

## **Bacteriocinas de probióticos. Nuevos enfoques bioterapéuticos: PINHE**

### **Bacteriocins of probiotics. New biotherapeutical approaches: PINHE**

Dolz M. C.

*Doctora en Farmacia. Centro de Información del Medicamento del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza. España.*

#### **Resumen**

La prevención de enfermedades y la conservación de los alimentos han motivado que el mundo industrial y el científico se interese por conocer con mayor detalle el modo de acción de los probióticos como alimentos funcionales y en particular las bacteriocinas que producen, por sus propiedades antimicrobianas. Cada día se descubren más bacteriocinas y se analizan sus mecanismos de acción a nivel molecular. No cabe duda, que en los próximos años se tendrá un mejor conocimiento de estos péptidos, que permitan aprovechar al máximo su potencial en beneficio del hombre, no sólo a nivel de la industria alimentaria como conservadores, sino además como nuevas alternativas antibióticas y como bioterapéuticos en la prevención de ciertas patologías. En este último sentido, Halocina H6 y en concreto PINHE (un péptido derivado de esta bacteriocina procedente de haloarqueas), ha mostrado ser un buen candidato para prevenir los daños ocasionados por isquemia y repercusión en el infarto de miocardio.

**Palabras clave:** Bacteriocinas, probióticos, PINHE, Halocina H6, inhibición Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, infarto de miocardio.

#### **Abstract**

The prevention of the occurrence of diseases in the individuals and the conservation of the foods has motivated that the industrial world and the scientist is interested to know with greater detail the way action the probiotics and in particular those that produce bacteriocins, for their antimicrobial properties. Every day more bacteriocins are discovered and analyzed its mechanisms of action at the molecular level. There is no doubt that in the next few years will have a better understanding of these peptides, which allow to maximize their potential for the benefit of man, not only at the level of the food industry as a conservative, but also as new antibiotic options and as bioterapeutics in the prevention of certain diseases. In the latter regard, Halocina H6 and in particular PINHE (a peptide derived from this haloarchaeal bacteriocin) has been shown to be a good candidate for preventing damage caused by ischemia and reperfusion, in myocardial infarction.

**Key words:** Bacteriocins, probiotics, PINHE, Halocina H6, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> inhibition, Myocardial infarction.

---

#### **Correspondencia:**

M.C. Dolz

Tel.: 34 976 481 415; Fax. +34 976 481 418

E-mail: mcarmendolz@redfarma.org

## Introducción

A través de la evolución, los microorganismos han desarrollado distintas estrategias para competir por nutrientes en su medio ambiente. Por ejemplo algunos han mejorado sus sistemas de quimiotaxis y otros han elaborado compuestos antimicrobianos para inhibir a otros miembros del ambiente. Diversas son las sustancias antagónicas que los microorganismos producen para dominar en su hábitat, desde los antibióticos de amplio espectro, productos del metabolismo como ácidos orgánicos, moléculas quelantes de hierro (sideróforos) y bacteriocinas.

La bioconservación es un método basado en el empleo de microorganismos, o de sus productos metabólicos, para inhibir o destruir microorganismos indeseables. Una forma de actuar de los llamados probióticos para lograr alcanzar un buen estado de salud del individuo, es a través de la resistencia otorgada contra la invasión de microorganismos patógenos. Entre las bacterias probióticas más utilizadas para el consumo humano se encuentran (aunque no de forma exclusiva) las llamadas bacterias ácido lácticas (BAL), que incluyen a las siguientes: *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. casei* spp *rhamnosus*, *L. delbrueckii* spp *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *Lactococcus lactis* spp *lactis*, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, entre otros <sup>1</sup>.

Las BAL proporcionan sabor y textura, incrementan el valor nutricional de los alimentos, y ya desde hace décadas se vienen utilizando en la industria alimenticia como bioconservadores, debido a la producción de bacteriocinas y otras sustancias que ejercen acción antibacteriana contribuyendo a prevenir la descomposición de los alimentos.

Las bacteriocinas de las BAL son péptidos que impiden el crecimiento de bacterias alterantes y patógenas de los alimentos, con la ventaja frente a los conservadores químicos, de ser proteínas que al biodegradarse no forman compuestos secundarios.

En la naturaleza existe una enorme diversidad de este tipo de sustancias. Las bacteriocinas han sido encontradas en casi todas las especies bacterianas examinadas hasta la fecha, y aún dentro de una especie podrían ser producidas diferentes tipos de bacteriocinas. Se piensa que el 99% de todas las bacterias pueden producir cuando menos una bacteriocina y la única ra-

zón de que no se hayan aislado es debido a que han sido muy poco estudiadas.

Las bacteriocinas se definen como proteínas y péptidos biológicamente activos, que tienen propiedades bactericidas contra otras especies estrechamente relacionadas, miembros de la misma especie o especies muy relacionadas con la cepa productora. Sin embargo, recientemente este concepto se ha modificado, ya que se ha encontrado también acciones bactericidas contra cepas distantes filogenéticamente de la cepa productora.

Entre las bacteriocinas más representativas a nivel de la industria alimentaria están <sup>1</sup>:

- Nisina, descrita en 1928, fue la primera bacteriocina aislada a partir de la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. Es la bacteriocina mejor caracterizada. Es un péptido de 34 aminoácidos y bajo peso molecular (inferior a 5 KDa) utilizada como conservador de alimentos y la única reconocida por la FDA con la categoría GRAS (Generally Recognized As Safe). No requiere de un receptor unido a la membrana de la célula blanco ya que reconoce la composición fosfolipídica de la célula. Su síntesis es compleja requiriendo procesos de transcripción, traducción, modificaciones post-traduccionales, secreción, procesamiento, y señales de transducción. Se produce de forma natural en algunos productos lácteos donde se utiliza como aditivo para prevenir la descomposición ocasionada por bacterias Gram positivas, especialmente *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria*.
- Pediocina PA-1 y sakacina P son péptidos que tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC con un papel importante en la capacidad de reconocimiento de la membrana de la célula blanco. Pediocina es producida por *Pediococcus acidilactici* se utiliza como conservador en productos vegetales y cárnicos y se ha observado una elevada actividad contra especies de *Listeria* por lo que tiene un alto potencial para ser utilizado como conservador en alimentos lácteos.
- Lactococcina G y plantaricinas EF y JK, también de síntesis compleja (regulada por la acción de 5 operones con 21 genes diferentes) son formadores de complejos de poración y tienen actividad antimicrobiana cuando interactúan como un sistema de 2 péptidos diferentes necesarios para la formación de poros y consecuente disipación del potencial de membrana.

- Divergicina A y acidocina B, son péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. Divergicina A, producida por *Caernobacterium divergens* LV13, se caracteriza por poseer un sistema de secreción que involucra la presencia de un péptido señal. Tiene un peso molecular de 4.6 kDa, es de naturaleza hidrofóbica y posee en su extremo N-terminal un sitio de rompimiento Ala-Ser-Ala (a diferencia de la acidocina B que tienen un sitio de rompimiento Gli-Gli), y actúa como péptido señal para el uso del sistema de secreción de la célula.
- Helveticinas J y V, acidofilicina A y lactacinas A y B son péptidos grandes (mayores de 30 kDa), siendo poco conocidas sus características bioquímicas y su modo de acción. Helveticina J, producida por *Lactobacillus helveticus*, se encuentra de manera natural en quesos madurados, es una proteína de 37 kDa. termolábil (30 min a 100°C) y el gen que la produce se localiza en el DNA cromosomal.
- Lactococina A es una bacteriocina producida por ciertas cepas de *Lactococcus lactis*. A diferencia de otras bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, como la nisina o la pediocina PA-1, su espectro antimicrobiano es muy reducido y se limita a ciertas cepas de lactococos. Sin embargo, la lactococina A puede tener aplicaciones prácticas en la industria láctea ya que ejerce un efecto lítico sobre lactococos empleados como cultivos iniciadores en las industrias queseras. La liberación de enzimas intracelulares en la matriz del queso juega un papel importante en el desarrollo de las propiedades organolépticas y en la aceleración de la maduración de ciertos tipos de quesos <sup>2</sup>.
- Enterocina P (EntP) es una bacteriocina producida por *E. faecium* P13, una BAL aislada de un chorizo elaborado artesanalmente, y que muestra una potente actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes*. A pesar de su innegable potencial como conservante natural de los alimentos, dicha bacteriocina está producida por una cepa de *Enterococcus*, un género que se ha asociado, en algunas ocasiones, a problemas de tipo sanitario. Por tanto, la selección de la EntP como bioconservante alimentario pasaría por su producción en hospedadores más seguros o en otros microorganismos de interés en la industria alimentaria (*Escherichia coli*, *Methylobacterium extorquens*, *Lactococcus lactis* y *Pichia pastoris*) <sup>3</sup>.
- Enterocina AS-48, que podría utilizarse a medio plazo como bioconservante de alimentos, es una bacteriocina producida por *Enterococcus faecalis* S-48. Se caracteriza por poseer una estructura circular, es decir, por tener sus extremos unidos, a diferencia de la gran mayoría de proteínas, que poseen un comienzo y un final. AS-48 es muy estable frente al pH y la temperatura y posee un amplio espectro de acción frente a numerosas bacterias, incluidas bacterias patógenas transmitidas por alimentos, por lo que es una molécula idónea para ser utilizada como bioconservante. Además dado que, en los últimos años el aumento de la resistencia bacteriana a antibióticos ha hecho necesaria la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, los péptidos antimicrobianos catiónicos naturales, como las bacteriocinas, "constituyen una buena alternativa" <sup>4</sup>.

El conocimiento del modo de actuación de las bacteriocinas sobre las membranas bacterianas permitirá en el futuro, diseñar moléculas antimicrobianas con nuevas características siendo hoy un importante campo de investigación.

Los efectos beneficiosos de los probióticos en la salud humana y en la nutrición están siendo cada vez más reconocidos. Diferentes grupos de trabajo, que estudian las propiedades y la funcionalidad de los microorganismos vivos en la dieta, sugieren que los probióticos desempeñan un papel importante en las funciones digestivas, inmunitarias y respiratorias, y podrían tener un efecto significativo en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, especialmente en los niños y en las poblaciones de alto riesgo.

El tema de las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas contenidas en la comida fermentada ha sido objeto de estudio durante los últimos 20 años. Se han caracterizado numerosos péptidos y ambos campos (probióticos y bacteriocinas) han atraído la atención de la comunidad científica para hacer frente al problema de las resistencias bacterianas. De hecho, dos antibióticos (la nisina y la lacticina se han utilizado para la prevención de la mastitis <sup>5</sup>.

Resulta de enorme interés a nivel biomédico el estudio de las halocinas, proteínas del tipo bacteriocina producidas por microorganismos del Dominio Archaea, siendo de destacar los estudios realizados con **Halocina H6**, cuya actividad sobre el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) es atribuida a un péptido derivado de la misma y que se denomina **PINHE**.

El intercambiador NHE, es un mecanismo presente en las membranas de todos los tipos celulares, tanto procariotas como eucariotas, y cataliza un intercambio electroneutro de  $H^+$  intracelular por  $Na^+$  extracelular<sup>5-9</sup>. Se sabe desde hace años que participa a nivel celular en procesos vitales que dependen del intercambio iónico transmembrana, tales como homeostasis de iones, pH intracelular, volumen celular, adhesión, determinación de la forma, migración y proliferación. La actividad normal del NHE es por tanto de importancia vital para la célula. Sin embargo, hay situaciones en las que existe un proceso anormal de hiperactividad del NHE que conducen a un proceso patológico. Desde el punto de vista tisular el NHE está implicado en diversos procesos fisiológicos y patológicos de vital importancia como la isquemia cardiaca, cerebral e intestinal, en los procesos de reperfusión tras un periodo de isquemia, la diuresis, la hipertensión arterial, la división de las células tumorales, la acidez gástrica, el transporte epitelial, la activación de los macrófagos, etc.<sup>10-12</sup>. El tratamiento de todos estos procesos patológicos mencionados anteriormente, podría verse mejorado en caso de disponer de un buen inhibidor del NHE. La investigación acerca de la inhibición del intercambiador NHE, ha cobrado interés en los últimos años, dado el efecto protector observado sobre miocardio isquémico y reperfundido tras un infarto. La hipótesis sobre la que se trabaja es, que como consecuencia de la isquemia se produce una escasez de energía y una acidificación del citoplasma de las células cardíacas que activa el intercambiador NHE. Como consecuencia, se produce una acumulación de  $Na^+$  intracelular en intercambio con  $H^+$  que fuerza al intercambiador  $Na^+/Ca^{++}$  a operar en sentido inverso, produciendo un aumento del  $Ca^{++}$  citosólico hasta niveles tóxicos que conducen a la muerte celular. La utilización de un inhibidor del intercambiador  $Na^+/H^+$  puede mejorar dicho cuadro patológico al evitar este "efecto cascada". Así lo demuestran diversos trabajos con productos sintéticos que ejercen esa acción inhibidora, amiloride y sus análogos (EIPA, DMA, MIA, AHMA)<sup>13-18</sup>. Otros inhibidores sintéticos, HOE694 y HOE642, en fase de experimentación, ejercen también efectos beneficiosos post-isquémicos, tanto sobre arritmias como a nivel de la hemodinámica y mecánica cardiaca<sup>11;14;19-23</sup>. Cariporide y Zoniporide otros derivados más específicos y potentes, que han mostrado ser efectivos por reducir la zona de necrosis en infartos experimentales de miocardio, tienen el grave inconveniente de ser poco reversibles<sup>24-26</sup>.

Ya en 1996 se demostró el efecto protector que tenía sobre la isquemia cerebral el bloqueo de NHE, gracias a experimentos con un modelo celular de isquemia basado en el bloqueo de la glucólisis<sup>27</sup>. Más tarde, estudios con un inhibidor sintético (SM20200) demostraron que la activación de NHE estaba directamente relacionada con los daños celulares neuronales y de la glia y que la inhibición de NHE tendría un gran valor terapéutico<sup>28</sup>. Dicha inhibición reduciría la progresión de los daños de la isquemia y la formación del edema cerebral y atribuirían parte de esos daños a la acumulación de neutrófilos que se reduciría por la inhibición de NHE<sup>29</sup>.

En la actualidad no se dispone de inhibidores fisiológicos de origen natural específicos del intercambiador NHE. Los NHE son inhibidos por compuestos sintéticos como amiloride<sup>30</sup> y sus análogos como EIPA<sup>31</sup>, pero no lo hacen de forma específica, inhibiendo a la vez otros intercambiadores, como  $Na^+/Ca^{++}$  y canales inespecíficos de  $Na^+$ . A pesar de estas limitaciones con elevado número de efectos secundarios, amiloride se está utilizando en terapéutica como diurético. Por otra parte, algunos derivados de la benzoilguanidina que han mostrado ser más específicos y potentes, Cariporide (HOE 642), HOE 694<sup>11;12</sup> y Zoniporide tienen el grave inconveniente de ser difíciles de revertir<sup>24-26</sup>.

Frente a este grave inconveniente que es la falta de reversibilidad, tenemos las halocinas que proceden de microorganismos del Dominio Archaea y de las cuales se han aislado y purificado algunas de ellas<sup>32-34</sup> comprobándose un efecto inhibidor sobre intercambiadores  $Na^+/H^+$  de halobacterias<sup>35</sup>. En concreto, se ha aislado una cepa sobreproductora de **halocina H6**, la cepa alicante SPH7 de *Haloferax gibbonsii*. H6 es una proteína de 30 KDa obtenida del sobrenadante del cultivo, que conlleva un largo y costoso proceso de purificación. Trabajos posteriores se han centrado en aislar de la cepa anterior un péptido, asociado a la halocina, que contiene toda la actividad inhibidora de ésta sobre el transportador NHE. Este péptido (**PINHE**), es el único inhibidor biológico (proteico) descrito hasta el momento, del intercambiador  $Na^+/H^+$  en eucariotas<sup>36;37;72</sup>. Su purificación es mucho más sencilla y económica que con la halocina de la que deriva. Los trabajos realizados sobre él han permitido la elaboración de una patente<sup>36</sup> y su descripción lo señala como un péptido hidrofóbico de 28 aminoácidos que ejerce una inhibición específica, reversible y dosis-dependiente del intercambiador  $Na^+/H^+$  (NHE) de células de mamífero incluyendo al hombre<sup>37</sup>.

PINHE es la primera molécula de origen natural (procedente de haloarceas) que ejerce actividad inhibitoria sobre el transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, no sólo en procariontas sino también en eucariotas por lo que estaría implicado en diferentes aspectos de la Fisiología y Patología, tales como el reestablecimiento de la homeostasis del pH citosólico cuando tiene lugar una acidificación<sup>7;8</sup>, lesiones debidas a isquemia y reperfusión<sup>14;18;20;38;39</sup>, hipertensión<sup>40</sup>, diabetes<sup>41</sup>, regulación de la homeostasis del volumen celular<sup>42</sup>, etc. PINHE como inhibidor de NHE constituye una novedad frente a los inhibidores descritos hasta la fecha, todos ellos de origen sintético y en distintas fases de investigación ya que por el momento solo amiloride, principio activo de (Ameride<sup>™</sup>) está siendo utilizado, como diurético ahorrador de potasio.

Experimentos preliminares de halocina H6 y PINHE con animales sugieren que PINHE es un buen candidato para prevenir los daños ocasionados por la isquemia-reperfusión. Las principales ventajas que ofrece PINHE respecto al resto de inhibidores del NHE conocidos hasta el momento, se deben a su naturaleza proteica, lo que posibilita su mejora sobre la base de la ingeniería genética y de proteínas. Y además que inhiba específicamente el NHE de células eucariotas, de la misma forma que ya se demostró para las haloarceas<sup>30</sup>, es un hecho realmente sorprendente, ya que es la primera vez que una sustancia del tipo bacteriocina muestra actividad similar frente a células eucariotas y procariontas, lo que abre un nuevo campo de investigación de los productos derivados del Dominio Archaea.

El objetivo final del presente trabajo es demostrar que PINHE péptido derivado de una bacteriocina de haloarceas: (1) inhibe el transportador NHE de células eucariotas, (2) evita la acumulación intracelular de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup> en un modelo de isquemia celular y (3) protege frente al daño de isquemia-reperfusión en un modelo animal de infarto de miocardio.

## Material y Métodos

### 1. CÉLULAS UTILIZADAS

#### 1.1. Archaeas

Se han utilizado *Haloferax gibbonsii* alicante SPH7 (CECT 4547) como cepa productora y *Halobacterium salinarum* NRC 817 como cepa sensible.

#### 1.2. Eucariotas

Se han empleado HEK293 (células de riñón de embriones humanos) ATCC CRL1573; Jurkat (linfocitos T

humanos) ATCC TIB152 (clon E6-1); NIH3T3 (fibroblastos de ratón) ATCC, HL1<sup>43</sup> donadas por el Dr. WC Claycomb (línea celular de músculo cardíaco de ratón). También se han utilizado cultivos primarios de células extraídas de músculo esquelético humano y células sanguíneas de origen humano.

## 2. CULTIVO DE CÉLULAS

### 2.1. Archaeas

El medio utilizado para el cultivo es el denominado SW25 que contiene: 2,66 M ClNa, 0,13 M Cl<sub>2</sub>Mg6H<sub>2</sub>O, 0,16 M SO<sub>4</sub>Mg7H<sub>2</sub>O, 6,64 mM Cl<sub>2</sub>Ca, 53,3 mM ClK, 1,6 mM CO<sub>3</sub>HNa y 4,48 mM BrNa y 0,5% de extracto de levadura. El pH se ajustó a 7,2. El medio se esterilizó en autoclave (121°C, 15 min). Los cultivos se incubaron a 37°C y con aireación durante 5-7 días. Para preparar medio sólido se añadió 2% de agar-agar.

### 2.2. Eucariotas

#### 2.2.1. Líneas celulares

Las células 293HEK se propagaron en medio de cultivo constituido por DMEM conteniendo 4 g/litro de glucosa y 3.7 g/l de bicarbonato sódico y suplementado con 10% FBS, 2 mM L-glutamina, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml, anfotericina 2.5 µg/ml y gentamicina 5 µg/ml. El cultivo se realizó en placas de Ø10 cm a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se cultivaron hasta confluencia, entonces se recolectaron mediante incubación con tripsina 0,12% en EDTA 0,5 mM y centrifugación a 300g durante 10 minutos, el precipitado se resuspendió en medio DMEM sin bicarbonato, conteniendo 10% de FBS y 25 mM de Hepes. Se realizó un recuento del número de células vivas utilizando un hemocitómetro y un colorante vital (Trypan blue dye). La suspensión celular se conservó en hielo hasta el ensayo. El cultivo de células NIH/3T3 se realizó de igual forma que HEK293 pero sustituyendo FBS por 10% de NCS. HL1: Se cultivaron según el protocolo del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular del LSU Health Science Center, School of Medicine de New Orleans. Los cardiomiocitos se cultivaron en medio de Claycomb al que se añadió 10% FBS, 0.1 mM norepinefrina (de una solución en 30 mM de ácido ascórbico), 2 mM L- glutamina, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml. Los frascos de cultivo se recubrieron manteniéndolos doce horas a 37°C con una solución conteniendo 0.02% gelatina y 12.5 µg/ml (2 ml por frasco T25); esta solución de gelatina/fibronectina se vació mediante aspira-

ción antes de la siembra. Se cultivaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. El medio se cambió diariamente y se realizaron pasadas (1:3) al alcanzar la confluencia. Se conservaron en congelación a -80°C con isopropanol (95% FBS y 5% DMSO) y a las 12 horas se pasa a N<sub>2</sub> líquido.

### 2.2.2. Músculo humano

El procesamiento de las biopsias de músculo esquelético humano para la separación, cultivo e identificación de células musculares se ha realizado siguiendo los protocolos descritos anteriormente<sup>44,45</sup>. Brevemente, las muestras de tejido muscular se obtuvieron como residuos de donaciones multitejidos, generadas en hospitales debidamente autorizados para dicha actividad y con la mediación de la coordinación de trasplantes hospitalaria correspondiente para la gestión administrativa y funcional de las distintas acciones a realizar.

Desde el momento de la disección y hasta su recepción en el laboratorio, es decir, durante el período de isquemia fría, el tejido se conservó a 4 °C en presencia de solución tamponada de Hank (HBSS) (Gibco BRL) conteniendo: 50 mg/L de tobramicina (tobradistín, Dista), 50 mg/L de vancomicina (diatracín, Dista), 50 mg/L de cotrimoxazol (soltrín, Omega) y 50 mg/L de anfotericina B (fungizona, Squibb). El tejido permaneció en estas condiciones entre 3 y 12 horas, transcurridas las cuales la solución de antibióticos fue sustituida por medio de cultivo M-199 (Gibco BRL), en las mismas condiciones de temperatura y durante un máximo de 24 horas. Como solución para el lavado de las células, se utilizó HBSS con albúmina humana al 4% (Grifols).

El tejido (procedente de biopsias de vasto externo de donantes varones) se sometió a una digestión enzimática. Para ello fue troceado en fragmentos de unos 3 mm<sup>3</sup>. Se procesaron unos 3 g de tejido cada vez. Seguidamente, se añadió HBSS conteniendo tripsina al 0.125% (Gibco BRL) y ácido etilén-diamino-tetracético (EDTA) (Sigma) al 0.02%, a razón de 10 mL/g. El recipiente con los fragmentos de tejido en la solución de disociación se incubó a 37 °C durante 45 min. A continuación, se añadió HBSS con 1mg/ml de soja (Gibco BRL) en proporción 1:1 (v/v) para inhibir la tripsina.

El material digerido fue filtrado a través de una gasa y lavado mediante centrifugación a 115 g, durante 2 min, para eliminar los restos de fibras musculares. Posteriormente el sobrenadante se centrifugó a 300 g durante 10 min y el sedimento obtenido se resuspendió en medio de cultivo y se sembró en placas recubiertas

previamente en el fondo con una solución estéril (121°C, 20 min.) de gelatina de cerdo (0.1%) en agua estéril durante dos horas a temperatura ambiente. Las células se cultivaron en medio de cultivo DMEM con 4 g/litro de glucosa y suplementado con 10% FBS, 2mM L-glutamina, penicilina (100U/ml), estreptomocina (100µg/ml), gentamicina (50µg/ml) y anfotericina (2.5µg/ml). Los cultivos se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se reemplazó dos o tres veces por semana y cuando se alcanzó el 60-75% de confluencia se realizaron subcultivos, para ello las células se recolectaron utilizando una solución de tripsina-EDTA como se ha indicado anteriormente. Después de centrifugación (300g, 10 min) e inhibición de la tripsina se lavaron (X2) con medio de cultivo fresco antes de utilizarlas o resembrarlas de nuevo.

Para su análisis citométrico las células, una vez recolectadas de la placa, se lavaron (X2) con PBS y se resuspendieron (5-10x10<sup>6</sup> cel/ml) en solución HHE (0.1% albúmina sérica humana y 5 mM EDTA en HBSS) y se incubó (30 min a temperatura ambiente) con el anticuerpo monoclonal 5.1H11 (1:100) específico de antígenos de superficie de mioblastos humanos (Developmental Studies Hybridoma Bank, Universidad de Iowa). Se lavaron (X3) con HHE y se incubaron (30 min a temperatura ambiente) con anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con isotiocianato (FITC). Como control negativo se utilizó un IgG de ratón.

Para el aislamiento de mioblastos de cultivos primarios de músculo humano se utilizó el procedimiento de selección positiva utilizando una técnica inmunomagnética.<sup>44</sup> Se empleó el anticuerpo monoclonal 5,1H11 y bolas paramagnéticas de poliestireno que llevan inmovilizado en su superficie un anticuerpo humano anti-ratón (CELLlection Pan Mouse IgG kit (DynaL, Oslo, Noruega). La suspensión de bolitas (Dynabeads) se mezclaron con el anticuerpo 5.1H11 y se incubaron a RT durante 30 minutos. Los tubos se colocaron en un concentrador de partículas (DynaIMPC) durante 1 min se separa el sobrenadante y se lavan las bolitas con el 5.1H11 fijado con HHE (X3). Se prepara, paralelamente, una suspensión celular (10-40x10<sup>6</sup> cel/ml). La suspensión y el complejo Dynabeads-5.1H11 se mezclan y se incuban a 4°C durante 15 minutos. Se mantiene el tubo en el concentrador y se lava (X2) con HHE. El complejo se rompe utilizando una solución de DNAsa e incubando 15 min a 37°C con agitación. El sobrenadante conteniendo las células se recupera con pipeta y se utiliza y/o siembra.

### 3. MEDIDA CITOMÉTRICA DEL pH INTRACELULAR EN CÉLULAS EUCARIOTAS

El análisis cinético del pH<sub>i</sub> y sus variaciones se realizó por citometría de flujo usando el fluorocromo BCECF-AM. Tal como se ha reseñado anteriormente <sup>46</sup>. Se diseñó un protocolo de adquisición de datos en el citómetro de flujo que recogió las señales de dispersión frontal (FS) y lateral (SS) de láser y las emisiones de fluorescencia verde (FL1) y naranja (FL3). Se estableció una representación biparamétrica de FS frente a SS para acotar la población de células vivas (mayor FS y menor SS). Se establecieron histogramas monoparamétricos de FL1, FL3 y de cociente FL3/FL1 y una representación de cociente FL3/FL1 frente al tiempo (tiempo final: 300 segundos). En esta última gráfica se delimitaron regiones de análisis estadístico sobre el eje de tiempos que abarquen la totalidad del eje del cociente. Los tubos para el análisis contenían: 100000 células a analizar de las eucariotas empleadas en el trabajo, 2 µl de BCECF-AM de una solución de 1 mg/ml en DMSO, la cantidad adecuada del inhibidor o control correspondiente y se completó hasta 1 ml con DMEM sin bicarbonato, HEPES y FBS. Se incubó a 37°C durante 15 minutos y en oscuridad.

La solución DMEM utilizada estaba exenta de bicarbonato, tenía 10% de FBS y estaba tamponada con Hepes conteniendo: glucosa 1 gr/L, piruvato sódico 110 mg/L, ClNa 140mM, ClK 2.6mM, PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub> 1.2mM, SO<sub>4</sub>Mg 1.2mM, Cl<sub>2</sub>Ca 1.0mM y Hepes 25mM ajustándose el pH a 7.4.

Terminada la incubación se introduce la suspensión de células en el citómetro de flujo y se inicia la adquisición de datos para recoger la línea base de fluorescencia durante 10-15 segundos. En los ensayos que precisan acidificación, esta se consigue interrumpiendo la adquisición de datos para añadir un pulso de propiónico al tubo de la muestra, se añadieron 50-100 µl de una solución 1 M de propionato sódico para obtener la acidificación del citoplasma deseada. Se reanuda la adquisición de datos hasta alcanzar el final del tiempo experimental.

En las experiencias realizadas con células de músculo esquelético y que se empleó un anticuerpo secundario conjugado con FITC como cromóforo y para determinar simultáneamente las células positivas al anticuerpo 5.1H11 y el pH intracelular se sustituyó el cromóforo BCECF-AM por carboxi-SNARF-1 AM 2 mM capturando la fluorescencia emitida en los canales FL2 y FL3 y determinando el cociente FL3/FL2 de forma similar a como se

ha realizado para el BCECF, mientras que la emisión de fluorescencia debida a FITC se recogió en el canal verde FL1.

Para cada tipo de células se estableció la relación entre el cociente de los canales de fluorescencia FL3/FL1 para BCECF-AM y los valores de pH<sub>i</sub>. Para ello se incubó las células en el medio descrito anteriormente pero tamponados a diferentes pH y en presencia de 2 µg/ml de nigericina. En el caso de utilizar SNARF fue el cociente FL3/FL2 el que se relacionó con el pH<sub>i</sub>.

### 4. MEDIDA DE LA VELOCIDAD INICIAL DE RECUPERACIÓN DEL pH<sub>i</sub>

Se realizó de acuerdo al método citométrico de medida de la actividad de NHE como hemos descrito anteriormente <sup>46</sup>. Brevemente la adquisición de datos del citómetro permite establecer una relación entre los valores del cociente FL3/FL1 (o en su caso FL3/FL2) en función del tiempo de la experiencia. Un ajuste matemático permite establecer una ecuación en función del tiempo del citado cociente cuyo valor de la derivada a tiempo cero nos permitió establecer la velocidad inicial de aumento del cociente. A partir de la relación cociente con pH<sub>i</sub> se ha calculado la velocidad inicial de recuperación del pH<sub>i</sub> y se define como actividad de NHE <sup>46</sup>.

### 5. REVERSIBILIDAD DE ACCIÓN DE PINHE

El ensayo para determinar la reversibilidad del efecto de PINHE sobre NHE se realizó determinando la velocidad inicial de recuperación del pH<sub>i</sub> sobre cultivos celulares. Las células se dividieron en tres grupos para su análisis citométrico. En el primero (control) las células se incubaron 15 minutos en el medio de ensayo en ausencia de PINHE y los otros dos en presencia de 1000 U/ml. Previo a la determinación de la velocidad inicial de recuperación del pH<sub>i</sub>, el grupo tres se centrifugó a 300g 10 minutos y el precipitado se resuspendió en 5 ml de medio sin inhibidor y se dejó equilibrar incubando a 37°C durante 30 minutos, la operación se repitió 3 veces. Al finalizar, las células lavadas se resuspendieron en 1 ml de la solución de ensayo sin PINHE y se procedió a determinar su velocidad de recuperación del pH<sub>i</sub> como se ha descrito anteriormente.

### 6. MEDIDA DE NA<sup>+</sup> INTRACELULAR

La medida de la concentración de Na<sup>+</sup> intracelular se realizó citométricamente utilizando el indicador

fluorométrico Sodium Green en su forma tetra-acetato (permeable a células). El vial de reacción contenía 100000 células, 4  $\mu\text{M}$  de Sodium Green (10  $\mu\text{l}$  de una solución 0.4 mM en DMSO) y DMEM sin bicarbonato sódico y 5.6 mM glucosa en 1 ml. Se incubó a 37°C durante un tiempo de 30 minutos que fue previamente determinado experimentalmente para las células ensayadas. La fluorescencia debida al Sodium Green se recogió en el canal de fluorescencia verde (FL1) del citómetro.

Para establecer la relación entre la fluorescencia y la concentración de sodio las células se incubaron con sodium green durante 30 minutos en una solución que contenía: 1 mM  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , 5.3 mM  $\text{ClK}$ , 1.2 mM de  $\text{SO}_4\text{Mg}$  anhidro, 10 mM glucosa, 25 mM HEPES y 5% BSA ajustado con tampón TRIS a 7.4. Se añadió  $\text{ClNa}$  1M para alcanzar las concentraciones de  $\text{Na}^+$  requeridas en el ensayo (0-50 mM) y 10  $\mu\text{M}$  de gramicidina (10  $\mu\text{l}$  de una solución 10 mM en etanol absoluto). Se continuó la incubación durante 30 minutos más. Terminada la incubación se paró la reacción introduciendo los tubos en hielo y se añadió 2  $\mu\text{g}$  de yoduro de propidio antes de su lectura en el citómetro.

## 7. MEDIDA DEL $\text{Ca}^{++}$ INTRACELULAR

Se realizó mediante citometría de flujo utilizando el fluorocromo Fluo-3-AM. El vial de reacción contenía: 100000 células,  $\mu\text{M}$  Fluo-3-AM (2  $\mu\text{l}$  de una solución 1 mM en DMSO), 5.6 mM glucosa y DMEM sin bicarbonato hasta 1 ml. La fluorescencia debida a Fluo-3-AM se recogió en el canal de fluorescencia verde del citómetro (FL1). La medida del pH intracelular se realizó simultáneamente con la medida de  $\text{Ca}^{+2}$  utilizando 2 mM del fluorocromo SNARF, calculando el cociente de fluorescencia FL3/FL2 como se ha descrito anteriormente como medida del pH<sub>i</sub>. En algunas experiencias se han incubado las células durante 30 min. a 37°C con 150 nM de Tapsigargina y 5 minutos con 4  $\mu\text{M}$  Rianodina.

## 8. MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

Se realizaron experimentos in vivo utilizando un modelo de isquemia-reperfusión en perros basado en la oclusión de la arteria coronaria.

Todos los estudios se realizaron sobre la base de los acuerdos de la Convención Europea de Estrasburgo de 18/06/1986. Los perros (15-25 Kg) se dividieron aleatoriamente en dos grupos (ocho animales cada uno),

uno recibió suero salino (grupo control) y el otro el inhibidor disuelto en salino. La cantidad total de inhibidor (4170 AU  $\text{Kg}^{-1}$ ) se disolvió en 2 ml de suero salino. Se cateterizó la femoral izquierda y a través de ella se introduce el suero y el inhibidor administrándolo durante 2 min. antes de la oclusión seguido de cuatro dosis (1043 AU  $\text{Kg}^{-1}$ ) a intervalos de 15 min. Se anestesiaron con 25 mg  $\text{Kg}^{-1}$  (i.v.) sodium thiopental (Pentothal®, Abbott) y se dieron dosis adicionales según necesidades.

Se intubaron y se ventilaron con aire (Respirator system 3000, Engström, Sweden). Se monitorizó la presión arterial media (Spectramed Statham P23XL transducer) y el ECG (lead I, II, III, and  $\text{V}_2$ ) conectando electrodos y transductores a un Grass 7F polygraph (Grass Instruments, Quincy, MA, USA).

Se consideró un latido ventricular prematuro todo complejo ventricular no precedido de una onda-P incluyendo no solo latidos ectópicos sino aquellos que aparecían dentro de una taquicardia ventricular.

El acceso a miocardio se realizó mediante toracotomía lateral (quinta costilla intercostal). Se ligó la rama izquierda de la arteria coronaria descendente durante 2 h (isquemia) y después de 3h de reperfusión el animal se sacrificó con una sobredosis de tiopental. Se extrajo el corazón y se analizó la zona de riesgo y tamaño del infarto mediante el uso de azul de metileno y N-azul tetrazolium según se ha descrito anteriormente <sup>42</sup>. Las porciones de miocardio no teñidas se diseccionaron, se pesaron y el tamaño del infarto se calculó como porcentaje de la región de riesgo o como la masa del ventrículo izquierdo.

## Resultados y Discusión

Las haloarqueas son microorganismos halófilos extremos. Su hábitat natural lo constituyen medios con elevadas concentraciones de sales. Estos microorganismos, tan sencillos en su organización celular como las bacterias, están incluidos en el Dominio Archaea y han evolucionado paralela e independientemente del resto de seres vivos, lo que supone importantes diferencias en la composición química, genética y capacidades biosintéticas y metabólicas con respecto a los otros dos dominios Bacteria y Eucarya. A partir del sobrenadante del cultivo de la haloarquea *Haloflex gibbonsii* Ma 23.39 se obtiene la halocina H6 que inhibe específicamente el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de haloarqueas sensibles como *Halobacterium salinarum*. Este

intercambiador es vital para estas células que viven en ambientes hipersalinos y lo precisan para mantener la homeostasis del Na<sup>+</sup>. Una purificación del sobrenadante del citado cultivo de *H. gibbonssi* sobre la base de la precipitación con acetona y purificación con FPLC en fase reversa con gradiente de acetonitrilo, permite purificar un péptido que conserva toda la actividad de H6<sup>37</sup>. Este péptido, denominado PINHE, se le ha determinado, mediante espectrometría de masas, un peso molecular de 2732 Da y está formado por 28 aminoácidos con la siguiente secuencia: N-Ser Trp Ile Asp Ser Ala Ser Thr Ala Ala Leu Gly Thr Asn Pro Val Thr Met Ser Ala Pro Gly Gly Thr Val Asn Ile Asp-C. Se trata de un péptido hidrófobo y termorresistente, soporta rangos amplios de pH (5-9), su actividad es independiente de la concentración salina y es sensible a pronasa y resistente a tripsina<sup>37</sup>.

## 1. REVERSIBILIDAD

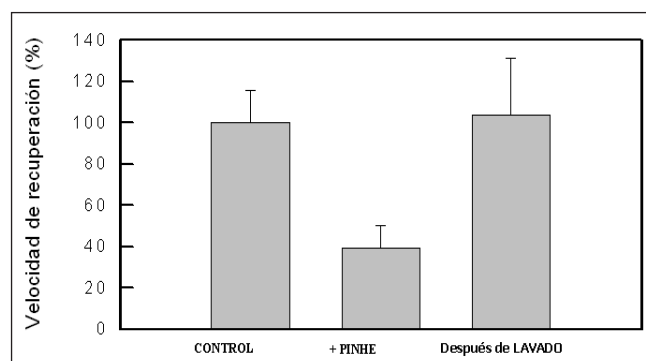
Para demostrar si la inhibición de PINHE sobre el intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> es reversible nos basamos en el efecto que sobre NHE unido al inhibidor, complejo NHE-PINHE, tendría el hecho de eliminar el inhibidor no ligado al NHE. Eliminando el PINHE (no ligado) de la suspensión celular, sustituyendo el medio de incubación con PINHE por otro exento del mismo y dejando equilibrar, si fuera reversible, cabría esperar que el PINHE ligado al NHE se soltara y pasara a la solución hasta alcanzar un nuevo equilibrio entre PINHE ligado al NHE y PINHE libre en suspensión. Si la dilución es suficiente (repetiendo este lavado y re-equilibrando las veces necesarias con una solución exenta del inhibidor) podríamos esperar que la velocidad de recuperación del pH intracelular, después de la acidificación del medio, se restableciera a valores próximos a la actividad del NHE sin el inhibidor (control).

La experiencia se llevó a cabo utilizando células NIH3T3. Las condiciones del ensayo fueron las del modelo de ensayo descrito en Material y Métodos. Las células se dividieron en tres grupos. En el grupo 1 las células se incubaron en el medio de ensayo sin la presencia de PINHE (control) y los otros dos grupos (grupo 2 y 3) se incubaron en presencia de PINHE (1000 U/ml). Después de la incubación, las células del grupo 3 se centrifugaron (250g, 10 min.) y se lavaron con cinco veces su volumen de medio sin PINHE y dejando equilibrar posteriormente durante 30 minutos. El procedimiento de dilución-lavado se repite tres veces y al finalizar, las células lavadas se resuspenden en 1 ml.

de la solución de ensayo (sin PINHE), se acidifica y se sigue la evolución del pH intracelular según nuestro protocolo, determinándose a continuación la velocidad inicial de recuperación del pH intracelular.

En la figura 1 se resume el resultado del experimento. Se representa el valor medio de la velocidad de recuperación del pH intracelular inicial (referida al control) para los tres grupos de células según el protocolo de ensayo. Se observa que la incubación con 1000U/ml de PINHE (grupo 2) produjo una inhibición del 40% de dicha velocidad al compararla con el 100% para el control (grupo 1), pero después del lavado-dilución del PINHE presente, observamos que la velocidad de recuperación del pH citosólico alcanza valores similares a los del control. Esta igualdad entre los grupos 1 y 3 contrasta con la inhibición significativa ( $P < 0.01$ ) que se produce en presencia de PINHE (grupo 2) y pone de manifiesto el carácter reversible de la acción del PINHE como inhibidor del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>.

**Figura 1.** Reversibilidad de la inhibición del PINHE sobre el intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de células NIH/3T3. (Control): Células incubadas en el medio de ensayo; (+PINHE) células incubadas en presencia de 1000 U/ml de PINHE; (Después de lavado): Las células incubadas con PINHE se sometieron a distintos lavados e incubaciones para eliminar la presencia del inhibidor. Los valores son media  $\pm$  intervalo de confianza al 99%.



## 2. INHIBICIÓN DE NHE

En este momento y después de los resultados de las experiencias realizadas hasta ahora, conocemos que PINHE es un inhibidor específico del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de células eucariotas. En las experiencias siguientes se determina el papel que la concentración de PINHE juega en la inhibición de la actividad de NHE y permitirá establecer valores de la concentración que produce el 50% (IC50) de la actividad del intercambiador. Los ensayos se han realizado con tres tipos de líneas celulares: fibroblastos de ratón NIH3T3, células

renales de embrión humano HEK293 y cardiomiocitos de ratón HL1.

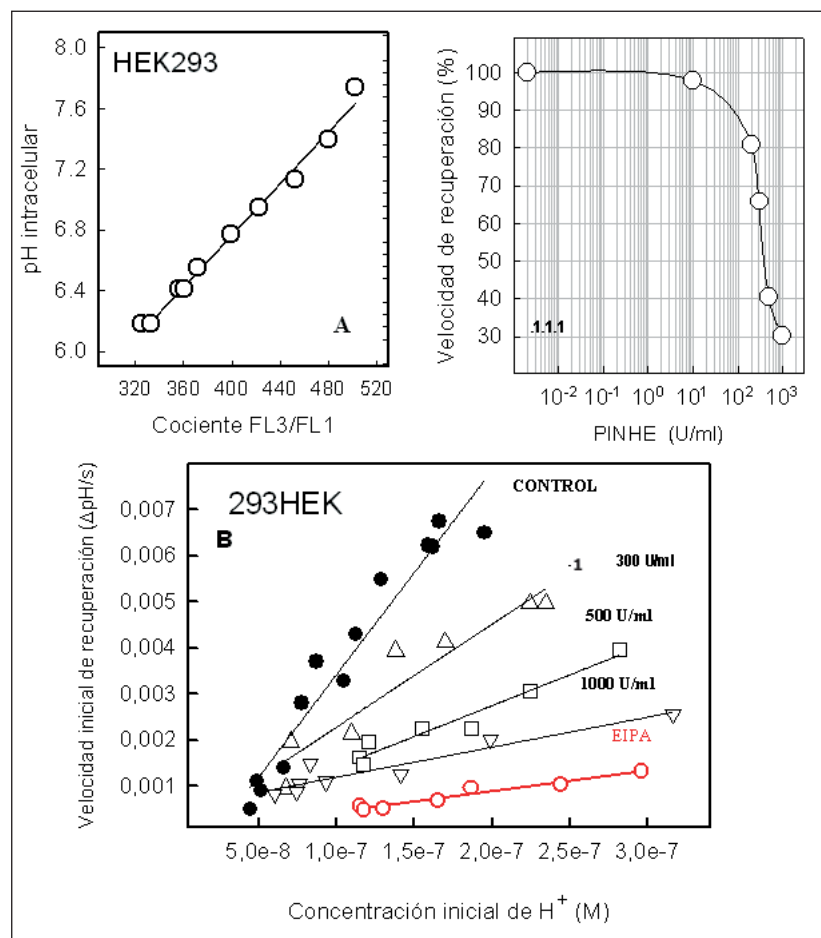
Los resultados de las experiencias con HEK293 se reseñan en la figura 2. La relación lineal que existe entre los valores del cociente de la lectura citométrica y el valor del pH<sub>i</sub> determinado tal como se describe en Material y Métodos se representa en la Figura 2A. Los resultados de la velocidad inicial de recuperación de pH<sub>i</sub> frente a la concentración de protones intracelulares (figura 2B) presenta una relación que aumenta linealmente con la acidificación inicial del citoplasma. Además, la presencia de PINHE, supone una reducción de la velocidad de recuperación de pH<sub>i</sub>. Esta reducción es dosis dependiente, como se puede apreciar en la figura 2C que presenta la típica forma sigmoidea de este tipo de relaciones. En ella se ha representado el porcentaje de la velocidad inicial de recuperación frente a la concen-

tración de PINHE para una determinada acidificación del citoplasma (en este caso 6.8) de la que se puede deducir un valor de IC<sub>50</sub> de aproximadamente 400 U.A./ml.. El valor de IC<sub>50</sub> calculado para otros pH<sub>i</sub> no presenta diferencias ( $P < 0.43$ ) por lo que se podría estimar un valor medio para el IC<sub>50</sub> del PINHE de 4.8  $\mu$ M para HEK293.

En las experiencias se ha llevado un control positivo de la inhibición de NHE como es etil-isopropil-amiloride (EIPA). A la concentración utilizada, 3  $\mu$ M, presenta una inhibición notable en todo el rango de pH<sub>i</sub> estudiado. Esta inhibición refuerza los resultados que como inhibidor dosis dependiente presenta PINHE (Tabla 1).

Se ha realizado un estudio similar de la dependencia que la inhibición tiene con la concentración de PINHE para la línea celular de fibroblastos de ratón NIH3T3 (Figura 3). Los datos presentan una similitud muy gran-

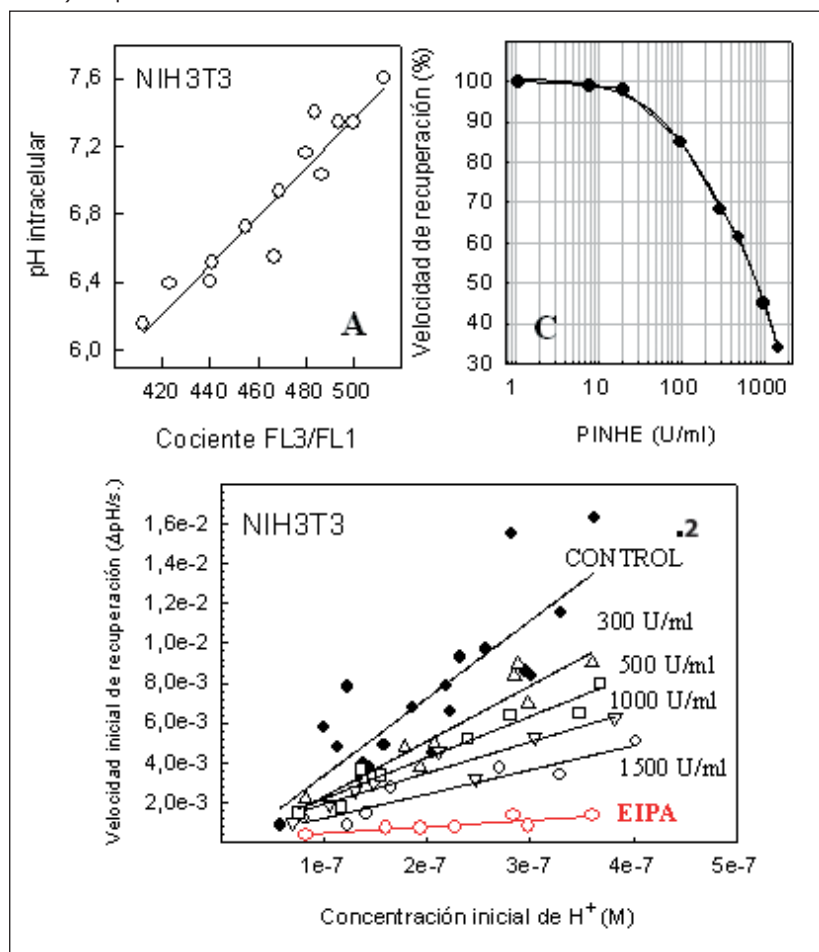
**Figura 2.** Inhibición por PINHE de la actividad de NHE de células HEK293: (A) Calibrado del pH<sub>i</sub> en función del cociente de fluorescencia FL3/FL1 de la lectura citométrica de BCECF; (B) Velocidad inicial de recuperación de pH<sub>i</sub> en función de la concentración de H<sup>+</sup> intracelular en presencia de: 0 (Control), 300, 500 y 1000 U.A./ml de PINHE y EIPA 3  $\mu$ M; (C) Velocidad de recuperación (respecto al control, 100%) del pH<sub>i</sub> en función de la concentración de PINHE.



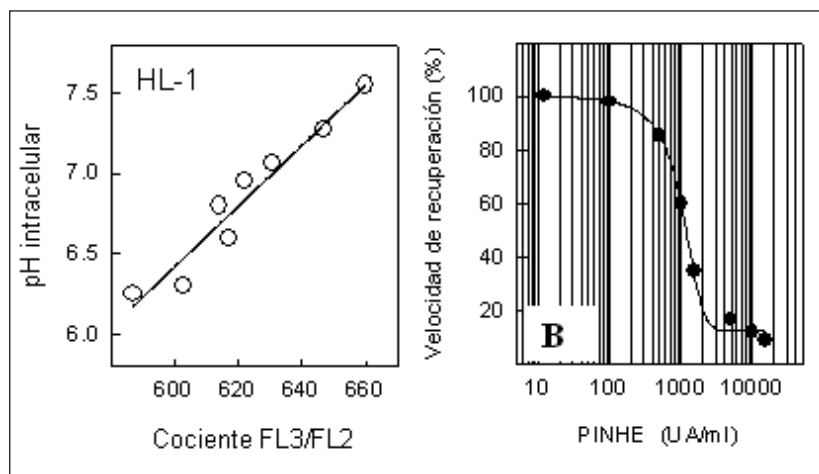
de con las obtenidas para HEK293 (Figura 2). La actividad del intercambiador, respecto a la concentración de H<sup>+</sup>, es muy similar en unas u otras células, así, para un pH<sub>i</sub> de 6.7 resultan, para el control, unas velocidades iniciales de recuperación de  $7.7 \times 10^{-3}$  DpH/s para NIH3T3 y de  $7.9 \times 10^{-3}$  DpH/s para HEK293. Aunque la inhibición por PINHE resulta bastante similar los valores de IC<sub>50</sub> que se obtienen para estas últimas son mas altos (800 U.A./ml) y equivale a un IC<sub>50</sub> de 9.5  $\mu$ M para NIH3T3 (Tabla 1).

La línea celular HL-1 derivó de la línea tumoral AT1 de cardiomiocitos auriculares de ratón<sup>48</sup>. Se puede crecer bien y conserva propiedades morfológicas, bioquímicas y electrofísicas de las células cardíacas. Presentan características ultraestructurales de las células embrionarias del músculo cardíaco. Expresan genes característicos de los miocitos auriculares de adulto, como a-miosina de cadena pesada, a-actina y conexina43, así como el factor natriurético auricular. Del análisis inmunohistoquímico se desprende que la distribución de los marcadores específicos cardíacos (desmina, miosina sarcomérica y factor natriurético auricular) es igual a los cardiomiocitos en cultivo. En definitiva, las células HL-1 son una línea celular de miocitos cardíacos que soportan bien muchos pases de cultivo conservando fenotipos específicos cardíacos<sup>48</sup>.

**Figura 3.** Inhibición por PINHE de la actividad de NHE de células NIH3T3: (A) Calibrado del pHi en función del cociente de fluorescencia FL3/FL1 de la lectura citométrica de BCECF; (B) Velocidad inicial de recuperación de pHi en función de la concentración de H<sup>+</sup> intracelular en presencia de: 0 (Control), 300, 500, 1000 y 1500 U.A./ml de PINHE y EIPA 3 μM; (C) Velocidad de recuperación (respecto al control, 100%) del pHi en función de la concentración de PINHE.



**Figura 4.** Inhibición por PINHE de la actividad de NHE en células HL1. (A): Calibrado del pHi en función del cociente de fluorescencia FL3/FL2 de la lectura citométrica de SNARF; (B): Velocidad de recuperación de pHi (respecto al control, 100%) en función de la concentración de PINHE.



**Tabla 1.** Valores obtenidos de IC<sub>50</sub> de inhibición de PINHE en las líneas celulares ensayadas.

Línea celular	IC <sub>50</sub> (μM)
HEK293	4.8
NIH3T3	9.5
HL-1	13

En la Tabla 1 y Figura 4 se muestra los resultados de la inhibición del PINHE sobre células HL-1 sometidas al modelo experimental de acidificación. En este caso, para la medida de pHi, se ha utilizado el cromóforo SNARF con lo que se deja el canal de fluorescencia verde para otro cromóforo (ver más adelante en la determinación de Ca<sup>++</sup>) a pesar de que la sensibilidad de SNARF es menor que BCECF para la medida de pHi. El análisis de la inhibición de PINHE sobre la línea celular HL-1 se resume en la Tabla 1 con un valor de IC<sub>50</sub> de 1100 U.A./ml con lo que se podría estimar el IC<sub>50</sub> en 13 μM.

La actividad de los inhibidores de NHE varía en gran forma, tanto con el tipo de células como con los parámetros que se utilizan para conocer la actividad del transportador, como queda reflejado en múltiples publicaciones. Así, por ejemplo, midiendo la entrada de Na<sup>+</sup> en hepatocitos de rata, Renner y col. obtenían valores de IC<sub>50</sub> para Amiloride, DMA y EIPA de 3, 0.5 y 0.1 mM respectivamente<sup>49</sup>. La recuperación de pHi en colonocitos de pollo era inhibida por EIPA con IC<sub>50</sub> 0.18 mM<sup>49</sup>. En miocardio de rata, la recuperación de pHi era inhibida por EIPA o SM15691 con un IC<sub>50</sub> de 80 nM<sup>46</sup>. La entrada de Na<sup>+</sup> debida a NHE de plaquetas de rata era inhibida por EIPA y HOE694 con un IC<sub>50</sub> de 0.1 μM, mientras que en eritrocitos de conejo HOE 694 lo hacía con un IC<sub>50</sub> de 0.8 mM y en células endoteliales de aorta bovina lo hacía con IC<sub>50</sub> de 0.1 mM, todas ellas comparable a EIPA<sup>14</sup>.

Los resultados de inhibición del intercambiador NHE por PINHE, pone de manifiesto dos cosas: (i) la inhibición dosis-dependiente de PINHE respecto a la actividad de NHE y (ii) la capacidad de inhibir NHE de todas las células ensayadas. El hecho de ensayar

con células de riñón (HEK293) y del músculo cardíaco (HL-1) nos lleva a la consideración de la acción de PINHE sobre las distintas isoformas de NHE. Las células cardíacas tienen una proporción abundante de isoformas NHE1<sup>13;52;53</sup>, mientras que las renales la tienen de NHE3<sup>54-56</sup>. Podemos deducir que PINHE tiene capacidad de inhibir ambas isoformas. La falta de anticuerpos específicos para las isoformas de NHE ha postergado el estudio de la especificidad de inhibición sobre las distintas isoformas.

### 3. SODIO INTRACELULAR

En la mayoría de las células la concentración de Na<sup>+</sup> intracelular está regulada. La concentración en células en reposo oscila en el rango 5-20 mM mientras en los fluidos extracelulares es muy superior (>100 mM).

La entrada de Na<sup>+</sup> en la célula genera un potencial de membrana negativo a través de la misma lo que origina un gradiente electroquímico. Dicho gradiente de Na<sup>+</sup> lo mantiene la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (NKE) que utiliza la energía derivada de la hidrólisis de ATP y que intercambia el Na<sup>+</sup> intracelular con K<sup>+</sup> extracelular (3:2). Este gradiente electroquímico generado debido al gradiente de Na<sup>+</sup>, lo utiliza la célula: (i) para acoplar el transporte de sodio al flujo a través de la membrana de solutos no favorables a ello, como, por ejemplo, nutrientes (azúcares o aminoácidos) o neurotransmisores, (ii) para la salida de H<sup>+</sup> vía intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE) (1:1) o (iii) el transporte de Ca<sup>++</sup> a través del intercambiador Ca<sup>++</sup>/Na<sup>+</sup> (NCE) (1:3).

Por todo ello, la concentración de Na<sup>+</sup> intracelular puede variar como consecuencia de muchas condiciones fisiológicas o fisiopatológicas y dado el papel que desempeña el gradiente de sodio, dichos cambios pueden acarrear diversas consecuencias fisiológicas. Un ejemplo claro lo constituye la isquemia, hipoxia severa u otras patologías que cursan con una acidificación del citoplasma y una falta de energía en la célula. En estas condiciones el intercambiador NHE se activa y extrae H<sup>+</sup> del interior introduciendo, fruto del intercambio, Na<sup>+</sup>. Es precisamente la acumulación de Na<sup>+</sup> en el citoplasma lo que inicia la cascada de efectos desfavorables, de ahí el papel beneficioso, cardioprotector, que ejerce la inhibición de NHE<sup>18;57</sup>.

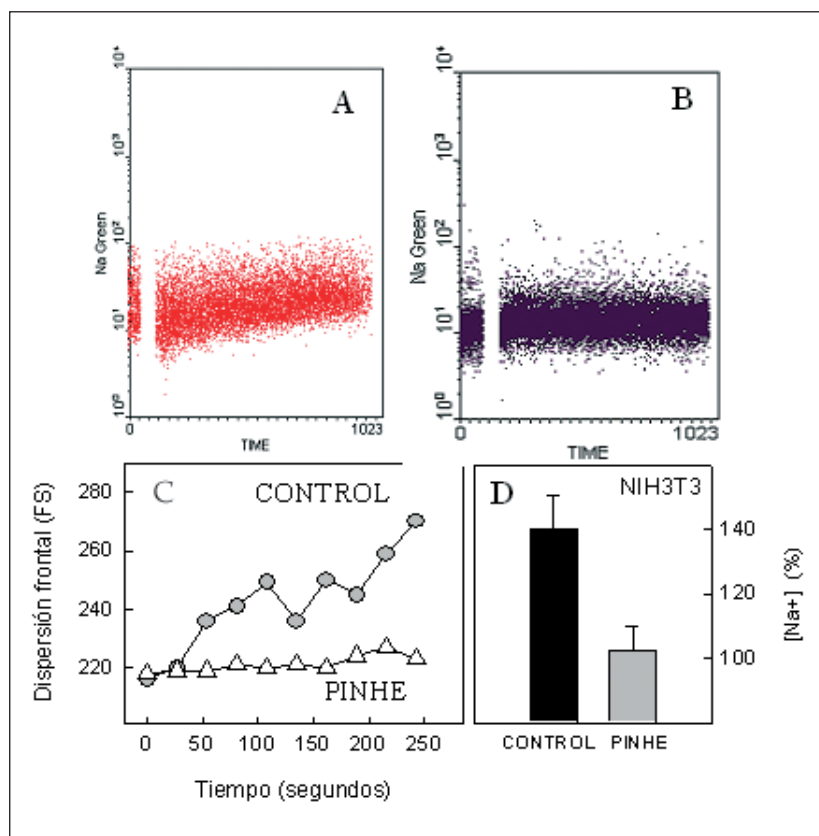
El efecto de la inhibición de NHE por PINHE sobre el Na<sup>+</sup> citosólico se analizó midiendo la concentración de Na<sup>+</sup> intracelular y su evolución tras la acidificación. El empleo de cromóforos fluorescentes sensibles a Na<sup>+</sup>

permite la monitorización del, Na<sup>+</sup> intracelular de forma no invasiva y conservando la funcionalidad celular. Este se ha medido mediante el empleo de Sodium-Green, que es permeable a la membrana celular y se une a Na<sup>+</sup> excitándose con luz visible y emitiendo fluorescencia en el canal verde. Presenta una afinidad más alta respecto a Na<sup>+</sup> que frente a K<sup>+</sup>.

La intensidad de fluorescencia de Sodium-Green aumenta con la concentración de Na<sup>+</sup>. Dentro del modelo experimental se establece un protocolo para su medida y monitorización. Las células se incuban con el fluorocromo y luego se analiza su fluorescencia en el citómetro. Para realizar el calibrado, se utilizaron células NIH3T3, tras incubación a 37°C con Sodium-Green, tras penetrar en las células a través de la membrana se observa la emisión de fluorescencia al unirse con Na<sup>+</sup>. Dado que Sodium-Green se encuentra en exceso (4 μM) respecto a Na<sup>+</sup>, el máximo que alcanza la curva establece el tiempo mínimo de incubación que garantiza suficiente reactivo. En el intervalo estudiado la intensidad de fluorescencia debida a Sodium-Green es lineal respecto a la concentración de Na<sup>+</sup> intracelular. Se comprobó utilizando gramicidina como ionóforo. Las células se incubaron durante 30 minutos con Sodium-Green para que penetre en la célula y entonces se añadió gramicidina hasta 10 μM que permite la entrada de Na<sup>+</sup> en la célula hasta equilibrar la concentración de Na<sup>+</sup> intra y extracelular lo que permite relacionar la medida de fluorescencia con la concentración de sodio.

En la figura 5 se reseña los resultados obtenidos de la evolución del Na<sup>+</sup> intracelular que resultan de aplicar el modelo experimental a células NIH3T3. Cuando se produce la acidificación se inicia un aumento del Na<sup>+</sup> que sigue una cinética parecida a la que hemos visto anteriormente con el pHi. El efecto del PINHE sobre la entrada de sodio se pone de manifiesto al comparar la figura 5A y 5B. En la primera, la activación de NHE debida a la acidificación se corresponde con un aumento de Na<sup>+</sup> con el tiempo, mientras que la presencia de 1000 U.A./ml de PINHE resulta en una variación mínima de la concentración del mismo (figura 5B). Los resultados medios de las experiencias realizadas (figura 5D) indican que a los cuatro minutos después de la acidificación las células controles han experimentado un aumento de la concentración hasta un valor de 140% respecto del valor basal (100%), pero la presencia del inhibidor PINHE hace que las células no experimenten variación. Esta diferencia (P<0.05) pone de

**Figura 5.** Evolución en el tiempo del Na<sup>+</sup> intracelular después de acidificación, según modelo experimental, de células NIH3T3 en ausencia (A) (control) y presencia de 1000 U.A./ml de PINHE (B). Variación de la dispersión frontal (FS) de NIH/3T3 (C) y valores medios respecto al valor inicial (100%) del Na<sup>+</sup> intracelular a los cuatro minutos después de la acidificación (D) (media  $\pm$  intervalo de confianza al 95%).



manifiesto un efecto protector de PINHE respecto del efecto perjudicial que la entrada brusca de Na<sup>+</sup> puede tener a nivel celular. Además, la concentración de Na<sup>+</sup> intracelular modifica algunas propiedades físicas de las células, así se aprecia en la figura 5C, donde tras la acidificación se observa un aumento de FS de reflejaría un aumento de volumen que está linealmente relacionado con la entrada de Na<sup>+</sup> en la célula y la consiguiente entrada de agua.; la presencia de PINHE hace permanecer la célula sin variación en FS lo que confirma lo observado para sodio.

En la figura 6 se representa la evolución del Na<sup>+</sup> intracelular después de la acidificación en mioblastos de músculo humano. Estas células se separaron de cultivos primarios de biopsia de músculo humano mediante el método inmunomagnético, con el empleo del anticuerpo monoclonal 5.1H11, tal como se ha descrito en Material y Métodos. Esta separación aísla mioblastos de otras células presentes en el músculo <sup>44</sup>. Los resultados están en la línea de los descritos para NIH3T3.

aunque menos acentuados (figura 6 A y B). En la figura 6C se muestra la evolución del Na<sup>+</sup> intracelular después de la acidificación y a lo largo de los cuatro minutos de experiencia. Como se aprecia la presencia de PINHE (1000 U.A./ml) evita el la entrada de Na<sup>+</sup> al interior celular. A los cuatro minutos el PINHE ha evitado el aumento del Na<sup>+</sup> intracelular a diferencia del control (figura 6D) donde se aprecia un incremento del 115 % respecto al control y PINHE (100%) (P<0.05).

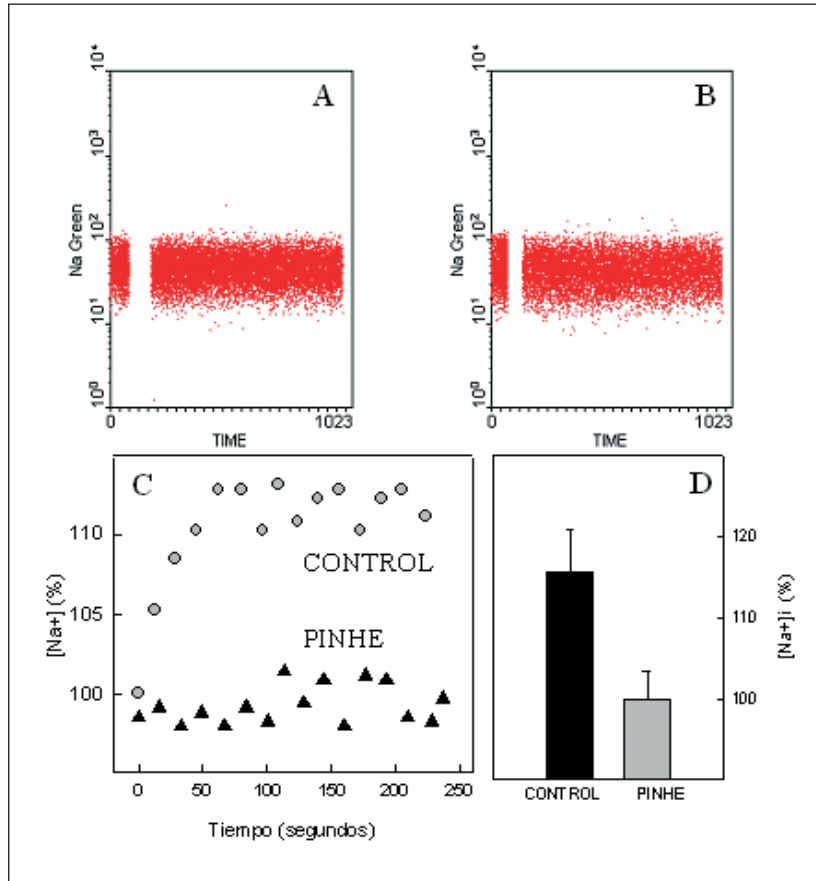
#### 4. CALCIO INTRACELULAR

Es evidente que los iones Na<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup> juegan un papel importante como moduladores, tanto de forma individual como interrelacionados de tal manera que variaciones en uno alteran al otro <sup>58</sup>. Las variaciones en la concentración de calcio se deben a: (i) la entrada y salida de calcio a través del sarcolema y/o (ii) la entrada o liberación del mismo en los almacenes intracelulares. Desde un punto de vista general las alteración del pH puede afectar dichos cambios y consecuentemente la actividad de muchas proteínas incluyendo bombas, canales, receptores y enzimas así como la actividad de muchos productos.

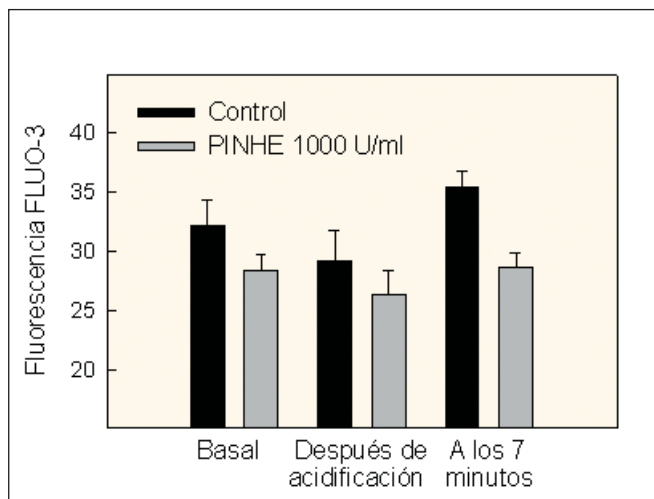
El posible efecto de PINHE sobre la variación de la concentración de calcio intracelular se estudió mediante técnicas citométricas. Se empleó el fluorocromo Fluo-3-AM. Es un indicador fluorescente de los niveles de Ca<sup>++</sup> intracelular. Fluo3-AM atraviesa la membrana, gracias a su estructura -éster AM- en donde las esterasas lo hidrolizan liberando fluo-3 que no es fluorescente hasta que se asocia con Ca<sup>++</sup>. En nuestros experimentos hemos bloqueado las entradas de Ca<sup>++</sup> a los reservorios intracelulares del mismo mediante la presencia de 150 nM de tapsigargina y 50 $\mu$ M de rianodina, quedando inhibidos tanto la ATPasa como los canales de Ca<sup>++</sup> <sup>59-61</sup>.

En la figura 7 se muestra el efecto del PINHE sobre el contenido de Ca<sup>++</sup> intracelular de cardiomiocitos de ratón de la línea HL-1. Los resultados muestran un valor inferior de calcio en los ensayos en donde PINHE está presente. A nivel basal dicho valor ya es inferior en el caso de incubación con PINHE (1000 U.A./ml) Ello indica una ligera protección que se manifiesta claramen-

**Figura 6.** Efecto de la incubación de mioblastos (5.1H11 +) de músculo humano con PINHE sobre la evolución de Na<sup>+</sup> intracelular después de acidificación citoplasmática. Evolución de Sodium-Green en el citómetro de control (A) y con 1000 U.A./ml de PINHE (B). Ejemplo de la evolución de Na<sup>+</sup> durante la experiencia (C) y diferencias medias a los cuatro minutos después de la acidificación respecto al valor inicial (100%) (D) (media ± intervalo de confianza al 95%).



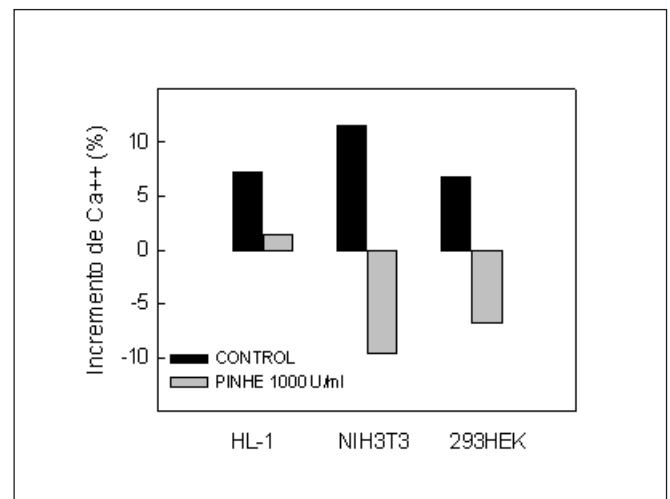
**Figura 7.** Influencia de la presencia de PINHE en la evolución de la fluorescencia debida al Ca<sup>++</sup> intracelular en el modelo de ensayo sobre cardiomiocitos HL-1. Los valores son media ± intervalo de confianza al 95%.



te a los 7 minutos con una subida del control cuya diferencia con las células incubadas con PINHE es significativa ( $P < 0.05$ ). El origen de este calcio puede ser la acción del intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> (NCE) en su forma inversa, esto es sacando Na<sup>+</sup> e introduciendo Ca<sup>++</sup>. La disminución de Ca<sup>++</sup> en el momento de la acidificación podría atribuirse al periodo intermedio en que NCE, en su forma habitual, contribuiría, junto con NHE, a aumentar la concentración de Na<sup>+</sup> lo que a su vez provoca la función.

En la figura 8 se muestra la variación (%) del Ca<sup>++</sup> intracelular respecto al basal transcurridos siete minutos de la acidificación. Los ensayos se realizaron con tres líneas celulares: cardiomiocitos de ratón (HL1), fibroblastos (NIH3T3) y renales de embrión humano (293HEK). La presencia de PINHE frena el aumento de Ca<sup>++</sup> intracelular en todos los casos. En este caso hay que señalar que solo las experiencias con HL1 se realizaron en presencia de los bloqueadores de la entrada de Ca<sup>++</sup> a los reservorios (thapsigargina y rhanodina). Las experiencias con NIH3T3 y 293HEK presentan una disminución del Ca<sup>++</sup> intracelular respecto al valor basal. Esta "desaparición" de Ca<sup>++</sup> se podría atribuir a la entrada en los reservorios ya que estos no están bloqueados.

**Figura 8.** Porcentaje del incremento de Ca<sup>++</sup> intracelular transcurridos siete minutos desde la acidificación y respecto al valor inicial (100%). Los ensayos se realizaron en líneas celulares de cardiomiocitos (HL1), fibroblastos (NIH3T3) y células de riñón de embrión humano (293HEK) en presencia de 1000 U.A./ml de PINHE y en ausencia del mismo (control).



No obstante no disponemos de pruebas experimentales para saber el destino de esta  $Ca^{++}$ .

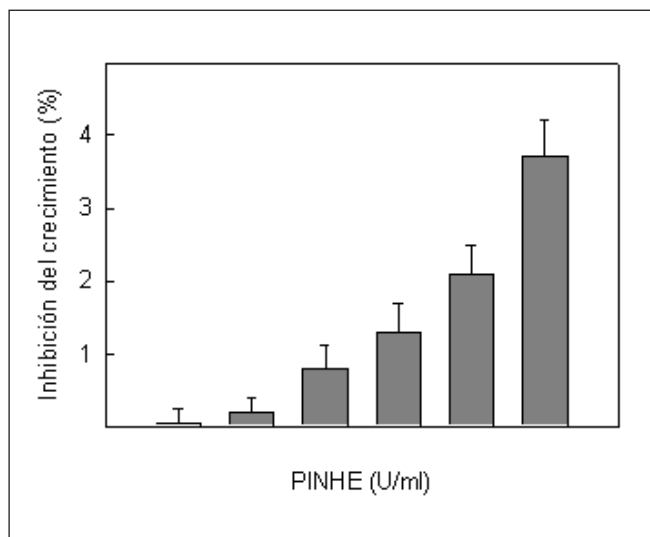
Se puede concluir como resumen que el PINHE en su acción de inhibición de NHE ejerce un efecto protector de la célula respecto del aumento de  $Ca^{++}$  citoplasmático como consecuencia de la acidificación del citoplasma.

## 5. PROLIFERACIÓN CELULAR

El efecto citotóxico que la presencia de PINHE puede tener sobre la proliferación celular en un cultivo, se abordó en base a la inhibición del crecimiento del cultivo de células NIH/3T3. El crecimiento de dichas células se realizó mediante cultivo a 37°C y 5%  $CO_2$  durante 72 horas en presencia de concentraciones crecientes de PINHE y se comparó con los correspondientes controles en ausencia del mismo y en presencia de DMSO (como disolvente). Se realizó una serie de controles paralelos con DMSO a concentraciones crecientes e iguales a las que se encontraban en los cultivos con PINHE. El porcentaje de inhibición se calculó refiriendo la absorbancia de la medida del crecimiento (formazán formado por la actividad metabólica de las células con el reactivo WST1) a los controles. El efecto inhibitor del DMSO sobre la proliferación, apareció en valores de concentración superiores al 3%. Este valor concuerda con otros valores reseñados en la bibliografía en donde se señala que el DMSO no tiene un efecto inhibitor de la proliferación celular por debajo de ciertas concentraciones, 1.5% <sup>62;63</sup>. sin apreciarse efectos en la apoptosis ni en la diferenciación celular o citotoxicidad <sup>62</sup>. El DMSO produce una parada reversible en la transición G0/G1 en líneas celulares del linfoma de Burkitt <sup>62</sup> o linfocitos T humanos <sup>64</sup>.

Los resultados del efecto del PINHE sobre la proliferación celular se reflejan en la figura 9. Se puede apreciar una inhibición ligera del crecimiento celular por debajo del 4% a la concentración más elevada (5000 U.A./ml), mientras que concentraciones inferiores a 1000 U.A./ml no presentan efecto alguno sobre el crecimiento de NIH3T3. El efecto inhibitor de la proliferación de inhibidores de NHE se constata en la bibliografía, así EIPA juega un papel clave en la regulación de la proliferación de hepatocitos <sup>65</sup>, HOE694 produce una inhibición dependiente de la dosis en células endoteliales de aorta bovina <sup>66</sup>, amiloride inhibe de forma reversible la proliferación de células renales

**Figura 9.** Inhibición del crecimiento de células NIH/3T3 por la presencia de PINHE en el medio de cultivo. El crecimiento se determinó mediante el reactivo WST1. Los valores son media  $\pm$  desviación típica.



y hepatocitos de ratón pero por mecanismos diferentes a la acción inhibitora sobre los intercambiadores NHE y NKE <sup>67</sup>. EIPA y amiloride presentan una limitación del crecimiento sobre la base de una inhibición de la síntesis de DNA en células de músculo liso de rata <sup>68</sup> o la incorporación de  $H^3$ -timidina a la línea de células pancreáticas AR42J <sup>69</sup>.

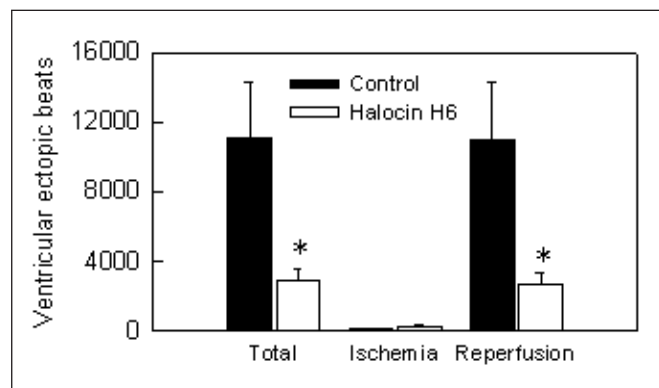
## 6. EXPERIMENTOS IN VIVO: ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN PERROS

Se realizaron experimentos in vivo utilizando un modelo de isquemia-reperfusión en perros consistente en la oclusión de la arteria coronaria. Los resultados demuestran que la inhibición de NHE con nuestro inhibidor produjo una disminución significativa de los latidos ectópicos ventriculares prematuros y del tamaño del infarto mientras que tanto la presión arterial como el ritmo cardíaco no se vieron afectados.

### 6.1. Latidos ectópicos ventriculares

Como se aprecia en la figura 10, el número de latidos ectópicos ventriculares detectados mediante ECG durante la perfusión fue significativamente ( $P < 0.05$ ) más bajo en el grupo tratado (2719; 680) (media; error estándar) que en el grupo control (10977; 3280), igualmente que el total de latidos ectópicos correspondientes a la oclusión más la perfusión <sup>37;72</sup>. Sin embargo no existieron diferencias significativas entre los grupos tratado (233; 116) y el control (123; 43) <sup>37</sup>.

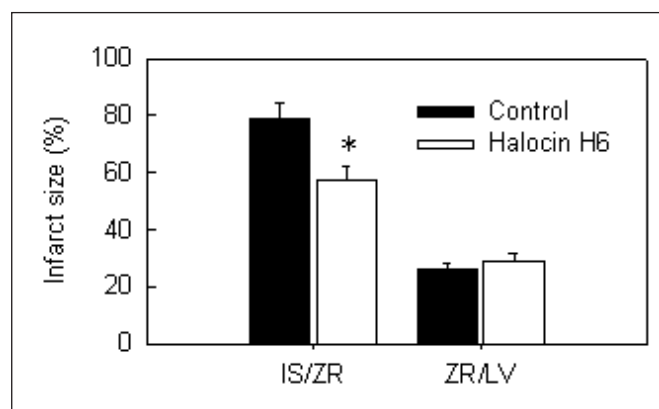
**Figura 10.** Latidos ectópicos ventriculares detectados a lo largo de la oclusión y reperusión. Resultados como media y error estándar (barra de error). \* $P < 0.05$  control frente a tratado.



## 6.2. Tamaño del infarto

En la figura 11 se muestra los valores del tamaño del infarto entre los grupos tratado y control. La acción del inhibidor produce una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) del tamaño del mismo expresado como el porcentaje de la zona de riesgo (IS/RZ) del control (73.2; 5.5) frente al tratado con PINHE (57.5; 5.0). Sin embargo no se detectaron diferencias significativas entre el grupo control (26.5; 1.6) y el tratado (29.2; 2.5) cuando se expresa la zona de riesgo (RZ) como porcentaje del peso del ventrículo izquierdo, lo que confirma la homogeneidad del modelo de infarto experimental utilizado<sup>37;72</sup>.

**Figura 11.** Valores de tamaño del infarto (media, error estándar) por control (suero salino) y grupo tratado (PINHE). Los resultados se expresan como porcentaje de zona de riesgo (IS/ZR) y zona de riesgo como porcentaje de peso de ventrículo izquierdo (ZR/LV). \* $P < 0.05$  control frente al grupo tratado.



## 7. CONCLUSIONES

Los resultados experimentales (in vivo) obtenidos en el presente trabajo confirman nuestra hipótesis de que PINHE inhibe el transportador NHE de células de mamífero

y que dicha inhibición es reversible y dosis dependiente. Las diferencias respecto a otros inhibidores sintéticos de NHE es debido al hecho de su naturaleza proteica y de las ventajas ya descritas anteriormente<sup>70</sup>: (i) Es efectivo a bajas concentraciones, (ii) es activo a temperaturas y concentraciones de sales altas, (iii) es resistente a la digestión con tripsina lo que permitiría utilizarlo en el tracto gastro-intestinal.

Todo ello confirma que PINHE puede ser un candidato para uso terapéutico en condiciones patológicas donde tanto la hiperactividad o la sobre expresión de NHE podría estar involucrada.

De los experimentos in vivo se deduce que la administración intravenosa de PINHE produce una protección significativa sobre el miocardio isquémico y reperfundido, reduciendo las arritmias durante la reperusión y disminuyendo el tamaño del infarto<sup>37;72</sup>. Todo ello está en acuerdo con el papel de PINHE como inhibidor de NHE que demostramos en este trabajo y que ha sido demostrado para otros inhibidores de NHE de mamíferos<sup>71</sup>.

Como conclusión final podemos decir que PINHE como producto de haloarqueas inhibe el NHE de mamíferos incluyendo al hombre y ejerce un efecto protector sobre el miocardio dañado en un modelo de isquemia-reperusión en perros<sup>37;72</sup>. Hasta la fecha PINHE es la única molécula biológica conocida que tiene un efecto inhibitor sobre el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en células de mamífero<sup>37</sup>. El descubrimiento de que PINHE inactiva o inhibe una molécula objetivo similar en mamíferos como lo hace en haloarqueas sugiere la posibilidad de que otras halocinas del Dominio Archaea compartan un papel similar, lo que abre las posibilidades de nuevas líneas de investigación futuras sobre estos efectos farmacéuticos.

## Bibliografía

- González-Martínez, B. E.; Gómez-Treviño M.; Jiménez-Salas Z. "Bacteriocinas de prebióticos. Características, propiedades antibacterianas y modo de acción". Mundo Alimentario Noviembre/Diciembre 2005. info@mundoalimentario.com
- Fernández-Dumont, A.; Horn N.; Rodríguez Gómez J.M.; Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos, ISSN 0300-5755, Nº 360, 2005, pags. 49-54.
- Gutiérrez-Merino, J. "Caracterización inmunoquímica de la enterocina P y evaluación de su clonación, producción y expresión funcional en Escherichia coli, Methylobacterium extorquens, Lactococcus lactis y Pichia pastoris". Tesis Doctoral 2006.
- Sánchez-Hidalgo, M. "Caracterización de variantes de la enterocina AS-48 obtenidas mediante mutagénesis dirigida". Tesis doctoral Universidad de Granada 2006.

5. López-Brea, M; Domingo D. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de La Princesa, Madrid. "Revisión Antibioticoterapia con prebióticos". *Rev Esp Quimioterap*, Junio 2007; Vol. 20 (Nº 2): 170-181. © 2007 Prous Science, S.A.- Sociedad Española de Quimioterapia.
6. Putney, L. K; Denker, S. P.; Barber, D. L. *Annu.Rev.Pharmacol. Toxicol.* **2002**, 42:527-52.
7. Counillon, L.; Pouyssegur, J. *J.Biol.Chem.* **2000**, 275, 1-4.
8. Orłowski, J.; Grinstein, S. *J.Biol.Chem.* **1997**, 272, 22373-22376.
9. Grinstein, S.; Rotin, D.; Mason, M. J. *Biochim.Biophys.Acta* **1989**, 988, 73-97.
10. Szabo, E. Z.; Numata, M.; Shull, G. E.; Orłowski, J. *J.Biol.Chem.* **2000**, 275, 6302-6307.
11. Scholz, W.; Albus, U. *Cardiovasc.Res.* **1995**, 29, 184-188.
12. Counillon, L.; Scholz, W.; Lang, H. J.; Pouyssegur, J. *Mol.Pharmacol.* **1993**, 44, 1041-1045.
13. Karmazyn, M.; Gan, X. T.; Humphreys, R. A.; Yoshida, H.; Kusumoto, K. *Circ.Res.* **1999**, 85, 777-786.
14. Scholz, W.; Albus, U.; Lang, H. J.; Linz, W.; Martorana, P. A.; Englert, H. C.; Scholkens, B. A. *Br.J.Pharmacol.* **1993**, 109, 562-568.
15. Scholz, W.; Albus, U.; Linz, W.; Martorana, P.; Lang, H. J.; Scholkens, B. A. *J.Mol.Cell Cardiol.* **1992**, 24, 731-739.
16. Fliegel, L.; Dyck, J. R. *Cardiovasc.Res.* **1995**, 29, 155-159.
17. Pei, J. M.; Zhou, J. J.; Bian, J. S.; Yu, X. C.; Fung, M. L.; Wong, T. M. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **2000**, 279, C1483-C1494.
18. Schafer, C.; Ladilov, Y. V.; Schafer, M.; Piper, H. M. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **2000**, 279, H2143-H2150.
19. Tritto, F. P.; Inserte, J.; Garcia-Dorado, D.; Ruiz-Meana, M.; Soler-Soler, J. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* **1998**, 115, 709-715.
20. Stromer, H.; de Groot, M. C.; Horn, M.; Faul, C.; Leupold, A.; Morgan, J. P.; Scholz, W.; Neubauer, S. *Circulation* **2000**, 101, 2749-2755.
21. Snabaitis, A. K.; Chambers, D. *Transplantation* **1999**, 68, 1444-1453.
22. Lang, F.; Madlung, J.; Bock, J.; Lukewille, U.; Kaltenbach, S.; Lang, K. S.; Belka, C.; Wagner, C. A.; Lang, H. J.; Gulbins, E.; Lepple-Wienhues, A. *Pflugers Arch.* **2000**, 440, 902-907.
23. Hale, S. L.; Kloner, R. A. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **2000**, 279, H2673-H2677.
24. Avkiran, M. *Circulation* **1999**, 100, 2469-2472.
25. Avkiran, M.; Marber, M. S. *J.Am.Coll.Cardiol.* **2002**, 39, 747-753.
26. Gazmuri, R. J.; Ayoub, I. M.; Kolarova, J. D.; Karmazyn, M. *Crit Care Med.* **2002**, 30, S166-S171.
27. Vornov, J. J.; Thomas, A. G.; Jo, D. *J.Neurochem.* **1996**, 67, 2379-2389.
28. Horikawa, N.; Nishioka, M.; Itoh, N.; Kuribayashi, Y.; Matsui, K.; Ohashi, N. *Pharmacology* **2001**, 63, 76-81.
29. Suzuki, Y.; Matsumoto, Y.; Ikeda, Y.; Kondo, K.; Ohashi, N.; Umemura, K. *Brain Res.* **2002**, 945, 242-248.
30. Cragoe, E. J., Jr.; Woltersdorf, O. W., Jr.; Bicking, J. B.; Kwong, S. F.; Jones, J. H. *J.Med.Chem.* **1967**, 10, 66-75.
31. Frelin, C.; Vigne, P.; Lazdunski, M. *J.Biol.Chem.* **1983**, 258, 6272-6276.
32. Meseguer, I.; Rodriguez-Varela F. *FEMS Microbiol.Lett.* **1985**, 28, 177-182.
33. Torreblanca, M.; Meseguer, I.; Rodriguez-Varela F. *J.Gen.Microbiol.* **1989**, 135, 2655-2661.
34. Torreblanca, M.; Meseguer, I.; Ventosa A. *Lett.Appl.Microbiol.* **1994**, 19, 201-205.
35. Meseguer, I.; Torreblanca, M.; Konishi, T. *J.Biol.Chem.* **1995**, 270, 6450-6455.
36. Torreblanca, M., Lequerica, J. L., O'Connor, E., Meseguer, I., Dolz, M. C., Such, L., Sánchez, M., and Alberola, A. Spain Patent **2002**.
37. Dolz, M. C. Tesis doctoral Universidad de Valencia, 2003.
38. Toyoda, Y.; Khan, S.; Chen, W.; Parker, R. A.; Levitsky, S.; McCully, J. D. *Ann.Thorac.Surg.* **2001**, 72, 836-843.
39. Goldberg, S. P.; Digerness, S. B.; Skinner, J. L.; Killingsworth, C. R.; Katholi, C. R.; Holman, W. L. *Ann.Thorac.Surg.* **2002**, 73, 569-574.
40. Roszkopf, D.; Dusing, R.; Siffert, W. *Hypertension* **1993**, 21, 607-617.
41. Matteucci, E.; Giampietro, O. *Diabetes Nutr.Metab* **2001**, 14, 225-233.
42. Gillis, D.; Shrode, L. D.; Krump, E.; Howard, C. M.; Rubie, E. A.; Tibbles, L. A.; Woodgett, J.; Grinstein, S. *J.Membr.Biol.* **2001**, 181, 205-214.
43. Claycomb, W. C.; Lanson, N. A., Jr.; Stallworth, B. S.; Egeland, D. B.; Delcarpio, J. B.; Bahinski, A.; Izzo, N. J., Jr. *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A* **1998**, 95, 2979-2984.
44. Lequerica, J. L.; Mirabet, V.; Montero, J. A.; Hurtado, C.; Piquer, S.; Carbonell, F. *Ann.Transplant.* **1999**, 4, 103-108.
45. Mirabet V; Lequerica JL; Montero J; Hurtado C; Carbonell F. "Cultivo *in vitro* de células satélite de músculo esquelético. "¿Una alternativa terapéutica para el tratamiento de la cardiopatía isquémica?". Investigación Cardiovascular 3[2], 91-103. Ref Type: Generic 2000.
46. Dolz, M.; O'Connor, J. E.; Lequerica, J. L. *Cytometry* **2004**, 61A, 99-104.
47. NACHLAS, M. M.; SHNITKA, T. K. *Am.J Pathol.* **1963**, 42:379-405., 379-405.
48. Claycomb, W. C.; Lanson, N. A., Jr.; Stallworth, B. S.; Egeland, D. B.; Delcarpio, J. B.; Bahinski, A.; Izzo, N. J., Jr. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* **1998**, 95, 2979-2984.
49. Renner, E. L.; Lake, J. R.; Cragoe, E. J., Jr.; Scharschmidt, B. F. *Biochim.Biophys.Acta* **1988**, 938, 386-394.

50. Calonge, M. L.; de la Horra, M. C.; Ilundain, A. *Biochim.Biophys.Acta* **1997**, *1325*, 263-271.
51. Toda, H.; Noguchi, T.; Miyagishi, A.; Ito, N.; Umekawa, K.; Sato, Y.; Kitano, M.; Ohashi, N. *Int.J.Tissue React.* **1999**, *21*, 61-70.
52. Petrecca, K.; Atanasiu, R.; Grinstein, S.; Orłowski, J.; Shrier, A. *Am.J.Physiol* **1999**, *276*, H709-H717.
53. Slepko, E.; Fliegel, L. *Biochem.Cell Biol.* **2002**, *80*, 499-508.
54. Besse-Eschmann, V.; Klisic, J.; Nief, V.; Le Hir, M.; Kaissling, B.; Ambuhl, P. M. *J.Am.Soc.Nephrol.* **2002**, *13*, 2199-2206.
55. Biemesderfer, D.; Pizzonia, J.; Abu-Alfa, A.; Exner, M.; Reilly, R.; Igarashi, P.; Aronson, P. S. *Am.J.Physiol* **1993**, *265*, F736-F742.
56. Wang, T.; Hropot, M.; Aronson, P. S.; Giebisch, G. *Am.J.Physiol Renal Physiol* **2001**, *281*, F1117-F1122.
57. Schafer, C.; Ladilov, Y.; Inserte, J.; Schafer, M.; Haffner, S.; Garcia-Dorado, D.; Piper, H. M. *Cardiovasc.Res.* **2001**, *51*, 241-250.
58. Austin, C.; Wray, S. *Circ.Res.* **2000**, *86*, 355-363.
59. Rogers, T. B.; Inesi, G.; Wade, R.; Lederer, W. J. *Biosci.Rep.* **1995**, *15*, 341-349.
60. Zucchi, R.; Ronca-Testoni, S. *Pharmacol.Rev.* **1997**, *49*, 1-51.
61. Ladilov, Y.; Haffner, S.; Balser-Schafer, C.; Maxeiner, H.; Piper, H. M. *Am.J.Physiol* **1999**, *276*, H1868-H1876.
62. Sharma, S.; Raymond, E.; Soda, H.; Izbicka, E.; Davidson, K.; Lawrence, R.; Von Hoff, D. D. *Leuk.Res.* **1998**, *22*, 663-670.
63. Greenman, S. B.; Rutten, M. J.; Fowler, W. M.; Scheffler, L.; Shortridge, L. A.; Brown, B.; Sheppard, B. C.; Deveney, K. E.; Deveney, C. W.; Trunkey, D. D. *Environ.Res.* **1997**, *75*, 85-93.
64. Sawai, M.; Takase, K.; Teraoka, H.; Tsukada, K. *Exp.Cell Res.* **1990**, *187*, 4-10.
65. Benedetti, A.; Di Sario, A.; Casini, A.; Ridolfi, F.; Bendia, E.; Pignini, P.; Tonnini, C.; D'Ambrosio, L.; Feliciangeli, G.; Macarri, G.; Svegliati-Baroni, G. *Gastroenterology* **2001**, *120*, 545-556.
66. de Dios, S. T.; Hannan, K. M.; Dilley, R. J.; Hill, M. A.; Little, P. J. *J.Diabetes Complications* **2001**, *15*, 120-127.
67. Grantham, J. J.; Grantham, J. A.; Donoso, V. S.; Cragoe, E. J., Jr. *J.Lab Clin.Med.* **1989**, *114*, 129-134.
68. Mitsuka, M.; Nagae, M.; Berk, B. C. *Circ.Res.* **1993**, *73*, 269-275.
69. Delvaux, M.; Bastie, M. J.; Chentoufi, J.; Ribet, A.; Vaysse, N. *Digestion* **1990**, *46 Suppl 2:156-61.*, 156-161.
70. Torreblanca, M.; Meseguer, I.; Rodriguez-Varela F. *J.Gen.Microbiol.* **1989**, *135*, 2655-2661.
71. Scholz, W.; Albus, U.; Linz, W.; Martorana, P.; Lang, H. J.; Scholkens, B. A.