.

3. Results

3.1. MTX increases intracellular calcium and sodium concentrations in a dose-dependent manner

MTX increased intracellular calcium in Fura-2AM-loaded CHO cells in a concentration-dependent manner. The rise in calcium consisted of two phases: a rapid increment, which occurred immediately after the addition of the toxin, followed by a plateau phase where calcium remained elevated for the duration of the experiment. The slope of the first phase increased with higher toxin concentrations reaching saturation around 800 pM [Fig. 1(a)]. Fitting the data to a sigmoidal function (Section 2) produced time constant of

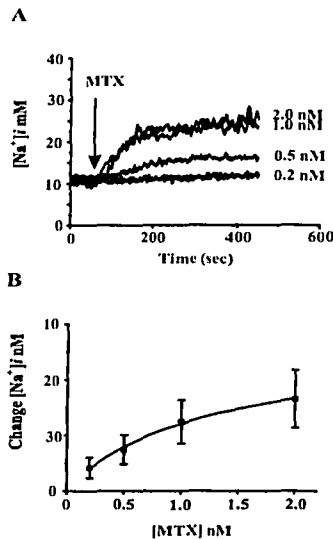


Fig. 2. MTX increases the intracellular sodium in a dose-dependent manner. (a) Representative examples of the time course of changes in $[Na^+]_i$ induced by several concentrations of MTX (shown in pM at the right of figure). MTX was added at the point indicated by the vertical arrow. (b) Concentration-response curve obtained from four experiments similar to (a). The values show the mean \pm standard deviation measured 400 s after addition of MTX [indicated by the vertical arrow in (a)]. The solid line shows the fit to a Hill model with half activation constant of 1.29 nM.

160 \pm 80 s with 1 nM MTX ($n = 6$, data not shown). Toxin concentrations below 0.1 nM did not cause any appreciable change in intracellular calcium. The increments in calcium reached saturation at 800 pM MTX. Higher toxin concentrations did not produce any further increment of the intracellular calcium concentration [Fig. 1(a)].

The dose-response curve was well fitted by a Hill equation (Section 2) producing a maximum calcium elevation = 491 \pm 39.4 nM, and half activation constant (K_{50}) = 713 pM [Fig. 1(b)].

MTX increased the intracellular sodium concentration ($[Na^+]_i$) of SBFI-AM-loaded CHO cells. This effect was also concentration dependent, and reached saturation with 1 nM MTX [Fig. 2(a)]. The elevation in $[Na^+]_i$ showed the same two phases previously described for the increments in intracellular calcium. The slope of the rapid change in $[Na^+]_i$ increased also with higher toxin concentrations. Fitting the sodium rise to a sigmoidal function produced time constants of 174 \pm 65 s with 1 nM MTX ($n = 6$, data not shown).

4

V. Morales-Tlalpan, L. Vaca / *Toxicol 00 (2001) 000–000*

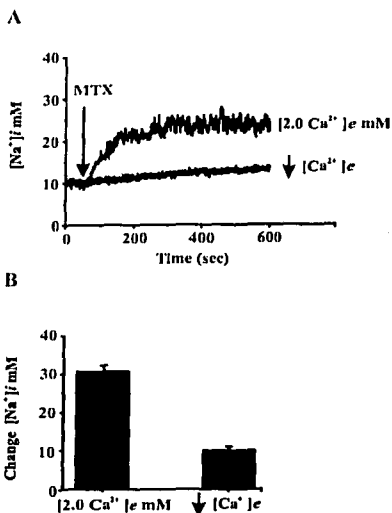


Fig. 3. Modulation by extracellular Ca^{2+} of the Maitotoxin response. (a) Representative experiment showing the effect of removing the extracellular Ca^{2+} on the sodium influx induced by MTX. Toxin was added at the point indicated by vertical arrow. Control cells are in 1.8 mM $CaCl_2$ in the extracellular solution. The ($[Ca^{2+}]_e$) cells were maintained in 5 mM EGTA (zero calcium added) for the duration of the experiment. (b) Pooled data illustrating the effect of removing extracellular Ca^{2+} in four independent experiments. The data shows the mean \pm standard deviation sodium values (in nM) measured 400 s after the addition of MTX. The values show 30.6 ± 1.5 and 9.93 ± 1 nM Na^+ in the presence and absence of extracellular Ca^{2+} , respectively.

The dose-response curve was fitted to a Hill equation resulting in a maximum $[Na^+]_i$ increment of 27.48 mM and a $K_{50} = 1.2$ nM MTX [Fig. 2(b)].

These results indicate that MTX activates calcium and sodium influx in a dose-dependent manner. The rise in calcium and sodium has similar time constants and both events saturate with around 1 nM MTX.

3.2. Modulation by extracellular cations of the Maitotoxin response.

There is some evidence in the literature indicating that extracellular calcium and/or sodium are required for the activation of the MTX response. To investigate the dependence of the MTX response on the presence of extracellular calcium and sodium, we performed experiments in which calcium or sodium was omitted from the extracellular

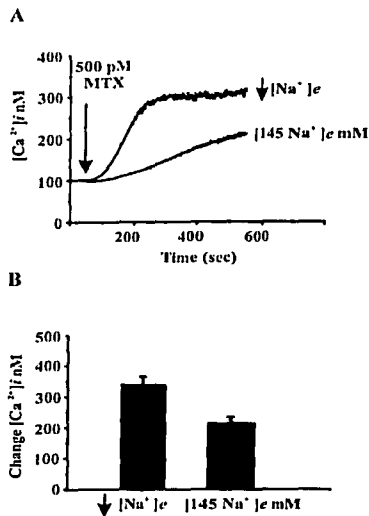


Fig. 4. Modulation by extracellular Na^+ of the Maitotoxin response. (a) Representative experiment illustrating the effect of removing the extracellular Na^+ on the MTX-induced Ca^{2+} influx. The control obtained with 145 mM extracellular Na^+ . In the ($[Na^+]_e$) experiment Na^+ was replaced by 145 mM NMDG. (b) Pooled data illustrating the effect of removing extracellular Na^+ in 8 independent experiments. The data shows the mean \pm standard deviation measured 400 s after the addition of MTX. The values for low $Na^+ = 337 \pm 27$ and 213 ± 20 nM Ca^{2+} for control.

solution. Fig. 3(a) illustrates the effect of 1 nM MTX on CHO cells loaded with SBFI.

With physiological extracellular calcium, MTX induced a typical sodium influx [Fig. 3(a), upper trace], however when calcium was omitted from the external medium (with EGTA) the MTX-induced sodium influx was abolished [Fig. 3(a), lower trace]. This result suggests that external calcium is indispensable for MTX-induced sodium influx. We explored next the role of extracellular sodium on the activation of the MTX-induced calcium influx. When all sodium was replaced by NMDG in the extracellular solution, MTX induced calcium influx in Fura-2-loaded cells, however, the time course of calcium influx was faster and the plateau phase was reached earlier than control [in the presence of sodium, Fig. 4(a)]. The sustained calcium elevation in the absence of extracellular sodium was higher than control, as illustrated in Fig. 4(b). With 500 pM MTX, the intracellular calcium concentration was 337 ± 27 nM ($n = 4$) in the absence of sodium and 213 ± 20 nM ($n = 8$) with sodium present in the

V. Morales-Tlalpan, L. Vaca / *Toxicol 00 (2001) 000-000*

5

3.3. Intracellular calcium potentiates MTX-induced calcium influx

To determine if $[Ca^{2+}]_i$ influence the MTX response, an additional series of experiments was undertaken. Tapsigargin (TG), an agent that selectively blocks Ca^{2+} uptake by the endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase and therefore leads to slow release of Ca^{2+} from internal stores, was used to induce a controlled elevation of $[Ca^{2+}]_i$. When TG increased the intracellular basal calcium concentration, the MTX-induced calcium influx was significantly enhanced. The change in calcium induced by MTX was larger and faster with higher intracellular calcium concentrations [Fig. 5(a)]. This effect saturates at intracellular calcium concentrations of 200 nM. The correlation between the previous basal calcium induced by TG with the change in calcium induced by a fix concentration of MTX (20 pM) was fitted by a Hill equation providing a half activation constant of 125 nM [Fig. 5(b)].

To evaluate if the effect of TG on the MTX-induced calcium influx was the result of a reduced rate of calcium removal from the cytosol (due to the blockade of the microsomal calcium ATPase), a series of experiments were performed utilizing the ionophore ionomycin to induce a controlled elevation of intracellular calcium prior to MTX stimulation. The potentiation effect observed with TG was maintained in the experiments using 200 nM ionomycin (data not shown).

These results indicate that the elevation in intracellular calcium potentiates the influx of calcium induced by MTX. This effect is saturable, since calcium increments beyond 200 nM did not result in further potentiation.

We explored next if MTX could activate sodium influx in the absence of extracellular calcium in cells with elevated $[Ca^{2+}]_i$ by the addition of 200 nM ionomycin. As previously shown (Fig. 3) with basal $[Ca^{2+}]_i$, MTX failed to induce sodium influx when the extracellular calcium was buffered by the addition of EGTA. Surprisingly enough, in experiments where $[Ca^{2+}]_i$ was elevated by the addition of 200 nM ionomycin, MTX induced sodium influx in the absence of extracellular calcium. The increment in $[Na^+]_i$ in ionomycin-treated cells was $36.7 \pm 9\%$ of the increment induced by MTX with basal $[Ca^{2+}]_i$ and 2 mM extracellular calcium (data not shown).

This result indicates that in the absence of extracellular calcium, the elevation of $[Ca^{2+}]_i$ is sufficient to partially restore MTX effects.

3.4. MTX does not affect cell viability

To investigate the possibility that MTX may alter membrane permeability, the activity of the cytoplasmic marker lactate dehydrogenase (LDH) was determined in the supernatant of MTX-treated cells. The release of LDH was measured in absence (control) and presence of several MTX concentrations (Fig. 6).

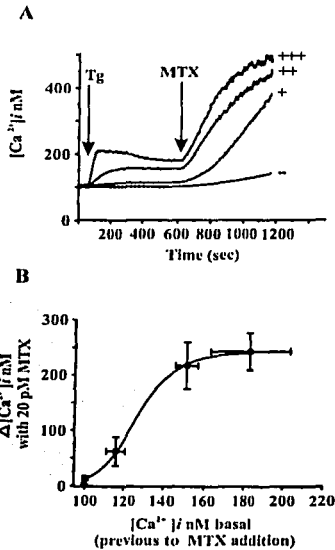


Fig. 5. The extracellular calcium potentiates the MTX response. (a) Representative examples of the effect of 20 pM MTX in cells previously stimulated with several concentrations of Tapsigargin (TG) to elevate the extracellular calcium. The first arrow indicates addition of TG; the second arrow indicates the addition of MTX. The symbols to the right indicate the control in the absence of TG(-) and the TG concentration tested of 20 pM (+), 2 nM (++) and 200 nM (+++). (b) The basal Ca^{2+} concentration (before addition of MTX) is plotted against the delta change in Ca^{2+} after addition of MTX for each TG concentration. The plot illustrates the potentiation by intracellular Ca^{2+} . The solid line shows the fit to a Hill equation with half activation constant of 125 nM intracellular Ca^{2+} and a Hill number = 13.

extracellular solution. Fitting both experiments to a sigmoidal function produced time constants of 160 and 500 s with NMDG and sodium, respectively. This result indicates that in the absence of sodium, the influx of calcium is faster and reaches the plateau phase earlier than with sodium present. This observation suggests that sodium and calcium are entering the cell via the same conducting pathway.

These results indicate that external calcium, but not sodium, is required for the action of MTX. The presence of extracellular sodium is not required for the activation of calcium influx by MTX; however, the MTX-induced sodium influx is completely dependent on the presence of extracellular calcium.

6

V. Morales-Talpan, L. Vaca / *Toxicol 00 (2001) 000-000*

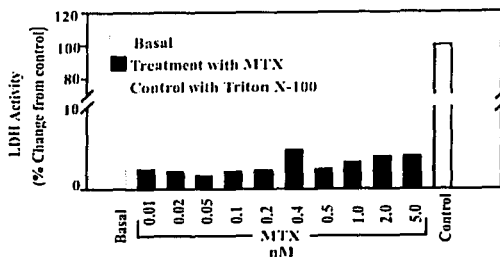


Fig. 6. MTX does not alter membrane permeability. A representative experiment ($n = 4$) of the activity of LDH measured in the supernatant of CHO cells incubated for 10 min at the toxin concentrations indicated in the figure. Basal indicates the LDH activity in cells incubated for 10 min in MTX-free medium. To measure the maximum LDH activity, the cells were disrupted with Triton X-100; this value was considered 100% of LDH activity.

No measurable LDH activity was detected in the supernatant of MTX-treated cells with toxin concentrations up to 5 nM, which is more than double the maximum concentration tested in the calcium and sodium influx experiments. This result suggests that MTX does not alter membrane permeability.

4. Discussion

4.1. MTX activates sodium and calcium influx

Due to the fact that MTX activates calcium influx in all cells and tissues tested, it was originally proposed that this toxin might be an ionophore (Gusovsky and Daly, 1990). Several lines of evidence, later on, provided important information conflicting with this original idea. It has been shown that MTX induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx in synaptosomes (Ueda et al., 1986) but not in liposomes (Takahashi et al., 1983). MTX did not activate channels in cell patches in the inside-out configuration; however, activation of cationic channels can be achieved in patches in the outside-out configuration (Dietl and Volkl, 1994). These results indicate that MTX can activate NSCC only when applied to the outside of the membrane. Furthermore, MTX induced only one or two single channels over a wide range of toxin concentrations (Nishio et al., 1996). More recently we have shown that incubating the cells with trypsin eliminated the MTX calcium influx (Gutierrez et al., 1997). In the present study we have shown that MTX induces a dose-dependent, saturable influx of calcium and sodium. Also important is the fact that MTX, at the concentrations tested, did not induce LDH leakage, indicating that membrane disruption is not responsible for the increments in sodium and calcium permeability in the cell. All these results strongly suggest that MTX is inducing its effects by interacting with a target at the plasma membrane. The nature of the putative MTX receptor remains to be established.

The half activation constant obtained for the calcium influx experiments (713 pM) was close to that for the sodium influx experiments (1.2 nM) and the time courses of both influxes followed a sigmoidal function with similar time constants (160 and 174 s for calcium and sodium, respectively). The influx of sodium was completely dependent on the presence of free extracellular and intracellular calcium. The influx of calcium did not depend on the presence of extracellular sodium; however, the absence of sodium in the extracellular solution accelerated the calcium influx. This result indicates that in the absence of sodium more calcium enters the cell. These results strongly suggest that the influx of calcium and sodium are occurring via the same conducting pathway, most likely a NSCC similar to those previously reported to be activated by this toxin (reviewed in Escobar et al., 1998).

4.2. Calcium modulates the MTX response

The finding that free extracellular and intracellular calcium is required for the MTX response is striking. Previous reports in the literature have shown that extracellular calcium is necessary for the MTX effects in a wide variety of cells (Gusovsky and Daly, 1990; Weber et al., 2000; Escobar et al., 1998; Sorrentino et al., 1997), however, this is the first report illustrating the potentiation of the MTX response by increments in intracellular calcium.

The gross stereo structure of MTX resembles that of gangliosides (Konoki et al., 1999), in fact the ganglioside GM1 inhibits some of the MTX effects (Konoki et al., 1999). Gangliosides are known to aggregate in membranes, forming stable clusters (Thompson and Tillack, 1985). Since MTX possesses hydrophobic and hydrophilic regions (Konoki et al., 1999), it is feasible that MTX may freely associate with lipids in the plasma membrane. The incorporation of MTX into the plasma membrane may be regulated by the presence of extracellular calcium and, therefore, when there is no free calcium present, the MTX effects are

ARTICLE IN PRESS

V. Morales-Talpan, L. Vaca / *Toxicol 00* (2001) 000–000

7

673 not observed. One can speculate that the association of MTX
674 with its putative receptor at the plasma membrane might be
675 calcium-dependent.

676 The potentiation of the MTX effect by increments in the
677 intracellular calcium concentration may be produced by a
678 different mechanism. There is abundant experimental
679 evidence indicating that MTX activates nonselective cationic
680 channels (NSCC) (reviewed in Escobar et al., 1998).
681 Based on our experimental findings and previously
682 published results we speculate that the MTX-activated
683 NSCC might be modulated also by intracellular calcium.
684 In fact, in experiments where $[Ca^{2+}]_i$ was elevated by iono-
685 mycin, MTX induced a small sodium influx in the absence
686 of extracellular calcium. This result indicates that the eleva-
687 tion of $[Ca^{2+}]_i$ is sufficient for MTX to induce a partial
688 response. Thus it appears as if increasing $[Ca^{2+}]_i$ may result
689 in potentiation of channel activity even in the absence of
690 extracellular calcium.

691 Alternatively, more complex mechanisms can be
692 envisioned to explain the effects of $[Ca^{2+}]_i$ on the MTX
693 response, for instance, calcium-calmodulin interactions or
694 calcium-dependent phosphorylation processes involved in
695 the activation of the NSCC by MTX. Ongoing experiments
696 may help to elucidate this point.

Acknowledgements

701 We thank Drs Alejandro Zentella-Dehesa and Edgar
702 Heimer for constructive comments on the manuscript and
703 Alicia Sampieri for her excellent technical assistance. This
704 work was supported by grants from Dirección General de
705 Asuntos del Personal Académico (DGAPA) and from the
706 Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) to
707 Luis Vaca. Verónica Morales-Talpan received a scholar-
708 ship from the Centro Médico Siglo XXI (Instituto Mexicano
709 del Seguro Social). This work is dedicated to the memory of
710 our close friend and collaborator Dr Díaz de León.

References

715 Bielfeld-Ackermann, A., Range, C., Korbmayer, C., 1998.
716 Maitotoxin (MTX) activates a nonselective cation channel in
717 *Xenopus laevis* oocytes. *Pflügers Arch.* 436 (3), 329–337.
718 Choi, O.H., Padgett, W.L., Nishizawa, Y., Gusovsky, F., Yasumoto,
719 T., Daly, J., 1989. Maitotoxin: effects on calcium channels,
720 phosphoinositide breakdown, and arachinodote release in
721 pheochromocytoma PC12 cells. *Mol. Pharmacol.* 37, 220–230.
722 Dietl, P., Volk, H., 1994. Maitotoxin activates a nonselective cation
723 channel and stimulates Ca^{2+} entry in MDCK renal epithelial
724 cells. *Mol. Pharmacol.* 45, 300–305.
725 Escobar, L.I., Salvador, C., Martínez, M., Vaca, L., 1998.
726 Maitotoxin, a cationic channel activator. *Neurobiology* 6 (1),
727 59–74.
728 Estacion, M., Nguyen, H.B., Gargus, J.J., 1996. Calcium is
permeable through a maitotoxin-activated nonselective cation

channel in mouse L cells. *Am J Physiol.* 270 (4 Pt 1),
C1145–C1152.
Grynkiwicz, G., Poenic, M., 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., Daly, J., 1989. Maitotoxin, a potent,
general activator of phosphoinositide breakdown. *FEBS Letters*
243 (2), 307–312.
Gusovsky, F., 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., Vaca, L., 1997. Characterization of
the maitotoxin-induced calcium influx pathway from human
skin fibroblasts. *Cell Calcium* 22 (1), 31–38.
Harootunian, A.T., Kao, J.P., Eckert, B.Y., Tsien, R.Y., 1989.
Fluorescence ratio imaging of cytosolic free Na⁺ in individual
fibroblasts and lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 264, 19458–19467.
Konoki, K., Hashimoto, M., Murata, M., 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.
Lehane, L., Lewis, R.J., 2000. Ciguatera: recent advances but the
risk remains. *Int. J. Food Microbiol.* 1, 61 (2–3), 91–125.
Leech, C.A., 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.
Leech, C.A., Habener, J.F., 1998. A role for Ca^{2+} -sensitive
nonselective cation channels in regulating the membrane
potential of pancreatic β -cells. *Diabetes* (47), 1066–1073.
Murata, M., Naoki, H., Matsunaga, S., Satake, M., 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.
Murata, M., Yasumoto, T., 2000. The structure elucidation and
biological activities of high molecular weight algal toxins:
maitotoxin, prymnesins and zooxanthellatoxins. *Nat. Prod.*
Rep. 17 (3), 293–314.
Musgrave, I.F., Seifert, R., Schultz, G., 1994. Maitotoxin activates
cation channels distinct from the receptor-activated non-
selective cation channels of HL-60 cells. *Biochem. J.* 301(Pt
2), 437–441.
Ohizumi, Y., Yasumoto, T., 1983. 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.
Pin, J.P., Yasumoto, T., Bockaert, J., 1988. Maitotoxin-evoked
 γ -aminobutyric acid release is due not only to the opening of
calcium channels. *J. Neurochem.* 50, 1227–1232.
Roe, M.W., Worley III, J.F., Qian, F., Tamarina, N., Mittal, A.A.,
Dralyuk, F., Blair, N.T., Mertz, R.J., Philipson, L.H.,
Dukes, I.D., 1998. Characterization of a Ca^{2+} + release-
activated nonselective cation current regulating membrane
potential and $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in transgenically derived
beta-cells. *J. Biol. Chem.* 273 (17), 10402–10410.
Schilling, W.P., Sinkins, W.G., Estacion, M., 1999. Maitotoxin
activates a nonselective cation channel and a P2Z/P2X(7)-like
cytolytic pore in human skin fibroblasts. *Am. J. Physiol.* 277 (4
Pt 1), C755–C765.
Soergel, D.G., Gusovsky, F., Yasumoto, T., Daly, J.W., 1990.
Stimulatory effects of maitotoxin on insulin release in

729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784

ARTICLE IN PRESS

785	insulinoma HIT cells: role of calcium uptake and phospho-	
786	inositide breakdown. <i>J. Pharmacol. Exp. Ther.</i> 255 (3), 1360-	841
787	1365.	842
788	Sorrentino, G., Monsurro, M.R., Singh, I.N., Kanfer, J.N., 1997.	843
789	Membrane depolarization in LA-N-1 cells. The effect of	844
790	maitotoxin is Ca(2+) and Na(+)-dependent. <i>Mol. Chem.</i>	845
791	<i>Neuropathol.</i> 30 (3), 199-211.	846
792	Tagliatalata, M., Amoroso, S., Yasumoto, T., Di Renzo, G.,	847
793	Annunziato, L., 1986. Maitotoxin and Bay-K-8644: two	848
794	putative calcium channel activators with different effects on	849
795	endogenous dopamine release from tuberoinfundibular neurons.	850
796	<i>Brain Res.</i> 3, 381(2), 356-8.	851
797	Takahashi, M., Ohizumi, Y., Yasumoto, T., 1982. Maitotoxin, a	852
798	Ca2+ channel activator candidate. <i>J. Biol. Chem.</i> 257 (13),	853
799	7287-7289.	854
800	Takahashi, M., Tatsumi, M., Ohizumi, Y., Yasumoto, T., 1983.	855
801	Ca2+ channel activating function of maitotoxin, the most potent	856
802	marine toxin known, in clonal rat pheochromocytoma cells.	857
803	<i>J. Biol. Chem.</i> 258, 10944-10949.	858
804	Thompson, T.E., Tillack, T.W., 1985. Organization glycosphingo-	859
805	lipids in bilayers and plasma membranes of mammalian cells.	860
806	<i>Annu. Rev. Biophys. Chem.</i> 14, 361-386.	861
807	Ueda, H., Tamura, S., Harada, H., Yasumoto, T., Takagi, H., 1986.	862
808	The maitotoxin-evoked Ca2+ entry into synaptosomes is	863
809	enhanced by cholera toxin. <i>Neurosci. Lett.</i> 67 (2), 141-146.	864
810		865
811		866
812		867
813		868
814		869
815		870
816		871
817		872
818		873
819		874
820		875
821		876
822		877
823		878
824		879
825		880
826		881
827		882
828		883
829		884
830		885
831		886
832		887
833		888
834		889
835		890
836		891
837		892
838		893
839		894
840		895
		896

SECCIÓN II

EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE CINASAS DE TIROSINA Y DE LA SOBREEXPRESIÓN PROTEÍNA *SRC* EN LA ENTRADA DE Ca^{2+} INDUCIDA POR MAITOTOXINA.

Datos no publicados. Artículo en preparación como primer autor.

Con base en artículos publicados por diferentes grupos de trabajo, en los cuales describen a la genisteína como una sustancia capaz de disminuir la entrada de Ca^{2+} inducida por la toxina, nosotros nos propusimos estudiar el efecto de este y otros inhibidores de cinasas de tirosina, con el fin de caracterizar con mas detalle la posible participación de una cinasa de tirosina en la respuesta a la MTX.

La genisteína y la tirfostina (inhibidores de cinasas de tirosina con estructuras diferentes), disminuyen la entrada del Ca^{2+} y Na^{+} inducida por la MTX. Por otra parte, la daidzeína, el análogo inactivo de la genisteína, no afecta la respuesta a la toxina.

Los datos anteriores sugieren fuertemente que hay una cinasa de tirosina involucrada en la activación de la entrada del Na^{+} y Ca^{2+} inducidas por la MTX. Mas aún, la expresión de una forma constitutivamente activa de *src* (proteína cinasa de tirosina) potencia la entrada de Ca^{2+} inducida por la MTX. Estos datos sugieren fuertemente que la respuesta a la MTX es modulada por una cascada de señalización, que incluye uno o varios pasos de fosforilación en los cuales está involucrada una o más cinasas de tirosina pertenecientes a la familia *src*.

EFFECTO DE INHIBIDORES DE CINASAS DE TIROSINA EN LA ENTRADA DE Ca^{2+} INDUCIDA POR MTX.

CINASAS CON ESPECIFICIDAD EN RESIDUOS DE TIROSINA.

La fosforilación esta implicada en la regulación de una extensa variedad de respuestas biológicas, que incluyen proliferación celular, migración, diferenciación y supervivencia de las células (Tomas y cols. 1997). La actividad de las proteínas cinasas de tirosina (PTK) es esencial para la transmisión de algunas de estas señales.

Las cinasas de tirosina se han clasificado en dos grandes grupos: El primer grupo incluye a los receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK) y el segundo grupo incluye a cinasas de tirosina del tipo no receptor (nRTK).

Los RTK catalizan la transferencia del fosfato y del ATP al grupo hidroxilo de los residuos de tirosina de algunas proteínas. Todos los RTK contienen una región o dominio de unión a ligando extracelular, que usualmente esta glicosilado. La región extracelular esta conectada a una región citoplásmica por una hélice transmembranal. La porción citoplásmica contiene una parte central con el dominio de cinasa y secuencias regulatorias que están sujetas a autofosforilación y a fosforilación por proteínas cinasas heterólogas.

Los RTK se encuentran normalmente como monómeros, y para activarse requieren la unión de un ligando en la región extracelular. La unión del ligando al receptor induce que dos receptores se dimerizen, esta unión promueve la autofosforilación de los dominios citoplásmicos. Es decir, parte de un ligando se une a un receptor y la otra parte se une al otro receptor, esta unión es estabilizada por las interacciones entre los receptores (Schlessinger 2000). Sin embargo, las estrategias moleculares para inducir que los receptores se dimerizen son diferentes para cada complejo.

Los RTK son moléculas muy importantes, porque reclutan y activan a una gran variedad de proteínas que están involucradas en vías de señalización. Muchos de los sitios probables de fosforilación están localizados en regiones no catalíticas de la molécula receptora. Estos sitios funcionan como sitios de unión a dominios SH2 (homóloga a *src*) o a los dominios PTB (sitios de unión a fosfotirosinas, phosphotyrosine binding) Por lo que los RTK, además de funcionar como receptores también funcionan como una plataforma de reconocimiento y reclutamiento de proteínas específicas.

Las proteínas que contienen dominios SH2 y PTB son proteínas moduladoras por naturaleza. Muchas de estas proteínas, tienen actividad enzimática intrínseca y los módulos proteicos pueden interactuar con proteínas, fosfolípidos o con ácidos nucleicos. Sin embargo, no son los únicos módulos proteicos, existen otros dominios proteicos que están involucrados en los procesos de señalización

Los dominios SH2 son regiones altamente conservadas de aproximadamente 100 aminoácidos, que reconocen fosfotirosinas. Estos dominios se unen frecuentemente a dominios catalíticos. Muchas proteínas poseen un solo dominio SH2, mientras que otras poseen más de uno. Los dominios PTB también reconocen a fosfotirosinas, sin embargo algunos dominios PTB se unen a secuencias no fosforiladas, mientras que otros se unen a ambos tipos de secuencias. Los dominios SH3, son módulos de 60-85 aa que participan en la interacción proteína-proteína, y se unen específicamente a regiones ricas en prolina. Frecuentemente se encuentran cercanas a los dominios SH2 de la misma proteína. Otro tipo de dominios involucrados en la señalización son los dominios homólogos a Plekstrina (PH), denominados así por su homología con la proteína plaquetaria plekstrina. Se encuentra en una gran variedad de proteínas involucradas en la transducción de señales y en proteínas del citoesqueleto formados por dominios de 100 aa. Generalmente, estos dominios muestran una baja homología entre ellos, sin embargo lo que los hace parecido es entre sí es el

arreglo tridimensional que presentan. Los dominios PH se unen específicamente a PIP_2 (fosfatidilinositol bis-fosfato) (Schlessinger 2000).

Los receptores con actividad de cinasas de tirosina incluyen a los receptores membranales para un grupo de factores solubles de crecimiento y para hormonas, tales como: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de parecido a la insulina (Thomas y cols 1997).

Al segundo pertenecen todas las cinasas del tipo no receptor (nRTK), es decir las cinasas citosólicas. Cada variante estructural presuntamente actúa en algún proceso celular y/o en alguna una vía metabólica específica. En casi todos los casos el papel de estas cinasas es desconocido, sin embargo presentan dominios proteicos como SH2, SH3 y PH. De este tipo de proteínas se han descrito 9 familias, de las cuales la mejor caracterizada es la familia *src*.

Src es una proteína cinasa de tirosinas, del tipo no receptor, y esta involucrada en múltiples vías de señalización, las cuales incluyen adhesión celular, asociación con integrinas, y asociación con factores de crecimiento previamente activados por sus respectivos agonistas (Thomas 1997; Zang y cols., 1996). La actividad enzimática de esta proteína, es regulada negativamente por la fosforilación en el C-terminal en el residuo de tirosina (aminoácido 529). La fosforilación de este residuo, crea un sitio de unión con el motivo SH2, como resultado de esta unión se da un cambio conformacional lo cual restringe el acceso al dominio de cinasa por sus sustratos. La sustitución de la tirosina que se encuentra en esta posición por fenilalanina, abate la interacción y el resultado es una forma constitutivamente activa de esta cinasa. Por otra parte, la sustitución de la arginina (residuo 297) por lisina en la región de unión a ATP en el sitio de cinasa de tirosina, abate la actividad de fosfotransferasa de la enzima, lo cual resulta en una proteína constitutivamente inactiva, capaz de bloquear a los factores de crecimiento ya estimulados (Thomas 1997).

INHIBIDORES CON ESPECIFICIDAD EN RESIDUOS DE TIROSINA .

La función biológica de las cinasas se ha explorado con la ayuda de inhibidores específicos. Estas herramientas farmacológicas han permitido argumentar la participación de las cinasas en procesos biológicos tales como la proliferación celular (Akiyama 1991). En particular para las cinasas con especificidad hacia los residuos de tirosina, se ha demostrado la utilidad de inhibidores tales como la genisteína y la tirfostina (ver figura 4).

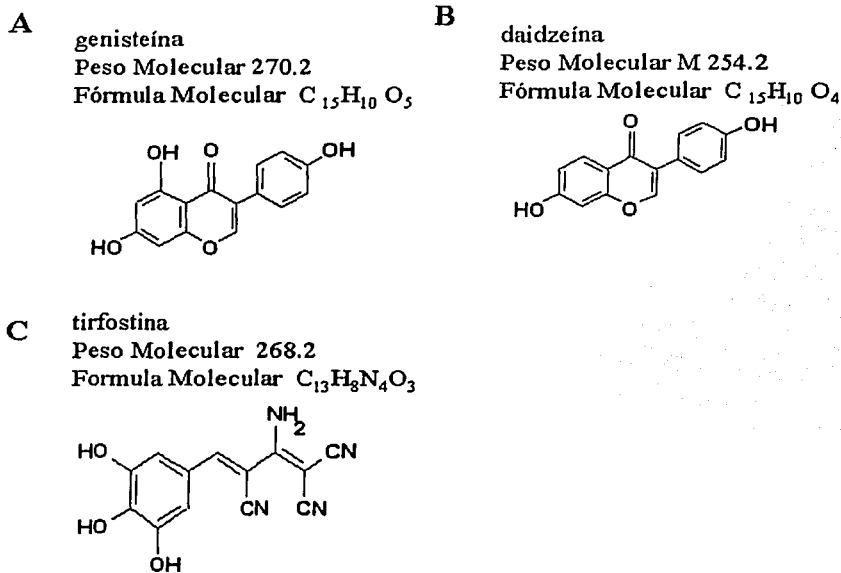


Figura 4. Estructura química de la genisteína, dadzeína y tirfostina. **A:** La genisteína (4',5,7-trihidroxiisoflavona) es un compuesto que se encuentra en altas concentraciones en la soya. La K_i de este inhibidor es del orden μM ; además de actuar como inhibidor de PTK también actúa como inhibidor competitivo del ATP; sin embargo, el ATP y la genisteína son estructuralmente diferentes, por lo que es posible que este compuesto reconozca diferentes regiones (Akiyama, 1991). **B:** Estructura química del análogo inactivo de la genisteína; nótese que la variación en la estructura es de tan sólo un grupo OH **C:** Las tirfostinas son potentes inhibidores de la autofosforilación de PTK; estas sustancias se sintetizan químicamente. Las células en cultivo pueden ser pretratadas con este compuesto, que penetra aproximadamente en 20 minutos. La vida media de estas sustancias es de aproximadamente 16-24 hrs. Estas sustancias poseen una especificidad muy restringida (Levitzyk y cols., 1991)

Con el fin de determinar el papel de cinasas de tirosina en la activación de la entrada del Ca^{2+} y Na^+ inducida por la MTX, en el presente estudio utilizamos estos dos poderosos inhibidores.

Para ver el efecto de estos inhibidores se realizaron curvas dosis-respuesta a la MTX en ausencia (figuras 5a y 5c) y presencia de genisteína (figura 5b) y de tirofostina (figura 5d). Las células fueron pretratadas durante 20 y 30 min con genisteína y tirofostina respectivamente. Como se puede observar, ambos inhibidores (estructuralmente diferentes) redujeron significativamente la entrada de Ca^{2+} inducida por la MTX, lo cual sugiere fuertemente que hay una cinasa de tirosina involucrada en la respuesta a la MTX.

Con el fin de confirmar que el efecto observado se debía al bloqueo de una cinasa y no al bloqueo de la vía de conducción de Ca^{2+} activada por la MTX, utilizamos a la daidzeína, el análogo inactivo de la genisteína. La daidzeína es estructuralmente muy similar a la genisteína (Fig. 4), pero este análogo es incapaz de inhibir las cinasas de tirosina. Se esperaba que si el efecto obtenido con la genisteína se debiera a un bloqueo inespecífico de la vía de conducción activada por MTX (NSCC-MTX), dicho bloqueo se mantuviera con este análogo inactivo. Los resultados obtenidos demuestran que el análogo inactivo fue incapaz de afectar la entrada de Ca^{2+} y Na^+ estimulada por MTX.

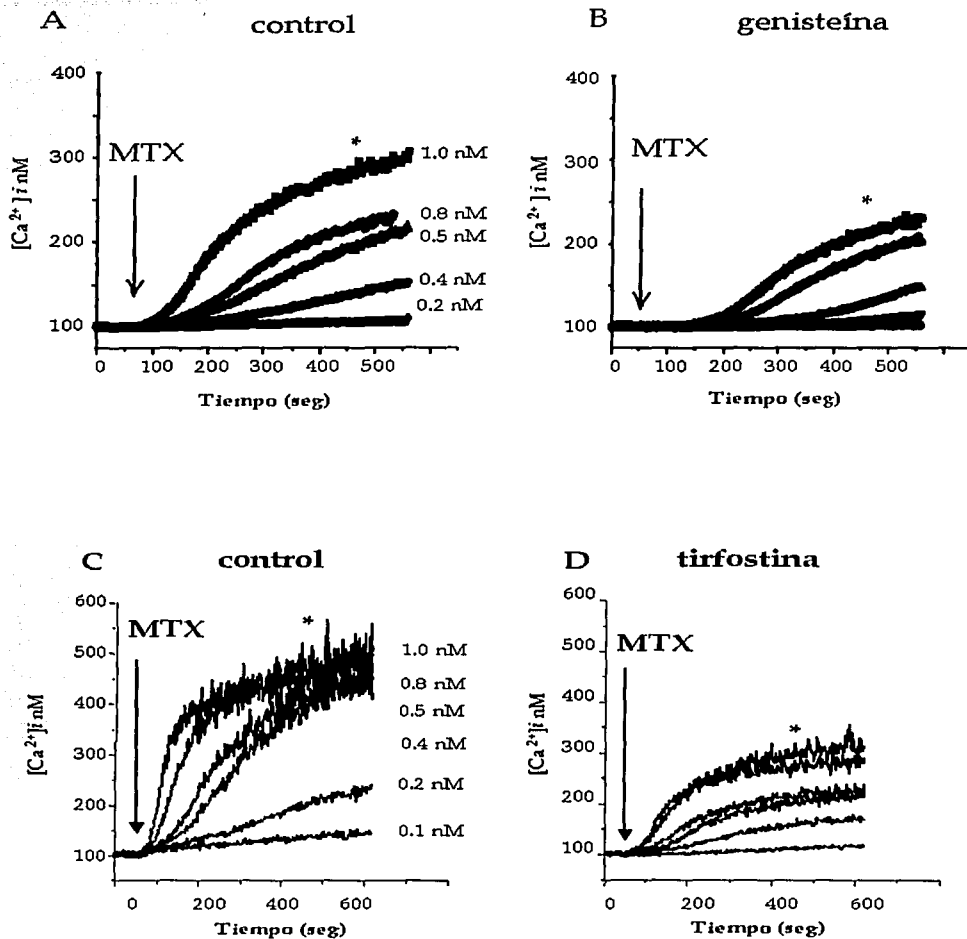


Figura 5: Efecto de los inhibidores de las cinasas de tirosina en la entrada de Ca^{2+} inducida por la MTX. Las concentraciones de MTX utilizadas están a la derecha de las figuras y el tiempo de aplicación está indicado por la flecha vertical. Gráficas A y C: Experimentos representativos que ilustran la respuesta típica a la MTX. Gráficas B y D en este caso las células fueron previamente incubadas con genisteína (100 μ M; 20 min) y tirifostina (5 μ M; 30 min).

Nota: Los experimentos controles y con los diferentes tratamientos se realizaron con el mismo lote de células.

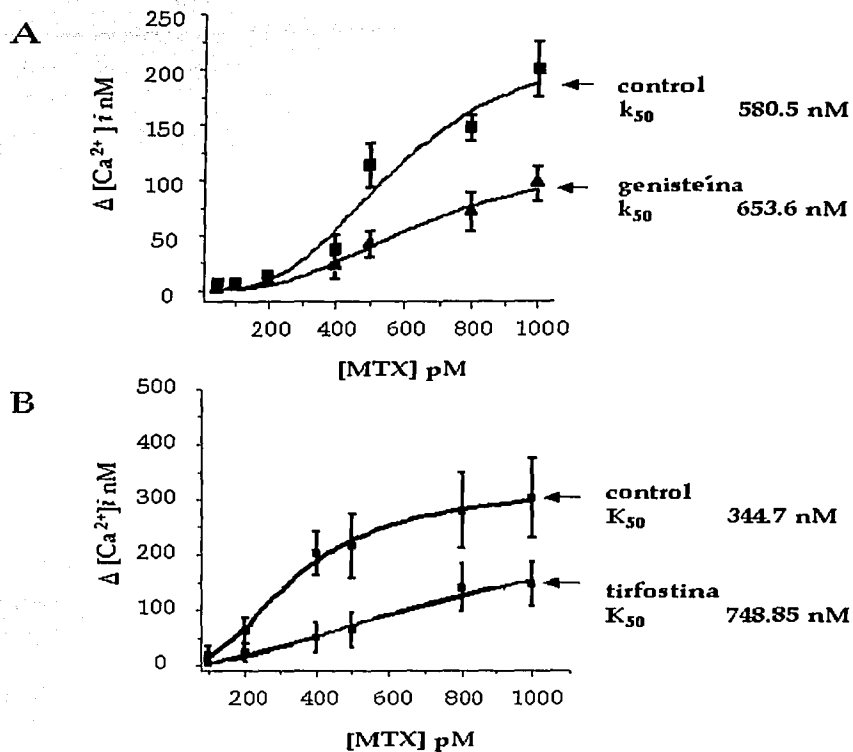


Figura 6. Gráficas comparativas de los datos normalizados entre los controles y los diferentes tratamientos (genisteína y tirfostina). Las líneas continuas representan el ajuste a la ecuación de Hill.

A: genisteína

B: tirfostina.

Resultados similares se obtuvieron midiendo la entrada de Na^+ inducida por la MTX mediante el uso del indicador SBFI en las células pretratadas con genisteína (figura 7A). Como se puede observar en la figura (7B) el efecto inhibitorio de la genisteína depende de la concentración.

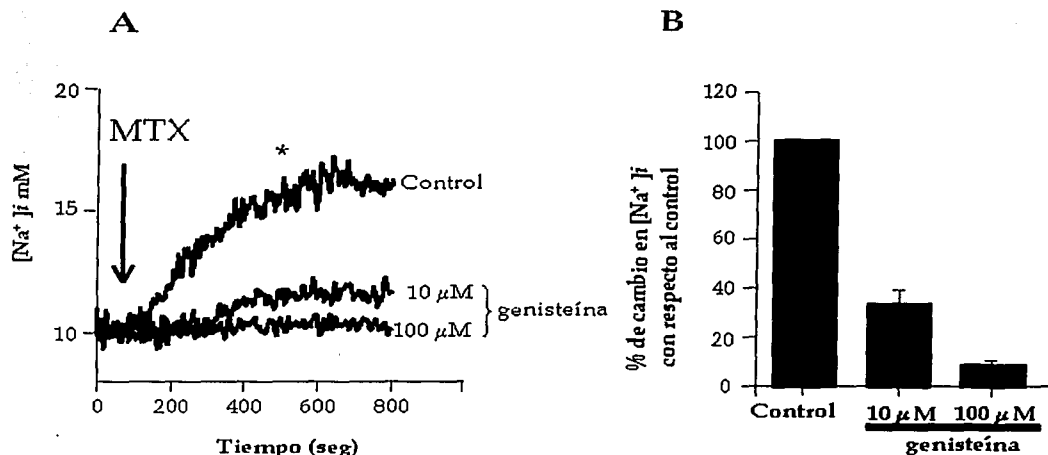


Figura 7. La genisteína inhibe la entrada de Na^+ activada por MTX. Las células se cargaron con el indicador fluorescente SBFI.

A: Ejemplo representativo del curso temporal de la entrada de Na^+ inducida con 500 pM de MTX, en células control, sin genisteína (trazo superior) y con diferentes concentraciones de genisteína (10 y 100 μM). El tiempo de adición de la toxina está señalado con la flecha vertical y la concentración de genisteína se muestra a la derecha de la gráfica.

B: Normalización de los datos de 6 experimentos independientes. Se gráfico el porcentaje del cambio con respecto al control. Los valores utilizados para construir esta gráfica se obtuvieron en el tiempo indicado por el asterisco en el panel A.

EL PAPEL DE LA *src* EN LA RESPUESTA A LA MAITOTOXINA.

Considerando que los inhibidores de cinasas de tirosina reducen significativamente la entrada de Ca^{2+} y Na^{+} estimulada por la MTX, decidimos explorar el efecto de la sobreexpresión de la cinasa *src* constitutivamente activa sobre la respuesta a la MTX. El efecto esperado de la sobreexpresión de esta proteína sería que al estar activada, *src* podría interaccionar con algún componente o componentes de la cascada de señalización activada por la MTX.

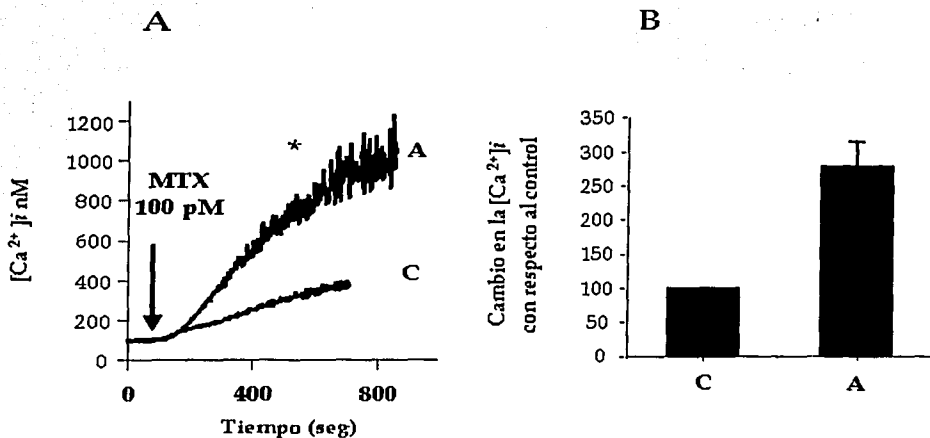
Para esto transfectamos células CHO (materiales y métodos) en cultivo con el plásmido conteniendo la isoforma constitutivamente activa de la cinasa *src*. Las células transfectadas se cargaron con el indicador Fura-2AM, y se midió la entrada de Ca^{2+} en respuesta a 100 pM MTX (ver figura 8).

La entrada de Ca^{2+} inducida por la MTX en las células transfectadas con la *src* constitutivamente activada fue mayor en comparación con las células sin transfectar. Lo cual indica que *src* o algún miembro de la familia *src* esta involucrado en la vía de señalización.

Estamos en el proceso de realizar una curva dosis respuesta a la toxina en células transfectadas con esta isoforma de *src*.

Sin embargo, es importante determinar si la actividad de cinasa de la *src* endógena aumenta cuando las células se estimulan con la MTX. Para ello pretendemos transfectar las células con una cinasa silvestre (no activada constitutivamente), con epítipo en su extremo amino terminal. Con el uso de anticuerpos específicos contra este epítipo, pretendemos visualizar la activación y translocación de la *src* en respuesta a la MTX.

Finalmente, por medio del uso de péptidos consenso para fosforilación por la *src*, pretendemos realizar estudios de su activación en respuesta a la MTX, midiendo los niveles de fosforilación de estos péptidos en un ensayo *in vitro*.



A cinasa activada constitutivamente (Y529F)
C Control

Figura 8. La cinasa SRC produce un aumento significativo de la respuesta a la MTX. En el panel A se muestra un ejemplo representativo de la entrada de calcio en respuesta a la MTX. El trazo inferior es el experimento control, y el trazo superior se realizó con células transfectadas con la cinasa *src* constitutivamente activa. El momento de adición de la toxina está señalado con la flecha vertical. En la gráfica B se muestra la normalización de los datos. Se graficó el porcentaje de los cambios con respecto al control (n=4). Los valores se obtuvieron en el tiempo indicado por el asterisco.

ARTICULOS ANEXOS

MARTINEZ-FRANÇOIS J. R., MORALES-TLALPAN, V. AND VACA L. (2002).
CHARACTERIZATION OF THE MAITOTOXIN-ACTIVATED CATIONIC
CURRENT FROM HUMAN SKIN.

CO-AUTOR.

PUBLICADO EN LA REVISTA JOURNAL OF PHYSIOLOGY.

El presente trabajo estudia la activación de una corriente cationica no selectiva por la MTX. Esta corriente es producida por la entrada de Ca^{2+} y Na^+ a la célula en respuesta a MTX. El curso temporal de la activación de la corriente concuerda con el aumento de la concentración de Ca^{2+} y Na^+ intracelulares inducidos por la MTX, lo cual sugiere fuertemente que ambos iones permean por la misma vía. En los fibroblastos, el Ca^{2+} también juega un papel preponderante en la modulación de la entrada de iones activada por la MTX. La remoción de Ca^{2+} de la solución intracelular o extracelular resulta en la inhibición del efecto de MTX. Este catión divalente no puede ser reemplazado por otros cationes como Ba^{2+} , Mn^{2+} o Mg^{2+} .

Characterization of the maitotoxin-activated cationic current from human skin fibroblasts

Juan Ramón Martínez-François, Verónica Morales-Tlalpan and Luis Vaca

Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México D.F. 04510

The maitotoxin (MTX)-induced cationic current (I_{mix}) from human skin fibroblasts was characterized using the patch-clamp technique in whole-cell configuration. Under resting conditions (absence of MTX), the main current observed is produced by an outwardly rectifying K^+ channel which is inhibited by 1 mM TEA. The current reversal potential was -86 mV ($n = 12$). MTX (500 pM) activated a current with a linear current–voltage relationship and a reversal potential of -10 mV ($n = 10$). Replacing the extracellular Na^+ and K^+ with *N*-methyl-D-glucamine (NMDG) caused a shift of the reversal potential to a value below -100 mV, indicating that Na^+ and K^+ , but not NMDG, carry I_{mix} . Further ion selectivity experiments showed that Ca^{2+} carries I_{mix} also. The resulting permeability sequence obtained with the Goldman–Hodgkin–Katz equation yielded $Na^+ (1) \approx K^+ (1) > Ca^{2+} (0.87)$. The I_{mix} activation time course reflected the changes in intracellular Ca^{2+} and Na^+ measured with the fluorescent indicators fura-2 and SBFI, respectively, suggesting that the activation of I_{mix} brings about an increment in intracellular Ca^{2+} and Na^+ . Reducing the extracellular Ca^{2+} concentration below 1.8 mM prevented the activation of I_{mix} and the increment in intracellular Na^+ induced by MTX. Mn^{2+} and Mg^{2+} could not replace Ca^{2+} , but Ba^{2+} could replace Ca^{2+} . MTX activation of current in 10 mM Ba^{2+} was approximately 50% of that induced in the presence of 1.8 mM Ca^{2+} . When 5 mM of the Ca^{2+} chelator BAPTA was included in the patch pipette, MTX either failed to activate the current or induced a small current (less than 15% of the control), indicating that intracellular Ca^{2+} is also required for the activation of I_{mix} . Intracellular Ba^{2+} can replace Ca^{2+} as an activator of I_{mix} . However, in the presence of 10 mM Ba^{2+} the activation by MTX of the current was 50% less than the activation with mM concentrations of free intracellular Ca^{2+} .

(Resubmitted 20 July 2001; accepted after revision 14 September 2001)

Corresponding author: L. Vaca: Department of Cell Biology, Institute of Cellular Physiology, UNAM, México, D.F. 04510.
Email: lvaca@ifisiol.unam.mx

Maitotoxin (MTX), a water-soluble polyether obtained from the marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*, is a potent activator of Ca^{2+} influx in a wide variety of cells (Gusovsky & Daly, 1990). This toxin may be one of the molecules involved in the seafood poisoning known as ciguatera (Yasumoto *et al.* 1976).

Ciguatera is a severe health problem in many countries where seafood is an important part of the diet. There are more than 20 000 cases of this disease each year worldwide. However, it is believed that many more cases are not properly diagnosed or reported (Yasumoto & Satake, 1996). Elucidating the cellular and molecular mechanisms underlying MTX action may help to prevent or treat ciguatera poisoning.

MTX is a powerful tool for studying changes in Ca^{2+} homeostasis. The fact that MTX does not appear to have ionophoretic activity (Takahashi *et al.* 1983), and that this toxin can activate Ca^{2+} influx in practically all cells tested from a wide variety of organisms, suggests the presence of a highly conserved MTX receptor (Escobar *et al.* 1998).

Another feature of this toxin is its potency. MTX effects are observed with toxin concentrations ranging from picomolar to nanomolar. Recently, we reported that human skin fibroblasts are very sensitive to MTX. The influx of Ca^{2+} showed a half-activation constant of 450 fM (Gutierrez *et al.* 1997).

Although the mechanism by which MTX activates the influx of Ca^{2+} remains unsolved, it appears to involve the activation of a current (I_{mix}) through Ca^{2+} -permeable cationic channels, as indicated by patch-clamp experiments performed on different cells and tissues (reviewed in Escobar *et al.* 1998). It is not yet clear whether the activation of this channel is direct, or mediated by a second messenger cascade.

The interactions between MTX and its putative receptor appear to be complex, since in some cells the presence of extracellular Ca^{2+} and/or Na^+ is required for the activation of I_{mix} (Escobar *et al.* 1998). However, no detailed characterization of the cation requirements for the MTX effect has been reported to date.

In this study we have characterized I_{mix} from human skin fibroblasts utilizing the whole-cell configuration of the

patch-clamp technique and fluorescent indicators to measure changes in the intracellular Ca^{2+} and Na^+ concentrations in response to MTX. The results obtained indicate that MTX activates a cationic current with a linear current-voltage relationship. The time course of activation of I_{mix} is correlated with the changes in intracellular Ca^{2+} and Na^+ as monitored with fluorescent indicators.

We have also characterized the ionic requirements for the MTX effect. We have found that in human skin fibroblasts extracellular Ca^{2+} , but not Na^+ , is required for the activation of I_{mix} . Ca^{2+} is required only during the initial application of MTX; removal of this cation after the onset of the response did not eliminate I_{mix} .

Other divalent cations such as Mg^{2+} or Mn^{2+} cannot replace extracellular Ca^{2+} , whereas Ba^{2+} can partially compensate for the absence of free extracellular Ca^{2+} . In 10 mM Ba^{2+} , MTX activates 50% of the current obtained with 1.8 mM Ca^{2+} .

Intracellular Ca^{2+} is also required for MTX action. When 5 mM BAPTA was included in the patch pipette, MTX failed to activate I_{mix} , indicating that nanomolar concentrations of free intracellular Ca^{2+} are also required for the activation of I_{mix} . As in the case of extracellular divalent cations, intracellular Mg^{2+} or Mn^{2+} cannot replace Ca^{2+} . Only Ba^{2+} at high concentrations can partially compensate for the absence of Ca^{2+} .

The results presented here, in combination with those found in the literature, indicate that MTX is a powerful and complex Ca^{2+} -mobilizing agent.

METHODS

Solutions and reagents

All salts used are analytical grade (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Ethyleneglycol-bis-(β -aminoethylether) N,N,N',N' -tetraacetic acid (EGTA), 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane- N,N,N',N' -tetraacetic acid (BAPTA), bovine serum albumin (BSA) and trypsin A3 were purchased from the Sigma Chemical Co. Maitotoxin was purchased from Calbiochem. Fura-2 acetoxy-methyl ester (fura-2 AM) was purchased from Molecular Probes. Maitotoxin was dissolved in a 10 mM Mes solution pH 5.6. For patch-clamp experiments, the extracellular solution contained (mM): 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl_2 , 10 Hepes, 5 glucose and 2 CaCl_2 ; pH 7.4. The CaCl_2 was omitted in low Ca^{2+} solutions and in divalent cation experiments as indicated in the text and figure legends. The intracellular solution contained (mM): 145 potassium aspartate, 5 NaCl, 10 Hepes, 1 MgCl_2 and 2 EGTA; pH 7.2. In experiments performed under low intracellular Ca^{2+} conditions, EGTA was replaced with 5 mM BAPTA. For intracellular Ca^{2+} and Na^+ measurements, the extracellular solution contained (mM): 120 NaCl, 1.2 KH_2PO_4 , 1.2 MgSO_4 , 4.75 KCl, 10 glucose, 20 Hepes, 1.8 CaCl_2 and 0.05% BSA; pH 7.2–7.4. In experiments with low extracellular Na^+ , this cation was replaced with N -methyl-D-glucamine (NMDG). To determine the relative ionic permeabilities for Ca^{2+} versus Na^+ and K^+ the following extracellular solutions were used (mM): 145 KCl or NaCl, 10 Hepes, 5 glucose and 2 CaCl_2 ; pH 7.4. When K^+ was present in the extracellular solution,

2 mM TEA was also added to block K^+ currents. The intracellular solutions contained (mM): 145 potassium or sodium aspartate, 10 Hepes and 2 EGTA; pH 7.2.

Cell culture

Human skin fibroblast cells were obtained from skin biopsies of healthy donors as previously described (Soto *et al.* 1996). Cells were given with the informed consent of the donors and all procedures were evaluated and approved by the ethics committee of the Universidad Nacional Autónoma de México and conformed to The Declaration of Helsinki. Cells were maintained in culture at 37°C (8–13 passages) in a humidity controlled incubator with 5% in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine (Gibco), 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ streptomycin and 25 ng ml^{-1} amphotericin B (Gibco).

Patch-clamp experiments

When monolayers reached confluency the cells were mechanically dispersed with a plastic pipette. Cells were placed on 35 mm Petri dishes in extracellular solution and mounted on the stage of a Nikon inverted microscope. The whole-cell configuration of the patch-clamp technique was used to study currents from single fibroblast cells under voltage-clamp (Hamill *et al.* 1981). Patch pipettes were made of 8161 glass (World Precision Instruments, Inc.) pulled to obtain pipette resistances in the range of 4–6 M Ω when measured in experimental solutions. Liquid junction potentials were compensated in experiments using NMDG-Cl solutions. The holding potential in all experiments was maintained at 0 mV. The cell capacitance varied between 8 and 12 pF. The AxoPatch 200A (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) was used as the patch-clamp amplifier. The reference electrode was an Ag-AgCl plug connected to the bath solution via a 100 mM KCl agar bridge. Voltage-clamp data were stored on tape and digitized later for analysis using the Digidata 1200 (Axon Instruments) analogue-digital interface and pCLAMP 6.0.4 software (Axon Instruments). The data were filtered at 10 kHz using a 4-pole Bessel filter (Axon Instruments) and digitized at 100 Hz. The binary data were converted to ASCII and multiple experiments were combined to obtain means \pm standard deviation (s.d.) using the SigmaPlot 2.0 software (Jandel Corporation). In all the described experiments, n = number of experiments performed for each condition. All experiments were performed at room temperature (22–25°C).

Determination of relative permeabilities

Ionic permeability ratios were calculated with a modified version of the Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) equation (González-Perrett *et al.* 2001):

$$\frac{P_{\text{Ca}}}{P_{\text{ion}}} = \frac{1 + \exp(-FV/RT) \{[\text{ion}]_i - [\text{ion}]_o \exp(-FV/RT)\}}{4 \{([\text{Ca}^{2+}]_o \exp(-2FV/RT)) - [\text{Ca}^{2+}]_i\}}$$

where V is the reversal potential (E_{ion}), R is the gas constant, T is the absolute temperature in kelvin, F is the Faraday constant and the ion is K^+ or Na^+ .

Free divalent cation determinations

Free concentrations of Ca^{2+} , Ba^{2+} and Mg^{2+} were determined using the program 'Bound and Determined' (BAD 4.35) as previously published (Brooks & Storey, 1992). Briefly, the free ion concentrations reported in this study were calculated by introducing the values of temperature, pH and concentrations of the buffers and all ions present in the experimental solutions into the BAD program.

Intracellular Ca²⁺ measurements

Confluent cells were mechanically dispersed with a plastic pipette after 2 min of incubation with 0.01% trypsin solution and placed in extracellular solution to a final concentration of $1.5\text{--}2 \times 10^6$ cells ml⁻¹ and incubated with 5 μM fura-2 AM for 45 min. After this, the cells were rinsed twice and incubated for 30 min in fura-2 AM-free solution. The cells were then rinsed 3–4 times and placed in a cuvette of an Aminco-Bowman series 2 luminescence spectrometer. The excitation wavelength was alternated between 340 and 380 nm every 2 s and the emission was collected at 510 nm. Each experiment was individually calibrated to obtain the maximum fluorescence after disrupting the cells with 0.1% Triton X-100, and the minimum fluorescence obtained after buffering the Ca²⁺ in the solution with 20 mM EGTA. The values obtained with this procedure were used to calculate the intracellular Ca²⁺ concentration according to previously published equations (Grynkiewicz *et al.* 1985). Auto-fluorescence of cells not loaded with fura-2 AM was subtracted from each experiment.

Intracellular Na⁺ measurements

Confluent cells were rinsed with Hanks' balanced salt solution (HBSS) and incubated for 2 min in 0.01% trypsin solution. After this, the cells were rinsed twice with extracellular solution and incubated for 45 min with extracellular solution containing 1% pluronic acid and 25 μM SBFI AM (Molecular Probes). The cells were rinsed and maintained in SBFI AM-free solution for 15 min, and placed in a cuvette of an Aminco-Bowman series 2 luminescence spectrometer. The excitation wavelength was 358 nm and the emission at 500 nm was collected every 2 s. Na⁺ calibration curves were performed according to previously published procedures for each individual experiment (Harootunian *et al.* 1989; Zhao *et al.* 1995).

RESULTS

K⁺ currents present in non-stimulated human skin fibroblasts

First we measured the currents present in human skin fibroblasts under resting conditions (absence of MTX). Figure 1A illustrates the outwardly rectifying current observed in fibroblasts studied with the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. This current showed a reversal potential of -86 mV (*n* = 12).

Increasing the extracellular K⁺ from 5 to 25 mM caused a shift of the reversal potential towards more positive values. Under this condition the reversal potential observed was -40 mV, which is near the predicted potential by the Nernst equation for a K⁺ electrode (-44 mV).

The outwardly rectifying current is completely inhibited by 1 mM TEA as illustrated in Fig. 1C. Figure 1D illustrates the current-voltage (*I*-*V*) relationships obtained in resting conditions (●), after increasing the extracellular K⁺ to 25 mM (□) and after the addition of 1 mM TEA (Δ).

These results indicate that under resting conditions, the main current present in human skin fibroblasts is produced by an outwardly rectifying K⁺ channel inhibited by TEA.

MTX activates a cationic current carried by K⁺, Na⁺ and Ca²⁺

The effect of 500 pM MTX on human skin fibroblast currents was measured. We have previously shown that at this toxin concentration, the maximal MTX response is achieved (Gutierrez *et al.* 1997). Interestingly, multiple applications of MTX up to a final concentration of 2 nM did not result in further changes in the amplitude of the MTX-induced current (data not shown). This result supports previously published data indicating that MTX has no ionophoretic activity.

After the addition of MTX, the activation of a linear current was observed when applying voltage ramps during a patch-clamp experiment in the whole-cell configuration (Fig. 2B). The linear current activated by MTX (*I*_{MTX}) showed a reversal potential of -10 mV (*n* = 10, Fig. 2B). Figure 2C compares the control current (before addition of MTX, ●) with the current evoked by MTX (Fig. 3C, □). Subtracting *I*_{MTX} from the control produced the net current activated by MTX (Fig. 3C, ▲). Due to the large amplitude of *I*_{MTX} in comparison with the control outwardly rectifying K⁺ current, the net current obtained after subtraction is very similar to *I*_{MTX} but it reverses at a slightly more positive value (-7 mV, Fig. 3C).

To determine the ionic selectivity of *I*_{MTX}, the cations from the extracellular bath solution were replaced with NMDG. Replacing the extracellular solution with NMDG-Cl

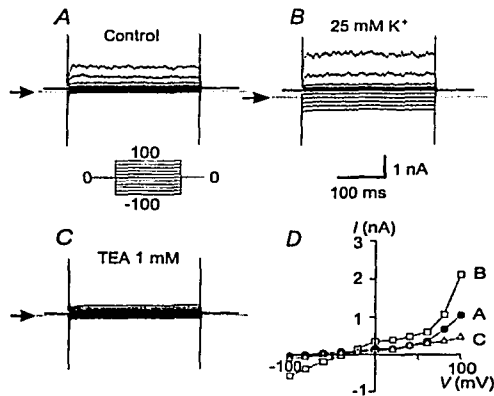


Figure 1. Basal K⁺ currents from human skin fibroblasts

Representative currents elicited in response to voltage steps from -100 to +100 mV (increment 20 mV) obtained from non-stimulated human skin fibroblasts. A, basal conditions. B, after increasing the extracellular K⁺ concentration from 5 to 25 mM. C, after applying 1 mM TEA. D, *I*-*V* curves for the three conditions described: basal (●), after increasing extracellular K⁺ to 25 mM (□) and after addition of 1 mM TEA (Δ). Representative traces are shown from one cell (*n* = 4). Arrows indicate zero current level. Holding potential, V_h = 0 mV.

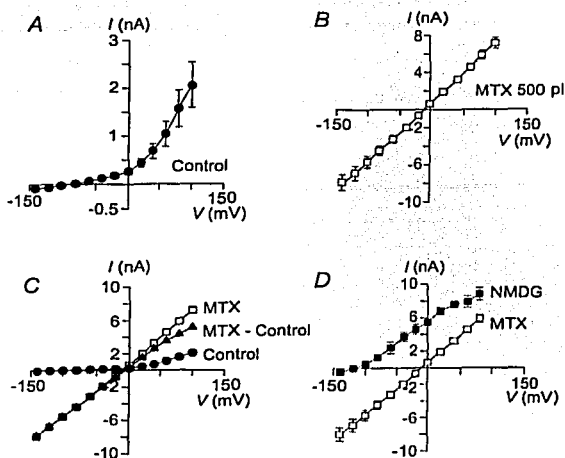


Figure 2. MTX activates a non-selective cationic current (I_{mix})

A, I - V curve of the basal K^+ current present in human skin fibroblasts in the absence of MTX, the current reversal potential is -85.8 ± 4.1 mV ($n = 12$). *B*, I - V curve of the current activated by 500 pM MTX, the current reversal potential is -10.10 ± 6.4 mV ($n = 10$). *C*, comparison of the I - V curves under control conditions (\bullet), total current after MTX application (control + MTX activated, \square) and the net current activated by MTX (total - control, \blacktriangle). *D*, I - V curves for I_{mix} obtained with physiological extracellular solution (\square) and with NMDG-Cl in the external medium ($n = 4$, \blacksquare). In the presence of external NMDG the current reversal potential shifts to values more negative than -100 mV. In all the cases means \pm s.d. are shown. Where not shown error bars are smaller than symbols. $V_h = 0$ mV.

resulted in a shift of the reversal potential of I_{mix} to a value more negative than -100 mV, indicating that I_{mix} carries cations but not NMDG (Fig. 2D). Under these experimental conditions, the calculated reversal potential for an anionic current according to the Nernst equation is near 0 mV.

Further ionic substitution experiments were performed to determine the relative permeability of Ca^{2+} with respect to K^+ and Na^+ (P_{Ca}/P_K and P_{Ca}/P_{Na}). I_{mix} was activated with

$[Ca^{2+}]_o = 2$ mM and symmetrical intra- and extracellular concentrations of K^+ or Na^+ (145 mM). When K^+ was present as the main cation, 2 mM TEA was added to the extracellular bath to inhibit the basal K^+ current present in fibroblasts. When I_{mix} was fully activated, $[Ca^{2+}]_o$ was raised to 5 mM and the change in the reversal potential (E_{rev}) was monitored (Fig. 3). Addition of 5 mM Ca^{2+} with Na^+ as the main cation present produced a shift in the E_{rev}

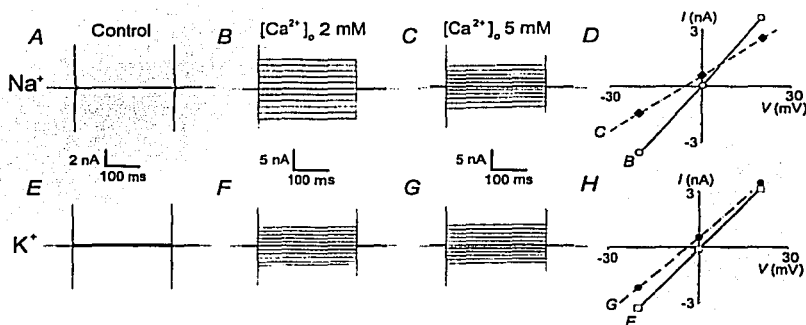


Figure 3. Relative cationic permeability of I_{mix}

Representative experiments showing the shift in the reversal potential of I_{mix} induced after increasing extracellular calcium from 2 to 5 mM. *A*, control currents (absence of MTX) in 145 mM symmetrical Na^+ produced by voltage steps from a holding potential of 0 mV to -100 mV and then to 100 mV in 20 mV steps. *B*, currents induced by 500 pM MTX in the presence of 2 mM extracellular Ca^{2+} . *C*, same cell as in *B* after raising extracellular Ca^{2+} to 5 mM. *D*, current-voltage relationship showing the mean values ($n = 4$) of the currents in 145 mM Na^+ and 2 mM Ca^{2+} (\circ — \circ) or 5 mM Ca^{2+} (\blacklozenge — \blacklozenge). *E*, control currents (absence of MTX) in 145 mM symmetrical K^+ and 2 mM TEA produced by voltage steps from a holding potential of 0 mV to -100 mV and then to 100 mV in 20 mV steps. *F*, currents induced by 500 pM MTX in the presence of 2 mM extracellular Ca^{2+} . *G*, same cell as in *F* after raising extracellular Ca^{2+} to 5 mM. *H*, current-voltage relationship showing the mean values ($n = 5$) of the currents in 145 mM K^+ and 2 mM Ca^{2+} (\square — \square) or 5 mM Ca^{2+} (\bullet — \bullet). The voltage scales in *D* and *H* show only the data between -30 and $+30$ mV to evidence the shift in the reversal potential. Horizontal dotted lines indicate the zero current level.

of -4.9 mV (Fig. 3D, $n = 4$). In a similar set of experiments with K^+ as the main cation present, the shift in the E_{rev} was -4.8 mV (Fig. 3H, $n = 5$). Calculating the relative permeabilities for each condition using a modified form of the GHK equation (Methods) resulted in P_{Ca}/P_{Na} and $P_{Ca}/P_K = 0.87$.

To evaluate the contribution of MTX to the changes in intracellular Ca^{2+} and Na^+ , cells were loaded with fluorescent indicators to measure the time course of changes in fluorescence. Whole-cell patch-clamp experiments were performed to follow the time course of I_{mix} activation.

Figure 4 illustrates representative experiments of the time course of activation of I_{mix} in response to 500 pM MTX (Fig. 4A) compared to the changes in intracellular Ca^{2+} (Fig. 4B) and Na^+ (Fig. 4C) as monitored by the fluorescent indicators fura-2 and SBFI, respectively. As illustrated in this figure, the time course of I_{mix} followed very closely the increment in intracellular Ca^{2+} and Na^+ induced by MTX. This result along with the selectivity experiments previously shown strongly suggests that the increments in intracellular Ca^{2+} and Na^+ are the result of the activation of I_{mix} . As we have previously shown, MTX does not induce release of Ca^{2+} from intracellular storage compartments in these cells (Gutierrez *et al.* 1997). Therefore, the changes in intracellular Ca^{2+} observed after MTX must result from Ca^{2+} influx.

Extracellular Ca^{2+} is required for the activation of I_{mix}

To investigate the dependence of extracellular Ca^{2+} on I_{mix} , we performed experiments in which the concentration of Ca^{2+} in the extracellular medium was modified.

Figure 5A illustrates the effect of 500 pM MTX on a cell bathed in the low Ca^{2+} extracellular solution. As shown in the figure, under these conditions MTX failed to activate I_{mix} . However, addition of 2 mM Ca^{2+} in the presence of MTX caused activation of I_{mix} (Fig. 5A, $n = 5$). To demonstrate that the current induced after Ca^{2+} application was not the result of Ca^{2+} re-addition, we performed experiments in which the extracellular Ca^{2+} was removed and later re-added in the absence of toxin (Fig. 5B). Under these conditions no current was observed until MTX was added.

Figure 5C shows that after I_{mix} is fully activated by the toxin, removal of extracellular Ca^{2+} has no effect on the current. This result indicates that Ca^{2+} is required to induce the current, but not to maintain I_{mix} , suggesting that Ca^{2+} is required for the association of MTX with its putative receptor.

Figure 5D shows that Ca^{2+} is required also for the increment in intracellular Na^+ induced by MTX and measured with SBFI. This result further supports the hypothesis that the increments in intracellular Na^+ are the result of I_{mix} activation.

Since Ca^{2+} is only required for the activation of I_{mix} , the relative permeability ratios for K^+ and Na^+ (P_K/P_{Na}) can be calculated once I_{mix} is fully activated by chelating extracellular Ca^{2+} with the addition of 5 mM EGTA to the bath solution. From these experiments the P_K/P_{Na} obtained was ~ 1 . The permeability ratios P_{Ca}/P_{Na} and P_{Ca}/P_K previously calculated (Fig. 3), give a selectivity of I_{mix} of Na^+ ($1 \approx K^+ > Ca^{2+}$ (0.87)).

Extracellular Ca^{2+} cannot be replaced by other divalent cations for I_{mix} activation

Since extracellular free Ca^{2+} is required for the activation of I_{mix} , it was important to determine if other divalent cations could replace Ca^{2+} for the activation of I_{mix} . MTX failed to activate I_{mix} when Mg^{2+} (up to 10 mM) replaced Ca^{2+} in the extracellular solution (Fig. 6A). Similar results were obtained with Mn^{2+} (data not shown). MTX in the presence of 5 mM extracellular Ba^{2+} induced about 25% of the current amplitude compared to 2 mM Ca^{2+} (Fig. 6B).

The percentage of current induced in the presence of Ba^{2+} , Mg^{2+} and Ca^{2+} is compared in Fig. 6D. In 10 mM Ba^{2+} , MTX induced about half the current amplitude activated in 2 mM Ca^{2+} . The Ca^{2+} requirement reached a saturation point

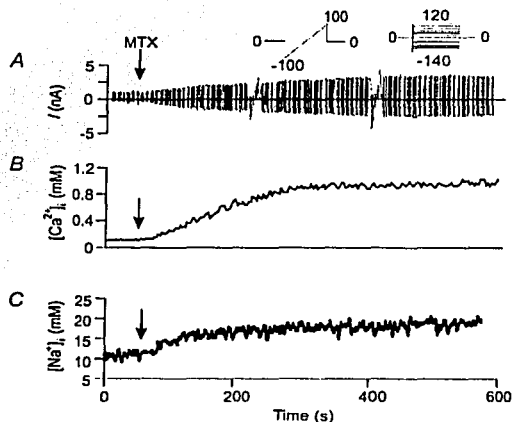


Figure 4. Time course of I_{mix} and the increments in intracellular Ca^{2+} and Na^+ concentrations

Concomitant measurements of current using patch clamp and intracellular Na^+ and Ca^{2+} with fluorescent indicators. *A*, a typical experiment showing the time course of I_{mix} activation. The current was evoked with continuous ramps from -100 to $+100$ mV. The ramps were interrupted to perform voltage steps from -140 to $+120$ mV in increments of 20 mV ($V_h = 0$ mV) to obtain $I-V$ curves. Voltage protocols shown in the inset. Vertical arrows indicate the time of addition of 500 pM MTX. *B*, time course of the changes in $[Ca^{2+}]_i$ in response to MTX monitored with the fluorescent indicator fura-2. *C*, time course of the changes in $[Na^+]_i$ monitored with the fluorescent indicator SBFI. Time scale is the same in all panels (shown at the bottom of the figure). Representative traces are shown from eight experiments.

around 1.8 mM, and further additions of Ca^{2+} did not result in I_{mix} amplitude increments (Fig. 6D).

Intracellular Ca^{2+} is also required for the activation of I_{mix}

The requirement of intracellular Ca^{2+} for the activation of I_{mix} was also evaluated (Fig. 7). When 5 mM BAPTA was included in the pipette solution to chelate the Ca^{2+} in the intracellular medium, MTX failed to activate I_{mix} (Fig. 7B). These results were obtained in the presence of 2 mM extracellular Ca^{2+} , indicating that free Ca^{2+} is required on both sides of the cell membrane for the activation of I_{mix} . Figure 7C shows the I_{mix} current density obtained with 1 mM free intracellular Ca^{2+} and in experiments with 5 mM BAPTA (no Ca^{2+} added). With BAPTA in the pipette, MTX induced 4.6% of the current activated without BAPTA (control 1.05 ± 0.3 nA pF^{-1} , BAPTA 0.05 ± 0.01 nA pF^{-1} , $n = 5$).

Intracellular Ca^{2+} can be replaced by Ba^{2+} but not by Mg^{2+}

The ability of divalent cations other than intracellular Ca^{2+} as activators of I_{mix} was evaluated by including BAPTA (5 mM) in the pipette solution along with a fixed concentration of Mg^{2+} or Ba^{2+} . The extracellular solution

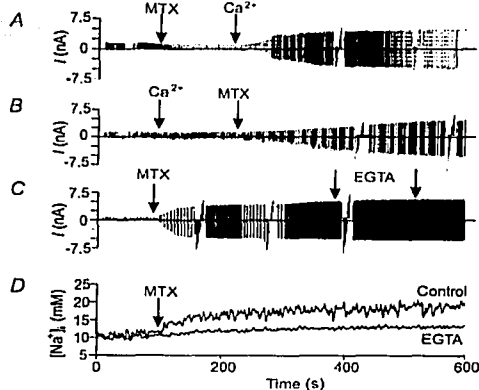


Figure 5. Extracellular cation requirement for the activation of I_{mix}

A, addition of MTX to the extracellular medium (in the absence of Ca^{2+}) did not induce the activation of I_{mix} . The subsequent addition of Ca^{2+} (2 mM) resulted in a typical activation of I_{mix} . B, when 2 mM Ca^{2+} is added before MTX current activation is produced only after toxin application. C, the effect of extracellular Ca^{2+} appears to be an irreversible process, the repeated addition of EGTA (5 mM each occasion) after the activation of I_{mix} does not have any effect on the current. D, the rise in $[\text{Na}^+]_i$ is not observed when extracellular Ca^{2+} is chelated with 5 mM EGTA prior to the addition of MTX. With 2 mM Ca^{2+} in the bath solution (Control), MTX induced typical increments in $[\text{Na}^+]_i$. The voltage ramp used in A is the same as that used in Fig. 3A. Representative traces are shown from five experiments for each condition.

contained physiological concentrations of Ca^{2+} as described in Methods. The free intracellular concentration of Ca^{2+} , Mg^{2+} and Ba^{2+} obtained under these conditions was calculated as described in Methods.

Only Ba^{2+} was capable of replacing Ca^{2+} . However, about 10 times more Ba^{2+} was required. Even at concentrations as high as 8 mM intracellular Mg^{2+} , MTX failed to induce I_{mix} ($n = 5$, data not shown).

DISCUSSION

Since the original finding showing that MTX may be one of the entities responsible for the seafood poisoning known as ciguatera, many attempts have been made to elucidate the molecular mechanism by which this toxin induces its effects. Evidence has accumulated in recent years indicating that MTX is a very powerful activator of Ca^{2+} influx in practically all cells tested. Due to the fact that MTX can activate Ca^{2+} influx in a wide variety of cells from different organisms, it was originally proposed that this

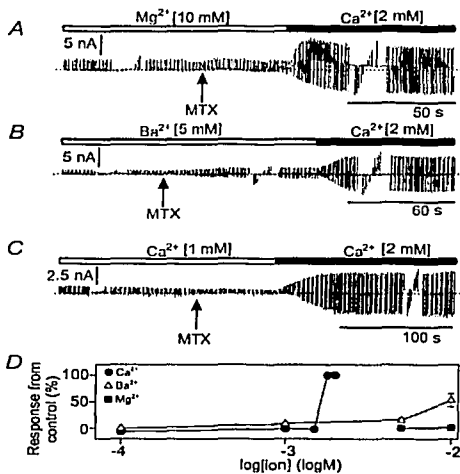


Figure 6. Extracellular divalent cations required for I_{mix} activation

A, Mg^{2+} does not replace the action of Ca^{2+} in the activation of I_{mix} . Only after the addition of Ca^{2+} was I_{mix} induced. B, Ba^{2+} was partially effective in replacing extracellular Ca^{2+} in the activation of I_{mix} . C, two extracellular concentrations of Ca^{2+} (1 and 2 mM). The activation of I_{mix} is observed only with 2 mM Ca^{2+} . Bars above the current recordings show the cation present in the bath. The patch-clamp stimulation protocol shown here is the same as in Fig. 3A. D, data obtained from the experiments in (A-C) and at other concentrations given in the text. The maximum current activated in the presence of 2 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ is considered 100% of the response. The symbols indicate mean and s.d. of n number of experiments for: Ca^{2+} ($n = 25$), Ba^{2+} ($n = 17$) and Mg^{2+} ($n = 10$). Where not shown error bars are smaller than symbols.

toxin was acting as an ionophore (Gusovsky & Daly, 1990). However, several lines of evidence argue against the ionophoretic activity of MTX. Firstly, MTX has no effect on liposomes or mitochondria (Takahashi *et al.* 1983). Secondly, we have previously shown that trypsin treatment of human skin fibroblasts eliminates the effects of MTX on Ca^{2+} influx, suggesting that a trypsin-sensitive protein from the plasma membrane is mediating the effects of MTX on Ca^{2+} (Gutierrez *et al.* 1997). Thirdly, MTX cannot activate channels in cell patches in the inside-out configuration obtained from Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. However, activation of cationic channels can be achieved in patches in the outside-out configuration (Dietl & Völkl, 1994), showing that MTX can activate the channel only when applied to the extracellular surface of the membrane. Furthermore, MTX induced only one or two single channels over a wide range of toxin concentrations in patches obtained from guinea-pig single ventricular myocytes (Nishio *et al.* 1996). In this report we have found that the rise in intracellular Ca^{2+} and Na^+ concentrations and the activation of I_{mix} by MTX saturate and occur at very low toxin concentrations. This type of behaviour is atypical for an ionophore. All these results strongly suggest that MTX is inducing Ca^{2+} and Na^+ influx via activation of non-selective cationic channels such as the one shown in this study. These observations suggest that MTX selectively recognizes a target in the cell membrane, which opens the possibility that MTX could be acting through a widely distributed, highly conserved receptor or channel.

MTX effects on human skin fibroblasts

Human skin fibroblasts provide an excellent model to study the mechanism of action of MTX. These cells are highly sensitive to this toxin; the half-activation constant for Ca^{2+} mobilization is in the femtomolar range (Gutierrez *et al.* 1997). The results presented here show that MTX activates a non-selective cationic current (I_{mix}) in these cells. The activation of I_{mix} is correlated with the increments in intracellular Ca^{2+} and Na^+ . The activation of I_{mix} and the increments in intracellular Na^+ induced by MTX require the presence of intracellular and extracellular free Ca^{2+} .

Previous studies have also reported macroscopic and single-channel currents activated by MTX in different cellular types (Escobar *et al.* 1998; Schilling *et al.* 1999). In all of them MTX (1 pM to 30 nM) induced large voltage-independent currents similar to the one reported here. The relative permeability calculated in the present study for I_{mix} ($\text{Na}^+ = \text{K}^+ > \text{Ca}^{2+}$) is in agreement with previous reports showing the activation of non-selective cationic currents by MTX (reviewed in Escobar *et al.* 1998).

In a recent study using the SK45 fibroblast cell line, Schilling *et al.* (1999) described a dual effect of MTX. At low toxin concentrations (<2 nM), MTX activates non-selective cation channels (NSCCs); at higher toxin

concentrations (>2 nM) a cytolytic/oncotic pore (COP) is activated. This COP becomes evident after 5 min of exposure to 2 nM MTX and permeates large molecules (<900 Da) such as fura-2 and NMDG. The MTX-induced COP resembles the large pore formed by stimulation of purinergic P2Z/P2X₇ receptors (Schilling *et al.* 1999). The present report focuses on the effects of low MTX concentrations on ionic conductances and the changes in intracellular Ca^{2+} and Na^+ . Our results indicate that I_{mix} does not permeate fura-2, as intracellular Ca^{2+} increments reach a plateau phase after MTX stimulation (Fig. 4A and Gutierrez *et al.* 1997). If MTX promoted fura-2 leakage, a plateau phase would not be observed. Furthermore, we have previously shown that in human skin fibroblasts the increments in fluorescence promoted by increasing MTX concentrations saturate, arguing against the possibility that MTX is promoting fura-2 leakage from the cell. Finally, the shift that occurs in the reversal potential when the extracellular cations are replaced with NMDG indicates that this cation does not permeate the MTX-activated channel.

The activation of I_{mix} in human skin fibroblasts requires the presence of free Ca^{2+} in the intracellular and

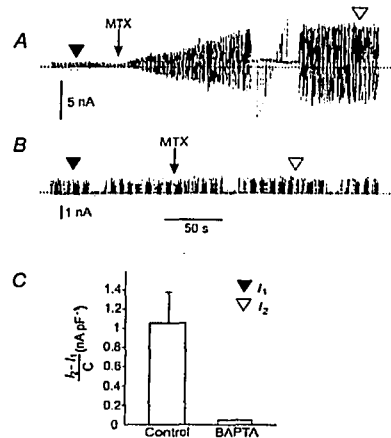


Figure 7. Intracellular Ca^{2+} is required also for activation of I_{mix}

A, control experiment showing the activation of I_{mix} in response to 500 pM MTX with $[\text{Ca}^{2+}]_o = 2 \text{ mM}$ and $[\text{Ca}^{2+}]_i = 1 \text{ }\mu\text{M}$. B, activation of I_{mix} when $[\text{Ca}^{2+}]_o = 2 \text{ mM}$ and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is near zero with 5 mM BAPTA in the pipette solution. The voltage ramp used here is the same as in Fig. 3A. C, mean \pm s.d. from experiments with or without BAPTA in the pipette solution. In BAPTA loaded cells only 4.57% of the current obtained in control conditions was observed ($n = 5$). The values of the I_{mix} current were obtained by subtracting the basal fibroblast K^+ current (I_1 , \blacktriangledown) from the total current activated by MTX (I_2 , ∇ , $n = 10$). The graph shows the values of the current corrected by capacitance ($I_2 - I_1/C$). The capacitance of the cells varied between 8 and 12 pF.

extracellular solutions. Extracellular Ca^{2+} is only required for the activation of I_{mix} , since removal of Ca^{2+} after I_{mix} activation does not affect the amplitude of the ionic current.

Ba^{2+} is an inefficient replacement for Ca^{2+} on both sides of the membrane, around 10 times the concentration being required to achieve the same activation of current. Other divalent cations do not replace Ca^{2+} . In other cell types, Ca^{2+} is also required for I_{mix} activation but no dose-response curve for Ca^{2+} or any evidence about the role of other divalent cations has been presented to date (Gusovsky & Daly, 1990; Escobar *et al.* 1998; Weber *et al.* 2000). In guinea-pig single ventricular myocytes, I_{mix} is activated in the absence of free Ca^{2+} on both sides of the membrane (Nishio *et al.* 1996). This is one of few reports found in the literature where Ca^{2+} is not required for MTX activation.

There are several possible reasons for the requirement: of free extracellular Ca^{2+} for I_{mix} activation. MTX may require extracellular Ca^{2+} to interact with its putative receptor in the plasma membrane. The hydrophobic region of MTX resembles that of gangliosides and it has been shown that the ganglioside GM1 inhibits some MTX effects (Konoki *et al.* 1999). Gangliosides aggregate in membranes, forming stable clusters (Thompson & Tillack, 1985). Extracellular Ca^{2+} may be required for the insertion of MTX into the plasma membrane.

Another possibility is that the NSCC activated by MTX is Ca^{2+} dependent. Several NSCCs are activated by intracellular Ca^{2+} (Hofmann *et al.* 2000). More complex mechanisms could be envisioned involving calcium-calmodulin interactions or calcium-dependent phosphorylation processes.

REFERENCES

BROOKS, S. P. J. & STOREY, K. B. (1992). Bound and determined: a computer program for making buffers of defined ion concentrations. *Analytical Biochemistry* 201, 119–126.

DIETL, P. & VÖLKL, H. (1994). Maitotoxin activates a nonselective cation channel and stimulates Ca^{2+} entry in MDCK renal epithelial cells. *Molecular Pharmacology* 45, 300–305.

ESCOBAR, L. I., SALVADOR, C., MARTÍNEZ, M. & VACA, L. (1998). Maitotoxin, a cationic channel activator. *Neurobiology* 6, 59–74.

GONZÁLEZ-PERRETT, S., KIM, K., IBARRA, C., DAMIANO, A. E., ZOTTA, E., BATTELLI, M., HARRIS, P. C., REISIN, I. L., ARNAUT, M. A. & CANTIello, H. F. (2001). Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca^{2+} -permeable nonselective cation channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98, 1182–1187.

GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M. & TSIEN, R. Y. (1985). A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* 260, 3440–3450.

GUSOVSKY, F. & DALY, J. (1990). Maitotoxin: a unique pharmacological tool for research on calcium-dependent mechanisms. *Biochemical Pharmacology* 39, 1633–1639.

GUTIERREZ, D., DÍAZ DE LEÓN, L. & VACA, L. (1997). Characterization of the maitotoxin-induced calcium influx pathway from human skin fibroblasts. *Cell Calcium* 22, 31–38.

HAMILL, O. P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. & 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.

HAROONTUNIAN, A. T., KAO, J. P., ECKERT, B. Y. & TSIEN, R. Y. (1989). Fluorescence ratio imaging of cytosolic free Na^{+} in individual fibroblasts and lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* 264, 19458–19467.

HOFMANN, T., SCHAEFER, M., SCHULTZ, G. & GUDERMANN, T. (2000). Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *Journal of Molecular Medicine* 78, 14–25.

KONOKI, K., HASHIMOTO, M., MURATA, M. & TACHIBANA, K. (1999). Maitotoxin-induced calcium influx in erythrocyte ghosts and rat glioma C6 cells, and blockade by gangliosides and other membrane lipids. *Chemical Research in Toxicology* 12, 993–1001.

NISHIO, M., MURAMATSU, I. & YASUMOTO, T. (1996). Na^{+} -permeable channels induced by maitotoxin in guinea-pig single ventricular cells. *European Journal of Pharmacology* 297, 293–298.

SCHILLING, W. P., SINKINS, W. G. & ESTACION, M. (1999). Maitotoxin activates a nonselective cation channel and a P2Z/P2X₂-like cytolitic pore in human skin fibroblasts. *American Journal of Physiology* 277, C755–765.

SOTO, H., MASSÓ, F., CANO, S. & DÍAZ DE LEÓN, L. (1996). Effects of mebenzazole on protein biosynthesis and secretion in human-derived fibroblast cultures. *Biochemical Pharmacology* 52, 289–299.

TAKAHASHI, M., TATSUMI, M., OIHIZUMI, Y. & YASUMOTO, T. (1983). Ca^{2+} channel activating function of maitotoxin, the most potent marine toxin known, in clonal rat pheochromocytoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 258, 10944–10949.

THOMPSON, T. E. & TILLACK, T. W. (1985). Organization of glycosphingolipids in bilayers and plasma membranes of mammalian cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 14, 361–386.

WEBER, W. M., POPP, C., CLAUS, W. & DRIESSCHE, W. V. (2000). Maitotoxin induces insertion of different ion channels into the *Xenopus* oocyte plasma membrane via Ca^{2+} -stimulated exocytosis. *Pflügers Archiv* 439, 363–369.

YASUMOTO, T., BAGNIS, R. & VERNoux, J. P. (1976). Toxicity study of surgeon fishes – II. Properties of the principal water-soluble toxin. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 42, 359–365.

YASUMOTO, T. & SATAKE, M. (1996). Chemistry, etiology and determination of methods of ciguatera toxins. *Journal of Toxicology – Toxin Reviews* 15, 91–107.

ZHAO, H., XU, X., DIAZ, J. & MUALLEM, S. (1995). Na^{+} , K^{+} , and H^{+}/HCO_{3}^{-} transport in submandibular salivary ducts. Membrane localization of transporters. *Journal of Biological Chemistry* 270, 19599–19605.

Acknowledgements

We would like to thank A. Sampieri for her excellent technical assistance. We would like to thank Dr Mark West for comments on the manuscript. This work was supported by a grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 25312-N to L.V. L.V. is an Alexander von Humboldt scholar. V.M.T. received a scholarship from the Centro Medico Siglo XXI (Instituto Mexicano del Seguro Social). This work is dedicated to the memory of our close friend and collaborator Dr Díaz de León.

DISCUSIÓN

En una gran variedad de tipos celulares, la MTX causa un rápido aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Gusovsky y cols., 1990), mediante la activación de un canal catiónico no selectivo que permea Ca^{2+} y Na^{+} (Daly y cols., 1995; Dietl y cols., 1994; Estación y cols., 1996; Murata y cols., 1992; Brereton y cols., 2001).

Los resultados mostrados en este trabajo se obtuvieron utilizando diferentes técnicas como registros electrofisiológicos (*patch-clamp*) y mediciones de Ca^{2+} y Na^{+} intracelulares. Confirmamos que la MTX induce una entrada de Na^{+} y de Ca^{2+} en los fibroblastos de piel humana y en las células CHO. La respuesta en ambos tipos celulares depende de la concentración de toxina utilizada y del tiempo. Estos resultados son congruentes con lo reportado por otros grupos de trabajo, donde se demuestra que la MTX aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular (Schilling y cols., 1999a; Schilling y cols., 1999b, Gutiérrez y cols., 1997).

El aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular inducido por la MTX es el resultado de la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y no del vaciamiento del retículo o de los compartimentos intracelulares (Gutiérrez y cols., 1997). Por lo tanto, el aumento del Ca^{2+} intracelular es el resultado de la activación de una vía de entrada de Ca^{2+} .

El proceso molecular por el cual la MTX activa a los NSCC-MTX se desconoce; sin embargo, como ya se ha mencionado con anterioridad, los procesos pueden ser los siguientes: la unión de la toxina a una proteína específica de la membrana plasmática (Gutiérrez y cols., 1997), o la posible inserción de los motivos hidrofóbicos de la MTX en la membrana (Konoky y cols., 1999), lo cual puede crear un poro no selectivo que permite el paso de Na^{+} y de Ca^{2+} al interior celular.

Aunque existe una gran cantidad de artículos sobre la toxina, se han realizado muy pocos trabajos para estudiar los mecanismos mediante los cuales la MTX activa a los canales catiónicos no selectivos.

Recientemente el grupo de Schilling (1999) ha reportado la activación de un poro que permite el paso de moléculas de aproximadamente 375 Da, a través de la membrana celular después de la activación de canales catiónicos permeables a Ca^{2+} por la maitotoxina. Estos poros citolíticos/oncóticos (COP) permiten el paso de moléculas de 375 Da y aparecen después de 10 minutos de aplicar 1.0 μM de toxina. Estos datos indican que la MTX induce la formación un poro que permite el paso de moléculas de gran tamaño. Sin embargo, en nuestros estudios realizados con los fibroblastos y en células CHO, no observamos liberación de LDH (140,000 Da) en las células tratadas hasta con 5.0 nM de MTX. Lo cual sugiere fuertemente la MTX no induce la formación de estos poros, probablemente porque las concentraciones de toxina que utilizamos sean mucho menores a las reportadas por estos autores. Por otra parte, los registros de Ca^{2+} y de Na^+ en ambos tipos celulares (fibroblastos y CHO) se saturan, lo cual indica que los marcadores fluorescentes no salen de la célula por esta vía. Estos datos son similares a lo reportado por otros autores (Gutiérrez y cols., 1997; Schilling y cols., 1999a; Konoki y cols., 1999; de la Rosa y cols., 2001).

El aumento en la concentración intracelular de Na^+ , Ca^{2+} , y la activación de la I_{mix} en las células CHO y en los fibroblastos de piel de humano producidos por la estimulación 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. Por otro lado, como se mostró en este trabajo, el efecto de la MTX no es inmediato; ya que existe un periodo de latencia entre la aplicación de la toxina y la activación de las vías de permeación. Esto sugiere que probablemente la unión de la MTX a su receptor hipotético involucre una serie de pasos que culminan con la activación de los NSCC-MTX. Es posible también explicar la lentitud de la respuesta si la MTX se inserta en la membrana, o que se

lleve a cabo la inserción de NSCC-MTX sintetizados *de novo* en la membrana plasmática como resultado de la estimulación con MTX (Weber y cols., 2000).

Si bien los mecanismos de activación de los NSCC-MTX no han sido bien descritos, se cree que este tipo de canales podría estar involucrado en fenómenos como la regulación del metabolismo, transporte iónico y volumen celular. Se ha propuesto que el canal NSCC-MTX podría formar parte de la familia de los canales del Receptor del potencial transitorio (TRP) (Brereton y cols., 2000).

La entidad molecular del receptor a la MTX debe todavía establecerse; sin embargo, ya sea que la MTX esté 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 distantes filogenéticamente (del insecto al humano). 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?.

Recientemente el grupo de Leech propuso que la MTX activa una corriente catiónica no selectiva, similar a la activada por los péptidos GLP-1 y PACAP en las células β -pancreáticas (Leech y cols., 1997), este mismo grupo reportó que el canal activado por la MTX está involucrado en mantener el potencial de membrana de la célula β pancreática (Leech y cols., 1998). Otros grupos han sugerido que la MTX activa a un canal del tipo TRP en los ovocitos de la rana *Xenopus* (Brereton y cols., 2000) y en la línea celular H4-IIIE de hígado (Brereton y cols., 2001). Estos reportes son particularmente interesantes, dado que son los primeros en demostrar que la MTX activa un canal catiónico no selectivo involucrado en diversas respuestas fisiológicas; es decir, al menos en estas células el canal NSCC-MTX parece tener un papel funcional específico.

En cuanto a las propiedades de permeación del canal activado por MTX, se han estudiado muy poco. Nuestros estudios demuestran que el curso temporal es el mismo para la activación de la corriente catiónica no selectiva activada por la MTX y para el aumento en la concentración de Na^+ y Ca^{2+} intracelulares. Lo anterior sugiere fuertemente que este canal permea Ca^{2+} y Na^+ , los cuales se acumulan rápidamente en el interior celular. Nuestros experimentos de selectividad muestran claramente una permeabilidad relativa de Na^+ (1) = K^+ (1) > Ca^{2+} (0.87). Los cationes de mayor tamaño, como el NMDG no permean por este canal.

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 y cols., 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 se observa 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_{mix} es más drástico que el reportado anteriormente (Schilling y cols., 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 lo general con las permeabilidades ya calculadas en otros sistemas. La I_{mix} 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, se cumplen las características generales de permeabilidad descritas anteriormente, aunque en algunos casos no

concuerdan con el esquema general de selectividad relativa obtenido hasta ahora, por ejemplo en células cardíacas de cobayo el Ca^{2+} permea mejor que el Na^+ (Kobayashi y cols., 1987).

Respecto a la modulación por cationes extra e intracelulares, se ha demostrado una fuerte dependencia de la MTX al Ca^{2+} extracelular por varios grupos independientes (Gusovsky y cols., 1990, Escobar y cols., 1998; Weber y cols., 2000). Como hemos demostrado aquí por primera vez, la dependencia de Ca^{2+} es muy específica, y la MTX no tiene efecto si se substituye el Ca^{2+} por otros divalentes catiónicos como el Mg^{2+} y Mn^{2+} . Únicamente el Ba^{2+} es capaz de sustituir parcialmente la dependencia de Ca^{2+} .

La regulación del calcio intracelular ha sido un tema de gran controversia, ya que en algunos tipos celulares se requiere calcio (Leech y cols., 1997; Worley y cols., 2000) mientras que en otros no (Kobayashi cols., 1987; Faivre cols., 1990; Diel y cols., 1994; Nishio cols., 1996). Nosotros logramos manipular los niveles de Ca^{2+} intracelular con las técnicas de *patch clamp* y fluorescencia aquí utilizadas, con lo cual se pudo determinar la dependencia de calcio intracelular. Con estas técnicas logramos establecer que se necesitan concentraciones nanomolares de Ca^{2+} libre en el medio intracelular para activar la respuesta a la MTX. Además, la elevación de Ca^{2+} intracelular potencia notablemente el efecto de la MTX. La caracterización de esta potenciación por el Ca^{2+} intracelular se presentó por primera vez en este trabajo de tesis.

Por otro lado 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 no mostró una menor I_{mtx} con altas $[\text{Mg}^{2+}]_i$ libre. Sin embargo, con $[\text{Ba}^{2+}]_i$ libre aproximadamente 1000 veces mayores que en las condiciones control, se obtuvo el mismo efecto de la toxina que con Ca^{2+} libre nanomolar.

Lo reportado aquí demuestra por primera vez que el Ca^{2+} intracelular es importante por varios factores: 1) Es necesario para producir la respuesta a la

MTX; 2) el requerimiento de Ca^{2+} es altamente específico, y otros cationes divalentes no pueden tomar su lugar y 3) el aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular potencia la respuesta a la MTX, es decir, a mayor concentración de Ca^{2+} intracelular y a una concentración fija de MTX, la respuesta es más rápida.

El fenómeno de potenciación probablemente se produzca por la activación de alguna proteína que dependa de Ca^{2+} , y que además esta sea regulada por Ca^{2+} con alta afinidad, cercano al rango fisiológico intracelular. Estos resultados pueden explicar por qué el Ca^{2+} solo puede ser reemplazado parcialmente por otros cationes, lo cual abre la posibilidad de que la toxina active una vía de entrada de Ca^{2+} regulada por alguna proteína específica que pegue Ca^{2+} , como calmodulina, que además une calcio en el rango fisiológico.

En cuanto a otros mecanismos de regulación de la respuesta a la MTX, encontramos evidencia experimental que indica que una cinasa de tirosina de la familia *src* esta implicada en la activación de NSCC-MTX. Esto se basa en dos observaciones: 1) los inhibidores específicos de cinasas de tirosina disminuyen fuertemente la entrada de Ca^{2+} y Na^+ iniciada por la MTX, y 2) la transfección de las células CHO con una isoforma constitutivamente activa de *src* produjo un aumento considerable de la entrada de Ca^{2+} y Na^+ inducida por la MTX. Lo anterior sugiere que *src* o algún miembro de la familia *src* están involucrados en la cascada de señalización iniciada por la MTX y que culmina con la activación de NSCC-MTX. Otra explicación posible es que la proteína *src* o algún miembro de esta familia fosforile directamente al canal NSCC-MTX. Estos resultados apoyan aun más la hipótesis de que la MTX desencadena una cascada compleja de señalización que culmina con la entrada de cationes debido a la activación de un canal catiónico no selectivo.

Sin duda el mecanismo de acción de la MTX difiere de los mecanismos más simples y directos utilizados por otras toxinas, lo cual la coloca como una herramienta útil y compleja, digna de estudios detallados a nivel molecular.

PERSPECTIVAS

Identificar molecularmente al canal catiónico activado por MTX, activadores

Determinar la identidad de la cinasa de tirosina involucrada en la modulación de la respuesta a MTX.

Estudiar el mecanismo mediante los cuales esta cinasa es activada en respuesta a MTX

Estudiar bloqueadores como un posibles agentes en el tratamiento de la Ciguatera

BIBLIOGRAFIA

- Adachi, R. & 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.
- Akiyama, T. & Ogawara, H. 1991. Use and specificity of genistein as inhibitor of protein tyrosine kinase. *Methods in Enzymol.* 201:362-70.
- Berta, P., Sladeczek, F., Derancourt, J., Durand, M., Travo, P. & Haiech, J. (1986). Maitotoxin stimulates the formation of inositol phosphates in rat aortic myocytes. *FEBS Lett* 197(1-2), 349-52.
- Bielfeld-Ackermann, A., Range, C. & Korbmacher, C. (1998). Maitotoxin (MTX) activates a nonselective cation channel in *Xenopus laevis* oocytes. *Pflugers Arch* 436(3), 329-37.
- Breteron, H. M., Chen, J., Rychkov, G., Harland, M. L. & Barritt, G. J. (2001). Maitotoxin activates an endogenous non-selective cation channel and is an effective initiator of the activation of the heterologously expressed hTRPC-1 (transient receptor potential) non-selective cation channel in H4-IIIE liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1540(2), 107-26.
- Breteron, H. M., Harland, M. L., Auld, A. M. & Barritt, G. J. (2000). Evidence that the TRP-1 protein is unlikely to account for store-operated Ca²⁺ inflow in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Cell Biochem* 214(1-2), 63-74.
- Daranas, A. H., Norte, M. & Fernández, J. J. (2001). Toxic marine microalgae. *Toxicon* 39(8), 1101-1263
- de la Rosa, L. A., Alfonso, A., Vilarino, N., Vieytes, M. R. & Botana, L. M. (2001). Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin. *Biochem Pharmacol* 61(7), 827-33.
- Caly, J. W., Lueders, J., Padget, W. L., Shin, Y. & Gusovsky, F. (1995). Maitotoxin-elicited calcium influx in culteres cells. *Biochem Pharmacol.* 45,300-305
- Darnell *et al*, 1990. *Molecular and Cellular Biology*. 2a. ed. Scientific American Books. cap 2.
- Dietl, P. & Volkl, H. (1994). Maitotoxin activates a nonselective cation channel and stimulates Ca²⁺ entry in MDCK renal epithelial cells. *Mol Pharmacol* 45(2), 300-5.
- Escobar, L. I., Salvador, C., Martinez, M. & Vaca, L. (1998). Maitotoxin, a cationic channel activator. *Neurobiology* 6(1), 59-74.
- Estacion, M., Nguyen, H. B. & Gargus, J. J. (1996). Calcium is permeable through a maitotoxin-activated nonselective cation channel in mouse L cells. *Am J Physiol* 270(4 Pt 1), C1145-52.
- Faivre, J. F., Deroubaix, E., Coulombe, A., Legrand, A. M. & Coraboeuf, E. (1990). Effect of maitotoxin on calcium current and background inward current in isolated ventricular rat myocytes. *Toxicon* 28(8), 925-37.

- Gee, N. S., Brown, J. P., Dissanayake, V. U., Offord, J., Thurlow, R. & Woodruff, G. N. (1996). The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the $\alpha 2\delta$ subunit of a calcium channel. *J Biol Chem.* 271(10):5768-76
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y., 1985. A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.
- Gusovsky, F. & Daly, J. W. (1990). Maitotoxin: a unique pharmacological tool for research on calcium-dependent mechanisms. *Biochem Pharmacol* 39(11), 1633-9.
- Gusovsky, F., Yasumoto, T. & Daly, J. W. (1989). Maitotoxin, a potent, general activator of phosphoinositide breakdown. *FEBS Lett* 243(2), 307-12.
- Gutierrez, D., Diaz de Leon, L. & Vaca, L. (1997). Characterization of the maitotoxin-induced calcium influx pathway from human skin fibroblasts. *Cell Calcium* 22(1), 31-8.
- Harootunian, A. T., Kao, J. P., Eckert, B. 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., Ochi, R. & Ohizumi, Y. (1987). Maitotoxin-activated single calcium channels in guinea-pig cardiac cells. *Br J Pharmacol* 92(3), 665-71.
- Kobayashi, M., Ohizumi, Y. & Yasumoto, T. (1985). The mechanism of action of maitotoxin in relation to Ca^{2+} movements in guinea-pig and rat cardiac muscles. *Br J Pharmacol* 86(2), 385-91.
- Konoki, K., Hashimoto, M., Murata, M. & 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.
- Konoki, K., Hashimoto, M., Nonomura, T., Sasaki, M., Murata, M. & Tachibana, K. (1998). Inhibition of maitotoxin-induced Ca^{2+} influx in rat glioma C6 cells by brevetoxins and synthetic fragments of maitotoxin. *J Neurochem* 70(1), 409-16.
- Lebrun, P., Hermann, M., Yasumoto, T. & Herchuelz, A. (1987). Effects of maitotoxin on ionic and secretory events in rat pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 144(1), 172-7.
- Leech, C. A. & 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(29), 17987-93.
- Leech, C. A. & Habener, J. F. (1998). A role for Ca^{2+} -sensitive nonselective cation channels in regulating the membrane potential of pancreatic beta-cells. *Diabetes* 47(7), 1066-73.
- Legrand, A. M. & Bagnis, R. (1984). Effects of highly purified maitotoxin extracted from dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* on action potential of isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 16(7), 663-6.
- Lehane, L. (2000). Ciguatera update. *Med J Aust* 172(4):176-9
- Lehane, L. & Lewis R. J. (2000). Ciguatera: recent advances but the risk remains. *Int J Food Microbiol.* 61(2-3):91-1

- Levitzki, A., Gazit, A., Oshero, N., Posner, I. & Gilon, C. (1991). Inhibition of protein-tyrosine kinases by tyrphostins. *Methods in Enzymol.* 201: 347-61
- Martinez, M., Salvador, C., Farias, J. M., Vaca, L. & Escobar, L. I. (1999). Modulation of a calcium-activated chloride current by Maitotoxin. *Toxicon* 37(2), 359-70.
- Mebs, D. (2001). Toxicity in animals. Trends in evolution?. *Toxicon* 39(1):87-96.
- Murata, M., Gusovsky, F., Yasumoto, T. & Daly, J. W. (1992a). Selective stimulation of Ca²⁺ flux in cells by maitotoxin. *Eur J Pharmacol* 227(1), 43-9.
- Murata, M., Sasaki, M., Yokoyama, A., Iwashita, T., Gusovsky, F., Daly, J. W. & Yasumoto, T. (1992b). Partial structures and binding studies of maitotoxin, the most potent marine toxin. *Bull Soc Pathol Exot* 85(5), 470-3.
- Murata, M., Naoki, H., Matsunaga, S., Satake, M. & 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.
- Murata, M. & Yasumoto, T. (2000). The structure elucidation and biological activities of high molecular weight algal toxins: maitotoxin, prymnesins and zooxanthellatoxins. *Nat Prod Rep* 17(3), 293-314.
- Musgrave, I. F., Seifert, R. & Schultz, G. (1994). Maitotoxin activates cation channels distinct from the receptor-activated non-selective cation channels of HL-60 cells. *Biochem J* 301(Pt 2), 437-41.
- Nishio, M., Muramatsu, I. & Yasumoto, T. (1996). Na(+)-permeable channels induced by maitotoxin in guinea-pig single ventricular cells. *Eur J Pharmacol* 297(3), 293-8.
- Ohizumi, Y., Kajiwara, A. & Yasumoto, T. (1983). Excitatory effect of the most potent marine toxin, maitotoxin, on the guinea-pig vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther* 227(1), 199-204.
- Ohizumi, Y. & Yasumoto, T. (1983). Contraction and increase in tissue calcium content induced by maitotoxin, the most potent known marine toxin, in intestinal smooth muscle. *Br J Pharmacol* 79(1), 3-5.
- Olivi, L. & Bressler, J. (2000). Maitotoxin stimulates Cd influx in Madin-Darby kidney cells by activating Ca-permeable cation channels. *Cell Calcium* 27(4), 187-93.
- Perez, C. M., Vasquez, P. A., & Perret, C. F. (2001). Treatment of ciguatera poisoning with gabapentin. *N Engl J Med.* 344(9):692-3.
- Pin, J. P., Yasumoto, T. & Bockaert, J. (1988). Maitotoxin-evoked gamma-aminobutyric acid release is due not only to the opening of calcium channels. *J Neurochem* 50(4), 1227-32.
- Roe, M. W., Worley, J. F., 3rd, Qian, F., Tamarina, N., Mittal, A. A., Dralyuk, F., Blair, N. T., Mertz, R. J., Philipson, L. H. & Dukes, I. D. (1998). Characterization of a Ca²⁺ release-activated nonselective cation current regulating membrane potential and [Ca²⁺]_i oscillations in transgenically derived beta-cells. *J Biol Chem* 273(17), 10402-10.

Sasaki, M., Matsumori, N., Maruyama, T., Nonomura, T., Murata, M., Tachibana, K., & 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. & Estacion, M. (1999a). Maitotoxin activates a nonselective cation channel and a P2Z/P2X(7)- like cytolytic pore in human skin fibroblasts. *Am J Physiol* 277(4 Pt 1), C755-65.

Schilling, W. P., Wasylyna, T., Dubyak, G. R., Humphreys, B. D. & Sinkins, W. G. (1999b). Maitotoxin and P2Z/P2X(7) purinergic receptor stimulation activate a common cytolytic pore. *Am J Physiol* 277(4 Pt 1), C766-76.

Shalaby, I. A., Kongsamut, S. & Miller, R. J. (1986). Maitotoxin-induced release of gamma-[3H]aminobutyric acid from cultures of striatal neurons. *J Neurochem* 46(4), 1161-5.

Sladeczek, F., Schmidt, B. H., Alonso, R., Vian, L., Tep, A., Yasumoto, T., Cory, R. N. & Bockaert, J. (1988). New insights into maitotoxin action. *Eur J Biochem* 174(4), 663-70.

Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103(2):211-25.

Stryer, 1995. *Bioquímica*. 4a. ed; Reverté., cap 27.

Takahashi, M., Ohizumi, Y. & Yasumoto, T. (1982). Maitotoxin, a Ca²⁺ channel activator candidate. *J Biol Chem* 257(13), 7287-89.

Takahashi, M., Tatsumi, M., Ohizumi, 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(18), 10944-9.

Thomas, S.M. & Brugge, J. S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:513-609.

Vassault, A., 1983. Lactate-dehydrogenase. UV-method with piruvate and NADH. In: Bergmeyer J, editors. *Methods in enzymatic analysis*. Weinheim, Germany: Verlag-Chemie: p 119-126.

Venant, A., Dazy, A. C., Diogene, G., Metezeau, P. & Marano, F. (1994). Effects of maitotoxin on calcium entry and phosphoinositide breakdown in the rabbit ciliated tracheal epithelium. *Biol Cell* 82(2-3), 195-202.

Voet et al. 1995. *Biochemistry*., 2a ed; Wiley. cap 11.

Weber, W. M., Popp, C., Clauss, W. & Van Driessche, W. (2000). Maitotoxin induces insertion of different ion channels into the *Xenopus* oocyte plasma membrane via Ca(2+)-stimulated exocytosis. *Pflugers Arch* 439(3), 363-9.

Worley, J. F., 3rd, McIntyre, M. S., Spencer, B. & Dukes, I. D. (1994). Depletion of intracellular Ca²⁺ stores activates a maitotoxin-sensitive nonselective cationic current in beta-cells. *J Biol Chem* 269(51), 32055-8.

Yasumoto, T., Nakajima, I., Bagnis, R. & Adachi, R. (1977) Finding of a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 43, 1021-1025.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Yoshii, M., Tsunoo, A., Kuroda, Y., Wu, C. H. & Narahashi, T. (1987). Maitotoxin-induced membrane current in neuroblastoma cells. *Brain Res* 424(1), 119-25.

Young, R. C., McLaren, M. & Ramsdell, J. S. (1995). Maitotoxin increases voltage independent chloride and sodium currents in GH4C1 rat pituitary cells. *Nat Toxins* 3(6), 419-27.

Zheng, W., DeMattei, J. A., Wu, J. P., Duan, J. J. W., Cook, L. R., Oinuma, H., & Kishi, Y. (1996) Complete relative stereochemistry of maitotoxin. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 7946-7968.