

2011

71180

71180

| |
|---------|
| MFN: |
| Clasif: |
| T-742 |



Trabajo de Tesis Doctoral presentado por Marina Rafaela Amaiden para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Director de Tesis Doctoral:

Dr. Cesar Horacio Casale

Co-director de Tesis Doctoral:

Dra. Verónica Silvina Santander

Miembros del jurado de Tesis:

Dra. Sonia Bertolotti

Dra. Laura Marta Vivas

Dr. Guillermo Gabriel Montich

A Dios que me guía
A mi esposo, Gustavo
A mi madre

Este trabajo fue posible a la ayuda de muchas personas, a todos ellos quiero agradecerles de corazón. A los que me guiaron y enseñaron, los que me brindaron su apoyo y acompañaron durante esta etapa... Gracias por ser parte de este sueño tan importante para mí!

En especial...

A Cesar por darme un lugar en su laboratorio, por enseñarme y guiarme todos estos años. Por su apoyo y generosidad para seguir adelante con este trabajo en todo momento. Muchas gracias por sus consejos!

A Vero por escucharme, por su ayuda y apoyo, por enseñarme y compartir literalmente codo a codo tantos lindos momentos. Gracias Vero por tu cariño y estar siempre!

A mi queridísima amiga Noelia, gracias plantita "Wnt" por poder contar con vos siempre, por compartir miles de momentos importantes, por ser incondicional, ayudarme y enseñarme tanto! Gracias a tu familia.

A Gabi y Alexis por sus aportes, ayuda y los lindos momentos que pasamos juntos. A mis compañeros Juan, Sofi y Ayi por compartir nuestras horas con mates y alegría.

Al grupo del Dr. Arce, Mauge, Kio, Guille y Gastón, por su aporte y ayuda.

A los jurados de esta tesis Sonia, Laura y Guillermo por su buena predisposición y su importante aporte a este trabajo

A mi esposo Gustavo por acompañarme cada día en el camino de la vida, por darme siempre su apoyo incondicional, por su inmensa generosidad y comprensión. Gracias por llenar mi vida de amor y por nuestra hermosa familia. Te amo!

A mi mamá por su amor, sus consejos y por hacer todo lo posible en ayudarme a lograr mis metas. Gracias por estar siempre a mi lado.

A mi hermana Sabi, su esposo Victor y a mis geniales sobrinos Vicky, Pablo y José por su cariño y apoyo.

A Nora, Horacio, Meky y Piono por su calidez, su generosa ayuda y por saber que siempre puedo contar con ustedes.

A Mario y Adriana por todos estos lindos años compartidos, por su ayuda y por darnos un lugar en el laboratorio 4. Gracias!

A Romi, Loli y Fer por compartir tantos hermosos momentos, mates, charlas y por su amistad.

A mis queridas amigas de siempre Adri, Pilar, Caro, Jime y Fla por estar a mi lado y por su amistad, sus consejos y por ser importantes en mi vida.

A Miguel Bueno, Pablo y Leo por ayudarme durante el trabajo en el bioterio. A Miguel Andres y Mariela por su contribución.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por financiar este trabajo.

A todos los integrantes del departamento de Biología Molecular que han contribuido a la realización de este trabajo.

De corazón gracias a todos, sin ustedes esto no hubiera sido posible!!!

“Hermoso es lo que vemos. Más hermoso es lo que sabemos. Pero mucho más hermoso es lo que no conocemos” *Niels Steensen*

INDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. Abreviaturas | 1 |
| 2. Resumen | 3 |
| 3. Introducción | 7 |
| 3.1. Microtúbulos | 7 |
| 3.2. Tubulina | 12 |
| 3.2.1. Modificaciones post-traduccionales de tubulina | 13 |
| 3.2.1.1. Acetilación/deacetilación de α -tubulina | 13 |
| 3.2.1.2. Poliglicilación de microtúbulos | 14 |
| 3.2.1.3. Poliglutamilación de tubulina | 15 |
| 3.2.1.4. Tirosinación/detirosinación de α -tubulina | 15 |
| 3.2.1.5. Fosforilación de tubulina | 17 |
| 3.3. Proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) | 17 |
| 3.4. ATPasas de membrana plasmática | 22 |
| 3.4.1. P-ATPasas de membrana plasmática | 23 |
| 3.4.1.1. Ca^{2+} -ATPasa | 23 |
| 3.4.1.2. H^+, K^+ -ATPasa | 24 |
| 3.4.1.3. Na^+, K^+ -ATPasa | 24 |
| 3.5. Regulación de P-ATPasas por interacción con tubulina | 27 |
| 3.6. Hipertensión arterial y la actividad NKA | 32 |
| 3.7. Parámetros hemorreológicos de los eritrocitos | 35 |
| 3.7.1. Deformabilidad de los eritrocitos | 36 |
| 4. Objetivos | 38 |
| 5. Materiales y Métodos | 39 |
| 5.1. Materiales | 39 |
| 5.2. Anticuerpos | 39 |
| 5.3. Pacientes | 40 |
| 5.4. Animales | 40 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 5.4.1. | Toma de muestras de sangre en ratas | 40 |
| 5.5. | Aislamiento de membrana de eritrocitos | 41 |
| 5.6. | Aislamiento de tubulina de diferentes compartimentos subcelulares de eritrocitos bajo condiciones estabilizantes de microtúbulos | 41 |
| 5.7. | Membrana plasmática de cerebro de rata | 42 |
| 5.8. | Preparación de tubulina de cerebro de rata | 43 |
| 5.9. | Dinámica de microtúbulos | 43 |
| 5.10. | Obtención de citosol de cerebro de ratas | 44 |
| 5.11. | Obtención de citosol de eritrocitos humanos | 44 |
| 5.12. | Tirosinación/detirosinación de tubulina | 44 |
| 5.13. | Ensayo de actividad Na^+, K^+ -ATPasa | 45 |
| 5.14. | Inmunofluorescencia | 45 |
| 5.15. | Preparación de anticuerpo unido a sefarosa | 46 |
| 5.16. | Inmunoprecipitación | 46 |
| 5.17. | Electroforesis e inmunoblot | 47 |
| 5.18. | Determinación de proteínas | 47 |
| 5.19. | Administración <i>in vivo</i> de paclitaxel y nocodazol | 47 |
| 5.20. | Determinación de la deformabilidad de eritrocitos | 48 |
| 5.21. | Determinación de presión arterial | 49 |
| 5.21.1. | Sistema indirecto no invasivo tail-cuff | 49 |
| 5.21.2. | Sistema directo | 51 |
| 5.22. | Análisis estadístico | 51 |
| 6. | Resultados | 52 |
| 6.1. | Presencia de tubulina en eritrocitos humanos | 52 |
| 6.2. | Distribución de tubulina en eritrocitos humanos | 53 |
| 6.3. | Distribución alterada de tubulina en eritrocitos humanos de individuos hipertensos | 57 |
| 6.4. | Contenido de diferentes isotipos de tubulina y actividad NKA en membrana de eritrocitos de individuos hipertensos y normotensos | 60 |
| 6.5. | Cuantificación del complejo tubulina acetilada/NKA en membrana de eritrocitos | 61 |
| 6.6. | Tubulina sedimentable y actividad NKA en eritrocitos | 64 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 6.7. | Inhibición de la actividad NKA por tubulina detirosinada | 68 |
| 6.8. | Ciclo de tirosinación/detirosinación en eritrocitos de individuos hipertensos y contenido de tubulina tirosina ligasa (TTL) | 70 |
| 6.8.1. | Eritrocitos humanos | 70 |
| 6.8.2. | Cerebro de ratas SHR | 73 |
| 6.9. | Polimerización de tubulina de cerebro de rata SHR | 74 |
| 6.10. | Contenido de MAPs y estabilidad microtubular en ratas SHR | 77 |
| 6.11. | Correlación entre el contenido de tubulina de membrana y la deformabilidad de los eritrocitos humanos | 79 |
| 6.12. | Análisis de la deformabilidad celular de eritrocitos de ratas SHR | 81 |
| 6.13. | Efecto del taxol y del nocodazol sobre el contenido de tubulina de membrana y la deformabilidad de los eritrocitos | 83 |
| 6.13.1. | Eritrocitos humanos | 83 |
| 6.13.2. | Eritrocitos de ratas | 85 |
| 6.14. | Cambios <i>in vivo</i> del contenido de tubulina de membrana afecta la presión arterial en ratas | 87 |
| 7. | Conclusión y discusión | 92 |
| 8. | Referencias bibliográficas | 106 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------|--|
| ATP | Adenosina-5'-Trifosfato |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| COMTs | Centros Organizadores de Microtúbulos |
| CrEL | Cremofor |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EGTA | Etilenglicol-bis(β -aminoetileter)-ácido tetraacético |
| GTP | Guanosina-5'-trifosfato |
| HS | Individuos hipertensos |
| MAPs | Proteínas Asociadas a Microtúbulos |
| Mem-tub | Tubulina de membrana |
| MES | (2-N-morfolino)-etanoácido sulfónico |
| MTs | Microtúbulos |
| NADH | Dinucleótido de nicotinamida adenina reducido |
| NKA | Na^+, K^+ -ATPasa |
| NS | Individuos normotensos |
| PA | Presión Arterial |
| PAS | Presión Arterial Sistólica |
| PBS | Buffer Fosfato Salino |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sodio |
| SDS-PAGE | Electroforesis en Gel de Poliacrilamida |
| Sed-tub | Tubulina sedimentable |
| SHR | Rata espontáneamente hipertensa |
| Sol-tub | Tubulina soluble |

| | |
|--------------|---|
| Taxol | Paclitaxel |
| TBS | Tris-Solución amortiguadora salina |
| TTCP | Tubulina Tirosina Carboxipeptidasa |
| TRIS | 2-amino-2-hidroximetil-1.3 propanodiol |
| TRITÓN X-100 | t-octilfenoxipolietoxietanol |
| TTL | Tubulina Tirosina Ligasa |
| Tubulina-Glu | Isotipo de tubulina detirosinada |
| Tween 20 | Monolaurato de Sorbitán Polioxietilénico 20 |

Resumen

La hipertensión arterial se asocia a un aumento en el contenido de Na^+ dentro de los eritrocitos como consecuencia principalmente de la disminución de la actividad Na^+, K^+ -ATPasa (NKA). En nuestro laboratorio previamente se demostró que la actividad NKA es inhibida *in vitro* e *in vivo* por la formación de un complejo con tubulina acetilada. En este trabajo se demostró que los eritrocitos humanos poseen diferentes isotipos de tubulina distribuidos en tres fracciones, fracción de membrana, soluble y estructura sedimentable (Sed-tub). Aunque el contenido de tubulina total en eritrocitos de individuos hipertensos (HS) y normotensos (NS) es el mismo, en los eritrocitos de HS hay un aumento en la cantidad de tubulina de membrana y una disminución en los niveles de tubulina de la fracción Sed-tub, a pesar de que esta fracción en HS es más resistente a la depolimerización inducida por nocodazol en comparación con la fracción Sed-tub de NS. Otra diferencia significativa observada en eritrocitos de HS fue el aumento en la membrana de las isoformas acetilada y detirosinada de tubulina en mayor proporción que la tubulina total, este hecho es de particular interés dado que en eritrocitos humanos la tubulina de membrana es capaz de formar un complejo con la NKA, en concordancia en HS se encontró un aumento en el contenido del complejo tubulina acetilada/NKA en comparación con los NS, como consecuencia en HS la actividad enzimática fue menor.

El tratamiento de los eritrocitos de NS con taxol, estabilizó la fracción Sed-tub y produjo un aumento en el contenido de tubulina acetilada, detirosinada y total en la fracción de membrana y una disminución de la actividad NKA, los valores obtenidos para cada parámetro luego del tratamiento con taxol fueron similares a los observados en HS. En contraposición, el tratamiento de eritrocitos de HS con nocodazol causó disminución del contenido de tubulina de membrana y aumento de la actividad NKA.

Por otro lado, se determinó que el aumento de tubulina detirosinada observada en la membrana de HS tendría un papel importante en la regulación de la actividad NKA, ya que preparaciones de tubulina con similar contenido de α -tubulina y tubulina acetilada, pero con alto contenido de tubulina detirosinada inhiben en mayor proporción la NKA. En adición, encontramos que los eritrocitos de HS tienen menor capacidad de tirosinar tubulina debido a un menor contenido de la enzima tubulina tirosina ligasa (TTL), lo que explica el mayor contenido de tubulina detirosinada.

En concordancia con la mayor estabilidad de la fracción Sed-tub observada en eritrocitos humanos, se determinó que en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) los microtúbulos son más resistentes al frío. En ausencia de las proteínas asociadas a

microtúbulos (MAPs), la tubulina de ratas normotensas Wistar y SHR pierde la capacidad de polimerización, pero esta capacidad es recuperada cuando se adicionan MAPs purificadas. La mayor polimerización de tubulina *in vitro* se obtiene por combinación de tubulina y MAPs de SHR. Esto sugiere, que tanto la tubulina como las MAPs de individuos hipertensos tienen características diferentes a las de normotensos. El análisis de la composición y contenido de las MAPs en ratas Wistar y SHR muestra diferencias significativas de las MAPs analizadas, MAP2AB, MAP1B y LC3. Los cambios observados en el contenido de las MAPs podrían ser responsables de la mayor capacidad de polimerización y estabilidad de los microtúbulos en individuos hipertensos.

Finalmente en el presente trabajo se encontró una correlación entre el aumento de la tubulina de membrana y la disminución de la deformabilidad de los eritrocitos, una importante propiedad reológica implicada en la determinación de la presión sanguínea. Se determinó que en ratas SHR el contenido de tubulina en la membrana de los eritrocitos aumentó progresivamente durante el período de desarrollo de la hipertensión (3-8 semanas), mientras que la deformabilidad disminuyó; en ratas Wistar tanto el contenido de tubulina en membrana como la deformabilidad permanecieron constantes. Por otro lado, en eritrocitos de individuos hipertensos tratados con nocodazol la tubulina de membrana disminuye y la deformabilidad celular aumenta, mientras que en eritrocitos de individuos normotensos tratados con taxol la tubulina de membrana aumenta y deformabilidad disminuye tanto *in vitro* como *in vivo*. En adición, modificaciones del contenido de tubulina de membrana del eritrocito *in vivo* genera cambios consecuentes en la presión arterial. En conjunto estos resultados ponen en evidencia una correlación entre la migración de la tubulina a la membrana de los eritrocitos y la disminución en la deformabilidad de estas células, dichas alteraciones hemorreológicas podrían contribuir al desarrollo y mantenimiento de la hipertensión, ya que tales anomalías influyen el flujo de sangre en general y lleva a la oclusión de microvasos.

Hypertension (high blood pressure) is associated with increased Na^+ levels in erythrocytes, mainly because of decreased activity of the enzyme Na^+, K^+ -ATPase (NKA). Previous studies in our laboratory demonstrated that formation of a complex between NKA and acetylated tubulin inhibits the enzyme activity *in vitro* and *in vivo*. The present study showed that human erythrocytes contain different tubulin isotypes concentrated in three fractions: membrane fraction ("Mem-tub"), soluble fraction, and sedimentable fraction ("Sed-tub"). Total tubulin content in erythrocytes of hypertensive (HS) and normotensive subjects (NS) is the same. However, HS erythrocytes have higher Mem-tub and lower Sed-tub levels. HS Sed-tub, compared to NS Sed-tub, is more resistant to nocodazole-induced depolymerization. In HS erythrocytes, the degree of increase of detyrosinated and acetylated tubulin was greater than that of total tubulin. Mem-tub is capable of forming a complex with NKA. The level of acetylated tubulin/NKA complex was higher, and enzyme activity was accordingly lower, in HS than in NS.

When NS erythrocytes were treated with taxol (a drug which stabilizes microtubules), sedimentable fraction was stabilized, levels of acetylated tubulin, detyrosinated tubulin, and total tubulin in membrane fraction were increased, and NKA activity was reduced; values for all of these parameters became similar to those in HS erythrocytes. Treatment of HS erythrocytes with nocodazole caused decrease of Mem-tub level and increased NKA activity.

On the other hand, it was determined that the increase in detyrosinated tubulin observed in the HS membrane have an important role in the regulation of NKA activity, since preparations of tubulin with similar content of α -tubulin and acetylated tubulin, but higher content of detyrosinated tubulin inhibits NKA activity in a greater proportion. In addition, we found that tubulin tyrosination ability was diminished in HS erythrocytes due to a lower content of tubulin tyrosine ligase enzyme (TTL), which explains the higher content of detyrosinated tubulin.

Consistent with the greater stability of Sed-tub fraction in human erythrocytes, we observed greater cold-resistance of microtubules spontaneously hypertensive rats (SHR) than in normotensive Wistar rats. In the absence of microtubule-associated proteins (MAPs), the polymerization ability of tubulin in both SHR and Wistar rats was lost, but this ability was restored by addition of purified MAPs. *In vitro* studies of tubulin polymerization suggested that properties of both tubulin and MAPs in SHR differ from those in normotensive animals. Three MAPs analyzed (MAP2AB, MAP1B, LC3)

showed significant differences in composition and content in SHR compared to Wistar rats. Such differences in MAP composition may account for the higher polymerization ability and microtubule stability in hypertensive individuals.

Analysis of erythrocyte deformability, an important rheological property contributing to blood pressure value, showed an inverse correlation with Mem-tub level. In SHR rats, erythrocyte Mem-tub level increased steadily during development of hypertension (age 3-8 weeks), while deformability decreased. In Wistar rats, both these parameters remained essentially constant. *In vitro* and *in vivo* studies showed that Mem-tub level decreased and deformability increased in nocodazole-treated HS erythrocytes, whereas Mem-tub level increased and deformability decreased in taxol-treated NS erythrocytes. Changes in tubulin content of erythrocyte membraned *in vivo* resulted in consistent changes in blood pressure.

These findings, taken together, indicate that migration of tubulin to the erythrocytes membrane is correlated with decreased erythrocyte deformability. Such hemorheological changes lead to alteration of overall blood flow and occlusion of microvessels, thereby contributing to development and maintenance of hypertension.

Introducción

La compartimentalización celular de las actividades genéticas y metabólicas de los organismos eucariotas impuso una de las mayores diferencias evolutivas de sus antecesores procariotas. Uno de los compartimentos más relevantes por su tamaño y complejidad es el núcleo, el cual, separado del citoplasma mediante una doble capa de membranas contiene casi la totalidad del ADN celular. Este es el sitio principal de síntesis de ADN y ARN. El espacio circundante al núcleo, el citoplasma, contiene el citosol y organelas citoplasmáticas. En el citosol se lleva a cabo la síntesis de proteínas y las reacciones del metabolismo celular intermedio, reacciones por las cuales pequeñas moléculas son degradadas y otras sintetizadas para generar los componentes de las macromoléculas. Dentro del citoplasma se extiende una compleja red de filamentos proteicos los cuales no sólo sirven de soporte y transporte de las organelas que se hallan dentro de él, sino que además le confieren a la célula importantes propiedades tales como su arquitectura y dinamismo. Esta red de filamentos se denomina citoesqueleto y está compuesta básicamente por tres tipos de filamentos: filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Cada tipo de filamento está compuesto por una proteína cuantitativamente importante y una serie de proteínas asociadas, las cuales le confieren diversas propiedades en cuanto a su estabilidad, dinamismo e interacción con otros componentes celulares (Mas, 1999).

3.1. Microtúbulos

Los microtúbulos constituyen una parte fundamental del citoesqueleto y están involucrados en la división, diferenciación, transporte intracelular, motilidad y morfología celular (Desai y Mitchison, 1997; Gelfand, 1991). Son polímeros cilíndricos huecos de 24 nm de diámetro formados por subunidades de una proteína globular, la *tubulina* (Fig. 1), un heterodímero formado por una subunidad α y una subunidad β , presente en casi todos los organismos eucariotas. En el tejido nervioso de animales superiores la tubulina representa alrededor del 10-20 % de las proteínas totales.

Para la formación de un microtúbulo la tubulina debe formar primero protofilamentos lineales, los cuales se forman por la unión de la subunidad β de un dímero con la subunidad α del siguiente dímero de tubulina, es decir el protofilamento se forma con dímeros de tubulina unidos de manera cabeza-cola. Aunque se han

descrito *in vivo* excepciones de microtúbulos de 12, 14 y 15 protofilamentos (Burton y Himes, 1979; Eichenlaub-Ritter y Tucker, 1984; Mogensen y col., 1989), el corte transversal de un microtúbulo típico muestra 13 protofilamentos (Tilney, 1973) ordenados en forma paralela formando un cilindro alrededor de un “core” central vacío. El microtúbulo formado es una estructura polar debido a que todos los protofilamentos están ordenados en una misma dirección (determinada por la orientación de la unión de las subunidades de tubulina).

La tubulina puede ensamblarse *in vitro* incubando a 37 °C un extracto proteico soluble de cerebro en presencia de GTP, Mg²⁺ y un agente quelante de Ca²⁺ (EGTA). Los microtúbulos formados pueden aislarse mediante centrifugación y desensamblarse por incubación a 0 °C quedando la tubulina en condiciones de ensamblarse nuevamente. Esta dependencia de la polimerización con la temperatura, es de gran utilidad como método de purificación de la tubulina. Varios ciclos de ensamble y desensamble de tubulina permite obtener preparaciones altamente enriquecidas en tubulina y proteínas que poseen una interacción selectiva con la misma.

El microtúbulo posee un extremo denominado “+”, cuya velocidad de crecimiento por adición de tubulina es más rápido que el extremo “-”. El heterodímero de tubulina une dos moléculas del nucleótido GTP, un sitio de unión se encuentra en la subunidad α donde el GTP no es hidrolizable, mientras que el segundo sitio localizado en la β tubulina une GTP reversiblemente que puede ser hidrolizado a GDP. Con respecto a la cinética de polimerización de la tubulina, se ha observado *in vitro* que la formación de microtúbulos es dependiente de la concentración del dímero de tubulina presente en el medio. Esta concentración se denomina concentración crítica C_c . Por encima de esta concentración la tubulina se ensambla, por debajo de la misma se desensambla. Tanto el ensamble como el desensamble, tienen lugar preferentemente sobre el extremo “+” de los microtúbulos. El GTP presente en la β -tubulina es hidrolizado a GDP luego que el dímero de tubulina se adiciona a los extremos de un microtúbulo en crecimiento. Así, el extremo de un microtúbulo consiste transitoriamente de subunidades de tubulina que contienen GTP mientras que el centro del microtúbulo está enriquecido en tubulina-GDP. Uno de los parámetros que determina la estabilidad de un microtúbulo es la velocidad a la cual la tubulina-GTP se adiciona al extremo “+” (Roychowdhury y Rasenick, 2008).

Un microtúbulo puede oscilar temporalmente entre fases de crecimiento y acortamiento. Este comportamiento complejo de los microtúbulos se ha denominado

inestabilidad dinámica (Kirschner y Mitchison, 1986). Los parámetros que describen el modelo de inestabilidad dinámica son cuatro: la velocidad de polimerización, la velocidad de depolimerización, la frecuencia de rescate del microtúbulo (transición de depolimerización a polimerización) y la frecuencia de catástrofe (transición de polimerización a depolimerización). Dos condiciones modulan la inestabilidad: la concentración de tubulina y el tipo de nucleótido (GTP o GDP) unido a la β -tubulina en el extremo “+” del microtúbulo. Un microtúbulo se convierte en inestable y se depolimeriza rápidamente (catástrofe) si la concentración de tubulina está por debajo de la C_c o si el extremo “+” posee subunidades de β -tubulina con GDP.

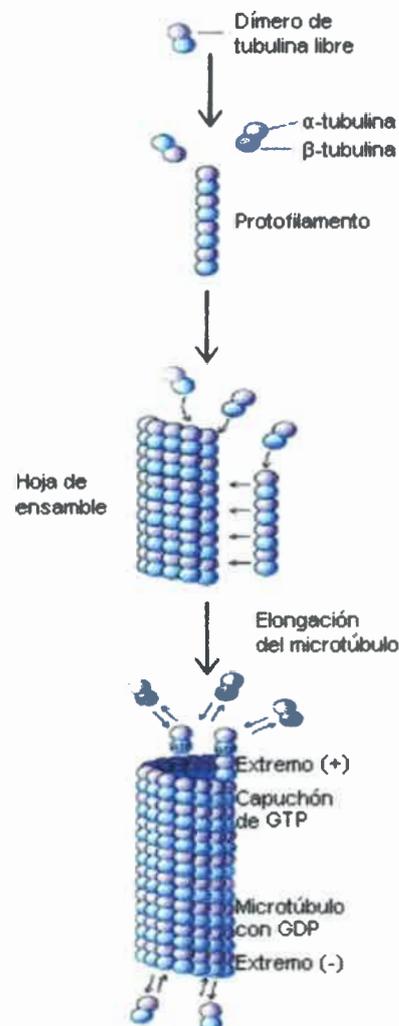


Figura 1: Polimerización de tubulina. Representación esquemática de la formación de un microtúbulo a partir de las subunidades de tubulina (Mas, 1999).

El acortamiento y crecimiento es una propiedad intrínseca de los microtúbulos. Muchos factores pueden interferir en las distintas fases del dinamismo de los mismos, entre ellos la participación de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) (ver más adelante). Existen dos tipos de mecanismos que explican el comportamiento dinámico de los microtúbulos. Uno es el mecanismo de “inestabilidad dinámica” mencionado anteriormente y otro es el denominado “treadmilling”, éste último modelo básicamente propone que la invariabilidad de la masa poblacional de microtúbulos en estado estacionario es la resultante de la sumatoria de equilibrios en los microtúbulos individuales. Así el ensamblaje de subunidades en el extremo “+” de cada microtúbulo es compensado por la pérdida de subunidades en el extremo “-” (Margolis y Wilson, 1978).

Un elemento importante para la formación de microtúbulos en células eucariotas lo constituye el *centro organizador de microtúbulos* (COMT) que se encuentra en la periferia nuclear. El papel principal del COMT es ser el centro desde el cual se ensamblan la mayoría de los microtúbulos (Kirschner y Mitchison, 1986), los microtúbulos citosólicos están dispuestos de tal forma que sus extremos “-” se encuentran concentrados espacialmente en el COMT y desde allí se dispersan en la célula quedando los extremos “+” en la periferia celular (Heidemann y col., 1980; Euteneuer y McIntosh, 1981). Además de las isoformas α y β de tubulina se ha encontrado formando parte del COMT isoformas γ , δ y ϵ de tubulina, las cuales no forman parte de microtúbulos sino que están involucradas en la nucleación de microtúbulos, duplicación del centríolo y otros eventos celulares (Fukushima y col., 2009).

El COMT puede contener un par de centríolos en su centro, cada centríolo es una pequeña organela cilíndrica de aproximadamente 0,2 μm de ancho y 0,4 μm de largo, cuyas paredes están formadas por nueve grupos de tres microtúbulos fusionados (tripleto). Los centríolos a menudo existen de a pares formando un ángulo recto entre sí y se hallan presentes en la mayoría de células animales pero están ausentes en hongos y plantas (Fig. 2). Como se mencionó anteriormente, los centríolos permanecen en el centro del centrosoma pero no hacen contacto directo con los extremos de los microtúbulos citosólicos. Los centríolos cumplen un papel importante durante la división celular y participan del anclaje de los microtúbulos en cilias y flagelos. A diferencia de los microtúbulos de ciertas estructuras especializadas tales como cilias, flagelos y axones, la mayoría de los microtúbulos de las células en interfase son

dinámicos, es decir intercambian subunidades de tubulina rápidamente con la población de tubulina no ensamblada (Saxton y col., 1984; Schulze y Kirschner, 1986; Mas, 1999).

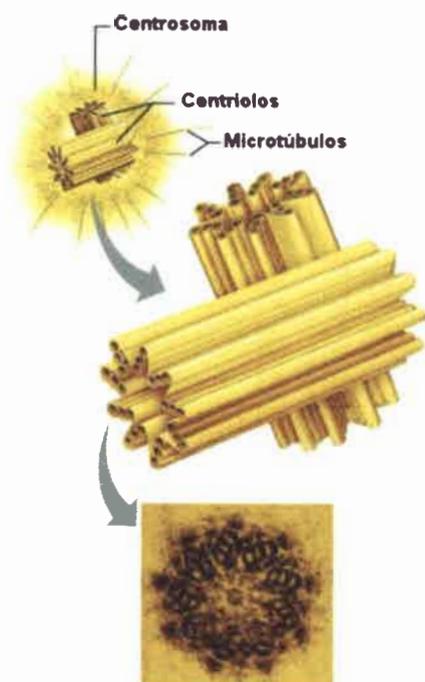


Figura 2: Representación esquemática del centrosoma. Dos centriolos próximos al núcleo, perpendiculares entre sí y rodeados de microtúbulos con los extremos “+” hacia el exterior (www.lacelula/centriolo.com).

Esta organización es típica de microtúbulos en la mayor parte de las células de mamíferos, sin embargo esta estructura no se observa en eritrocitos de mamíferos, estudios de microscopía electrónica muestran que los eritrocitos humanos no contienen microtúbulos (van Deurs y Behnke, 1973). Por otro lado, en vertebrados no mamíferos, la membrana de los eritrocitos está reforzada por un haz de microtúbulos que circunscribe a la membrana cortical en el plano horizontal de la célula, dicha estructura es conocida como banda marginal de microtúbulos. La función de esta banda marginal es proporcionar apoyo estructural a la membrana celular y la morfología elíptica, típica de los eritrocitos de vertebrados. Sobre la base de estos resultados muchos autores niegan la presencia de tubulina en eritrocitos humanos (Bennett, 1985; Cohen y col.,

1990; Liao y col., 2000), no obstante estudios recientes de proteómica realizados por Goodman y col. (2007) demuestran la presencia de diferentes isoformas de tubulina tales como tubulina $\alpha 3$, $\alpha 6$ y $\beta 1$ en eritrocitos humanos.

3.2. Tubulina

La tubulina (Fig. 3) es codificada por múltiples genes estrechamente relacionados. En ratones han sido aislados siete genes para α -tubulina y ocho genes para β -tubulina. Las subunidades de α -tubulina muestran una homología de más del 90 % entre sí, un porcentaje de homología similar se observa para las subunidades de β -tubulina, exceptuando la tubulina $\beta 1$ que presenta una homología de aproximadamente el 78 % con respecto a las otras subunidades β (Hammond y col., 2008).

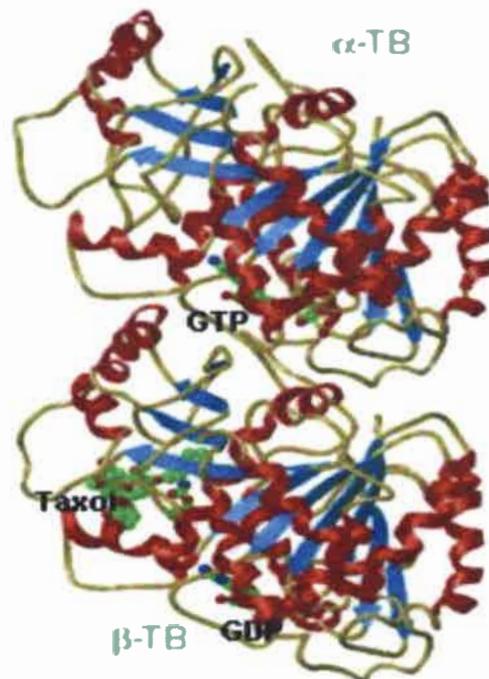


Figura 3: Diagrama de cinta del dímero de tubulina. Dímero de tubulina visto desde el lado exterior del microtúbulo, arriba se muestra la subunidad de α -tubulina con su sitio de unión a GTP y abajo la subunidad β -tubulina conteniendo GDP y taxol (Nogales y col., 1998).

La región carboxilo terminal (C-terminal) de ~15 residuos de aminoácidos para β -tubulina y uno menos extenso para α -tubulina, constituye el principal dominio variable. Esta región se encuentra en la superficie exterior de los microtúbulos, participa en la interacción de los microtúbulos con proteínas motoras y MAPs (Hammond y col., 2008) y es donde se llevan a cabo ciertas modificaciones pos-traduccionales (MPTs) tales como: tirosinación/detirosinación, modificación $\Delta 2$, poliglutamilación y poliglicilación. De esta manera, la secuencia variable de la región C-terminal puede dar lugar a diferentes isoformas específicas. Existen además otras modificaciones pos-traduccionales tales como acetilación, fosforilación y palmitoilación que ocurren en otros sitios de tubulina diferentes al extremo C-terminal (Fukushima y col., 2009). La expresión de las isoformas de tubulina es diferente entre órganos y tipos celulares y está regulada durante el desarrollo. Todas estas modificaciones, conservadas a través de la evolución, pueden actuar individualmente o en combinación para controlar funciones específicas de los microtúbulos (Hammond y col., 2008.)

3.2.1. Modificaciones post-traduccionales de tubulina

3.2.1.1. Acetilación/deacetilación de α -tubulina

La acetilación de α -tubulina ocurre en el residuo lisina de la posición 40 sobre el extremo amino terminal (N-terminal). La acetilación se asocia principalmente con microtúbulos estables y ocurre después del ensamblado de los microtúbulos (Fig. 4).

La enzima encargada de la acetilación de α -tubulina no ha sido identificada, sin embargo recientemente se ha demostrado la presencia de una histona acetil transferasa, NAT10, que podría estar involucrada en la acetilación de tubulina (Shen y col., 2009). Por otro lado, las enzimas que catalizan la reacción opuesta, es decir la deacetilación, han sido descritas, ellas son la Histona Deacetilasa 6 (HDAC6) y SIRT2. La HDAC6 es un miembro de la familia histona deacetilasa que es preferentemente citoplasmática y co-localiza con microtúbulos. Esta puede deacetilar tubulina y microtúbulos *in vitro*, y la supresión de la función de HDAC6 por inhibidores farmacológicos o pequeños ARN interferencia (siARN) *in vivo* conduce a un marcado aumento en la acetilación de la tubulina. La segunda histona deacetilasa, SIRT 2, la cual es dependiente de NAD^+ ,

también ha sido identificada como una tubulina deacetilasa. SIRT 2 co-inmunoprecipita con la HDAC6 en extractos celulares, lo cual aumenta la posibilidad de que estas enzimas cooperen para deacetilar tubulina *in vivo* (Hammond y col., 2008; Westermann y Weber, 2003).

Un amplio número de investigaciones demuestran que la acetilación de tubulina no es esencial para la supervivencia celular pero si afecta funciones especializadas. Se ha propuesto un papel de la acetilación de tubulina en la motilidad celular ya que la sobreexpresión de HDAC6 aumenta los movimientos quimiotácticos de células NIH-3T3, mientras que la inhibición de HDAC6 inhibe la migración celular (Haggarty y col., 2003). En células CAD, el isotipo acetilado de tubulina está ausente, sin embargo el tratamiento de estas células con inhibidores de deacetilasas tales como la tricostatina A o la tubacina induce acetilación de tubulina, una vez acetilada la tubulina es capaz de asociarse con la Na⁺,K⁺-ATPasa (NKA) de membrana plasmática e inhibir su actividad catalítica (Santander y col., 2006).

3.2.1.2. Poliglicilación de microtúbulos

La poliglicilación es la unión covalente a través de una unión isopeptídica de una cadena lateral de poliglicina a un residuo glutamato conservado que esta en el carboxilo terminal de α y β -tubulina. La poliglicilación puede ser muy extensa involucrando la adición de más de 34 residuos extra y es predominante en tubulina de esperma de mamíferos. En el presente no se conocen las enzimas responsables de la poliglicilación, pero ha sido descrita una actividad de deglicilación en el citosol de *Paramecium*, lo que indica que al igual que otras modificaciones de tubulina, la poliglicilación es reversible (Xia y col., 2000).

Mutaciones de los tres sitios de glicilación de α -tubulina no provocan efectos observables, aunque mutantes de los cinco sitios de glicilación de β -tubulina no son viables. Apreciablemente un sitio simple no es esencial pero la reducción del nivel de glicilación por mutagénesis de algún sitio, pero no de todos, produce células que muestran un crecimiento y motilidad anormal, como también defectos en la citocinesis (Xia y col., 2000).

3.2.1.3 Poliglutamilación de tubulina

En esta inusual modificación una cadena lateral de poliglutamato de longitud variable esta unida, a través de una unión isopeptídica, al grupo γ -carboxilato de un glutamato en el extremo carboxilo terminal de tubulina. La poliglutamilación fue demostrada para α -tubulina en cerebro de mamíferos y subsecuentemente fue detectada en todos los isotipos de α y β -tubulina.

Preparaciones de tubulina poliglutamilada han sido aisladas de cerebro de rata y de *Crithidia fasciculata*. La enzima de rata muestra una constante de sedimentación de 10S que corresponde a un peso molecular de 300 kD. Trabajos realizados en células Hela muestran que la poliglutamilación esta regulada en el ciclo celular, aunque los picos de actividad poliglutamilasa se dan en la fase G2, el nivel de tubulina glutamilada es máximo durante la mitosis.

Las evidencias encontradas hasta el presente indican que la poliglutamilación puede influenciar diferencialmente la interacción entre los microtúbulos y sus proteínas asociadas. Ensayos *in vitro* muestran que algunas MAPs, tales como kinesina y tau, muestran fuerte afinidad por microtúbulos que han sido modificados por adición de una cadena lateral de ácido glutámico con una longitud de tres residuos mientras que su afinidad por largas cadenas laterales disminuye (Larcher y col., 1996; Bonnet y col., 2001).

3.2.1.4. Tirosinación/detirosinación de α -tubulina

La adición de una tirosina al extremo C-terminal de α -tubulina es una modificación pos-traducciona ampliamente estudiada (Fig. 4). Debido a que la tirosina C-terminal de la α -tubulina es codificada por el ARN mensajero, la modificación primaria es la remoción de tirosina por la enzima tubulina tirosina carboxipeptidasa (TTCP) (Argaña y col., 1978). Como resultado la tubulina detirosinada expone un ácido glutámico carboxilo-terminal y por ello es a menudo llamada Glu-tubulina. La incorporación de un nuevo residuo de tirosina a la tubulina detirosinada es una reacción dependiente de ATP catalizada por la enzima tubulina tirosina ligasa (TTL), en esta reacción se restaura la tirosina C-terminal produciendo Tyr-tubulina (Barra y col., 1973). La tubulina detirosinada puede además sufrir remoción del penúltimo ácido

glutámico lo que lleva a la formación de tubulina $\Delta 2$, la cual no es sustrato para la TTL, y de este modo escapa al ciclo de tirosinación (Paturle-Lafanechere y col., 1991; Rudiger y col., 1994).

La detirosinación ocurre preferentemente después del ensamblado de los microtúbulos, porque la TTCP prefiere polímeros, en tanto que la TTL prefiere dímeros de tubulina como sustrato. Se considera que la detirosinación por sí misma no estabiliza los microtúbulos, pero sí se usa como un marcador de estabilidad microtubular, sin embargo estudios recientes de Peris y col. (2009) demuestran que los microtúbulos detirosinados son sustratos de poca afinidad para factores desensamblantes promoviendo así la estabilización de dichas estructuras. Los caminos de transducción de señales que llevan a la formación de microtúbulos detirosinados involucran a la pequeña GTPasa Rho y mDia (Cook y col., 1998; Palazzo y col., 2001). Los microtúbulos detirosinados parecen estar estabilizados por supresión de la dinámica en el extremo positivo a través de un complejo de tapado de composición desconocida (Infante y col., 2000).

Para analizar directamente la función del ciclo de tirosinación, los genes que codifican para la TTL han sido suprimidos en ratones. Los ratones carentes de TTL nacen sin malformaciones aparentes, pero mueren dentro del primer día de nacimiento, demostrando que la enzima es necesaria en cierta etapa del desarrollo de algunos tipos de células neurales.

La $\Delta 2$ -tubulina constituye una fracción considerable de tubulina de cerebro. En cultivo de células de mamíferos, la aparición de $\Delta 2$ -tubulina puede ser usada para detectar líneas celulares que tienen baja actividad TTL. Aunque estas células tienen un citoesqueleto microtubular normal, cuando son inyectadas en ratones desnudos producen un aumento de tumores, poniendo en evidencia que durante la tumorigenesis la actividad TTL se pierde. De hecho, en la mayoría de las células de cáncer de pecho que han sido investigadas, la actividad TTL está disminuida y como consecuencia el nivel de detirosinación en estas células es elevado (Mialhe y col., 2001).

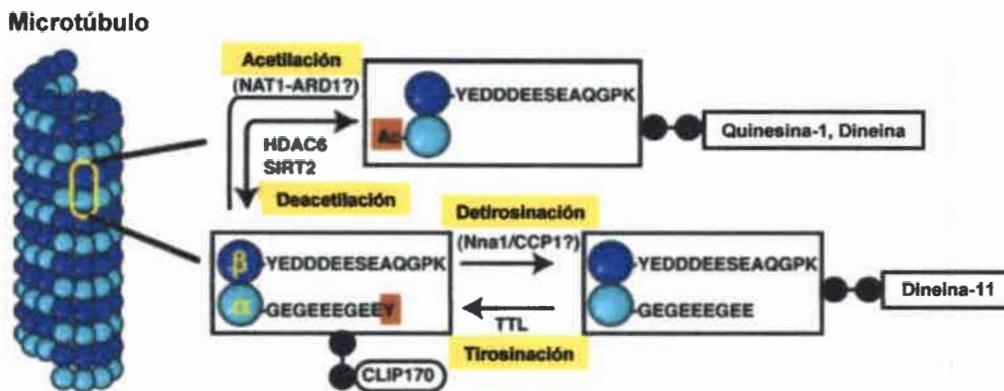


Figura 4: Representación esquemática de dos modificaciones postraduccionales de tubulina. Se representan los procesos de acetilación/deacetilación (arriba) y tirosinación/de tirosinación (abajo). Los microtúbulos están compuestos de heterodímeros de α (celeste) y β (azul) tubulina. Los residuos unidos y removidos están remarcados en anaranjado (Fukushima y col., 2009).

3.2.1.5. Fosforilación de tubulina

La fosforilación ocurre sobre un residuo de serina en el extremo C-terminal de β -tubulina. Es una modificación raramente observada y su función es desconocida. La fosforilación tiene un papel importante en la regulación de algunas MAPs, pero resulta interesante destacar que sólo parece ser una modificación menor para los microtúbulos. Esto podría deberse a que la tubulina es una proteína altamente aniónica y la introducción de un grupo fosfato cargado negativamente puede no ser suficiente para cambiar la estructura o carga de la proteína (Westermann y Weber, 2003).

3.3. Proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs)

En células vivas los microtúbulos se ensamblan en estructuras estables tales como los procesos de neuronas maduras o axonemas ciliares y flagelares, pero también son importantes en eventos dinámicos tales como la formación del uso mitótico. Durante estos procesos los microtúbulos experimentan una rápida transición entre estados de crecimiento y acortamiento. Este fenómeno de inestabilidad dinámica es una propiedad

esencial de la tubulina que puede ser demostrado *in vitro*. *In vivo* la estabilidad de los microtúbulos es modulada por efectores celulares tales como diferentes proteínas (ej. catanina), factores que promueven la catástrofe (ej. estatmina), proteínas motoras (ej. XKCM1) y diferentes familias de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) (Drewes y col., 1998). La clonación y el secuenciamiento de las MAPs han permitido identificar dos familias principales que difieren en sus regiones de unión a microtúbulos, ellas son: 1) La familia MAP2/tau (MAP2, MAP4 y tau) cuyas proteínas contienen secuencias similares responsables de su unión a la región COOH-terminal de las subunidades de tubulina. El dominio de unión a microtúbulos de estas MAPs consiste de tres a cuatro secuencias repetidas de un motivo de 18 aminoácidos que se encuentra próximo al dominio COOH-terminal de las moléculas; y 2) La familia MAP1 (MAP1A, MAP1B y MAP1S) cuyas proteínas tienen un dominio de unión a microtúbulos que consiste de 21 secuencias repetidas situadas en el centro de las moléculas y que contienen la secuencia KKEE o KKE (Maccioni y Cambiazo, 1995). En cuanto a la funcionalidad de las MAPs existe una superposición entre los miembros de la familia MAP2/tau y MAP1 (Teng y col., 2001).

Proteínas de la familia MAP2/tau:

Estructuralmente, tienen secuencias repetitivas de unión a los microtúbulos cercanos al extremo C-terminal, poseen un motivo conservado KXGS que puede ser fosforilado y tienen una proyección N-terminal de tamaño variable que en el caso de MAP2 y tau tienen una carga neta negativa. Cada proteína tiene varias isoformas, con variaciones en la longitud de la proyección y el número de repetidos de unión a microtúbulos. Las principales formas de MAP2 son MAP2C, la cual es relativamente corta y MAP2A y MAP2B, que contienen una proyección más larga. Las diferentes formas de MAP2 se expresan principalmente en neuronas en diferentes estadios del desarrollo, MAP2C es regulada después de estadios tempranos del desarrollo neuronal, mientras que MAP2B se expresa durante el desarrollo y edad adulta. La isoforma MAP2A se expresa luego de que los niveles de MAP2C disminuyen y no se detectan uniformemente en las neuronas maduras. Por otro lado, las proteínas tau se dividen en dos clases principales, una que comprende aquellas isoformas que contienen tres repeticiones de unión a microtúbulos y la segunda que incluye a las isoformas con cuatro repeticiones. Las primeras se expresan predominantemente durante el desarrollo

temprano, mientras que las isoformas con cuatro repeticiones se expresan durante el estado adulto.

Análisis estructurales revelan la presencia de las proteínas de la familia MAP2/tau a lo largo de los microtúbulos en las neuronas. En cuanto a su funcionalidad, estas MAPs se caracterizan por su capacidad para unirse y estabilizar microtúbulos, además incrementan la rigidez e inducen la formación de ramos de microtúbulos en sistemas celulares heterólogos. (Al Bassam y col., 2002). Interesantemente, las isoformas de tau que contienen tres o cuatro secuencias repetidas de unión a microtúbulos muestran diferente efecto sobre la dinámica de los microtúbulos, isoformas con cuatro repetidos protegen a los microtúbulos de la depolimerización más firmemente que las isoformas con tres repetidos (Panda y col., 2003). El fenotipo knockout simple para tau y MAP2 sugiere para estas proteínas funciones específicas pero no esenciales en la morfogénesis del sistema nervioso. Tau ha sido ampliamente estudiada por su estrecha relación con la enfermedad de Alzheimer y demencias frontotemporales (Lee y col., 2001; Goedert y col., 2000). A pesar de la función estabilizante de las MAPs, en las células los microtúbulos muestran comportamiento dinámico aún cuando estas proteínas son altamente expresadas (Kaech y col., 1996), esto se debe a que su unión es regulada por diversos factores entre los cuales uno de los más importantes es la fosforilación. En particular, la unión de MAP2/tau a microtúbulos puede ser regulada por fosforilación del motivo KXGS en cada repetición de unión a microtúbulos, hecho que disminuye la afinidad por los microtúbulos. Los motivos de fosforilación son sustratos de múltiples proteínas quinasas que incluyen la proteína quinasa A (PKA) y la quinasa que regula la afinidad a microtúbulos (MARK) (Meyer y col., 1995).

MAP4, el último miembro de la familia MAP2/tau, a diferencia de las demás MAPs que son predominantemente de origen neural, se caracteriza por ser de amplia ubicación, se expresa en varios órganos incluyendo cerebro, glándula adrenal, pulmón, hígado, músculo y corazón (Dehmelt y Halpain, 2004). Se ha propuesto para esta proteína un papel en la regulación de la dinámica de los microtúbulos mitóticos durante la metafase, por otro lado, la isoforma específica de músculo de ésta proteína es necesaria durante la miogénesis, aunque su función exacta en estos procesos no es conocida (Dehmelt y Halpain, 2004).

Proteínas de la familia MAP1:

Son MAPs clásicas que se unen a lo largo del enrejado de microtúbulos. Los genes que codifican para MAP1A, MAP1B y MAP1S son traducidos como largas proteínas que luego sufren clivaje proteolítico próximo al extremo C-terminal, generándose así cadenas pesadas (MAP1A-HC de 350 kDa, MAP1B-HC de 300 kDa y MAP1S-HC de 100 kDa) y cadenas livianas (LC2 de 28 kDa de MAP1A, LC1 de 32 kDa de MAP1B y MAP1S-LC de 26 kDa). Se puede encontrar una proteína accesoria en el complejo de proteínas MAP1A y MAP1B, la cual es producto de un gen que codifica en forma independiente del resto para una cadena liviana de MAP1, llamada LC3 (19 kDa) que se co-expresa con MAP1A o MAP1B (Mann y Hammarback, 1994; Mann y Hammarback, 1996). Tanto las cadenas livianas generadas a partir de MAP1A (LC2) y MAP1B (LC1) como la cadena liviana LC3 pueden interactuar con ambas cadenas pesadas, la de MAP1A y la de MAP1B (Halpain y Dehmelt, 2006) (Fig. 5).

La funcionalidad de esta familia de MAPs esta regulada por la formación de complejos entre las distintas proteínas que la constituyen. La asociación de moléculas de cadena liviana, incluida LC3, con MAP1A y MAP1B puede alterar la capacidad de las cadenas pesadas para unirse a microtúbulos y alterar la dinámica de estos (Mann y Hammarback, 1994, 1996; Schoenfeld y col., 1989). Las moléculas de cadena liviana se han detectado en una proporción de 6-8 veces mayor comparadas con sus respectivas cadenas pesadas y tienen la capacidad de unirse a microtúbulos en ausencia de moléculas de MAP1. La unión de las cadenas livianas LC1 y LC2 a los microtúbulos hace que estos se reorganicen en haces ondulados y aumentan la resistencia de los microtúbulos a la depolimerización por drogas (Noiges y col., 2002; Togel y col., 1998) y ambas proteínas promueven la polimerización de tubulina *in vitro*.

De las tres cadenas livianas, el efecto de LC3 sobre la estabilidad y dinámica de los microtúbulos es el que menos se conoce. Recientemente, Faller y col. (2009) demostraron que LC3 puede co-localizar con microtúbulos *in vivo* (independientemente de las cadenas pesadas de MAPs) y en contraposición con LC1 y LC2, no reorganiza a los microtúbulos dentro de haces ondulados. Células transfectadas con LC3 presentan marcados cambios en la dinámica de los microtúbulos, mostrando un aumento en la estabilidad y una disminución de la dinámica de estos, ya que suprime los eventos de acortamiento y catástrofe, incrementando la frecuencia de eventos de rescate. Por otro lado, la unión de LC3 a microtúbulos aumenta la detirosinación de tubulina (Faller y col., 2009).

A diferencia de lo que ocurre con las cadenas pesadas, la expresión de las diferentes cadenas livianas han sido detectadas en células no neuronales, por esta razón su efecto sobre la dinámica de las microtúbulos puede ser relevante en otros tejidos y sugiere que las cadenas livianas tienen funciones adicionales a su asociación con las cadenas pesadas de MAP1 (Mei y col., 2000).

Las cadenas pesadas de MAP1A y MAP1B contienen secuencias adicionales que sirven de unión a microtúbulos. Los aminoácidos que se encuentran en los dominios de unión a microtúbulos son diversos, incluyendo residuos cargados positiva y negativamente (Noiges y col., 2002; Halpain y Dehmelt, 2006).

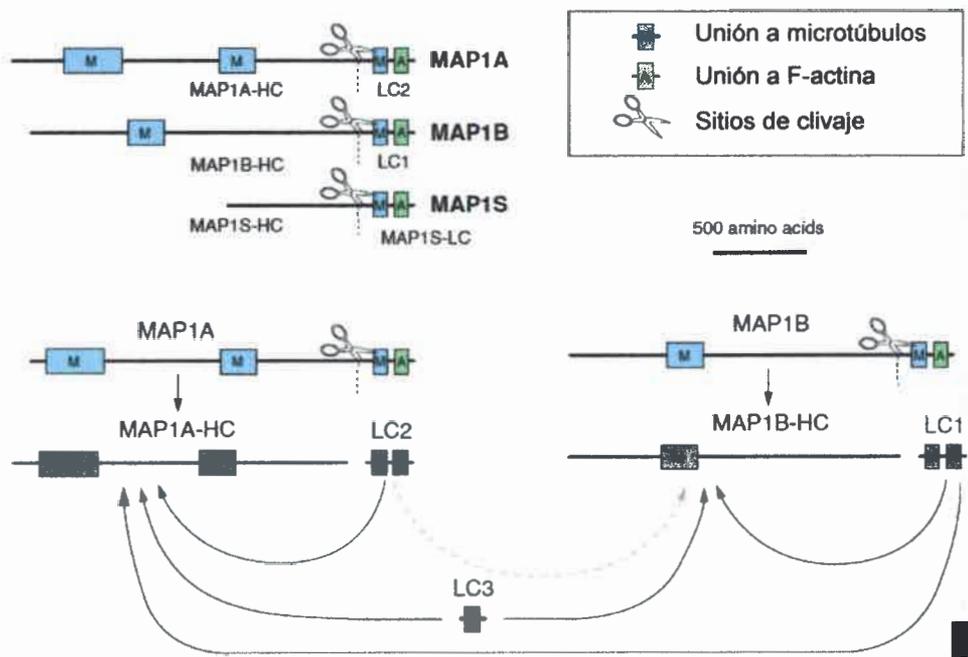


Figura 5: Dominios de organización y procesamiento postraduccional de proteínas de la familia MAP1. MAP1A, MAP1B y MAP1S contienen secuencias de unión a microtúbulos y a F-actina en la región C-terminal y sitios de unión a microtúbulos adicionales en la región N-terminal de MAP1A y MAP1B. Todos los miembros de la familia son clivados próximos al extremo C-terminal dando cadenas pesadas y livianas. Las cadenas livianas interactúan con las cadenas pesadas formando complejos. LC3, la cadena liviana codificada por un gen adicional, se encuentra en los complejos maduros de MAP1A o MAP1B (Halpain y Dehmelt, 2006).

La proteína MAP1B se expresa principalmente durante el desarrollo neuronal temprano, se localiza en los axones y disminuye de manera gradual durante la

maduración. MAP1A en cambio, se expresa principalmente en las neuronas adultas y se localiza en las dendritas; mientras que MAP1S se expresa en varios tejidos incluyendo cerebro de rata. MAP1A y MAP1B fueron descubiertas por su capacidad para unirse a microtúbulos y estabilizarlos; estudios *in vitro* sugieren que la actividad de MAP1B es más débil cuando se la compara con las proteínas MAP2, lo cual puede deberse a factores tales como la inhibición de la actividad estabilizante de microtúbulos de la cadena liviana de MAP1B por su cadena pesada o una fosforilación diferencial. La fosforilación de MAP1B por la Glucogeno Sintetasa Quinasa-3 β (GSK₃ β) ha sido ampliamente estudiada *in vitro* e *in vivo*, ocurre en los residuos Ser1260 y Thr1265 y son específicamente fosforilados en los axones en crecimiento (Trivedi y col., 2005). La eliminación completa del gen de MAP1B da como resultado la ausencia del corpus callosum, sugiriendo que el mecanismo de crecimiento axonal es afectado (Halpain y Dehmelt, 2006).

La inhibición simultánea de MAP1B y MAP2 o tau resulta en fenotipos más severos que en knockouts simples y sugieren un papel funcional para MAP1B, tau y MAP2 en la migración neuronal y en procesos de extensión (Halpain y Dehmelt, 2006).

3.4. ATPasas de membrana plasmática

Las membranas biológicas, formadas por proteínas inmersas en una bicapa lipídica, permiten la interacción de las células con el medio que las rodea, controlando la entrada de nutrientes y la excreción de productos de desechos. Asimismo son responsables de la compartimentalización de metabolitos entre los distintos orgánulos celulares. Algunos de estos procesos de transporte tienen lugar por mecanismos de difusión simple, mientras que otros están mediados por proteínas transportadoras de membrana (Lodish, 2002).

Las ATPasas son enzimas que acoplan la hidrólisis o síntesis de ATP al movimiento de un soluto a través de la membrana. Se clasifican en tres grupos de acuerdo a su composición proteica, localización celular y mecanismo de acción; las familias de ATPasas conocidas son las ATPasas vacuolares o V-ATPasas, las F-ATPasas constituidas por porciones F₀ y F₁ y las P-ATPasas llamadas así por presentar un intermediario fosforilado durante su ciclo catalítico.

V-ATPasas: las representantes de este grupo se encuentran en membranas de lisosomas y endosomas y se encargan de bombear protones desde el citosol hacia el interior de la organela. Están constituidas por un gran dominio citosólico, compuesto por cinco subunidades diferentes, que fija ATP y ejerce la acción hidrolítica. El complejo proteico de la bomba se completa con un canal para el paso de protones, que es un dominio transmembrana formado por varias copias de subunidades c y una subunidad a.

F-ATPasas: el integrante de mayor interés está en la membrana interna de las mitocondrias y funciona como ATPsintetasa impulsada por el flujo de protones. Está compuesta por asociación de múltiples subunidades en un complejo proteico, presenta un gran dominio extramembrana con actividad catalítica (F_1) y otro transmembrana que forma el canal de protones (F_0).

P-ATPasas: poseen una estructura básica compuesta por una o dos subunidades que atraviesan la membrana. La subunidad principal llamada α (100 kDa) es la responsable de la actividad ATPasa, tiene el sitio de unión de ATP, se fosforila durante el proceso de transporte y forma el canal por donde se desplazan los iones. Pertenecen a esta clase la NKA, la Ca^{2+} -ATPasa y la H^+,K^+ -ATPasa (Blanco, 2006).

3.4.1. P-ATPasas de membrana plasmática

3.4.1.1. Ca^{2+} -ATPasa

Las membranas plasmáticas de las células animales, de levaduras y probablemente también de vegetales, contienen ATPasas de Ca^{2+} (135 kDa) que transportan este ion hacia fuera de la célula en contra de su gradiente electroquímico, contribuyendo a mantener baja la concentración de iones Ca^{2+} libres en el citosol.

Presenta una subunidad α catalítica que posee un sitio de fijación para ATP. El aumento de Ca^{2+} citosólico induce la fijación de estos iones a la calmodulina, una proteína reguladora que fija Ca^{2+} y desencadena la activación alostérica de la ATPasa de Ca^{2+} , como consecuencia, la exportación de iones Ca^{2+} desde la célula se acelera y

rápida se restaura la baja concentración citosólica de Ca^{2+} libre original (Lodish, 2002).

3.4.1.2. H^+, K^+ -ATPasa

La H^+, K^+ -ATPasa se localiza en células parietales del estómago, esta compuesta por una subunidad α de 95 kDa y una β de 60-90 kDa, es la base molecular de la producción de ácido gástrico y es el camino común final que media la secreción de ácido clorhídrico por las células parietales gástricas. Esta enzima media el cambio electroneutral de H^+ intracelular y K^+ extracelular, acoplado a la hidrólisis del ATP, para llevar a cabo la secreción de ácido cuando las células parietales son estimuladas. La secreción de ácido gástrico es estimulada por factores tales como gastrina, histamina y acetilcolina, y es inhibida por somatostatina (Shi, 2005).

3.4.1.3. Na^+, K^+ -ATPasa

La enzima NKA es la proteína responsable del transporte activo de iones Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática; la presencia en las membranas celulares de una actividad ATPasa que es estimulada por la presencia simultánea de iones Na^+ y K^+ y que es específicamente inhibida por glicósidos cardíacos (ouabaína, digoxina y digitoxina) fue descubierto hace más de cuarenta años (Skou, 1957). La enzima es una proteína heterodimérica que consiste de una subunidad α y una β , la subunidad α está compuesta por aproximadamente 1.000 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular de ~110 kDa (Fig. 6). Se han identificado cuatro isoformas de esta subunidad α_1 , α_2 , α_3 y α_4 , de las cuales la forma principal, α_1 , se encuentra en la mayoría de los tejidos y es la predominante en riñón y en la mayoría de los epitelios. La subunidad α posee cinco bucles extracelulares (M1 a M10), como ambos extremos son intracelulares, hay diez segmentos transmembrana. Los bucles extracelulares son cortos, excepto M7 y M8. En cuanto a las estructuras intracelulares, se destacan tres bucles, un largo bucle central entre M4 y M5 compuesto de ~430 residuos de aminoácidos, una larga cola N-terminal de ~90 residuos de aminoácidos y un bucle intracelular de ~120 residuos entre M2 y M3. Estos bucles contienen el dominio de unión a nucleótidos o N,

el dominio de fosforilación o P, ambos formados por los bucles M4-M5 y un dominio actuador o A que se forma por el tallo N-terminal y los bucles M2-M3 (Kaplan, 2002).

La subunidad β tiene un peso molecular de ~ 55 kDa, es una proteína de membrana tipo II (cruza una sola vez la membrana) y su extremo amino está en el citoplasma. Esta subunidad está compuesta de 370 residuos de aminoácidos y tiene 4 isoformas. Los primeros 30 aminoácidos están expuestos hacia el citosol y aproximadamente 300 residuos de aminoácidos se doblan para formar la porción extracelular. En esta porción hay 3 secuencias consenso que están extensamente glicosiladas (Fig. 6). Estudios sobre la enzima purificada muestran que ambas subunidades son esenciales para la actividad enzimática.

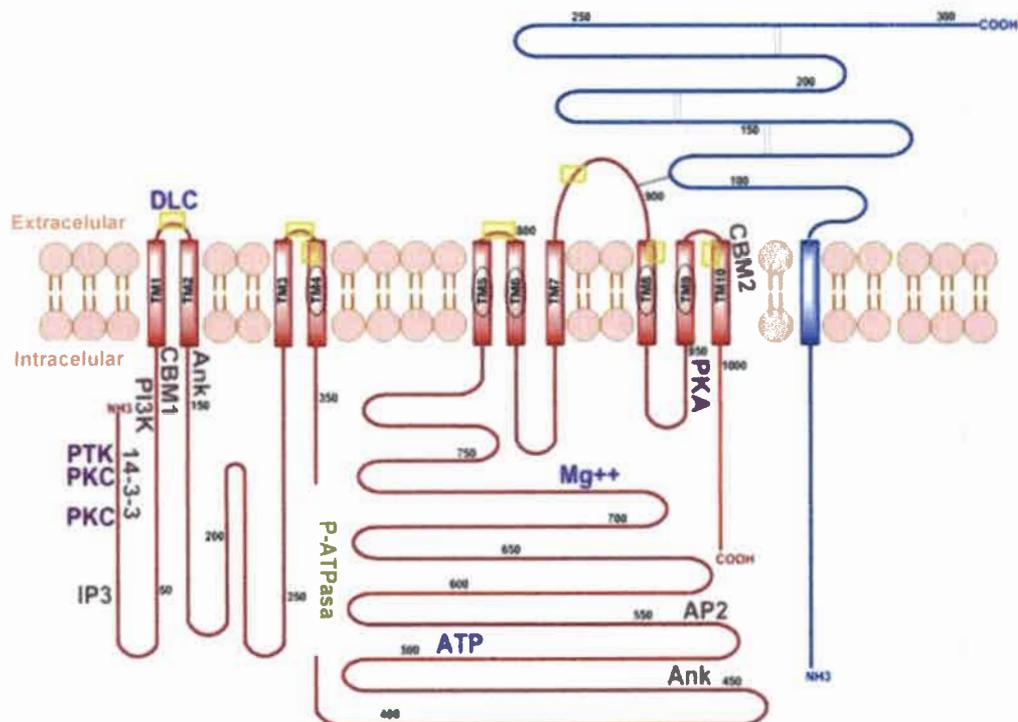


Figura 6: Ilustración esquemática de la NKA. Principales sitios de unión a ligandos y sitios activos sobre la subunidad $\alpha 1$ (rojo) y $\beta 1$ (azul). Las elipses en los dominios transmembrana indican las regiones involucradas en la unión del Na^+ y/o K^+ . DLC, indica el principal sitio de unión a esteroides. Los rectángulos amarillos indican otros sitios involucrados en la unión DLC. PTK, PKC y PKA: sitios de fosforilación. PI3K: sitio de unión. IP3: sitio de unión. 14-3-3: sitio de unión de la proteína 14-3-3. CBM1/2: sitios de unión de caveolina 1 y 2. Ank: sitio de unión de ankirina. AP2: sitio de unión de proteína adaptadora 2. Mg^{++} : sitio de unión del magnesio. ATP: indica el área involucrada en la unión de ATP. P-ATPase: indica el motivo conservado de las P-ATPasas (Nesher y col., 2007).

En el ciclo catalítico de la NKA se pueden distinguir diferentes estados de la enzima (Fig. 7). La enzima en su forma E_1 tiene sitios intracelulares de unión a cationes y alta afinidad por el Na^+ y el ATP, la fosforilación de E_1 produce la forma E_1P , cuando el ADP sale la unión del Na^+ a la enzima es obstruida. Luego ocurre otro cambio conformacional, los iones Na^+ pasan a la superficie extracelular y la fosfoenzima es menos sensible a la adición de ADP pero es sensible a la hidrólisis, esta forma, E_2P , une iones K^+ a la superficie externa, los iones defosforilan la enzima y quedan atrapados para formar el estado E_2K_2 . La liberación del K^+ a la solución intracelular es catalizada por el ATP, uniéndose a un sitio con baja afinidad para el ATP. La enzima retorna del estado E_2 a la forma E_1 , con una baja afinidad para el K^+ , los iones salen a la superficie interna y la proteína está lista para un nuevo ciclo (Kaplan, 2002).

La modulación de la actividad NKA por drogas o factores intrínsecos afecta una variedad de fenómenos fisiológicos. La inhibición de la bomba en condiciones donde la concentración intracelular de cationes no está alterada lleva a la activación de caminos de señalización clásicos tales como ERK y Src (Mohammadi y col., 2001).

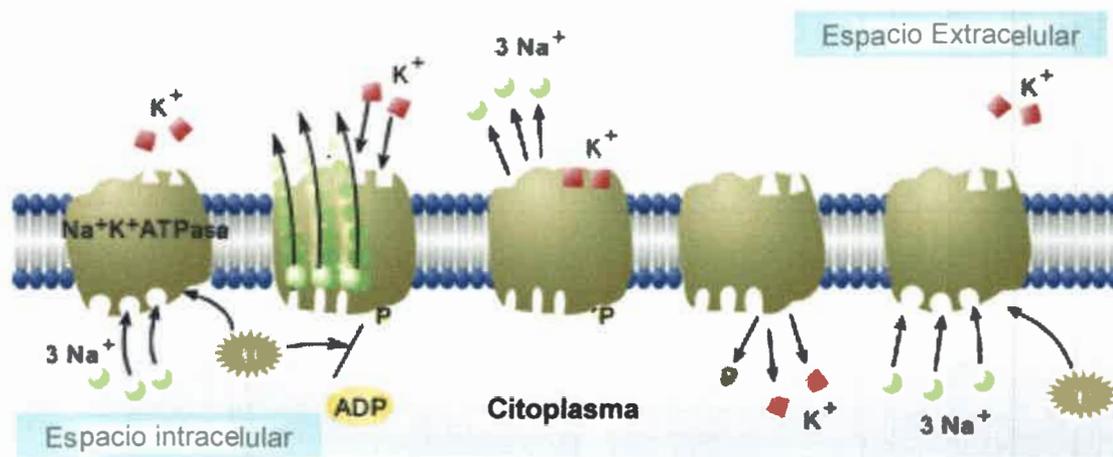


Figura 7: Ciclo de reacción de NKA. El esquema muestra los pasos para el ciclo de reacción involucrados en el transporte activo de iones Na^+ y K^+ (Kaplan, 2002).

3.5. Regulación de P-ATPasas por interacción con tubulina

Se ha demostrado que varias proteínas integrales de membranas, además de proteínas citoplasmáticas, interaccionan con tubulina ensamblada y no ensamblada, lo que permite encontrar una fracción de tubulina presente en las membranas. La presencia de tubulina asociada a membranas plasmáticas de cerebro ha sido observada por diversos investigadores (Bhattacharyya y Wolff, 1975; Walters y Matus, 1975; Gozes y Littauer, 1979; Babitch, 1981; Strocchi y col., 1981; de Néchaud y col., 1983; Hargreaves y Avila, 1985).

Inicialmente el grupo del Dr. Barra y posteriormente el grupo del Dr. Casale fueron los primeros en describir las interacciones entre la tubulina y las P-ATPasas (Beltramo y col., 1992 y 1994; Nuñez-Fernandez y col. 1997; Alonso y col., 1998; Casale y col., 2001; 2003 y 2005; Campetelli y col., 2005; Santander y col., 2006; Monesterolo y col., 2008; Zampar y col., 2009).

Beltramo y col. (1994) demostraron que aproximadamente el 30 % de la tubulina puede ser aislada como un componente con características hidrofóbicas, dado que cuando se extraen membranas de cerebro con una solución que contiene Tritón X-114 y la preparación es particionada, parte de la tubulina total de membrana aparece en la fase detergente. Por otro lado, cuando las membranas son sometidas a un tratamiento alcalino, las moléculas de tubulina son removidas de las membranas y luego de la partición aparecen principalmente en la fase acuosa. Este hecho demuestra que la tubulina no es una proteína integral de membrana sino que el comportamiento hidrofóbico se debe a su asociación con un componente integral de membrana. Por otro lado, se demostró que la tubulina hidrofóbica contiene una alta proporción del isotipo acetilado (Beltramo y col., 1992). Posteriormente (Nuñez-Fernandez y col. 1997), encontraron que el componente de membrana que le confiere carácter hidrofóbico a la tubulina es una proteína de 100 kDa, que posteriormente (Alonso y col. 1998) la identificaron como la subunidad α de la enzima NKA.

El descubrimiento del complejo tubulina/NKA llevo a investigar el efecto de la formación del complejo sobre la actividad enzimática. Se encontró que la interacción de tubulina con la NKA inhibe la actividad enzimática (Casale y col 2001). El grado de inhibición se correlaciona con: 1) la concentración de la isoforma de tubulina acetilada presente en la preparación de tubulina usada, y 2) la cantidad de tubulina acetilada aislada como un componente hidrofóbico. La modificación farmacológica de la

actividad de la enzima, mediante el uso de L-glutamato en cultivo de astrocitos, muestra que el aumento de la actividad NKA se correlaciona con una disminución del contenido de tubulina hidrofóbica, demostrando que la asociación/disociación de tubulina acetilada con NKA está involucrada en la regulación de la actividad enzimática en células vivas (Casale y col. 2003). La estimulación de la actividad NKA mediada por la disociación del complejo tubulina acetilada/NKA también ocurre en células no neurales tales como células COS, Hep-2, CHO, L6 y NIH 3T3 (Casale y col. 2005). Por otro lado, se ha demostrado que en células CAD, una línea celular de origen neural, el isotipo acetilado de tubulina no está presente, en relación con los antecedentes descritos anteriormente en esta línea celular la NKA no se activa por el tratamiento con L-glutamato y el complejo tubulina/NKA no se encuentra en las membranas. El tratamiento de células CAD con inhibidores de deacetilasas (tubacina o tricostatina A - TSA-) provoca aparición del isotipo acetilado de tubulina, formación del complejo tubulina/NKA y reducción de la actividad enzimática. La adición de L-glutamato a las células tratadas, provoca disociación del complejo y la actividad enzimática es restaurada (Fig. 8). Estos hallazgos (Santander y col. 2006) ponen en evidencia que la acetilación de la tubulina es esencial para la interacción de esta proteína con la NKA de membrana y la resultante inhibición de la actividad enzimática.

En estudios posteriores (Zampar y col. 2009), se demostró que la tubulina acetilada se asocia con el dominio citoplasmático cinco (CD5) de la NKA y que la enzima es capaz de interactuar con microtúbulos y posiblemente podría actuar como un sitio de anclaje de los microtúbulos a la membrana plasmática.

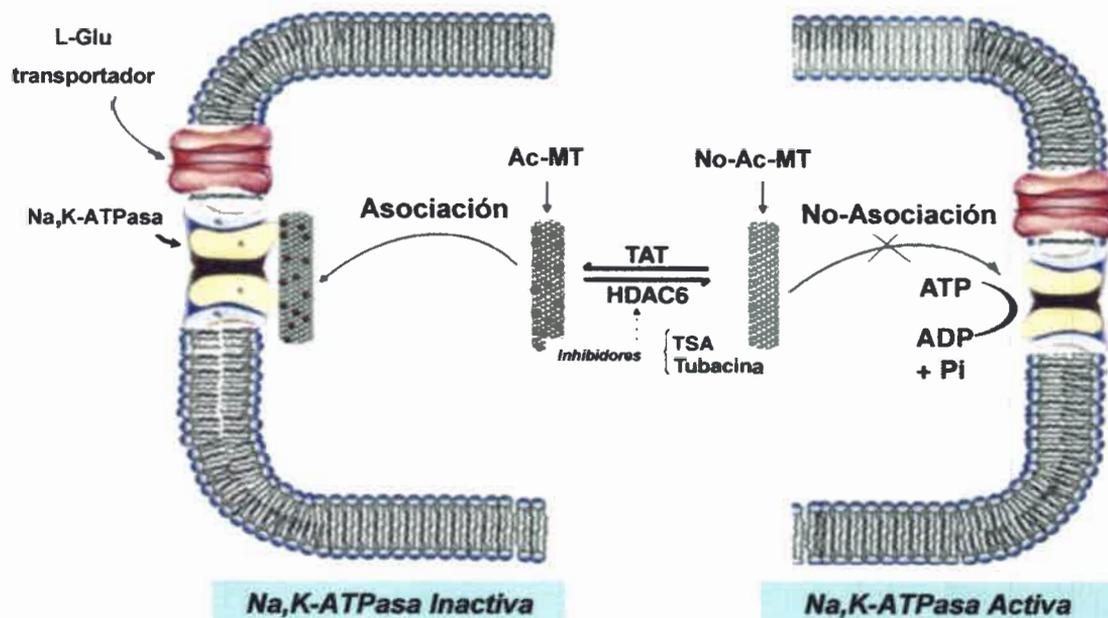


Figura 8: Representación esquemática de la asociación de microtúbulos con NKA de membrana determinada por el estado de acetilación. El balance de las actividades de tubulina acetil transferasa (TAT) y HDAC6 determina la cantidad de microtúbulos acetilados y no acetilados (Ac-MT y No Ac-MT). Los Ac-MT se asocian con las membranas a través de la NKA e inhiben la actividad de la enzima. Los No Ac-MT no se pueden asociar con las membranas y la NKA no es inhibida. La asociación de los microtúbulos con la NKA puede ser liberada por la entrada de L-glutamato. La acción inhibitoria de TSA y tubacina sobre HDAC6 induce aumento del nivel de Ac-MT (Arce y col., 2008).

Estudios realizados en nuestro grupo demuestran que la tubulina acetilada no sólo forma complejos con la NKA sino que también interacciona con otros miembros de la familia de las P-ATPasas (Campetelli y col. 2005; Monesterolo y col., 2008). Demostramos que la H^+ -ATPasa de levaduras interacciona con tubulina acetilada para formar un complejo en el cual la actividad enzimática es inhibida, la incubación de las levaduras con glucosa disocia el complejo y restaura la actividad enzimática. La disociación del complejo por glucosa es inhibido por 2-deoxi-D-glucosa, el cual es un sustrato competitivo para la entrada de glucosa, indicando que la disociación involucra a los transportadores de glucosa. La formación del complejo tubulina/ H^+ -ATPasa también fue demostrada *in vitro* incubando membranas de levaduras y tubulina purificada. Posteriormente demostramos que en *Saccharomyces cerevisiae* existe una serina proteasa Lpx1 que es activada por disminución del pH citosólico cuando las células son

estimuladas por glucosa. Esta proteasa activa disocia el complejo en un proceso donde la tubulina es degradada y la H⁺-ATPasa es activada (Campettelli, 2010).

Por otro lado, demostramos que la tubulina acetilada es capaz de asociarse a la Ca²⁺-ATPasa (PMCA) en vesículas de membrana plasmática (PMVs). La formación del complejo tubulina acetilada/PMCA modifica la actividad de la enzima y el etanol o la calmodulina provocan la disociación de dicho complejo. Esta regulación de PMCA por tubulina acetilada también fue encontrada en células COS, CAD y eritrocitos (Monesterolo 2008). Posteriormente encontramos que, los lípidos que rodean al complejo influyen sobre el efecto que causa la tubulina acetilada sobre la actividad de PMCA. Cuando la enzima purificada es reconstituida en lípidos ácidos la formación del complejo estimula la actividad enzimática, mientras que si la reconstitución se realiza en lípidos neutros el efecto que provoca la tubulina es dependiente de la concentración de tubulina. Estos estudios demuestran que PMCA es regulada por tubulina acetilada y que esta regulación es dependiente de la concentración de tubulina y la composición lipídica que rodea al complejo (Monesterolo y col., 2011).

La interacción reversible de la tubulina acetilada con las enzimas NKA, H⁺-ATPasa y PMCA tiene como finalidad regular sus actividades catalíticas, esto demuestra por primer vez una función para la acetilación de la tubulina. Factores externos como el L-glutamato, glucosa o etanol inducen disociación de los complejos NKA- H⁺- y PMCA/tubulina, respectivamente. Estos pueden ser mecanismos complementarios que llevan a la disociación de los complejos y a la modulación de las actividades ATPasas (Fig. 9). Por otro lado, no se conoce si las moléculas de tubulina que forman complejos con las ATPasas son parte de un microtúbulo o se asocian a las ATPasas como dímeros individuales.

Las actividades de las ATPasas a nivel de membrana son elementos esenciales en la recepción y transmisión de señales. Los activadores endógenos de estas bombas iónicas, como por ejemplo la aducina para la bomba de Na⁺, son importantes factores en la regulación de la señalización. En este contexto la tubulina acetilada es el primer inhibidor endógeno descrito para las ATPasas (Arce y col., 2008).

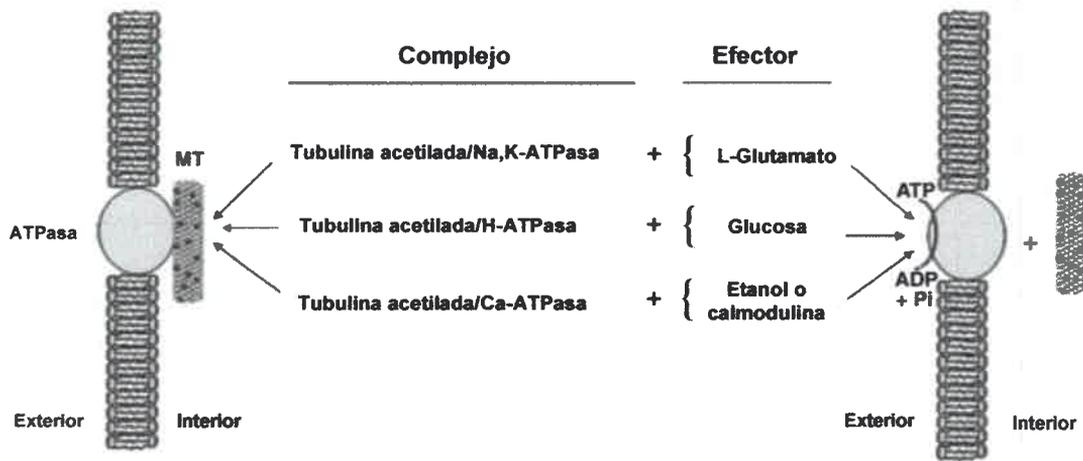


Figura 9: Representación esquemática del efecto de disociación de diversos componentes sobre el anclaje de microtúbulos a la NKA, H⁺-ATPasa y PMCA. Las ATPasas no muestran actividad enzimática cuando se asocian con microtúbulos acetilados. La liberación de los microtúbulos desde la membrana por el tratamiento con distintos efectores resulta en un aumento de la actividad ATPasa (Arce y col., 2008).

La regulación de la actividad NKA es muy importante debido a que muchos procesos fisiológicos incluyendo la transmisión del impulso nervioso, respuesta nutritiva y bombeo de Ca²⁺, dependen del gradiente electroquímico que resulta de la actividad de la enzima. Por otro lado, ciertos procesos patológicos tales como la hipertensión arterial y la alteración en la excreción de Na⁺ por los riñones están relacionadas a desordenes en el transporte activo de iones por la bomba de sodio, con la participación de componentes del citoesqueleto (Arce y col., 2008).

La enzima NKA mantiene el gradiente de sodio entre los compartimientos extra e intracelulares en varios tejidos influyendo en el volumen celular, procesos de absorción en el riñón o en el intestino y excitabilidad en el músculo (Schwartz y col., 1975). En la hipertensión, la inhibición de la NKA aumenta la concentración intracelular de Na⁺ en el miocardio y arteria, provocando aumento de la contracción del miocardio y mayor resistencia periférica. Contrariamente, en el riñón se estimula la bomba de Na⁺, aumenta la reabsorción tubular y la retención de sodio (Rodríguez-Iturbe y col., 2007). A nivel molecular se ha encontrado en pacientes hipertensos que la actividad NKA de eritrocitos está disminuida en un 50 %, en consecuencia se encuentra un alto contenido de Na⁺ intracelular (Sudhakar y col., 1998).

3.6. Hipertensión arterial y la actividad NKA

La hipertensión arterial es una enfermedad multifactorial y un problema de salud en todo el mundo porque constituye el factor de riesgo más importante para la cardiopatía coronaria, enfermedad cerebro vascular, insuficiencia cardíaca, nefropatía terminal y la enfermedad vascular periférica. Se calcula que en nuestro país la tasa de mortalidad a partir de complicaciones adyacentes a la enfermedad corresponde al 4 % de los fallecidos y como causa básica de muerte, la hipertensión arterial es responsable del 37 % de los fallecidos cada año. El envejecimiento de las poblaciones, la urbanización y cambios socioeconómicos del mundo en desarrollo han conducido a un aumento del predominio de la hipertensión. La prevención, la detección, el tratamiento y el control de la hipertensión cumplen un papel crucial en la protección de la enfermedad cardiovascular (Erdine y Aran, 2004).

A nivel fisiológico la presión arterial (PA) es controlada por varios mecanismos. Existen mecanismos neurales y hormonales que reaccionan dentro de segundos o minutos para cambiar el diámetro de los vasos sanguíneos, la resistencia vascular y la actividad cardíaca. Por otro lado hay mecanismos renales que reaccionan dentro de horas o días y restauran la PA principalmente controlando el volumen plasmático. Un aumento de la PA hace que el riñón excrete más sal y agua disminuyendo así el volumen extracelular y plasmático (Khalil, 2006). La hipertensión involucra cambios anormales y persistentes en los mecanismos de control de la PA (Meneton y col., 2005).

Una dieta alta en sal ha sido ampliamente asociada con la hipertensión; un gran conjunto de pruebas relaciona a la sal, la función de los riñones y la hipertensión (Meneton y col., 2005). Una disminución en la capacidad de los riñones para excretar sal puede causar retención de sal y agua, incrementando así el volumen extracelular y plasma y como consecuencia la PA. En individuos de la misma edad, cambios abruptos en la entrada o excreción de sal inducen un gran aumento en la PA y son llamados sal sensible.

La identificación de varios mecanismos moleculares confirma que la sensibilidad a la sal y la PA no está determinada por un simple gen, sino que se debe a la acción combinada de varios genes. Cada uno de estos genes puede afectar uno o más canales, transportadores o enzimas asociadas con los mecanismos de control neural, hormonal, vascular y renal. Análisis de las bases genéticas de la sensibilidad a la sal y la hipertensión han implicado a más de veinte genes en humanos (Luft, 2001).

Los canales epiteliales de Na^+ (CENa) sensibles a amilorida contribuyen a la reabsorción de sodio en la nefrona distal y los genes que codifican para las subunidades α , β y γ de estos canales pueden tener mutaciones o polimorfismos que afectan la excreción de sodio y la PA. Mutaciones en las subunidades β y γ , conocido como Síndrome de Liddle, se asocian con la hipertensión sal sensible, caracterizada por una disminución en los niveles de renina y supresión de la secreción de aldosterona (Khalil, 2006).

En los eritrocitos y linfocitos de individuos con hipertensión esencial, la actividad del intercambiador Na^+/H^+ esta aumentada pero puede no reflejar anormalidades genéticas. Varias hormonas o factores pueden afectar las actividades de los canales tubulares renales y transportadores. El sistema renina-angiotensina-aldosterona tiene un papel principal en el control de la reabsorción de sodio y la PA (Lavoie y col., 2004). El aumento crónico en el plasma de angiotensinógeno puede incrementar los niveles de angiotensina II (ANG II) y causar hipertensión; el receptor de ANG II (AT_1R) media muchos efectos de la ANG II sobre la reabsorción de sodio y secreción de aldosterona. Ratas alteradas genéticamente confirman claramente la función del sistema renina-angiotensina en el control de la PA (Meneton y col., 2005).

Mutaciones en las enzimas involucradas en la síntesis de aldosterona y en la función del receptor del mineralocorticoide también afectan la PA. El hiperaldosteronismo resulta de un gen quimera que pone a la aldosterona sintasa CYP11B2, normalmente expresada en la glomerulosa adrenal, bajo el control de un promotor dependiente de la hormona corticotropica, como consecuencia CYP11B2 es expresada aberrantemente en la fasciculata adrenal donde continuamente produce aldosterona, dando como resultado hipertensión (Kosachunhanun y col., 2003).

El efecto del aumento de presión por una dieta alta en sal puede ser, debido a un aumento en el plasma de un factor que inhibe la actividad NKA (Wang y col., 2003). La expansión aguda de la volemia en perros aumenta la capacidad del plasma para inhibir la actividad NKA, este incremento también es observado en la hipertensión esencial, en ratas SHR (espontáneamente hipertensas) y en ratas hipertensas Milan (Meneton y col., 2005). La naturaleza de la sustancia responsable de la inhibición de la actividad NKA en la hipertensión no es conocida.

Se ha demostrado que deficiencias en la actividad NKA son la causa del incremento en el contenido de Na^+ observado en eritrocitos de pacientes hipertensos (Sudhakar y col., 1998; Kim y col., 2008). La NKA en conjunto con el intercambiador

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, son considerados los responsables de la regulación intracelular de la concentración de Na^+ (de Mendonca y col., 1980; Garay y col., 1980). La actividad reducida de la NKA ha sido observada en eritrocitos de ratas SHR (Rykdelski y col., 1981) y de pacientes humanos con hipertensión esencial (Aderounmu y Salako, 1979). El aumento en el contenido de Na^+ ha sido reportado tanto en eritrocitos (Lijnen y col., 1990, Sudhakar y col., 1998) como en glóbulos blancos (Ambrosini y col., 1981; Boon y col., 1985) de pacientes hipertensos.

Se conoce que la aducina, una proteína del citoesqueleto que se encuentra en la superficie interna de la membrana plasmática, puede modular la actividad NKA en los tubulos renales y los genes que codifican la α -aducina pueden afectar la sensibilidad a la sal y la PA. Se ha encontrado una asociación positiva en la frecuencia de polimorfismo G460W en el gen de la α -aducina en pacientes hipertensos y controles. En ratas Milan hipertensas, un aumento en la actividad NKA esta relacionada a un gen aberrante de la aducina (Meneton y col., 2005; Khalil, 2006).

Se ha observado que ratas SHR o que generan hipertensión por su sensibilidad a NaCl (Dahl sensibles) poseen una inhibición de la NKA y una elevación en la PA de un 30-40 % (Bagrov y col., 2009; Xavier y col., 2009). A pesar de que la hipertensión es un desorden multifactorial, está descrita una correlación entre la disminución de la actividad NKA y el aumento de la PA. Por otro lado, las ratas Dahl y las SHR muestran un aumento de la PA cuando son tratadas con ouabaína, un inhibidor específico de la actividad NKA (Bagrov y col., 2009; Xavier y col., 2009), mientras que en ratas normotensas el efecto del inhibidor sobre la PA no se observa. Estos resultados no permiten concluir si la inhibición de la NKA es una causa primaria de hipertensión, pero reflejan que indudablemente la inhibición de la NKA está involucrada en la hipertensión arterial ya sea como causa o como un agravante que contribuye al aumento de la hipertensión. El hecho de que en ratas normotensas la PA no aumenta por inhibición de la NKA con ouabaína (Xavier y col., 2009), pero si en ratas Dahl y SHR, nos permiten especular que la causa de la inhibición de la actividad NKA por ouabaína es diferente en las ratas hipertensas, probablemente debido a la acción de la ouabaína sobre los dos grupos conocidos de NKA que pueden encontrarse en la célula, el que funciona como bomba iónica y el de señal de transducción (Liang y col., 2007), se conoce que tanto la ouabaína como otros esteroides cardiotónicos tienen diferentes efectos sobre estos dos grupos de ATPasa (Tian y col., 2006).

3.7. Parámetros hemorreológicos de los eritrocitos

A nivel fisiológico se ha descrito que en el desarrollo de la hipertensión pueden producirse anomalías de distinto tipo que ocasionan disfunción endotelial, modificación en la liberación de mediadores químicos, aumento de la resistencia periférica y modificaciones en la perfusión de órganos (Boudier y Ambrosio, 2000). Es clásico definir a la hipertensión como el producto del gasto cardíaco por la resistencia periférica total. Analizando la resistencia periférica podemos entender el papel importante de los factores hemorreológicos a nivel de la microcirculación. En la hipertensión, se observan frecuentemente factores como el aumento de la viscosidad sanguínea o plasmática, aumento de la rigidez de las células sanguíneas y la reducida capacidad de los eritrocitos para circular por capilares de igual o menor diámetro, alteraciones en la capacidad de agregación y desagregación, diferentes comportamientos de las propiedades dinámicas, elevados valores de hematocrito, fibrinógeno o colesterol y triglicéridos (Gobel y col. 1991; Foresto y col., 2000; Alet y col., 2001).



Figura 10: Eritrocitos humanos. Microscopía electrónica de barrido de eritrocitos humanos, coloreadas por software (panel superior). Se puede observar como el eritrocito debe deformarse para atravesar el cordón esplénico hacia el seno esplénico (panel inferior derecho) (Mohandas y Gallagher, 2008).

Todas estas alteraciones tienen una acción hemorreológica con una gran interferencia en la microcirculación que aumenta el riesgo cardiovascular durante la hipertensión (Yamel y col., 1991). En resumen, puede afirmarse que en la hipertensión se generan cambios hemorreológicos en toda la extensión del aparato cardiovascular, quedando por definir si los mismos son causa o consecuencia de la hipertensión (Foresto y col., 2005).

3.7.1. Deformabilidad de los eritrocitos

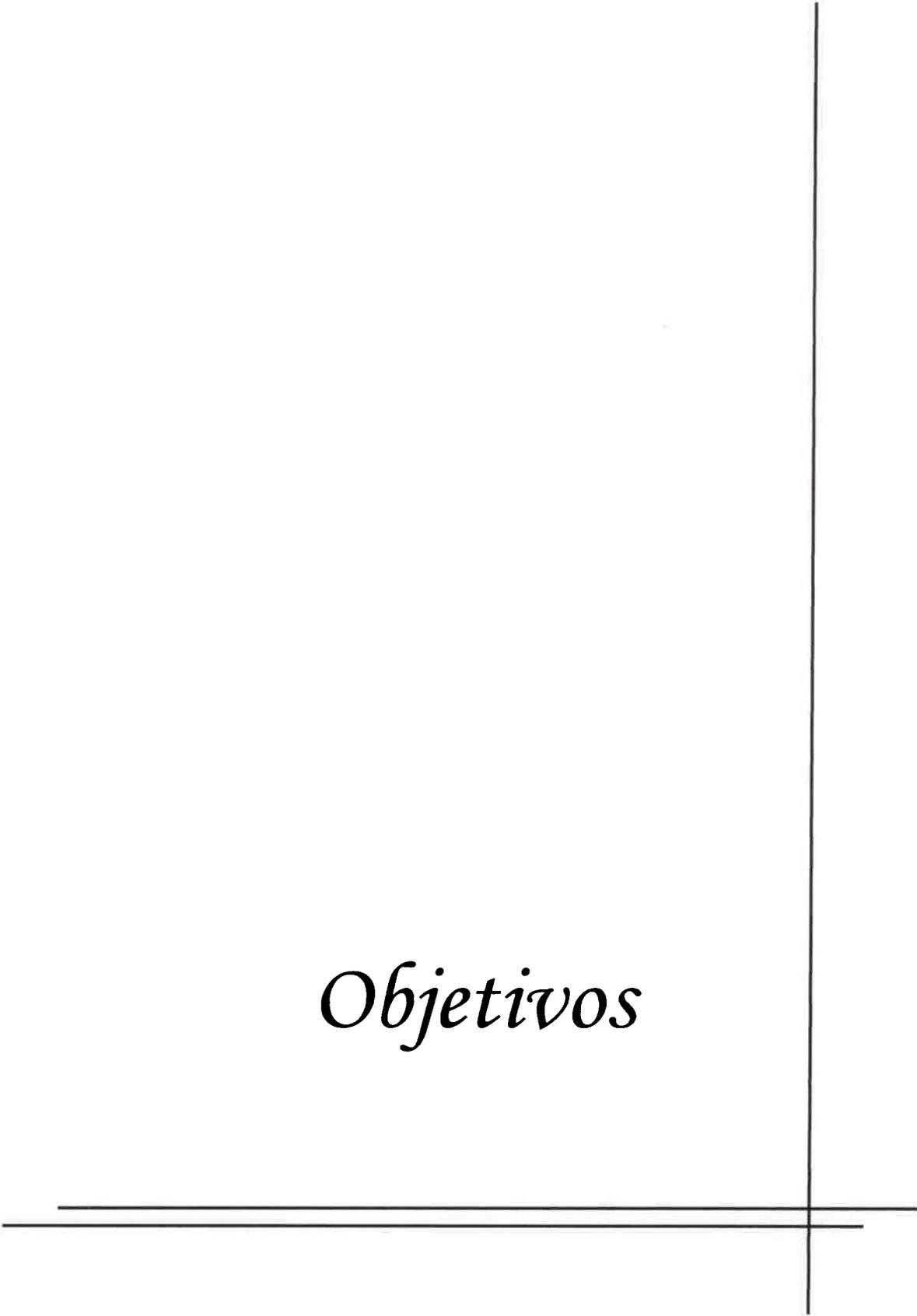
Los eritrocitos son células con forma de discos bicóncavos en ausencia de fuerzas externas. En el ser humano el diámetro de estas células es de 8 μm , cuyo espesor varía de 2 μm en el centro a 2,5 ó 3 μm cerca del borde, su volumen medio es de 90 μm^3 y su superficie de 130 μm^2 . La forma bicóncava facilita la principal función del eritrocito que es el transporte de gases. Además esta forma de disco bicóncavo permite que bajo la acción de fuerzas externas, los eritrocitos puedan deformarse notablemente para atravesar los estrechos capilares de la microvasculatura (Mohandas y Gallagher, 2008). Dado que las membranas biológicas son deformables pero inextensibles, en el eritrocito la mayor superficie de la membrana en relación a su volumen permite que esta célula pueda adoptar otras formas cuando actúan sobre ella fuerzas externas (Savarí, 2007) (Fig. 10).

Los eritrocitos son tanto por sus propiedades mecánicas como por su abundancia los principales determinantes del comportamiento reológico de la sangre. Los principales determinantes de la deformabilidad de estas células son la geometría (relación superficie/volumen), la viscosidad interna (función de la hemoglobina) y las propiedades viscoelásticas de la membrana celular (ATP, calcio, composición lipídica y proteica) (Chabanel y col., 1987; Chien, 1987; Ernst, 1987; Cabrales, 2007).

La membrana del eritrocito esta compuesta por una bicapa fosfolipídica y por debajo de ella se encuentra una red tridimensional de moléculas de espectrina, en conjunto las propiedades de ambos componentes dan como resultado la morfología discoide de los eritrocitos. La bicapa fosfolipídica contribuye a la resistencia y ayuda a mantener el área de superficie, mientras que la red de espectrina o citoesqueleto es el principal responsable de las propiedades elásticas del eritrocito (Diez-Silva y col.,

2010). Estudios por más de tres décadas sobre los glóbulos rojos de individuos sanos y pacientes con desordenes hereditarios han permitido identificar procesos moleculares que subyacen a las funciones normales y aberrantes de la membrana del eritrocito (Mohandas y col., 1983; Mohandas y Chasis, 1993; Mohandas y Evans, 1994; Discher 2000; Delaunay, 2007; Mohandas y Gallagher, 2008). En la hipertensión arterial frecuentemente se observa aumento de la rigidez de las células sanguíneas y reducida capacidad de los eritrocitos para circular por capilares de igual o menor diámetro (Gobel y col., 1991; Alet y col., 2001). Las ratas SHR son un excelente modelo para estudiar la hipertensión esencial humana (Mori y col., 1995; Arata y col., 1999, Ariyoshi y col., 2010). El desarrollo de la hipertensión en SHR comienza a las 3 semanas de edad y se establece completamente entre las 7-8 semanas, de acuerdo con el establecimiento de la hipertensión se ha descrito un aumento en la rigidez de membrana de los eritrocitos de estas ratas (Chabanel y col., 1987). Ariyoshi y col. (2010) demostraron que en SHR hay una marcada disminución de la deformabilidad de los eritrocitos durante el desarrollo de la hipertensión y que esto es mantenido en SHR maduras (18 semanas), esta marcada y sostenida disminución de la deformabilidad no puede ser explicada por un cambio en el volumen corpuscular medio ni en la concentración media de hemoglobina, por lo que se considera que podría ser causada por anormalidades en la membrana del eritrocito. Tal anormalidad reológica influencia las condiciones generales del flujo de sangre y lleva a la oclusión de microvasos en SHR (Aragon-Birlouez y col., 1984; Chabanel y col., 1987; Seki, 1994; Ariyoshi y col. 2010). Sin embargo la información con respecto a la deformabilidad de los eritrocitos es muy limitada. Aunque aun no se conocen los factores moleculares que afectan a la deformabilidad de los eritrocitos de pacientes hipertensos, la disminución de la deformabilidad eritrocitaria se atribuye a alteraciones en la composición lipídica de sus membranas y a modificaciones de la actividad ATPasa o del transporte de Na^+/K^+ (Levenson y Simon, 2000). De acuerdo con esto, y como se mencionó anteriormente, se ha encontrado que en eritrocitos de individuos con hipertensión arterial esencial (Aderounmu y Salako, 1979) y eritrocitos de SHR (Rykdeliski y col., 1981) la actividad NKA está inhibida, aumentando así el contenido intracelular de Na^+ .

Objetivos



Materiales y métodos

5.1. Materiales

Membrana de nitrocelulosa, fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF), nocodazol, paclitaxel (taxol), tritón X-100, SDS, tween-20, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sal de sodio MES, HEPES, trizma base, sefarosa, ATP, NADH, lactato deshidrogenasa, piruvato quinasa, fosfoenolpiruvato, carboxipeptidasa bovina, β -mercaptoetanol, TEMED, marcador de peso molecular, cremophor[®]EL y DMSO se compraron en Sigma Chemical Co. Ácido cítrico anhidro, cloruro de potasio, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, cloruro de magnesio, persulfato de amonio se obtuvieron de Cicarelli. Filtros de nitrato de celulosa de 5 μ m de tamaño de poro se compraron en Microlar. El kit de detección Lumigen[™] PS-3 y film de quimioluminiscencia de alta eficiencia se obtuvieron en GE Healthcare Life Sciences.

5.2. Anticuerpos

Anticuerpo 6-11B-1 desarrollado en ratón específico para tubulina acetilada, DM1A desarrollado en ratón específico para α -tubulina (Piperno y Fuller, 1985), anticuerpo monoclonal 1A2 desarrollado en ratón específico para tubulina tirosinada (Kreis, 1987), anticuerpo policlonal de conejo específicos para α -tubulina, M7-PB-E9 desarrollado en ratón específico para la subunidad α de la NKA (Ball y col., 1982), anticuerpos monoclonales de ratón AP20 y AA6 específicos para MAP2 y MAP1AB respectivamente (Sloboda y col., 1976), anticuerpo anti-LC3 producido en conejo (Fink y col., 1996), PI3 quinasa (Skolnik y col., 1991), IgG de ratón conjugado con peroxidasa, IgG de conejo conjugado con peroxidada (Voller y col., 1976), IgG de ratón conjugado con rodamina (Becker, 1969) e IgG de ratón conjugado con fluoresceína (Amante y col., 1972) son de Sigma Chemical Co. El anticuerpo policlonal ID3 desarrollado en conejo específico para TTL fue gentilmente cedido por el Dr. J. Wehland. El anticuerpo policlonal de conejo específico para tubulina detirosinada (anti-Glu) fue preparado en nuestro laboratorio como lo describieron Gundersen y col. (1984).

5.3. Pacientes

Las muestras fueron tomadas de pacientes femeninos y masculinos del Hospital Regional de Río Cuarto (Córdoba, Argentina). Se tomaron muestras de sangre (3 ml) de pacientes con hipertensión esencial y de pacientes normotensos. Se consideró a un individuo hipertenso cuando su presión sanguínea fue de 160/110 mm Hg para las presiones sistólicas y diastólicas respectivamente. Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos Vacutainer (Becton Dickinson, Plymouth, UK) conteniendo EDTA como anticoagulante y almacenadas a 4 °C por un máximo de 96 horas.

5.4. Animales

Se utilizaron ratas de la cepa SHR como modelo hipertenso y ratas Wistar como controles normotensos a partir de los 28 días de edad. Los animales fueron mantenidos en jaulas con libre acceso al alimento y al agua en una habitación a 25 °C, 55 % de humedad y con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad.

5.4.1. Toma de muestras de sangre en ratas

Las muestras de sangre de rata fueron tomadas de la cola del animal realizando un pinchazo con aguja y recolectando una gota de sangre en un portaobjetos, para ello las ratas fueron inmovilizadas sin anestesiarse. Las muestras de sangre fueron extendidas y sujetas a inmunofluorescencia. Cuando se necesitaron volúmenes de sangre mayores, las muestras fueron obtenidas por decapitación y la sangre se recolectó en un recipiente conteniendo como anticoagulante EDTA dipotásico al 0,3 %.

5.5. Aislamiento de membrana de eritrocitos

Se centrifugó sangre humana (2 ml) durante 5 minutos a 100 x g, el sobrenadante fue eliminado y el pellet fue resuspendido en 6 ml de buffer de lisis (buffer fosfato de sodio 7.5 mM, pH 7.5, conteniendo 1 mM EDTA y 20 µg/ml PMSF). La resuspensión se incubó 15 minutos en hielo y se centrifugó 15 minutos a 70 000 x g. El pellet obtenido fue lavado tres veces con 4 ml de buffer de lisis sin PMSF, finalmente el pellet fue resuspendido en 300 µl de buffer de lisis con PMSF y almacenado a -20 °C hasta su uso.

5.6. Aislamiento de tubulina de diferentes compartimentos subcelulares de eritrocitos bajo condiciones estabilizantes de microtúbulos.

Se centrifugó sangre humana (~ 8 ml) durante 5 minutos a 100 x g a temperatura ambiente, el sobrenadante fue eliminado y el pellet, fuente de eritrocitos, fue dividido en cuatro fracciones de ~ 700 µl cada una. Una fracción fue resuspendida en 3 ml de buffer de lisis con 0.01 mM taxol, 1 % Tween-20 y 5 % SDS e incubada durante 30 minutos en hielo ("tubulina total", ~10 mg proteína/ml). La segunda fracción fue resuspendida en 3 ml de buffer de lisis conteniendo 0.01 mM taxol y 0.5 % Tritón X-100, incubada durante 3 minutos a temperatura ambiente y luego centrifugada durante 10 min a 20 000 x g a 37 °C. El sobrenadante fue recolectado y centrifugado a 100 000 x g durante 30 minutos a 37 °C. El pellet fue recolectado y resuspendido en 300 µl de buffer de lisis ("tubulina microtubular o Sed-tub", ~5 mg proteína/ml). La tercera fracción fue resuspendida en 3 ml de buffer de lisis conteniendo 0.01 mM taxol y centrifugado durante 30 minutos a 100 000 x g a 4 °C. La tubulina contenida en la fracción sobrenadante fue purificada a través de una columna de fosfocelulosa como fue descrito por Shelanski y col. (1973) y Sloboda y Rosenbaum (1982). La columna fue eluída con buffer Mes (100 mM Mes pH 6.8 con el agregado de 1 mM MgCl₂) y se recolectaron 500 µl de tubulina pura ("tubulina citosólica", 1 mg proteína/ml). La cuarta fracción fue procesada como se describe anteriormente para el aislamiento de membrana de eritrocitos, excepto que el buffer de lisis contenía 0.01 mM taxol. El pellet fue resuspendido en 300 µl de buffer de lisis ("tubulina de membrana", 2 mg proteína/ml).

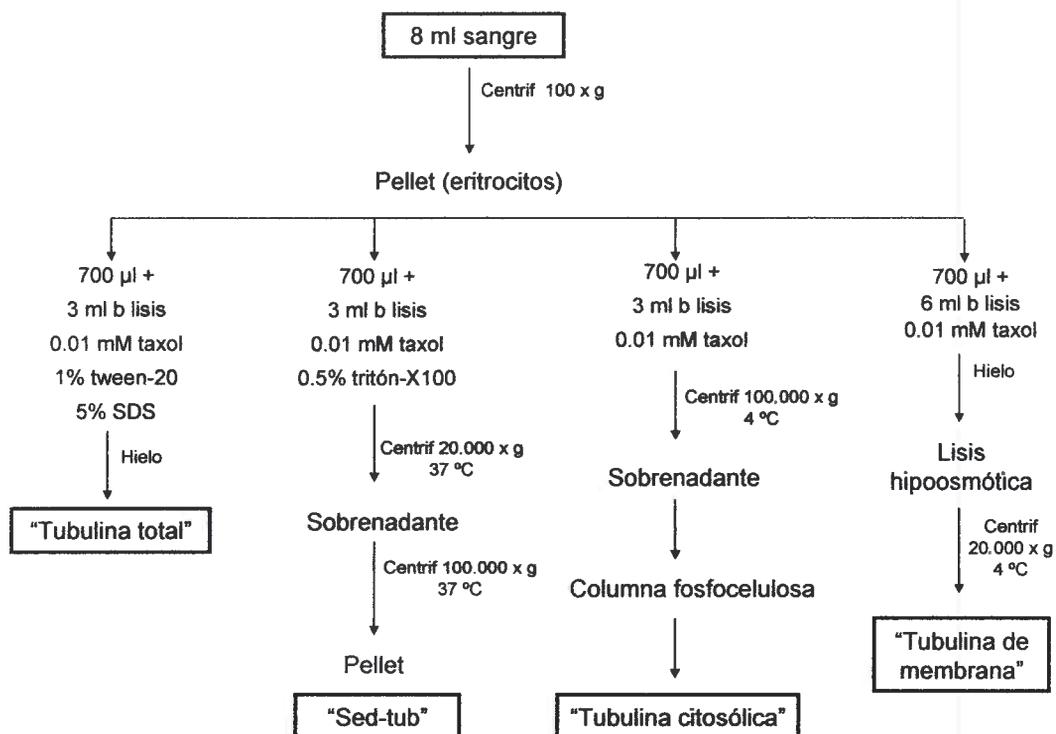


Figura 11: Esquema de centrifugación para la obtención de las diferentes fracciones de tubulina.

5.7. Membrana plasmática de cerebro de rata

Se homogeneizaron cerebros de ratas a 4 °C en un volumen de buffer Tris-sacarosa (10 mM Tris, pH 7.4, conteniendo sacarosa 240 mM) y centrifugados a 1 000 x g durante 10 minutos. El pellet fue descartado y el sobrenadante fue centrifugado a 4 °C durante 30 minutos a 10 000 x g. El pellet fue resuspendido en agua (3 ml/g original de tejido). Esta suspensión se incubó 30 minutos en hielo y luego se centrifugó a 100 000 x g durante 1 hora. El pellet, fuente de membranas, fue resuspendido en TBS en una proporción de 1 ml/g original de tejido y mantenido a 4 °C hasta su uso.

5.8. Preparación de tubulina de cerebro de rata

Cerebros de ratas de 30-60 días fueron homogeneizados a 4 °C en 1 volumen de buffer MEM conteniendo 5 mM de MgCl₂, el homogenato fue centrifugado a 100 000 x g durante 45 minutos. El pellet se descartó y el sobrenadante fue incubado con 40 % de glicerol durante 20 minutos a 37 °C y posteriormente centrifugado a 70 000 x g durante 30 minutos. El pellet, fuente de tubulina, fue resuspendido en 300 µl de buffer MEM.

Cuando se utilizaron preparaciones de tubulina sin MAPs, los pellets de tubulina fueron purificados mediante dos ciclos de ensamblado/desensamblado, seguidos por cromatografía de fosfocelulosa como describieron previamente Shelanski y col. (1973) y Sloboda y Rosenbaum (1982).

Para la obtención de tubulina enriquecida en la iso especie detirosinada, tubulina libre de MAPs fue incubada durante 40 minutos a 37 °C con carboxipeptidasa bovina A, a una concentración final de 10 µg/ml y luego la preparación se mantuvo en hielo hasta el momento de usar.

5.9. Dinámica de microtúbulos

Para determinar la capacidad de ensamblado de la tubulina de ratas Wistar y SHR, tubulina (~5-7 µg) de cerebro de rata de ambas cepas fueron incubadas a 37 °C en buffer MES 100 mM pH 7.4 con 0.2 mM de GTP y 40 % de glicerol. Cada 5 minutos, en un intervalo comprendido entre los 0-60 minutos, se extrajeron alícuotas de la mezcla y se midió la absorbancia a 340 nm para monitorear el crecimiento de los microtúbulos.

Para determinar la capacidad de desensamblado, se obtuvieron microtúbulos a partir de tubulina de cerebro de rata Wistar o SHR incubada a 37 °C durante 60 minutos en buffer MES 100 mM pH 7.4 con 0.2 mM de GTP y 40 % de glicerol. Las preparaciones de microtúbulos se incubaron a 0 °C en buffer MES 100 mM pH 7.4 con 0.2 mM de GTP y 40 % de glicerol y cada 10 minutos se extrajeron alícuotas de la mezcla para medir la absorbancia a 340 nm.

5.10. Obtención de citosol de cerebro de ratas

Cerebros de ratas Wistar o SHR de 8 semanas fueron homogeneizados en un volumen (p/v) de buffer MEM (100 mM Mes, conteniendo 1 mM MgCl₂, pH 6.7). El homogenato fue centrifugado a 100 000 x g durante 1 h a 4 °C y la fracción sobrenadante fue sometida a electroforesis e inmunoblot para analizar el contenido de TTL.

5.11. Obtención de citosol de eritrocitos humanos

Sangre humana (2 ml) fue centrifugada durante 5 minutos a 100 x g, los eritrocitos contenidos en el pellet fueron resuspendidos en 6 ml de buffer de lisis (7.5 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7.5), incubados 15 minutos en hielo para su lisis y centrifugados durante 1 h a 100 000 x g. El sobrenadante, conteniendo la fracción citosólica fue utilizado para realizar diferentes determinaciones.

5.12. Tirosinación/detirosinación de tubulina

Para determinar la capacidad de tirosinación y detirosinación de tubulina de eritrocitos de individuos normotensos e hipertensos, 0.1 ml de citosol de eritrocitos humanos de ambos orígenes fue incubado con 5×10^{-4} mM ATP, 0,02 mM KCl, 2.5×10^{-3} mM MgCl₂ y 0.2 ml de tubulina de cerebro de rata a 37 °C. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se procesaron para la determinación de tubulina tirosinada y detirosinada por inmunoblot usando anticuerpos 1A2 y anti-Glu, respectivamente.

5.13. Ensayo de actividad NKA

La actividad enzimática fue determinada por el método de Salvador y Mata (1996). Membranas de eritrocitos o de cerebro (5-10 μg proteína), dependiendo del experimento, fueron adicionadas a la mezcla de reacción (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 20 mM KCl, 100 mM NaCl, 2.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM EGTA, 0.16 mM NADH, 1 mM fosfoenolpiruvato, 2.5 IU piruvato quinasa y 2.5 IU lactato deshidrogenasa) en un volumen final de 340 μl . La mezcla se dejó 10 minutos a temperatura ambiente y la reacción fue iniciada por la adición de 1 mM ATP. La oxidación del NADH fue medida durante 15 minutos a temperatura ambiente a 340 nm usando un registro espectrofotométrico. Cubetas control fueron preparadas sin enzima o con enzima desnaturalizada por calor. La actividad enzimática fue estimada como la diferencia entre las muestras incubadas en ausencia y presencia de 1 mM ouabaína. Los experimentos fueron realizados por cuadruplicado.

5.14. Inmunofluorescencia

Los eritrocitos fueron fijados sobre portaobjetos con metanol anhidro a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Las muestras fueron lavadas, incubadas con 2 % (p/v) albúmina sérica bovina en NaCl/Pi (PBS) por 30 minutos y sometidas a inmunofluorescencia indirecta como describen DeWitt y col. (1998). Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo M7-PB-E9 desarrollado en ratón (dilución 1:50) para visualizar la subunidad α de la NKA, anticuerpo policlonal anti-tubulina desarrollado en conejo (dilución 1:100) para detectar α -tubulina, anticuerpo DM1A desarrollado en ratón (dilución 1:100) para detectar α -tubulina y anticuerpo ID3 desarrollado en conejo (dilución 1:100) para detectar TTL. IgG de ratón e IgG de conejo ambos conjugados con fluoresceína e IgG de conejo conjugado con rodamina (dilución 1:50) fueron usados como anticuerpos secundarios, respectivamente. Los portaobjetos fueron montados con Fluor Save y observados con un microscopio de fluorescencia Zeiss y con un microscopio confocal LSM 5 Pascal (Zeiss, Jena, Germany), usando filtros de canal dual para visualizar simultáneamente los fluorocromos rodamina e isotiocianato de fluoresceína.

5.15. Preparación de anticuerpo unido a sefarosa

Los anticuerpos 6-11B-1 y anti-fosfatidilinositol 3-quinasa p110, ambos desarrollados en ratón, fueron covalentemente unidos a Sefarosa 4B activada con CNBr como describen Hubbert y col. (2002) con leves modificaciones. Las perlas de sefarosa fueron lavadas con 100 volúmenes de 1 mM HCl a 21 °C. Las perlas empaquetadas (1 ml) fueron mezcladas con anticuerpo (2.5 mg de proteína) en 1 ml buffer de acoplamiento (0.5 M NaCl conteniendo 0.2 M NaHCO₃, pH 8.2). La mezcla fue agitada sobre una plataforma durante 4 h a 21 °C y cargada dentro de una pequeña columna cromatográfica. Los anticuerpos no unidos fueron removidos lavando con 5 ml de buffer de acoplamiento. Las perlas unidas al anticuerpo fueron transferidas a una cubeta y suspendidas en 1 ml de buffer de acoplamiento conteniendo 200 mM glicina, para bloquear los sitios de sefarosa no reactivos. La mezcla fue agitada durante 2 h a 21 °C y la glicina no unida fue removida lavando las perlas con 10 ml de buffer de acoplamiento. Las perlas unidas al anticuerpo fueron lavadas con 1.5 ml de 0.01 mM Tris/HCl, pH 8, conteniendo 140 mM NaCl y 0.025 % NaN₃ y almacenadas a 4 °C hasta su uso (máximo 2 días).

5.16. Inmunoprecipitación

Membranas de eritrocitos (300 µl, 5 mg proteína/ml) fueron solubilizadas con buffer de lisis. Alícuotas de 0.3 ml fueron mezcladas con 0.15 ml de anticuerpo empaquetado anti-tubulina acetilada (6-11B-1) e incubadas 4 h a 20 °C. Las muestras fueron centrifugadas y el material precipitado fue lavado 5 veces con NaCl/Tris-Tritón. Fracciones de 50 µl de perlas empaquetadas fueron resuspendidas en 50 µl de sample buffer, calentadas a 50 °C durante 15 minutos y centrifugadas 1 minuto a 100 x g. Alícuotas (20 µl) de la fracción soluble fueron sometidas a SDS-PAGE. Un control usando anticuerpo fosfatidilinositol 3-quinasa-Sefarosa en lugar del anticuerpo 6-11B-1-Sefarosa fue corrido en paralelo.

5.17. Electroforesis e inmunoblot

Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE sobre un gel de poliacrilamida al 15 % para visualizar las diferentes isoformas de tubulina, TTL y LC3, o en un gel de poliacrilamida al 8% para visualizar NKA, MAP 1 y MAP 2, por el procedimiento de Laemmli (1970). Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con anticuerpo primario DM1A (dilución 1:1000) para la determinación de α -tubulina, 6-11B-1 (dilución 1:1000) para la determinación de tubulina acetilada, 1A2 (dilución 1:1000) para la determinación de tubulina tirosinada, anti-Glu (dilución 1:200) para la determinación de tubulina detirosinada, M7-PB-E9 (dilución 1:250) para la determinación de la subunidad α de NKA, ID3 (dilución 1:1000) para la determinación de TTL, anti-LC3 (1:1000) específico para LC3, AP20 (dilución 1:1000) y AA6 (dilución 1:500) específicos para MAP2 y MAP1 respectivamente. Las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-tritón X-100 y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (IgG de ratón o IgG de conejo). La reacción antígeno-anticuerpo se detectó usando el método del 4-cloro-1-naftol o por quimioluminiscencia. La intensidad de las bandas fue cuantificada usando el programa Scion Image.

5.18. Determinación de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (1976), usando albúmina sérica bovina como control.

5.19. Administración *in vivo* de paclitaxel y nocodazol

Ratas Wistar o SHR fueron inyectadas con paclitaxel 0,02 mM o nocodazol 0,2 mM, ambas drogas administradas intraperitonealmente.

La solución de paclitaxel fue preparada de la siguiente manera, 2 mg de paclitaxel y 0,66 mg de ácido cítrico se disolvieron en 3.3 ml de alcohol etílico y 0.16 ml de CrEL (cremofor). Para cada dosis se tomó una alícuota de 50 μ l y se llevó a un volumen final de 500 μ l con solución fisiológica.

La solución de nocodazol fue preparada con 0.6 mg de nocodazol disuelto en 100 % DMSO. Cada dosis fue de 0.1 ml/rata.

Cada cepa de rata fue separada en diferentes subgrupos para cada una de las drogas administradas: tratamientos, vehículos y controles.

Subgrupo tratamiento: recibió 3 dosis de paclitaxel o nocodazol según corresponda (Wistar o SHR) cada 45 minutos

Subgrupo vehículo: recibió 3 dosis de solución vehículo de la preparación de paclitaxel o nocodazol respectivamente

Subgrupo control: no recibió ningún tratamiento.

5.20. Determinación de la deformabilidad de eritrocitos

La deformabilidad de los eritrocitos se midió siguiendo la metodología descrita por Cabrales (2007). Básicamente la técnica consiste en medir la presión que se debe aplicar a una solución de eritrocitos para que estos atraviesen una membrana con un tamaño de 5 μ m de poro. Dado que los eritrocitos poseen un tamaño “helicoidal” de ~10 μ m, para atravesar la membrana deben deformarse, cuanto menor sea la presión aplicada sobre el sistema mayor es la deformabilidad de los eritrocitos. De esta manera, midiendo la presión necesaria para que los eritrocitos atraviesen la membrana se puede calcular β (Skalak y col., 1983), que es la resistencia al flujo de los eritrocitos a través de la membrana, utilizando la siguiente ecuación:

$$\beta = (P_i / P_0 - 1) \nu / h + 1$$

Donde P_i es la presión inicial necesaria para que la suspensión de eritrocitos en solución fisiológica atraviese la membrana a un flujo determinado, P_0 es la presión de la solución

fisiológica, v es la relación entre el volumen celular y el volumen del poro de la membrana y h es el volumen de empaquetamiento de los eritrocitos.

La determinación de la P_i fue realizada en una solución de eritrocitos provenientes de 1 ml de sangre. Para ello, la sangre fue sometida a los diferentes tratamientos indicados en cada figura y posteriormente los eritrocitos se lavaron dos veces y se resuspendieron en 3 ml de solución fisiológica. Esta suspensión fue perfundida a través de un filtro de policarbonato con un tamaño medio de poro de $5\ \mu\text{m}$ a flujos constantes y sucesivos de 0.5, 0.7, 0.8 y 0.9 ml/min, durante 3 minutos. A cada flujo se determinó la P_i y se calculó β . Dado que hay una relación lineal entre β y el flujo de perfusión podemos definir a ψ como la pendiente de la curva β vs flujo de perfusión. Un aumento de ψ indica menor deformabilidad y viceversa una disminución de ψ mayor deformabilidad.

5.21. Determinación de la presión arterial

5.21.1. Sistema indirecto no invasivo “tail-cuff”

La presión arterial sistólica (PAS) se midió en ratas sin anestesiar, utilizando un equipo AD instruments. Las medidas de PAS se obtuvieron de un promedio de tres mediciones por animal cada vez que se realizó el monitoreo de PAS.

El método aplicado para tomar la presión se basa en la técnica esfingomanométrica utilizada para medir la presión arterial en humanos. Este método permite solamente determinar la presión arterial sistólica mediante la aplicación de una presión externa capaz de detener la circulación y de ésta forma se torna imperceptible el pulso. En el momento en que la presión externa aplicada iguala a la interna se puede determinar la presión arterial sistólica.

En condiciones normales el flujo sanguíneo es del tipo laminar; mayor en el centro del vaso y menor en la periferia. Cuando se interrumpe su circulación no se observa ningún cambio en la medida captada por el sensor del aparato, al ir descomprimiendo el manguito se recobra el flujo pero con características de flujo turbulento. La presión para lograr éste flujo es la mayor que corresponde a la PAS (Fase I de Korotkoff). El equipo AD instruments esta equipado con un manguito

(cuff), que sirve para ocluir el paso de sangre y con un transductor que sirve para seguir la evolución del pulso a lo largo de la medición. Esta señal es captada por el sensor que está colocado en la cola que transduce la señal a un programa a través de dos canales. Durante el procedimiento el cuff se infla hasta que desaparezca la señal del pulso debido a la obstrucción de la vena. El cuff se desinfla automáticamente. El valor de la presión sistólica se mide cuando el flujo se restablece (Whitesall y col., 2004).

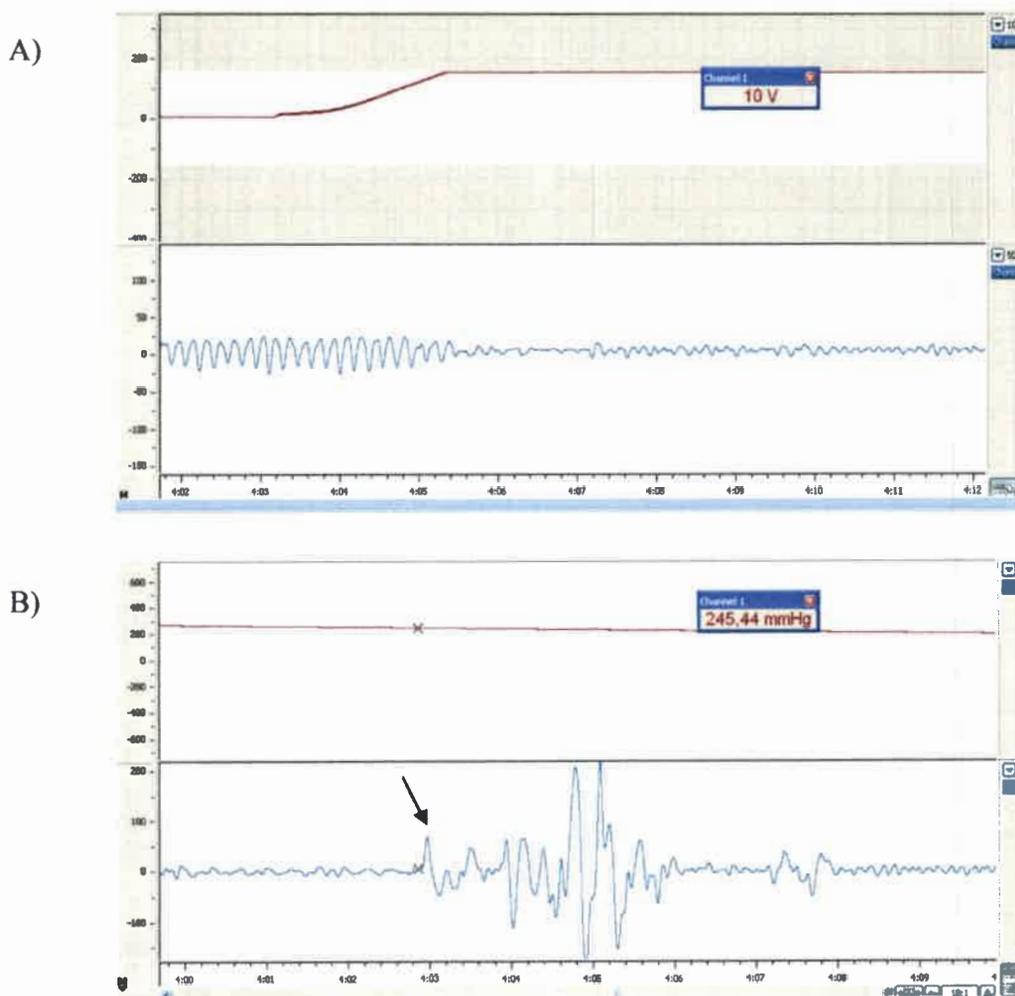


Figura 12: Representación de formas de onda de flujo mostrado en la determinación de la presión arterial a través del método indirecto “tail-cuff”. (A) Interrupción del flujo sanguíneo de tipo laminar, sin cambios en la medida captada por el sensor. (B) Flujo sanguíneo de tipo turbulento, la presión para lograr éste flujo corresponde a la PAS.

5.21.2. Sistema directo

La determinación de la presión arterial también se realizó utilizando el método directo, el cual consiste en la punción de la arteria carótida, las ratas fueron anestesiadas con 5 mg/Kg de ketamina 50 inyectada intraperitonealmente. Luego se realizó una incisión de 2 cm de longitud en sentido cráneo-caudal y se llegó al paquete vasculo-nervioso. Por punción de la arteria carótida se introdujo un catéter 24-G de 19 mm (Abbocath-T), se retiró el mandril y se avanzó la totalidad de la cánula en el interior de la arteria. Una vez observado el retorno de sangre arterial por la cánula, la misma se conectó a un prolongador T-35 de 1 m (Tubatoxi PT-353), el cual se continúa con un transductor de membrana (Hewlett-Packard 21080 A). En el interior del mismo se colocó solución fisiológica más heparina sódica 1/10. El transductor se conectó a un registrador de presión arterial Hewlett-Packard modelo 1280, que registra presión arterial sistólica, diastólica y media (Sabbatini y col., 2003).

5.22. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm S.D. Los test ANOVA y Student-Newman-Keuls fueron utilizados debido a que el número de animales utilizado fue distinto entre los grupos. Las diferencias en los resultados se consideró estadísticamente significativa para $P < 0,05$.

Resultados

6.1. Presencia de tubulina en eritrocitos humanos

Los eritrocitos de vertebrados no mamíferos contienen tubulina distribuida en tres fracciones diferentes. Una fracción citoplasmática no polimerizable, una fracción que forma parte de microtúbulos, los cuales están organizados en una estructura llamada banda marginal (Lee y col., 2007) y una tercera fracción de tubulina asociada a la membrana plasmática. Contrariamente, en eritrocitos humanos la presencia de tubulina se ha demostrado únicamente mediante estudios de proteómica llevados a cabo por Pasini y col. (2006) y Goodman y col. (2007) quienes demostraron que estas células contienen las cadenas de tubulina α -6, β -1 y α -3. Dado que, el anticuerpo DM1A es específico para α -tubulina y que no discrimina entre las diferentes modificaciones post-traduccionales, este anticuerpo es usado para estimar la cantidad de α -tubulina total. Realizando la técnica de SDS-PAGE seguida de western blot revelando con dicho anticuerpo, claramente se observa la presencia de α -tubulina en eritrocitos humanos (Fig. 13 A). Las modificaciones post-traduccionales de tubulina en células eucariotas incluyen detirosinación/tirosinación y acetilación/deacetilación. Para confirmar el hallazgo de tubulina en eritrocitos humanos, los eritrocitos fueron lisados usando buffer hipotónico y sometidos a western blot usando anticuerpos específicos para α -tubulina total (DM1A), β -tubulina (Tub 2.1), tubulina tirosinada (Tub 1A2), tubulina detirosinada (anticuerpo Glu) y tubulina acetilada (6-11B-1). La presencia de bandas revelada con cada uno de estos anticuerpos (Fig. 13A) confirma la presencia de tubulina en los eritrocitos humanos. Experimentos comparativos de western blot demuestran que la proporción de tubulina total, en relación al total de proteínas, fue 9 veces menor en eritrocitos humanos que en cerebro de ratas (datos resumidos en Fig. 13 B). Proporcionalmente la cantidad de tubulina acetilada fue levemente mayor en eritrocitos humanos que en cerebro de rata, sin embargo la proporción de las otras tres isoformas determinadas no fueron significativamente diferentes.

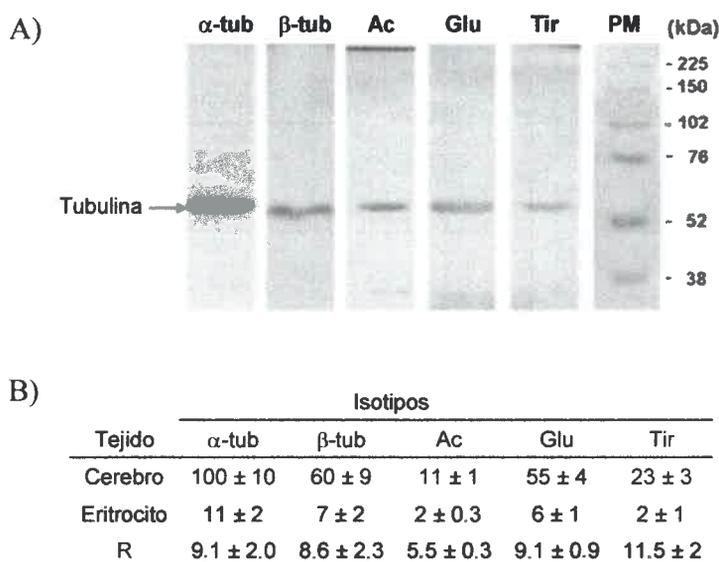


Figura 13: Presencia de tubulina en eritrocitos humanos. Eritrocitos obtenidos de 2 ml de sangre fueron lisados en 3 ml de buffer conteniendo 1 % de Tritón X-100. (A) Una alícuota del lisado (250 μ g de proteínas) fue analizada por SDS-PAGE y western blot usando anticuerpos específicos para α -tubulina total (α -tub), β -tubulina (β -tub), tubulina tirosinada (Tir), tubulina detirosinada (Glu) y tubulina acetilada (Ac). (B) Las bandas de tubulina fueron cuantificadas usando el programa Scion Image, las bandas de α -tubulina total fueron definidas como el 100 %. Los valores son expresados como la media \pm S.D. de tres experimentos independientes. Muestras de homogenato preparadas de cerebros de ratas de 30 días de edad fueron procesadas en paralelo con propósitos comparativos. Las muestras de cerebros no se muestran en (A).

6.2. Distribución de tubulina en eritrocitos humanos

Los estudios previos realizados indican que la tubulina se localiza heterogéneamente dentro del eritrocito. Para analizar la distribución subcelular, se lisaron eritrocitos humanos usando buffer hipotónico, se sometieron a un esquema de centrifugación diferencial (Fig. 14 A) y posteriormente se analizó el contenido de tubulina en cada fracción. Para la obtención de las diferentes fracciones, el lisado se centrifugó a 20 000 x g durante 20 minutos y se obtuvo la fracción sobrenadante (S1) y un precipitado (P1) que contiene la fracción de membrana. La tubulina presente en P1 fue llamada “Mem-tub” (tubulina de membrana). La fracción S1 fue nuevamente centrifugada a 100 000 x g y se obtuvieron 2 nuevas fracciones conteniendo tubulina:

una perteneciente a la fracción sobrenadante (S2), llamada “Sol-tub” (tubulina soluble) y otra fracción correspondiente al precipitado (P2), llamada “Sed-tub” (tubulina sedimentable), ésta fracción P2 o Sed-tub es similar a la banda marginal de microtúbulos encontrada en eritrocitos de no mamíferos. La fracción sobrenadante S2 fue procesada para obtener tubulina soluble libre de hemoglobina. Cada una de las fracciones obtenidas durante este procedimiento (lisado total, S1, P1, S2, P2) fueron sometidas a inmunoblot usando anticuerpo DM1A específico contra α -tubulina total (Fig. 14 B). La suma de la proporción de tubulina en P1 (Mem-tub) + S2 (Sol-tub) + P2 (Sed-tub) puede ser considerada como tubulina total. Los valores obtenidos para cada fracción fueron: 21 ± 3 , 15 ± 4 y 63 ± 7 , respectivamente (Fig. 11 B). Para excluir la posibilidad de que la fracción Sed-tub fuera una fracción de membrana que sedimenta a $100\,000 \times g$ pero no a $20\,000 \times g$, las fracciones P1 (Mem-tub) y P2 (Sed-tub) se resuspendieron con buffer de lisis conteniendo 1 % Tritón X-100, se centrifugaron a $100\,000 \times g$ durante 30 minutos y se les analizó el contenido de tubulina en las fracciones sobrenadante (S3 y S4) y precipitado (P3 y P4) resultantes (Fig. 14 A y B). El tratamiento con detergente solubilizó el 100 % de la tubulina de la fracción Mem-tub (comparar S3 con P3), pero no solubilizó la tubulina de la fracción Sed-tub (comparar S4 con P4), demostrando que la interacción de la tubulina “Mem-tub” con elementos membranosos en naturaleza es diferente a la tubulina de la fracción “Sed-tub”. En conjunto, estos experimentos demuestran que la tubulina está presente en los eritrocitos de mamíferos y que en los eritrocitos humanos la tubulina se encuentra distribuida en al menos tres fracciones diferentes separables por centrifugación diferencial, éstas son las fracciones Mem-tub, Sed-tub y Sol-tub.

La localización de tubulina dentro del eritrocito fue también estudiada usando microscopía de inmunofluorescencia confocal. La localización de la NKA, como un marcador de membrana, fue detectada usando un anticuerpo específico. La tubulina se encontró dispersa en el citoplasma (Fig. 15), en muchas células se observó una zona relativamente brillante en la periferia, sugiriendo que la tubulina se puede concentrar próxima a la membrana. Una cantidad menor de tubulina parece co-localizar con la membrana (Fig. 15C, C’).

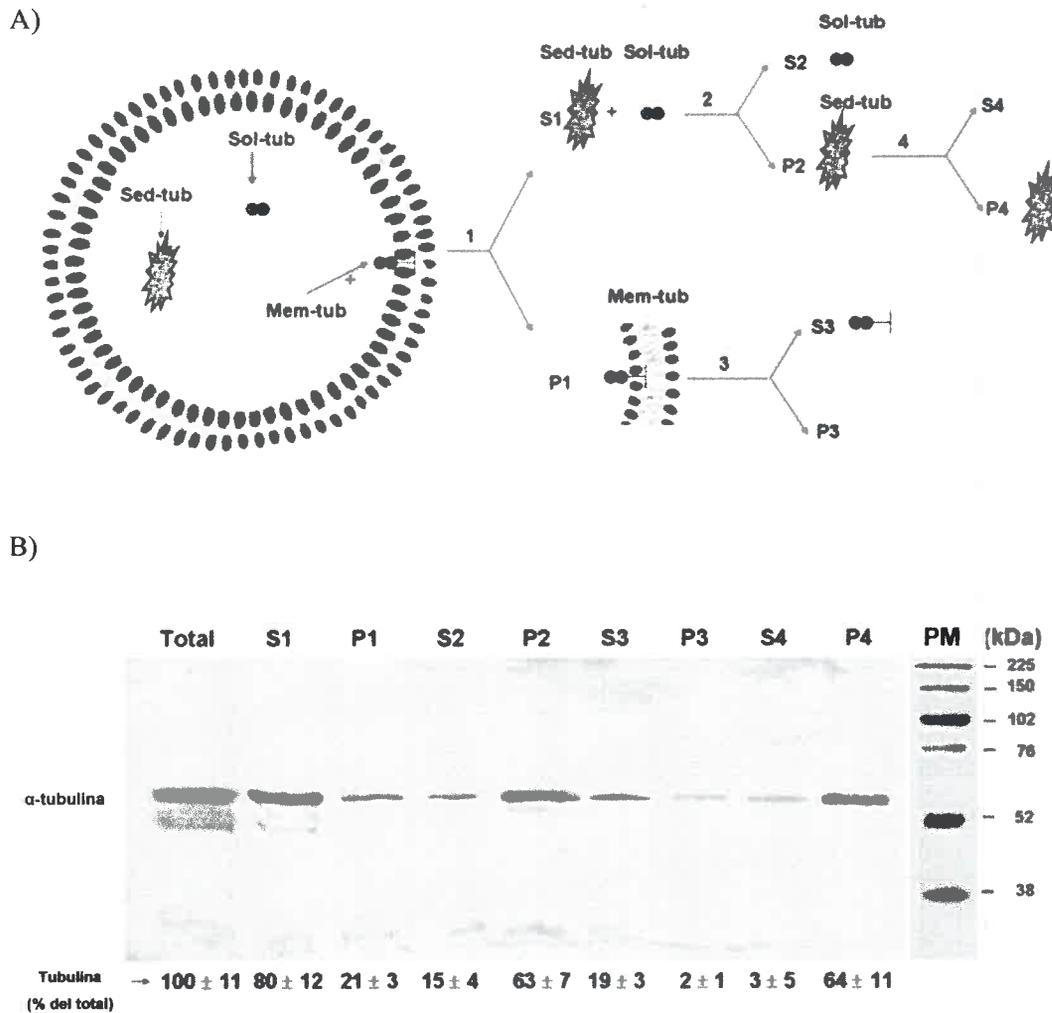


Figura 14: Esquema de centrifugación diferencial para aislar las diferentes fracciones de tubulina de eritrocitos humanos. (A) Eritrocitos obtenidos a partir de 8 ml de sangre humana fueron lisados en buffer hipotónico conteniendo PMSF. El lisado fue centrifugado a 20 000 x g durante 20 min. a 30 °C, el precipitado (P1) se lavó tres veces con 6 ml de buffer de lisis sin PMSF, se resuspendió en 3 ml de buffer de lisis (Mem-tub) y se almacenó a -20 °C. La fracción sobrenadante (S1) fue centrifugada a 100 000 x g durante 30 min a 30 °C, obteniéndose las fracciones sedimentable (P2, conteniendo Sed-tub) y sobrenadante (S2, Sol-tub). La fracción Sol-tub fue cargada en una columna cromatográfica para obtener tubulina soluble libre de hemoglobina. Luego, alícuotas de las fracciones Mem-tub (P1) y Sed-tub (P2) fueron incubadas con buffer de lisis conteniendo 1% de Tritón X-100 y centrifugadas a 100 000 x g durante 30 min a 30 °C. Las fracciones sobrenadante y sedimentable de P1 fueron llamadas S3 y P3 y las de P2 fueron llamadas S4 y P4. (B) Alícuotas de cada fracción, fueron sometidas a inmunoblot e incubadas con anticuerpo DM1A para estimar la cantidad de α -tubulina. La densidad óptica de las bandas de tubulina fueron cuantificadas usando el programa Scion Image y expresadas en unidades arbitrarias. Los valores son la media \pm S.D. de tres experimentos independientes, expresado como porcentaje de la cantidad de tubulina en el lisado total.

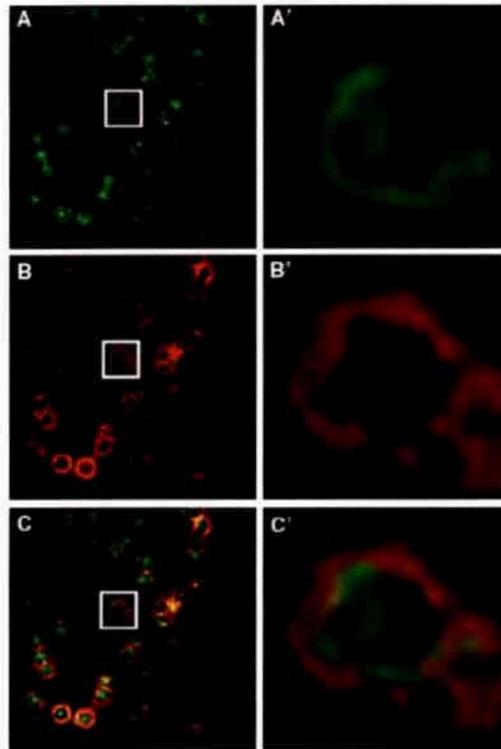


Figura 15: Distribución subcelular de tubulina en eritrocitos humanos. Eritrocitos humanos fueron fijados sobre portaobjetos y analizados por microscopia de inmunofluorescencia confocal usando el anticuerpo DM1A para α -tubulina (verde, A) y el anticuerpo H-300 para la subunidad α de la NKA (rojo, B). (C) Fusión. A', B' y C': aumento de las áreas indicadas en los rectángulos de A, B y C, respectivamente.

*Tubulina y actividad NKA en eritrocitos humanos
de individuos hipertensos*

6.3. Distribución alterada de tubulina en eritrocitos humanos de individuos hipertensos

Para determinar si durante la hipertensión se producen cambios en los eritrocitos a nivel de tubulina, se estudió la presencia y distribución de esta proteína en las tres fracciones distinguibles operacionalmente de eritrocitos humanos de individuos hipertensos. El estudio se realizó en 50 individuos con hipertensión arterial esencial (H) y se analizaron 20 individuos normotensos (N), los cuales fueron considerados controles. La tabla 1 muestra los datos demográficos y hemodinámicos de los grupos N y H.

Tabla 1. Datos demográficos y hemodinámicos de la población en estudio

| Parámetros | H (n = 50) | N (n = 20) | P |
|--------------------------------------|-------------|-------------|--------|
| Edad (años) | 65.4 ± 10.2 | 67.3 ± 9.3 | - |
| Sexo, fem/masc | 32/18 | 9/11 | - |
| Peso (kg) | 77 ± 12 | 74 ± 11 | NS |
| PA sistólica (mmHg) | 161 ± 22 | 127 ± 13 | < 0.05 |
| PA diastólica (mmHg) | 102 ± 10 | 85 ± 11 | < 0.05 |
| Triglicéridos (mg/dl) | 254 ± 12 | 108 ± 7 | < 0.01 |
| Diabetes (si/no) | 0/50 | 0/20 | - |
| Hipercolesterolemia (si/no) | 4/46 | 0/20 | - |
| Tratamiento antihipertensivo (si/no) | 26/24 | - | - |
| Urea (mg/dl) | 35 ± 9 | 33 ± 6 | NS |
| Creatinina (mg/dl) | 0.79 ± 0.15 | 0.72 ± 0.22 | NS |
| Na ⁺ (mM) | 140 ± 12 | 143 ± 9 | NS |
| K ⁺ (mM) | 5 ± 1 | 4 ± 2 | NS |

H paciente hipertenso, N individuo normotenso, NS no significativo

La determinación de tubulina en las diferentes fracciones subcelulares pone en evidencia que, en forma semejante a los controles, esta proteína estuvo presente en todos los compartimentos analizados de eritrocitos de individuos hipertensos. Por otro lado la cuantificación de tubulina en las diferentes fracciones muestra que la cantidad de

tubulina total (sin distinguir compartimento) medida por western blot no difirió significativamente entre los eritrocitos de ambos grupos (Fig. 16 A). Un resultado similar fue encontrado cuando se cuantificaron los niveles de tubulina citosólica en eritrocitos provenientes de individuos hipertensos y normotensos. En contraste, los niveles de tubulina polimerizada que forma parte de la estructura sedimentable (Sed-tub) fueron 65 % menores en eritrocitos de individuos hipertensos comparada con eritrocitos de individuos normotensos. Esta disminución del contenido de tubulina en la fracción Sed-tub de individuos hipertensos, se correlacionó con un aumento del 200 % de tubulina en la fracción de membrana. Por lo tanto, los resultados sugieren que en eritrocitos de individuos hipertensos se produciría una redistribución de la tubulina desde una estructura citoplasmática como lo es la fracción Sed-tub hacia la membrana celular. Estos resultados fueron confirmados por análisis de microscopía de inmunofluorescencia. La inmunofluorescencia indirecta de eritrocitos de individuos normotensos muestra un delgado anillo fluorescente en la periferia de la célula el cual corresponde a la fracción Sed-tub (Fig. 16 B, N y N'). En las mismas muestras analizadas por microscopia confocal se observa la fracción Sed-tub como un anillo de puntos en individuos normotensos, porque esta estructura es un ramillete de microtúbulos que circunscribe la membrana cortical en el plano horizontal de la célula (Cohen y col., 1990; Liao y col., 2000). Por lo tanto, los planos confocales muestran solo algunos puntos de los microtúbulos (Fig. 16 C; N y N'). En eritrocitos de individuos hipertensos, la inmunofluorescencia indirecta muestra una fluorescencia distribuída uniformemente (Fig. 16 B; H y H') y las imágenes confocales muestran fluorescencia en la periferia y el centro de la célula (Fig. 16 C; H y H'), sugiriendo la localización de tubulina en la membrana.

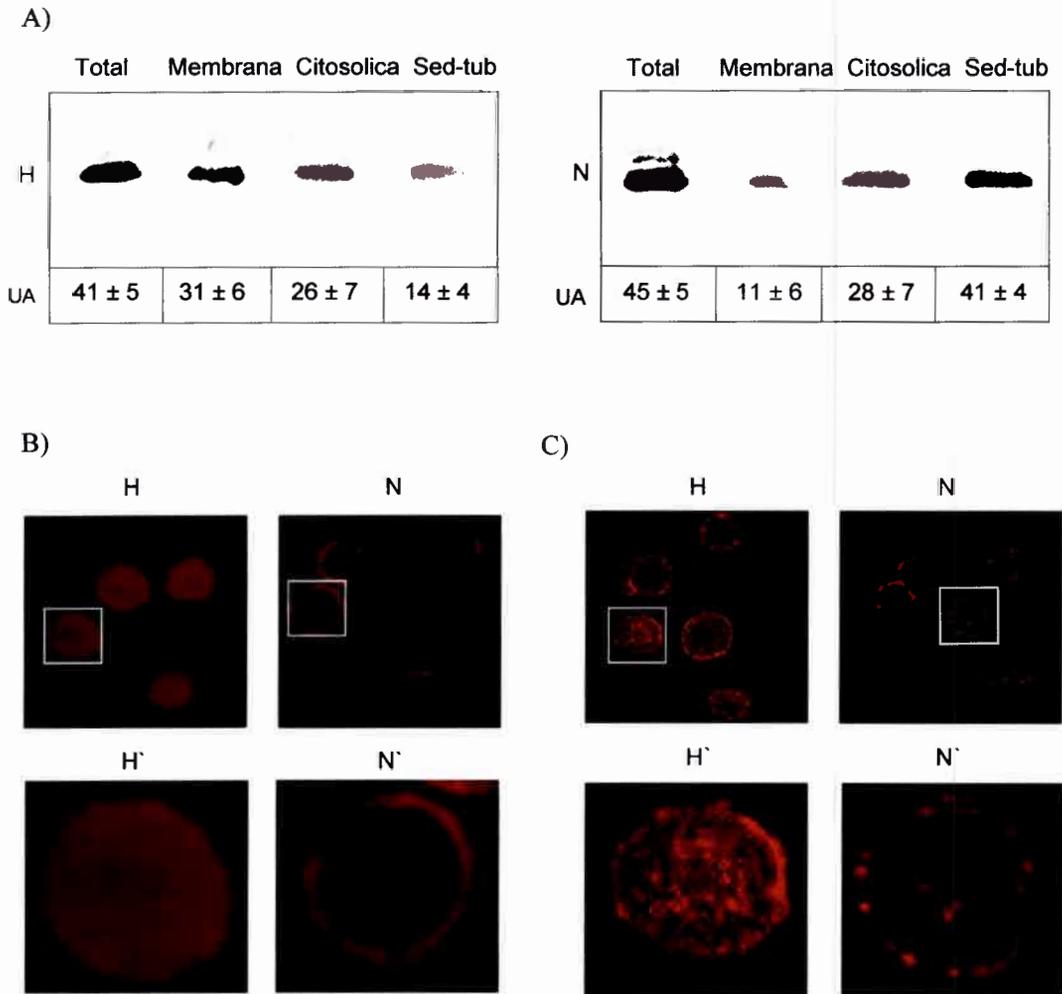


Figura 16: Distribución de tubulina en eritrocitos de individuos hipertensos y normotensos. (A) Se obtuvieron fracciones de tubulina total, de membrana, citosólica y fracción Sed-tub a partir de 2 ml de sangre humana bajo condiciones estabilizantes de microtúbulos como se describe en materiales y métodos. Alícuotas de cada fracción (200 μ g proteína) fueron usadas para determinar la cantidad de α -tubulina por inmunoblot usando el anticuerpo DM1A. Las bandas de tubulina fueron cuantificadas usando el programa Scion Image. Los valores son expresados como unidades arbitrarias (media \pm S.D. de tres experimentos independientes). Eritrocitos de individuos hipertensos (H) y normotensos (N) fueron fijados sobre portaobjetos y analizados por microscopía de inmunofluorescencia indirecta (B) y confocal (C) usando el anticuerpo DM1A. (H') y (N'): ampliación del área indicada por el rectángulo en (H) y (N), respectivamente.

6.4. Contenido de diferentes isotipos de tubulina y actividad NKA en membranas de eritrocitos de individuos hipertensos y normotensos

El próximo objetivo fue determinar si además de la distribución subcelular ocurrían otros cambios a nivel de tubulina durante la hipertensión, para ello la cantidad de tubulina total y de sus diferentes isoformas, tales como tubulina acetilada, tirosinada y detirosinada, fue determinada en membrana de eritrocitos por western blot usando anticuerpos específicos. En este caso la tubulina total se refiere a α -tubulina medida con un anticuerpo (DM1A) que no discrimina entre los diferentes isotipos de la proteína.

| | Tubulina de membrana (Mem-tub) | | | | NKA | |
|---|--------------------------------|-------------|------------|------------|------------|----------------------------------|
| | Total | Tir | Glu | Ac | Actividad | |
| H | | | | | | (nmol Pi / mg prot h) 65 ± 30 |
| | 86.1 ± 7.4 | 61.7 ± 19.2 | 17.4 ± 1.8 | 60.8 ± 3.6 | 42.1 ± 3.2 | |
| N | | | | | | 260 ± 15 |
| | 44.1 ± 0.1 | 22.8 ± 3.1 | 4.1 ± 0.1 | 19.7 ± 2.3 | 39.4 ± 1.6 | |

Figura 17: Contenido de diferentes isotipos de tubulina y actividad NKA en membrana de eritrocitos de individuos hipertensos (H) y normotensos (N). A partir de 2 ml de sangre se extrajeron membranas de eritrocitos humanos como se describe en materiales y métodos. Alícuotas (250 μ g proteína) fueron analizadas por SDS-PAGE y western blot para cuantificar los diferentes isotipos de tubulina y los niveles de NKA, usando anticuerpos específicos. Las bandas fueron cuantificadas usando el programa Scion Image, los valores debajo de las correspondientes bandas son mostrados como unidades arbitrarias (UA) (media \pm S.D. de tres experimentos independientes). Una segunda alícuota de membrana (50 μ g proteína) fue usada para determinar la actividad NKA. Los valores de actividad enzimática son expresados como μ mol Pi / (ml cel x h). Los valores mostrados son la media de tres experimentos independientes. La diferencia entre los grupos H y N para cada isoforma de tubulina y actividad NKA fue estadísticamente significativa ($P < 0.01$).

En forma semejante a lo observado para tubulina total (Fig. 16 A), los niveles de todas las isoformas analizadas fueron mayores en la membrana de eritrocitos de individuos hipertensos comparada con las membranas de individuos normotensos. Sin embargo, en la cuantificación de las bandas se puede observar que el aumento en los niveles de tubulina acetilada y detirosinada fue significativamente mayor que para tubulina total (Fig. 17), este hecho refleja un enriquecimiento de estas isoformas en la membrana de eritrocitos de individuos hipertensos.

En las mismas muestras se midió la cantidad de NKA y se cuantificó su actividad. Los análisis por western blot muestran que la cantidad de la enzima no fue significativamente diferente entre las membranas de eritrocitos de individuos hipertensos y normotensos, sin embargo, la actividad NKA fue 75 % menor en la membrana de individuos hipertensos (Fig. 17).

6.5. Cuantificación del complejo tubulina acetilada/NKA en membrana de eritrocitos

Dado que resultados previos de nuestro laboratorio muestran que la tubulina acetilada puede formar un complejo con la NKA en diferentes sistemas (Casale y col., 2001; 2003; 2005), se propuso determinar si el desplazamiento de la tubulina desde la fracción “Sed-tub” a la membrana podría ser correlacionado con un aumento en la formación del complejo tubulina acetilada/NKA y con la inhibición de la actividad enzimática. Para ello, se determinó la cantidad de complejo en membrana de eritrocitos de individuos hipertensos y normotensos utilizando la técnica de inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-tubulina acetilada (6-11B-1) unido a perlas de sefarosa. La cantidad de NKA en el precipitado fue analizada por western blot usando un anticuerpo específico (M7-PB-E9). La cantidad de NKA inmunoprecipitada fue mayor en eritrocitos de individuos hipertensos (Fig. 18 B, línea H) que en individuos normotensos (Fig. 18 B, línea N), indicando que en membrana de eritrocitos de individuos hipertensos hay mayor cantidad del complejo tubulina acetilada/NKA. La enzima no precipitó cuando las perlas de sefarosa se unieron a un anticuerpo irrelevante como lo es el anticuerpo CI, específico para fosfatidilinositol 3-quinasa (Fig. 18 B, línea C1). El análisis por western blot de las fracciones no precipitadas muestra resultados

consistentes con el anterior, ya que se puede observar un mayor contenido de NKA en los sobrenadantes de individuos normotensos, lo cual demuestra que en estos individuos la enzima no está formando parte del complejo con tubulina acetilada (Fig. 18 C). El porcentaje de NKA total asociada con tubulina acetilada en membrana de eritrocitos de individuos hipertensos fue ~83 %, pero solo ~30 % para individuos normotensos.

La mayor cantidad del complejo tubulina acetilada/NKA en individuos hipertensos fue confirmada por experimentos de co-localización. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal de las doble inmunofluorescencias muestran en eritrocitos de individuos hipertensos un intenso color amarillo en la fracción de membrana indicando una significativa co-localización entre la NKA y la tubulina de membrana de (Fig. 18 D, H y H'). En contraste, en los eritrocitos de los controles normotensos la fracción de membrana se observa enteramente teñida de color rojo, correspondiente a la coloración de la NKA, indicando que no existe co-localización entre la enzima y la tubulina que en esta condición se observa en el citosol (Fig. 18 D, N y N').

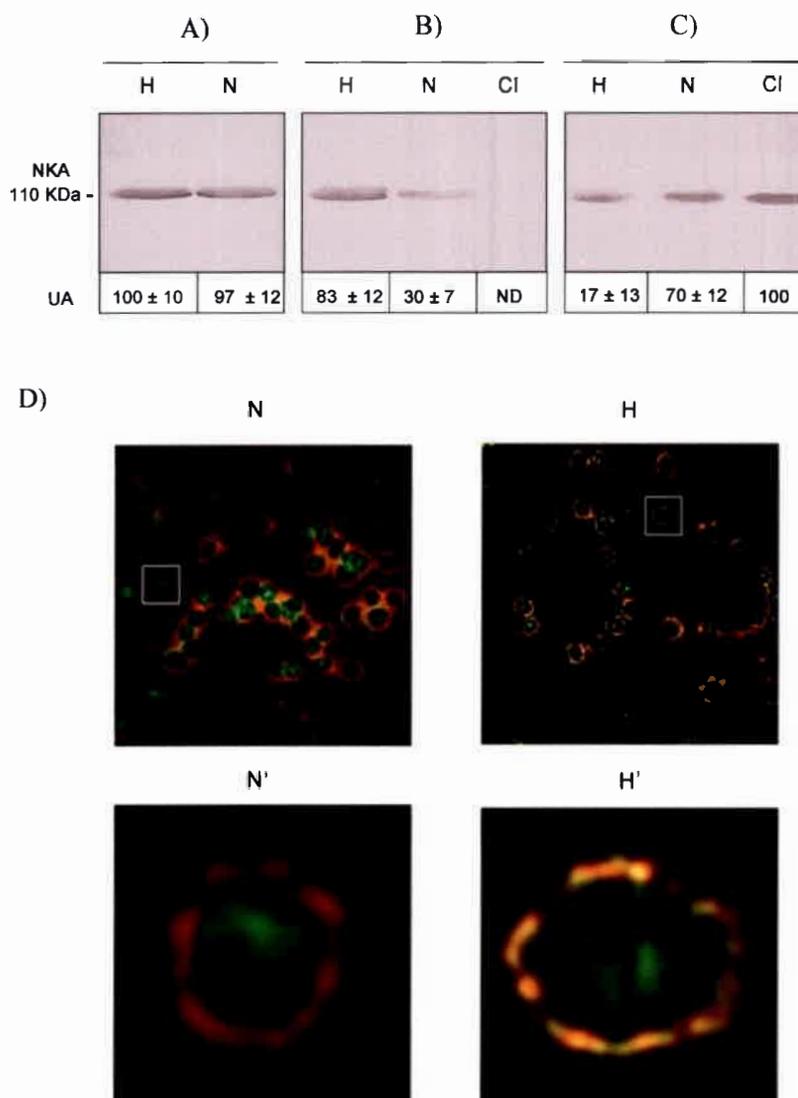


Figura 18: Complejo tubulina acetilada/NKA en membranas de eritrocitos de individuos hipertensos (H) y normotensos (N). (A) Membranas de eritrocitos de individuos normotensos e hipertensos fueron solubilizadas con 0.5 % Tritón X-100 y analizadas por inmunoblot con el anticuerpo M7-PB-E9, específico para NKA. (B) Las membranas solubilizadas en detergente fueron inmunoprecipitadas con sefarsa unida al anticuerpo 6-11B-1, específico para tubulina acetilada, o anticuerpo CI, específico para fosfatidilinositol 3-quinasa como control. Los inmunoprecipitados fueron analizados por inmunoblot con M7-PB-E9. (C) Fracción sobrenadante de la inmunoprecipitación de B. Igual cantidad de proteínas de membrana fue sembrada en todas las líneas. Las bandas de NKA fueron cuantificadas usando el programa Scion Image. Los valores, correspondientes a la media \pm S.D. de tres experimentos independientes son expresados como unidades arbitrarias y se muestran en los paneles inferiores de A, B, y C. ND, no detectado. (D) Eritrocitos de individuos normotensos (N) e hipertensos (H) fueron fijados sobre portaobjetos y sujetos a doble inmunofluorescencia usando anticuerpos específicos para NKA (rojo) y para α -tubulina (verde). La co-localización se observa en amarillo. (N') y (H'): aumento del área indicada por el rectángulo en (N) y (H), respectivamente.

6.6. Tubulina sedimentable y actividad NKA en eritrocitos

El menor contenido de tubulina en la fracción Sed-tub de eritrocitos de individuos hipertensos comparado con normotensos (Fig. 16) podría ser consecuencia de la translocación de tubulina desde la fracción Sed-tub hacia la membrana. Además, puesto que las membranas de eritrocitos de individuos hipertensos contienen mayor cantidad de tubulina acetilada y detirosinada (Fig. 17 A) y que estos isotipos de tubulina son considerados “marcadores” de estabilidad microtubular, se sugiere que la fracción Sed-tub de eritrocitos de individuos hipertensos es más estable que en los individuos normotensos. Para probar esta hipótesis, se determinó la sensibilidad de la fracción Sed-tub a la depolimerización por nocodazol (agente desensamblante de microtúbulos). Para ello, se trataron muestras de sangre de individuos hipertensos y normotensos con nocodazol durante diferentes períodos de tiempo, posteriormente la tubulina que permaneció polimerizada en la fracción Sed-tub fue cuantificada. Encontramos que la fracción Sed-tub de eritrocitos de individuos normotensos fue progresivamente desensamblada, mientras que en los individuos hipertensos esta estructura permaneció prácticamente intacta (Fig. 19), estos resultados sugieren una mayor estabilidad de la fracción Sed-tub en individuos hipertensos, probablemente relacionada a los elevados niveles de tubulina detirosinada y acetilada observados en las membranas de los eritrocitos de los individuos hipertensos (Fig. 17).

Dado que la actividad NKA es menor en membranas de eritrocitos de individuos hipertensos, habría una relación inversa entre la estabilidad de la fracción Sed-tub y la actividad NKA. Para investigar si este resultado es una relación causal, se realizaron dos experimentos: 1) se indujo la estabilidad de la fracción Sed-tub con taxol en eritrocitos normotensos, para simular la situación observada en eritrocitos hipertensos y 2) se trataron eritrocitos hipertensos con nocodazol, para despegar la tubulina de membrana, condición similar a un eritrocito normotenso. En ambos casos se midió la actividad NKA de membrana.

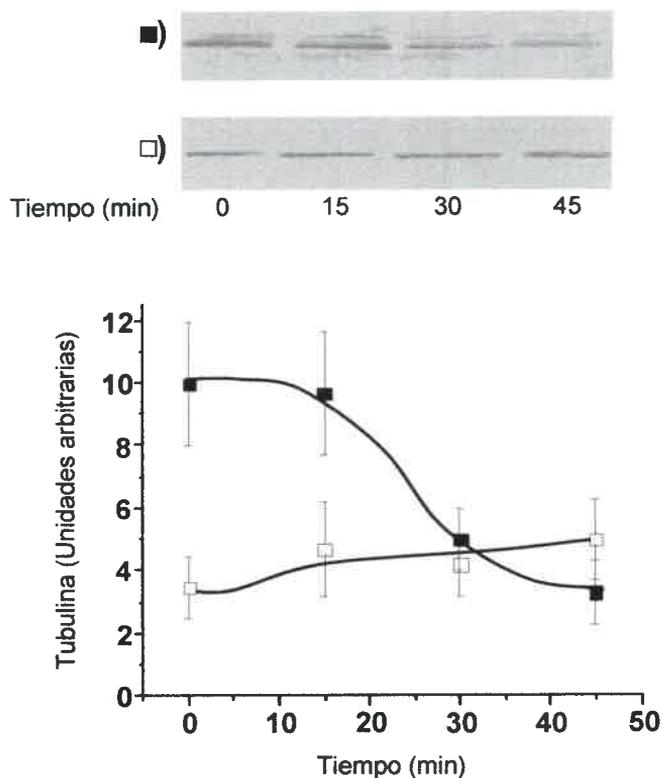


Figura 19: Estabilidad de la fracción Sed-tub en eritrocitos de individuos hipertensos. 2 ml de sangre de individuos hipertensos (□) y normotensos (■) fueron incubados con nocodazol 0.05 mM durante los tiempos indicados. Luego los eritrocitos fueron aislados por centrifugación y la fracción Sed-tub fue obtenida bajo condiciones estabilizantes de microtúbulos como se describe en materiales y métodos. El contenido de α -tubulina de la fracción Sed-tub fue analizada por inmunoblot con el anticuerpo DM1A. El panel superior muestra las bandas de tubulina de un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Las bandas fueron cuantificadas y los valores (unidades arbitrarias) fueron graficados en función del tiempo de incubación con la droga y se muestran en el panel inferior. Los datos son la media \pm S.D. de tres experimentos independientes.

Los resultados muestran que la estabilización de la fracción Sed-tub de eritrocitos normotensos por taxol estuvo acompañada por un aumento de los niveles de tubulina de membrana, tal como se observa por microscopía de fluorescencia (Fig. 20 A). Este aumento fue de 2.4 ± 0.1 veces con respecto al control sin tratamiento (Fig. 20 C). Cuando se analizaron los niveles de las isoformas de tubulina acetilada y detirosinada en la fracción de membrana (Fig. 20 C) se observó un aumento aún mayor, 3.7 ± 0.2 y 5.4 ± 0.1 , respectivamente, sugiriendo nuevamente un enriquecimiento de estos isotipos

de tubulina en la membrana. Finalmente, el tratamiento con taxol resultó en una disminución de un 60 % de la actividad NKA. Todos los valores obtenidos luego del tratamiento con taxol de los eritrocitos de individuos normotensos fueron similares a los observados en eritrocitos de individuos hipertensos.

En contraste, las imágenes de las inmunofluorescencias muestran que luego del tratamiento de eritrocitos hipertensos con nocodazol la tubulina fue desplazada de la membrana (Fig 20 A), en efecto, la cuantificación de los diferentes isotipo de tubulina por western blot, muestran cantidades de tubulina en la membrana significativamente menores que los controles sin tratamiento y similares a los observados para eritrocitos normotensos (Fig. 20 C). En concordancia, se observó un aumento del 110 % en la actividad NKA (Fig. 20 B).

En conjunto los resultados mostrados en las figuras 19 y 20 sugieren que la estabilidad de la fracción Sed-tub de los eritrocitos estaría influenciando el contenido de la tubulina de membrana y consecuentemente la actividad NKA.

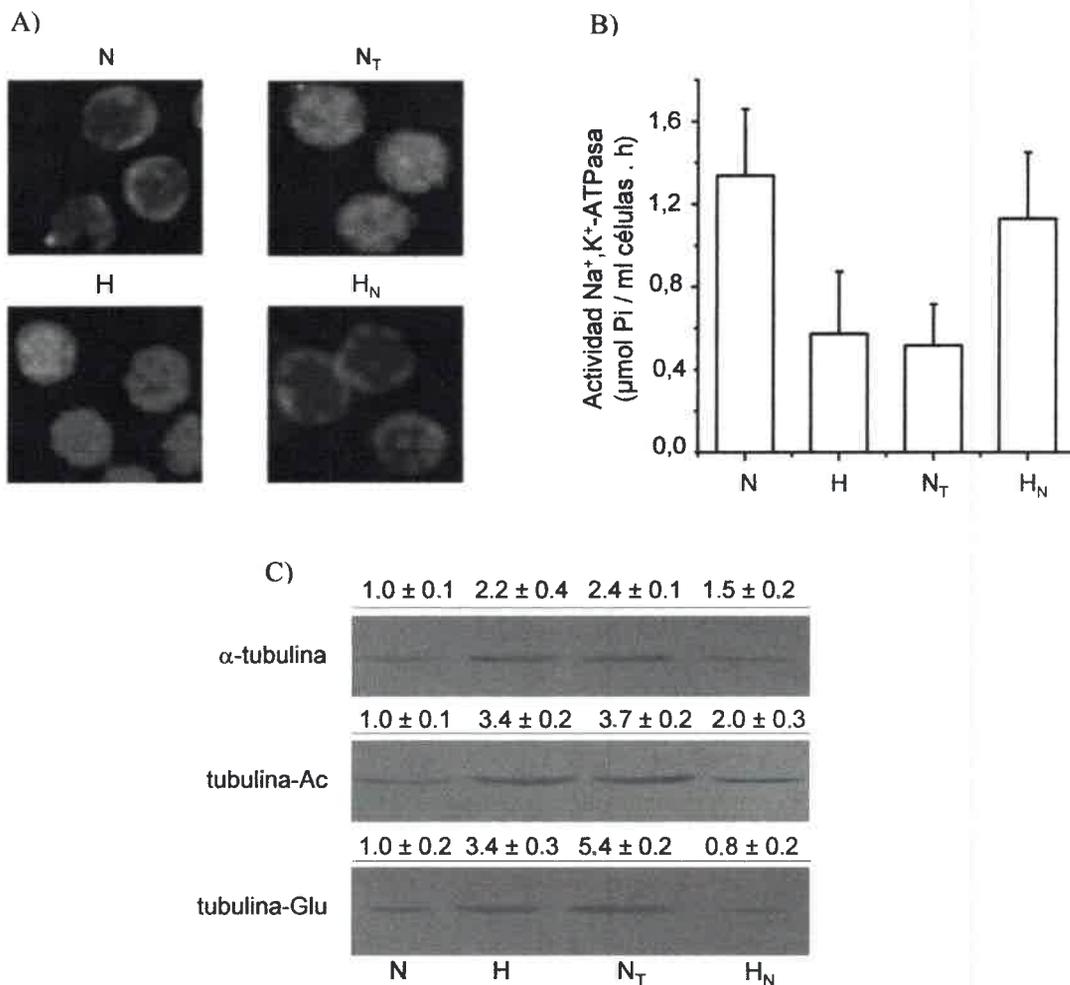


Figura 20: Efecto del taxol y nocodazol sobre el contenido de los diferentes isotipos de tubulina en membrana y la actividad NKA de eritrocitos de individuos hipertenso y normotensos. Sangre de individuos normotensos fue incubada en presencia (N_T) o ausencia (N) de taxol 5×10^{-3} mM y sangre de individuos hipertensos fue incubada en presencia (H_N) o ausencia (H) de nocodazol 0.05 mM, durante 2 h a 37 °C. La sangre luego fue centrifugada a 100 x g por 10 min y los eritrocitos se resuspendieron en suero libre de drogas y se incubaron durante 1 h a 37 °C. (A) Los eritrocitos fueron fijados sobre portaobjetos y se analizó la distribución de tubulina por inmunofluorescencia indirecta usando el anticuerpo DM1A. (B) Se obtuvieron membranas de eritrocitos y se determinó la actividad NKA como se describe en materiales y métodos. Los datos son la media ± S.D. de tres experimentos independientes y se expresan como $\mu\text{mol Pi}/(\text{ml cel} \times \text{h})$. (C) Se determinaron los niveles de α -tubulina, tubulina acetilada y tubulina detirosinada en la membrana de los eritrocitos. Las bandas se cuantificaron y los valores, expresados como unidades arbitrarias se muestran debajo de cada banda. Los datos corresponden a la media ± S.D. de tres experimentos independientes.

Tubulina detirosinada y actividad NKA en la hipertensión

6.7. Inhibición de la actividad NKA por tubulina detirosinada

Previamente en nuestro laboratorio se ha demostrado que la acetilación de la tubulina es esencial para la interacción de esta proteína con la NKA (Santander y col., 2006), sin embargo no se conoce si otras modificaciones postraduccionales de tubulina están implicadas en la regulación de la actividad de la enzima.

Debido a que en membranas de eritrocitos de individuos hipertensos no sólo la tubulina acetilada está aumentada sino que también la tubulina detirosinada presenta un aumento en mayor proporción con respecto a la tubulina total (Fig. 17), se planteó como hipótesis que la tubulina detirosinada podría tener un papel importante en la regulación de la actividad NKA. Para evaluar esto, determinamos la actividad de la enzima en membranas de cerebro de rata pre-tratadas con dos preparaciones diferentes de tubulina, ambas preparaciones con similar contenido de tubulina total y acetilada pero con diferente contenido de tubulina detirosinada, para lograr esto, una de las preparaciones fue previamente tratada con carboxipeptidasa bovina, de esta manera se incrementó en 5 veces el contenido de tubulina detirosinada (Fig. 21 A).

Como se muestra en la Fig. 21 B, la preparación de tubulina con alto contenido de tubulina detirosinada fue capaz de inhibir el 50 % de la actividad NKA con 50 μ g de tubulina/ml, mientras que para lograr el mismo porcentaje de inhibición con la preparación de tubulina con bajo contenido de tubulina detirosinada fue necesario utilizar 200 μ g tubulina/ml. Estos resultados sugieren que aunque la acetilación es esencial para la interacción de la tubulina con la NKA, el estado de detirosinación de la tubulina tendría un papel importante en la regulación de la actividad enzimática. Por lo tanto, alteraciones en el ciclo de tirosinación/detirosinación podrían provocar las modificaciones observadas en la actividad NKA de individuos hipertensos.

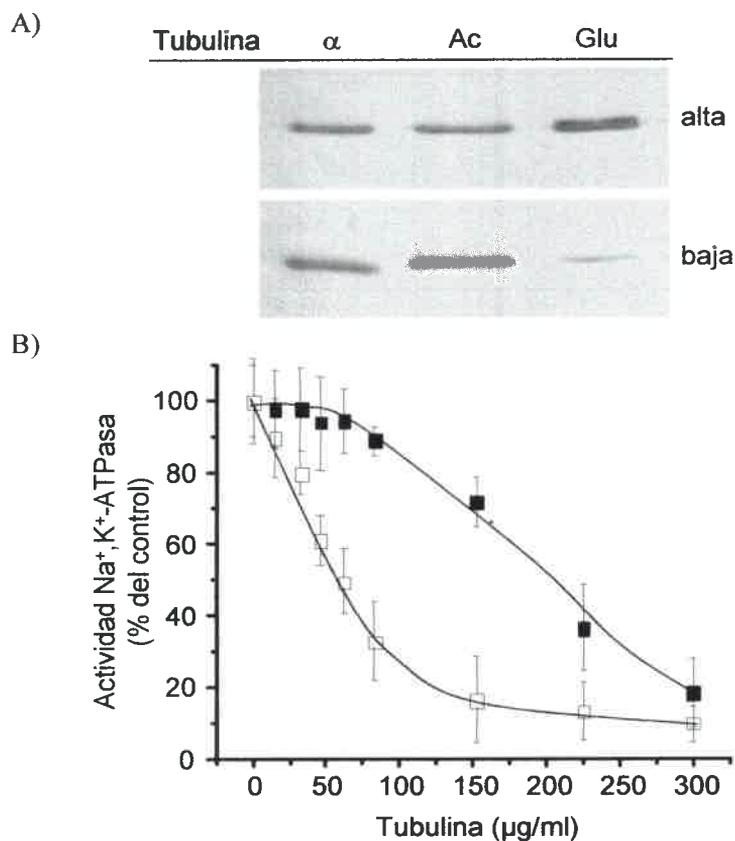


Figura 21: Inhibición de NKA por tubulina detirosinada. (A) Cantidades idénticas de tubulina de ambas preparaciones (tubulina total) se utilizaron para el análisis de los isotipos acetilado y detirosinado por inmunoblot. Las bandas de tubulina pertenecen a un experimento representativo de tres experimentos independientes. (B) La actividad $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPasa}$ fue medida por el método de oxidación del NADH. Antes de la adición de ATP, el sistema fue preincubado a 37°C por 25 min en presencia de diferentes preparaciones de tubulina a las concentraciones indicadas en la figura. Se utilizaron dos preparaciones de tubulina con diferente contenido del isotipo detirosinado, una preparación con bajo contenido del isotipo detirosinado, baja (■), obtenida a través de purificación estándar de tubulina de cerebro de rata y una preparación con alto contenido del isotipo detirosinado, alta (□), la cual se obtuvo por incubación de la preparación anterior durante 40 min a 37°C con carboxipeptidasa bovina a una concentración final de $10 \mu\text{g/ml}$. Los datos se expresan como % del control y corresponden a la media \pm S.D. de tres experimentos independientes.

6.8. Ciclo de tirosinación/detirosinación en eritrocitos de individuos hipertensos y contenido de tubulina tirosina ligasa (TTL)

Debido a que las membranas de eritrocitos de pacientes hipertensos presentan un alto contenido de tubulina detirosinada y que probablemente esta tubulina se origina por una translocación a la membrana de la tubulina que forma parte de la fracción Sed-tub, se propuso investigar la capacidad de tirosinación/detirosinación de la fracción citosólica de eritrocitos humanos de individuos hipertensos. Este análisis se llevó a cabo también en cerebro de rata.

6.8.1 Eritrocitos humanos

Para los experimentos con eritrocitos humanos, se incubaron preparaciones de tubulina purificada con la fracción citosólica de eritrocitos de individuos hipertensos y normotensos. A diferentes tiempos se extrajo una alícuota, la cual se utilizó para cuantificar el contenido de tubulina tirosinada y detirosinada. Como se observa en la figura 18 el extracto citosólico de los eritrocitos de individuos hipertensos tiene menor capacidad de tirosinar tubulina comparado con el extracto citosólico de individuos normotensos. De hecho, en la incubación de tubulina con la fracción citosólica de individuos hipertensos los niveles de tubulina detirosinada aumentaron más de 12 veces, mientras que en la incubación con citosol de individuos normotensos estos niveles no fueron significativamente modificados (Fig. 22 A). Cuando se analizaron los niveles de tubulina tirosinada, el segundo isotipo de tubulina implicado en el ciclo tirosinación/detirosinación, no se observaron modificaciones significativas en los niveles de este isotipo cuando la tubulina se incubó con la fracción citosólica de eritrocitos de individuos normotensos, pero los niveles de tubulina tirosinada disminuyeron significativamente cuando la tubulina se incubó con extracto de individuos hipertensos (Fig. 22 B), en concordancia con el aumento de tubulina detirosinada observada en la figura 22 A.

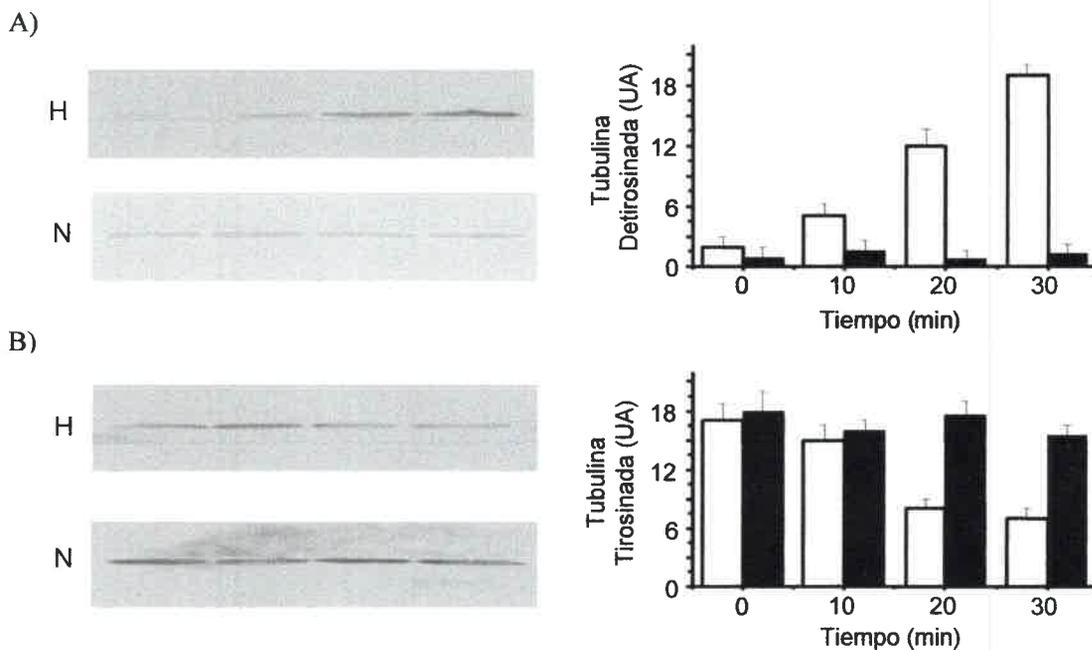


Figura 22: Capacidad de tirosinación/detirosinación de tubulina en fracción citosólica de eritrocitos humanos. Citosol de eritrocitos de individuos hipertensos (H, barras blancas) o normotensos (N, barras negras) fue extraído e incubado con tubulina purificada de cerebro de rata (200 μ g) a 37 $^{\circ}$ C durante los tiempos indicados. A cada tiempo se extrajo una alícuota para determinar la cantidad de tubulina detirosinada (A) y tirosinada (B) por inmunoblot usando anticuerpo policlonal anti Glu-tubulina y 1A2, respectivamente. Las bandas fueron cuantificadas usando el software Scion Image y los valores son mostrados en el panel derecho de cada figura. Los datos son la media \pm S.D. de tres experimentos independientes. Las bandas mostradas en el panel izquierdo corresponden a un experimento representativo.

La menor capacidad de tirosinar tubulina observada en eritrocitos de individuos hipertensos puede ser debido a una baja actividad TTL o a una alta actividad tubulina tirosina carboxipeptidasa (TTCP); a su vez la baja actividad TTL puede deberse a una disminución en la cantidad de la enzima y/o a una disminución en la actividad enzimática.

Para determinar si existen diferencias en la cantidad de TTL de eritrocitos de individuos normotensos e hipertensos, se aisló la fracción citosólica de los eritrocitos y se analizó el contenido de TTL por inmunoblot. La figura 23 A muestra que los eritrocitos humanos de individuos hipertensos contienen un 50 % menos de TTL comparado con eritrocitos de individuos normales. Estos resultados fueron confirmados por análisis de microscopía de inmunofluorescencia. Como se observa en la Fig. 23 C,

los eritrocitos de individuos normotensos marcados con anticuerpo anti-TTL (Ab ID3) poseen mayor marca fluorescente distribuida uniformemente por toda la célula, mientras que en los eritrocitos de individuos hipertensos tratados de manera similar la fluorescencia se observa solo en la periferia, próxima a la región de membrana, sugiriendo no solo un menor contenido de TTL en estas células sino además una localización diferencial de esta enzima.

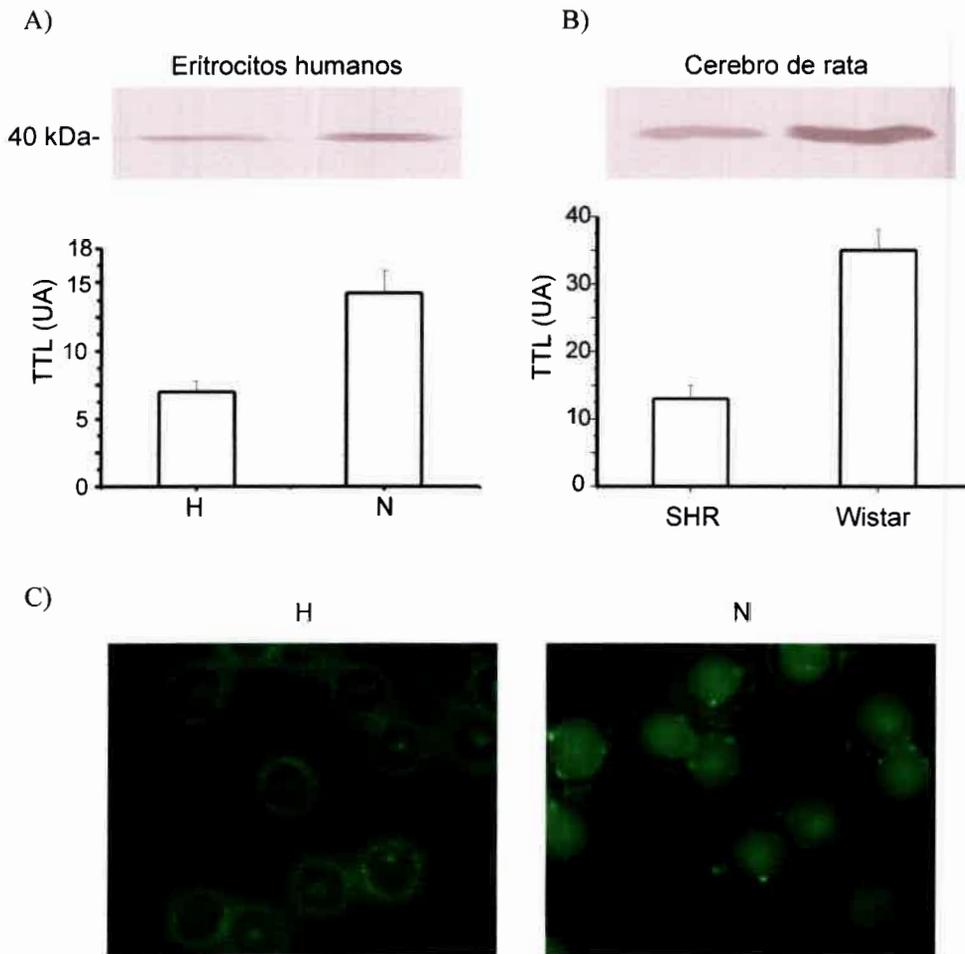


Figura 23: Contenido de TTL en eritrocitos humanos hipertensos y cerebro de ratas SHR. (A) Fracción citosólica de eritrocitos de individuos hipertensos (H) o normotensos (N) y (B) fracción citosólica de cerebro de ratas SHR o Wistar (control normotenso) fueron extraídas y una alícuota fue usada para determinar el contenido de TTL por inmunoblot usando anticuerpo ID3. Las bandas mostradas corresponden a un experimento representativo de tres. Las bandas fueron cuantificadas usando el software Scion Image y los valores se muestran en el gráfico del panel inferior. Los datos son la media \pm S.D. de tres experimentos independientes. (C) Eritrocitos de individuos hipertensos y normotensos fueron fijados sobre portaobjetos y analizados por microscopía de inmunofluorescencia usando el anticuerpo ID3, específico para TTL.

6.8.2. Cerebro de ratas SHR

Debido a que en eritrocitos humanos el contenido de tubulina en la estructura citoplasmática Sed-tub es muy bajo y la estructura del polímero es desconocida, los siguientes experimentos se realizaron en cerebro de rata, un tejido con alto contenido de tubulina. Para ello, previamente se analizó en este nuevo sistema el contenido de TTL y los niveles de tubulina detirosinada de membrana en ratas SHR usadas como modelo hipertenso y ratas Wistar consideradas controles normotensos. La figura 23 B muestra que, en forma concordante a lo observado en eritrocitos humanos hipertensos, los niveles de TTL en cerebro de rata son aproximadamente un 50 % menor en SHR comparado con los niveles de ratas Wistar. Este hecho concuerda con el análisis del contenido de tubulina detirosinada en la membrana de cerebro. En la figura 24 se puede observar que las membranas de ratas SHR contienen un 15 % más de tubulina total en la membrana en comparación con cerebro de ratas Wistar. Por otro lado, la iso especie detirosinada es un 40 % mayor en membranas de cerebro de ratas SHR, lo que muestra que el incremento de esta iso especie fue significativamente mayor que el aumento de tubulina total, reflejando una vez más el enriquecimiento de tubulina detirosinada en la membrana celular de individuos hipertensos.

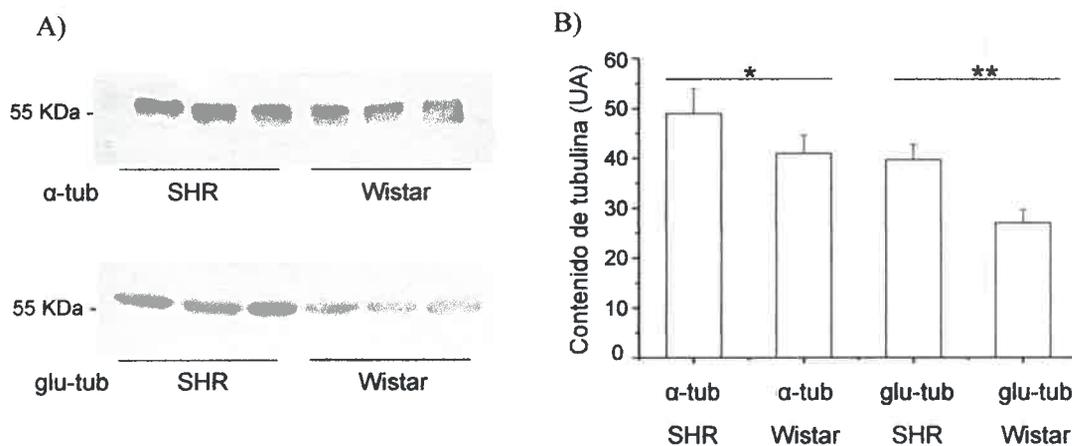


Figura 24: Contenido de tubulina en membranas de cerebro de ratas. (A) Se obtuvieron membranas a partir de cerebros de ratas SHR y Wistar, como se describe en materiales y métodos. Alícuotas de 200 μ g fueron usadas para determinar la cantidad de α -tubulina y tubulina detirosinada (glu-tubulina) por inmunoblot usando anticuerpo DM1A y anti-glu respectivamente. (B) Las bandas fueron cuantificadas usando el programa Scion Image. Los valores son expresados como unidades arbitrarias y corresponden a la media \pm S.D. de tres experimentos independientes. Con asteriscos se marcan los valores significativamente diferentes entre sí, * $p=0.01$; ** $p=0.005$.

*Caracterización parcial de la dinámica de
microtúbulos y contenido de MAPs en cerebro de
ratas SHR*

6.9. Polimerización de tubulina de cerebro de rata SHR

En eritrocitos de individuos hipertensos la fracción Sed-tub es más resistente a la depolimerización de tubulina frente a drogas como el nocodazol comparado con la Sed-tub de individuos normotensos (Fig. 19). Si bien la fracción Sed-tub no está formada por microtúbulos típicos, la estabilidad de la tubulina en esta macroestructura en pacientes hipertensos, en forma semejante a lo observado para microtúbulos, sería correlativa con el aumento en los niveles de isoformas de tubulina consideradas marcadores de estabilidad microtubular, tubulina acetilada y detirosinada. Si bien no se ha determinado el contenido de estas isoformas en la fracción Sed-tub, el aumento en mayor proporción de estas isoformas en las membranas de los eritrocitos de individuos hipertensos reflejarían el incremento de las mismas en la fracción Sed-tub, debido a que previamente postulamos que el origen de la tubulina de membrana de eritrocitos se produciría por una translocación de la tubulina que forma parte de la Sed-tub. Teniendo en cuenta estos antecedentes y el hecho de que la tubulina detirosinada también está aumentada en membrana de cerebro de ratas SHR (Fig. 24), se sugiere que el dinamismo de los microtúbulos es un factor importante para la regulación de la actividad ATPasa en diferentes tipos de células y que en individuos hipertensos (tanto humanos como ratas) este dinamismo estaría modificado.

Debido a que la estructura de la fracción Sed-tub de eritrocitos es desconocida, se estudió el dinamismo de los microtúbulos en cerebro de ratas SHR. Para esto, se extrajo tubulina con MAPs de cerebro de ratas SHR y Wistar, y a partir de esta tubulina se analizó la polimerización de microtúbulos *in vitro* en presencia de GTP. Bajo estas condiciones se determinó que en ratas SHR se producen 7 veces más microtúbulos que en ratas normotensas (Fig. 25 A y D). Por otra parte, el 70 % de los microtúbulos polimerizados de ratas SHR fue resistente al desensamblaje cuando se incubaron a 4 °C.

El ensayo de polimerización de microtúbulos también se realizó con tubulina libre de MAPs y con mezclas de tubulina y MAPs de diferentes orígenes. Para ello preparaciones de tubulina de cerebro de rata se cargaron en una columna cromatográfica de fosfocelulosa, la tubulina fue eluída y posteriormente la columna fue lavada con ClNa 0.5 M para eluir las proteínas de alto peso molecular (MAPs), se recolectaron diferentes fracciones y se analizaron por electroforesis. Aquellas fracciones que presentaron bandas de alto peso molecular (250-280 kDa) fueron utilizadas como fuente de MAPs. Cuando las preparaciones de tubulina tanto de ratas hipertensas como

de normotensas fueron desprovistas de sus MAPs la capacidad de polimerización de los microtúbulos se perdió, como puede observarse en las figuras 25 B y D en ambos casos los valores de absorbancia disminuyen. Pero la capacidad de polimerización de microtúbulos fue restaurada cuando MAPs purificadas de ratas SHR o Wistar fueron adicionadas a las preparaciones de tubulina, ya sea a la tubulina obtenida de la misma cepa de rata o de la cepa contraria (Fig. 25 C y D). Aunque las MAPs de ambas cepas de ratas fueron capaces de restaurar la capacidad de polimerización de la tubulina, la mayor polimerización de microtúbulos *in vitro* fue obtenida por combinación de tubulina de ratas SHR y MAPs del mismo origen. Esta combinación, tubulina y MAPs de SHR, produce 2 veces más microtúbulos en comparación con las combinaciones de tubulina de SHR y MAPs de ratas Wistar, tubulina de ratas Wistar y MAPs de SHR o tubulina y MAPs de ratas Wistar (Fig. 25 C y D). Estos resultados sugirieron que tanto la tubulina como las MAPs de los individuos hipertensos presentan características diferentes a las de individuos normotensos que le confieren mayor capacidad de polimerización y menor dinamismo a los polímeros de tubulina.

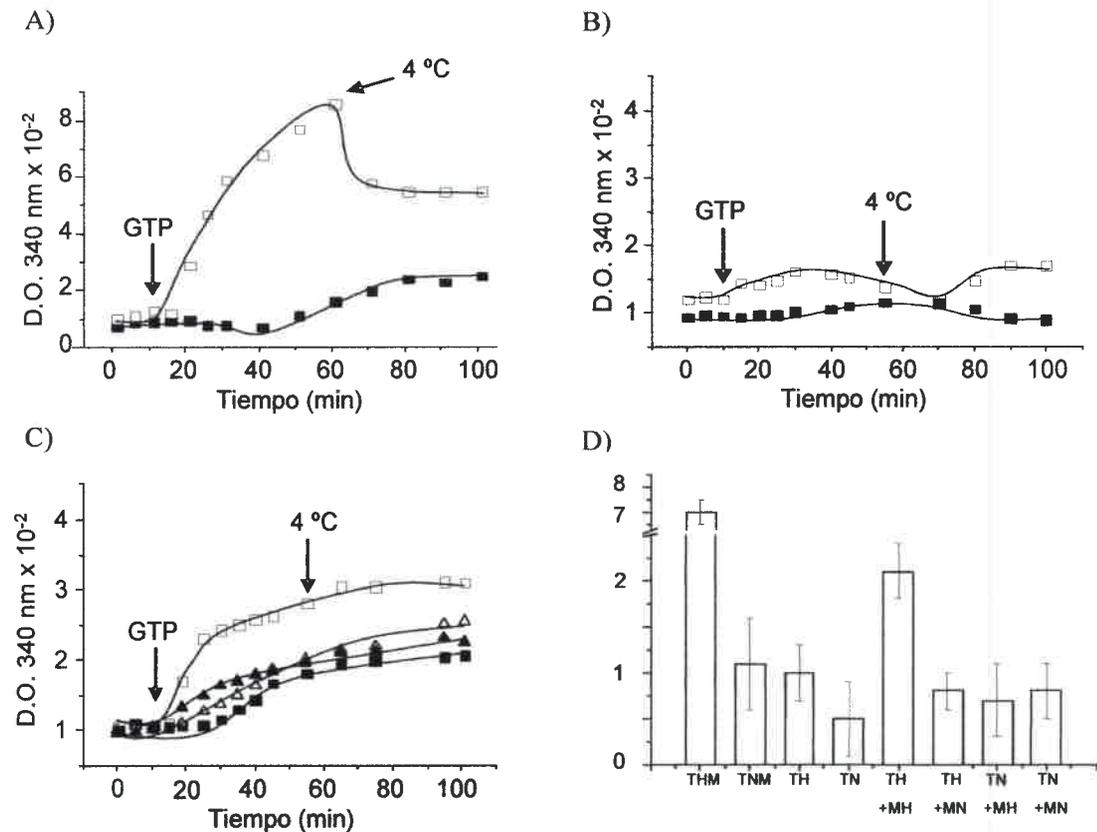


Figura 25: Polimerización *in vitro* de tubulina de cerebro de ratas SHR y Wistar. El ensamblado de los microtúbulos fue medido en forma continua siguiendo el incremento de la absorbancia a 340 nm, usando tubulina con MAPs (A) o sin MAPs (B) de cerebro de ratas SHR (cuadrados vacíos) y Wistar (cuadrados rellenos) como sustrato. (C) La polimerización de microtúbulos fue estudiada con tubulina de cerebro de rata sin MAPs endógenas purificada de ratas SHR (cuadrados) o Wistar (triángulos) y luego suplementadas con MAPs de ratas SHR (símbolos abiertos) o MAPs de ratas Wistar (símbolos llenos). Todas las determinaciones fueron iniciadas sin GTP a 37 °C, luego de 10 min. de incubación se adicionó 1 mM GTP. A los 60 min. la temperatura se bajó a 4 °C y la polimerización fue medida durante 40 min. más. (D) Diferencia de absorbancia ($\Delta 340 \text{ nm}$) entre 0 y 60 min. de incubación a 37 °C. THM: tubulina con MAPs de ratas SHR, TNM: tubulina con MAPs de ratas Wistar, TH: tubulina purificada de ratas SHR, TN: tubulina purificada de ratas Wistar, MH: fracción de MAPs de ratas SHR, MN: fracción de MAPs de ratas Wistar. Los datos corresponden a la media \pm S.D. de tres experimentos independientes.

6.10. Contenido de MAPs y estabilidad microtubular en ratas SHR

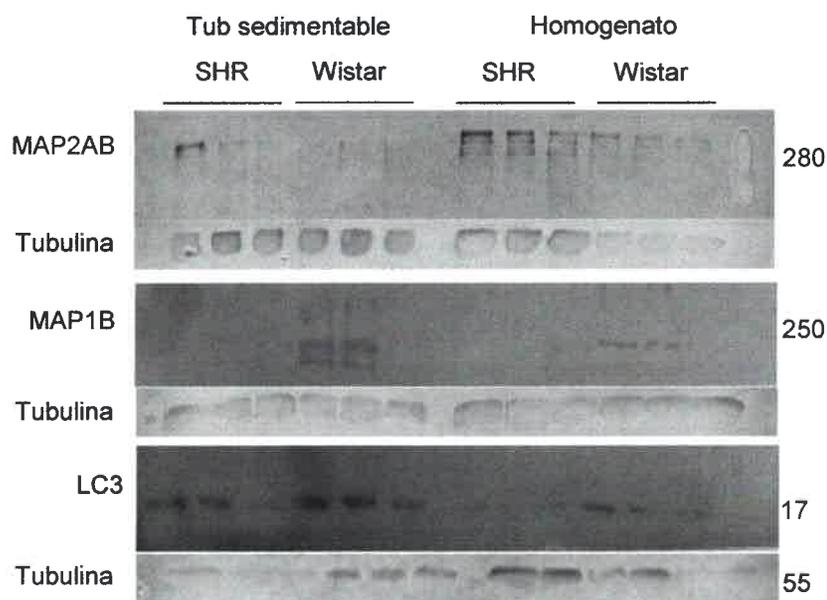
El estado de tirosinación/detirosinación de los microtúbulos refleja el dinamismo de estos polímeros, Gundersen y col. (1984) reportaron que los microtúbulos dinámicos principalmente se encuentran tirosinados, mientras que los microtúbulos estables están principalmente detirosinados. Con respecto a esto, nuestros resultados muestran que 1) en las membranas de eritrocitos de pacientes hipertensos están aumentadas las isoformas marcadoras de estabilidad microtubular, tubulina acetilada y detirosinada, probablemente debido a la translocación de la tubulina desde la fracción Sed-tub a la membrana, 2) los microtúbulos de cerebro de ratas SHR y la fracción Sed-tub de eritrocitos de individuos hipertensos son más estables a la acción de diferentes agentes depolimerizantes, tales como bajas temperaturas (4 °C) y nocodazol respectivamente y 3) *in vitro* la tubulina de cerebro de ratas SHR produce 7 veces más microtúbulos. Estos resultados podrían ser explicados por diferencias entre individuos hipertensos y normotensos en la composición y contenido de las proteínas responsables de promover la polimerización y estabilidad de los microtúbulos, tales como las MAPs, ya que como se demostró en el punto anterior la capacidad de polimerización de la tubulina purificada de ratas SHR o Wistar depende de la presencia de estas proteínas asociadas y dicha capacidad es diferente según el origen de las MAPs. Sobre la base de estos resultados se propuso analizar el contenido de diferentes MAPs en cerebro de individuos hipertensos y normotensos.

Para el análisis se utilizaron cerebros de ratas SHR y Wistar, a partir de los cuales se extrajeron a través de homogenización y centrifugación diferencial tubulina sedimentable que forma parte de microtúbulos y homogenato que fueron sometidos a electroforesis e inmunoblot para cuantificar las diferentes MAPs.

Se analizó la presencia de MAP1 y MAP2 involucradas en la estabilización de los microtúbulos y LC3, la cadena liviana de MAP1 la cual regula la unión de la cadena pesada a los microtúbulos y el grado de tirosinación de los mismos (Faller y col., 2009). En correlación con los experimentos de polimerización, a pesar de que todas las MAPs analizadas estuvieron presentes en ambas cepas de ratas, encontramos diferencias en la cantidad de las MAPs entre los dos grupos (Fig. 26).

Como se muestra en la figura 26, el contenido de MAP2AB fue 40 % menor en microtúbulos y homogenato de ratas SHR comparado con los controles normotensos. Mientras que la disminución de MAP1B en cerebro de ratas SHR fue aún mayor, siendo

un 83 % y un 72 % menor el contenido de esta proteína unida a microtúbulos y en homogenato, respectivamente, en comparación con los controles Wistar. Por otro lado, cuando se analizó el contenido de la cadena liviana de MAP1, LC3, curiosamente se encontró que en ratas SHR hay un aumento del 50 % de esta proteína unida a microtúbulos a pesar de que en homogenato hay un 43 % menos que en ratas Wistar (Fig. 26 A y B



B)

| | SHR | | Wistar | |
|--------|--------------|-------------|------------|-------------|
| | R | | R | |
| | Tub sed | Homogenato | Tub sed | Homogenato |
| MAP2AB | 0,14 ± 0,03 | 1,18 ± 0,29 | 0,35 ± 0,1 | 2,83 ± 0,85 |
| MAP1B | 0,10 ± 0,015 | 0,26 ± 0,08 | 0,60 ± 0,3 | 0,95 ± 0,28 |
| LC3 | 3 ± 1,05 | 0,82 ± 0,28 | 2 ± 0,7 | 1,47 ± 0,5 |

R: relación de los valores de MAPs sobre tubulina

Figura 26: Contenido de MAPs en cerebro de ratas SHR y Wistar. A partir de cerebro de ratas SHR y Wistar se obtuvieron las fracciones de homogenato y tubulina sedimentable que forma microtúbulos por centrifugación diferencial. (A) Alícuotas de cada fracción fueron analizadas por SDS-PAGE e inmunoblot para determinar el contenido de MAP2AB, MAP1B, LC3 y α -tubulina. (B) Las bandas fueron cuantificadas usando el programa Scion Image y a partir de estos valores se calculó R, que es la relación de los valores correspondientes al contenido de MAPs sobre el contenido de α -tubulina en la fracción correspondiente. Los valores mostrados corresponden a la media \pm S.D., n=6.

Participación de la tubulina de membrana en la deformabilidad de los eritrocitos: efecto sobre la presión arterial

6.11. Correlación entre el contenido de tubulina de membrana y la deformabilidad de los eritrocitos humanos

Los eritrocitos de individuos hipertensos se caracterizan por ser menos deformables que los eritrocitos de individuos normotensos (Alet y col., 2001; Gobel y col. 2001). Dado que hemos encontrado que en membranas de eritrocitos de individuos hipertensos el contenido de tubulina es ~150 % mayor que en eritrocitos de individuos normotensos, y que este aumento se debe a que la tubulina acetilada forma un complejo con la NKA que resulta en la inhibición enzimática, es probable que el aumento de tubulina en la membrana modifique propiedades reológicas del eritrocito, tales como la deformabilidad, la cual podría afectar la resistencia al flujo impactando de este modo sobre la presión arterial. Para probar esta hipótesis, se midió la deformabilidad de los eritrocitos usando el método de filtración y se determinó la resistencia al flujo (β). Dado que β es proporcional al flujo usado para deformar las células, la pendiente de la curva nos permitió calcular ψ . Dicho parámetro (ψ) es independiente del flujo usado para deformar las células. El aumento de los volares de β y ψ indican una disminución de la deformabilidad celular.

Cuando se cuantificó la resistencia al flujo de eritrocitos de individuos hipertensos, se obtuvieron valores de β 40 % mayores que los valores correspondientes a eritrocitos de individuos normotensos, como consecuencia, los valores de ψ también aumentaron observándose en este caso un incremento de aproximadamente un 50 % (Fig. 27 A, Tabla 2). Estos resultados indican que los eritrocitos de pacientes hipertensos son menos deformables que los de individuos normotensos.

Por otro lado, en la figura 27 B se observa que, como se demostró previamente, aunque el contenido de tubulina total es el mismo tanto en individuos hipertensos como normotensos, el contenido de tubulina en la fracción de membrana es ~2 veces mayor en individuos hipertensos (comparar con tabla 2). Este resultado fue confirmado por inmunofluorescencia indirecta, en la figura 27 C se muestra que los eritrocitos de individuos hipertensos tienen un patrón fluorescente distribuido uniformemente indicando la localización de tubulina en membrana, mientras que en los eritrocitos de individuos normotensos la fluorescencia se observa como un delgado anillo periférico correspondiente a la fracción Sed-tub.

En conjunto, los resultados mostrados en la figura 27 ponen en evidencia una correlación entre el aumento de la tubulina de membrana y la disminución de la deformabilidad de los eritrocitos.

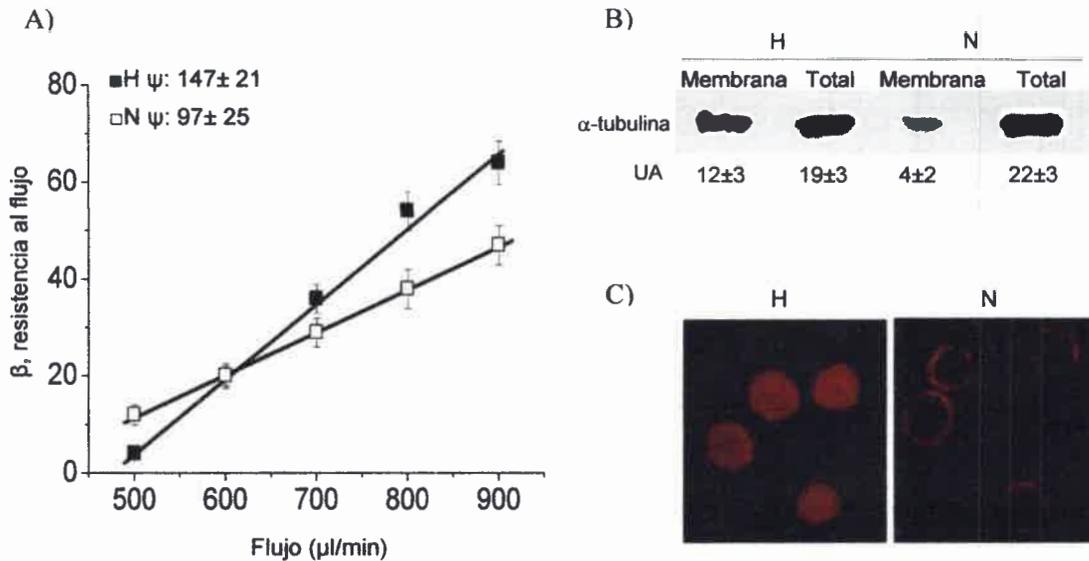


Figura 27: Correlación entre el contenido de tubulina de membrana y la deformabilidad de los eritrocitos humanos. (A) Eritrocitos de 1 ml de sangre de individuos normotensos (N) e hipertensos (H) fueron usados para determinar la resistencia al flujo β a través de un poro de filtro como se describe en materiales y métodos. Los valores de deformabilidad expresados en el inserto como Ψ fueron calculados de la pendiente de la curva. Los valores de β y Ψ son la media \pm S.D. de tres experimentos independientes. (B) Fracciones de homogenato y membrana fueron obtenidas de 2 ml de sangre humana. Una alícuota de cada fracción fue usada para determinar la cantidad de α -tubulina por inmunoblot usando DM1A. Las bandas de tubulina fueron cuantificadas usando el programa Scion Image. Los valores correspondientes a la media \pm S.D. de tres experimentos por triplicado son expresados como unidades arbitrarias. (C) La tubulina de eritrocitos de H y N fue analizada por inmunofluorescencia indirecta usando el anticuerpo DM1A.

Tabla 2: Contenido de tubulina de membrana, actividad Na^+, K^+ -ATPasa y deformabilidad celular de eritrocitos humanos y de ratas

| | Humano ^a | | | | Rata ^b | | | |
|--------|---------------------|----------|----------|----------|-------------------|----------|----------|----------|
| | N | | H | | Wistar | | SHR | |
| | -Tx | +Tx | -Noc | +Noc | -Tx | +Tx | -Noc | +Noc |
| ψ | 100 | 166 ± 21 | 151 ± 22 | 84 ± 25 | 100 | 253 ± 31 | 196 ± 20 | 116 ± 27 |
| MTub | 100 | 240 ± 10 | 320 ± 40 | 150 ± 20 | 100 | 220 ± 34 | 260 ± 65 | 95 ± 14 |
| NKA | 100 | 37 ± 15 | 44 ± 22 | 87 ± 31 | ND | ND | ND | ND |

^aLos valores de deformabilidad (Ψ) y el contenido de tubulina de membrana (MTub) fueron tomados de las Fig. 27 y 29, los valores de actividad NKA fueron tomados de la Fig. 19 y expresados como % de los valores de N sin tratamiento (-Tx).

^bLos valores de deformabilidad (Ψ) y el contenido de tubulina de membrana (MTub) fueron tomados de las Fig. 28 y 30 y expresados como % de los valores de ratas Wistar sin tratamiento (-Tx).

Tx y Noc: Tratamiento con taxol y nocodazol, respectivamente. - y +: ausencia o presencia de tratamiento, respectivamente. ND: no determinado.

6.12. Análisis de la deformabilidad celular de eritrocitos de ratas SHR

Debido a que el desarrollo de la hipertensión en ratas SHR comienza a las 3 semanas de vida y se establece completamente entre las semanas 7 y 8 (Chabanel y col., 1987) se consideró importante investigar si durante el desarrollo de la hipertensión ocurren cambios en el contenido de tubulina de membrana y en la deformabilidad de los eritrocitos. Para ello, se obtuvieron muestras de sangre de ratas SHR y Wistar durante el período comprendido entre las semanas 4 y 8, las cuales se utilizaron para el análisis de los parámetros mencionados anteriormente.

La figura 28 A muestra el contenido de tubulina en eritrocitos de ratas SHR y Wistar a lo largo del tiempo, como se puede observar en la figura a los 33 días de edad (4 semanas) no se encuentran diferencias significativas en la distribución de tubulina ni en su contenido, ya que la cuantificación de la fluorescencia muestra valores similares entre las dos cepas de ratas (Fig. 28 B). El contenido de tubulina en la membrana no se modificó en forma significativa en las ratas Wistar en todo el período medido, sin embargo, en la cepa SHR el contenido de tubulina comenzó a aumentar en la membrana

Por otro lado, el análisis de deformabilidad al día 42 de edad muestra que, similar a lo observado en humanos, los eritrocitos de ratas SHR son menos deformables que los eritrocitos de ratas normotensas. De hecho, los valores de β para los eritrocitos de SHR fueron 45 % mayores que los correspondientes a ratas Wistar, dando como resultado valores de ψ un 96 % mayor (Fig. 28 C, Tabla 2). En conjunto estos resultados indican una correlación entre el aumento de la tubulina de membrana de eritrocitos, disminución de la deformabilidad celular y el desarrollo de la hipertensión en ratas SHR.

6.13. Efecto del taxol y del nocodazol sobre el contenido de tubulina de membrana y la deformabilidad de los eritrocitos

6.13.1. Eritrocitos humanos

Dado que el tratamiento de los eritrocitos humanos *in vitro* con nocodazol induce disociación de la tubulina de la membrana y el tratamiento con taxol aumento del contenido de tubulina en la membrana (Fig. 20), se propuso determinar si los cambios en el contenido de tubulina de membrana inducidos por estas drogas tienen algún efecto sobre la deformabilidad de los eritrocitos. Para esto, eritrocitos de individuos hipertensos y normotensos fueron tratados con nocodazol y taxol, respectivamente, y luego se determinó la deformabilidad celular.

Cuando los eritrocitos de individuos hipertensos fueron tratados con nocodazol, la deformabilidad aumentó un 80 %, llegando a ser este valor similar al de los eritrocitos de individuos normotensos, considerados controles (Tabla 2 y Fig. 29 A, comparar Hnoc con N). Para corroborar los cambios en el contenido de tubulina a nivel de membrana, eritrocitos de individuos hipertensos tratados o no con nocodazol fueron sometidos a inmunofluorescencia, utilizando el anticuerpo DM1A para cuantificar α -tubulina, como controles se utilizaron eritrocitos de individuos normotensos. Las medidas de intensidad de fluorescencia de los eritrocitos tratados con nocodazol (Fig. 29 B, panel H) confirman que el contenido de tubulina de membrana disminuyó significativamente después del tratamiento con la droga. La intensidad y distribución de la fluorescencia observada en los eritrocitos hipertensos después del tratamiento con

nocodazol no fue significativamente diferente a los controles normotensos (Fig. 29 B, panel N).

Por otro lado, en los eritrocitos de individuos normotensos tratados con taxol se observó un patrón similar al de los eritrocitos de individuos hipertensos, es decir que el tratamiento con la droga provocó una disminución de la deformabilidad celular de aproximadamente un 66 % (Tabla 2 y Fig. 29 A, comparar N con Ntx) y, tal como se demostró previamente, el taxol produjo un incremento en el contenido de tubulina de membrana de un 140 % (Tabla 2 y Fig. 29 B, panel N). Estos resultados indican que, al menos *in vitro*, modificaciones en el contenido de tubulina de membrana de eritrocitos humanos se correlacionan con alteraciones en la deformabilidad de estas células.

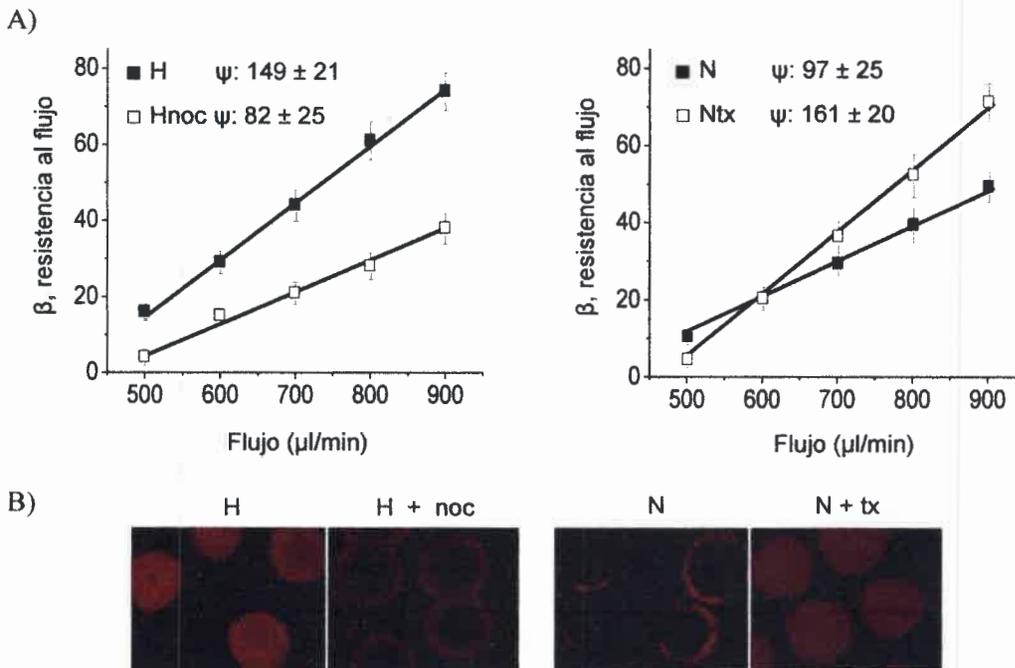


Figura 29: Efecto del taxol y del nocodazol sobre la deformabilidad y el contenido de tubulina de membrana de eritrocitos humanos. 2 ml de sangre de individuos hipertensos (H) fueron incubados a 37 °C durante 2 h en ausencia o presencia de 0,02 mM nocodazol (noc). El mismo volumen de sangre de individuos normotensos fue incubado a 37 °C durante 2 h en ausencia a presencia 5 x 10⁻³ mM taxol (tx). (A) Eritrocitos de 1 ml de sangre tratada o no con la droga respectiva fueron usados para determinar la resistencia al flujo β y la deformabilidad fue calculada y expresada en el inserto como Ψ . Los valores de β y Ψ son la media \pm S.D. de tres experimentos independientes. (B) Eritrocitos de H y N tratados o no con nocodazol y taxol, respectivamente fueron analizados por inmunofluorescencia indirecta usando el anticuerpo DM1A.

6.13.2. Eritrocitos de ratas

Para probar el efecto *in vivo* del nocodazol y del taxol sobre la deformabilidad de los eritrocitos, ratas Wistar fueron inyectadas intraperitonealmente con taxol y ratas SHR fueron inyectadas con nocodazol, a diferentes tiempos luego de la administración de la droga respectiva se determinó el contenido de tubulina de membrana y la deformabilidad de los eritrocitos (Fig. 30).

La figura 30 A muestra que a los 14 días post-inyección el tratamiento de las ratas SHR con nocodazol provocó un aumento significativo en la deformabilidad de los eritrocitos. En efecto, los valores de ψ en estas células fueron 70 % menores que los valores obtenidos en ratas SHR sin tratamiento (Tabla 2 y Fig. 30 A, panel SHR). Bajo las mismas condiciones se observó una disminución del 170 % en el contenido de tubulina de membrana de los eritrocitos (Tabla 2 y Fig. 30 B, panel SHR). Los valores de deformabilidad de los eritrocitos y el contenido de tubulina de membrana de ratas SHR tratadas con nocodazol durante 14 días fueron similares a los valores observados en ratas Wistar sin tratamiento (Tabla 2 y Fig. 30 A y B). El efecto del nocodazol no fue observado al día 20 post-tratamiento, a este tiempo los valores de ψ y el contenido de tubulina de membrana retornaron a los valores basales observados al día 0 (Fig. 30 A y B, paneles SHR).

Por otro lado, la inyección de ratas Wistar con taxol, provocó un efecto rápido sobre la deformabilidad de los eritrocitos y el contenido de tubulina de membrana. La administración intraperitoneal de la droga a ratas Wistar provocó a las 3 horas post-inyección una disminución significativa de la deformabilidad de los eritrocitos, lo que se observa como un aumento de un 153 % en los valores de ψ (Tabla 2 y Fig. 30 A, panel Wistar). Además, a este tiempo, el taxol indujo un aumento del contenido de tubulina de membrana de un 120 % (Tabla 2 y Fig. 30 B, panel Wistar). Sin embargo, estos cambios fueron transitorios ya que las medidas realizadas a los 6, 14 y 20 días (Fig. 30 A y B, paneles Wistar) no mostraron cambios significativos con respecto al control sin tratamiento, indicando que el taxol fue eliminado o metabolizado rápidamente.

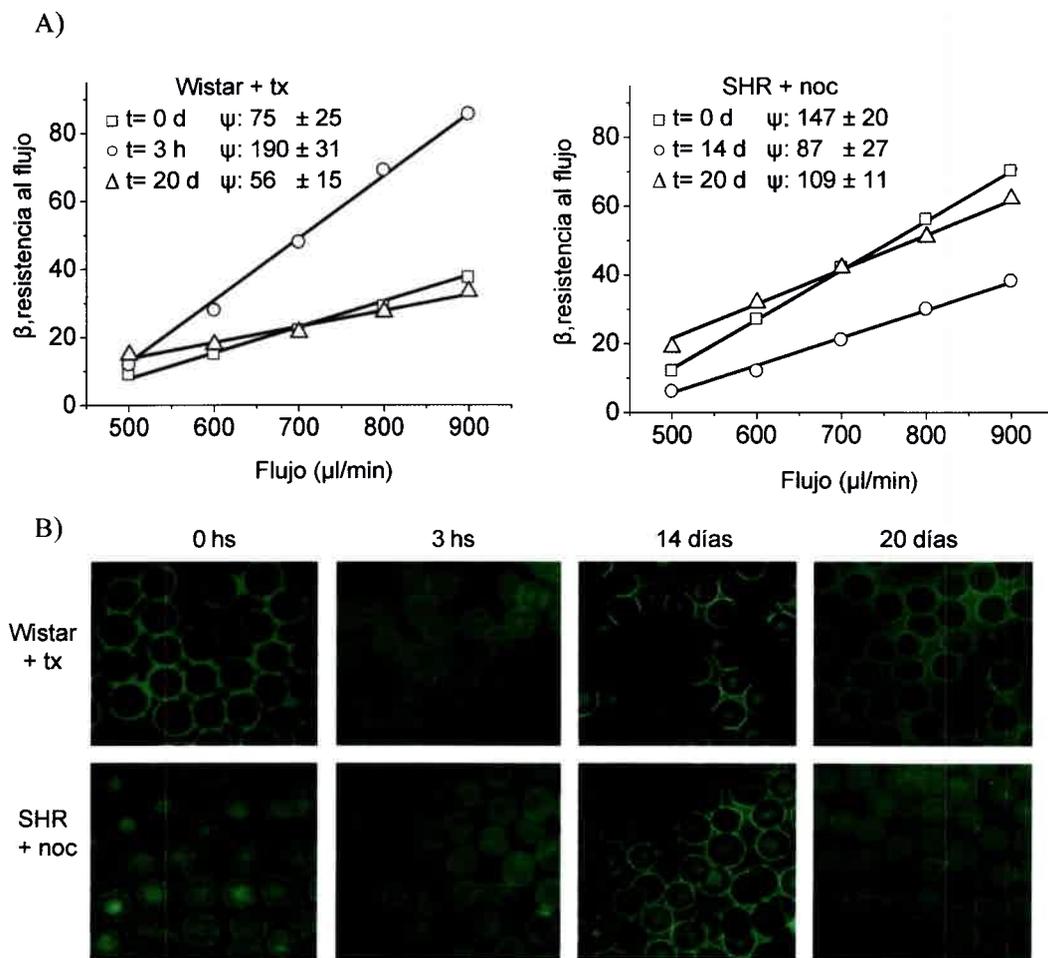


Figura 30: Efecto *in vivo* del tratamiento con nocodazol y taxol sobre la deformabilidad y el contenido de tubulina de membrana de eritrocitos de ratas. Ratas SHR fueron inyectadas intraperitonealmente con nocodazol (SHR + noc) y ratas Wistar fueron inyectadas con taxol (Wistar + tx) como se describe en materiales y métodos. A los tiempos indicados, (A) 1 ml de sangre fue extraída para medir la resistencia al flujo β y calcular la deformabilidad, la cual se expresa en el inserto como Ψ . Los valores de β y Ψ son la media \pm S.D. de tres experimentos independientes. (B) Se determinó el contenido de α -tubulina en eritrocitos por inmunofluorescencia indirecta usando el anticuerpo DM1A .

6.14. Cambios *in vivo* del contenido de tubulina de membrana afecta la presión arterial en ratas.

Los resultados mostrados previamente indican que, en concordancia a lo observado *in vitro* para eritrocitos humanos, en experimentos *in vivo* realizados con ratas, el cambio de los niveles de tubulina de membrana de eritrocitos modifican la deformabilidad de estas células. De acuerdo con esto, se observó que cuando los niveles de tubulina de la membrana disminuyen en los eritrocitos de ratas SHR aumenta la deformabilidad y por el contrario, si aumenta la tubulina de la membrana en ratas Wistar entonces disminuye la deformabilidad. Por lo tanto, el contenido de tubulina en la membrana estaría modificando parámetros reológicos en eritrocitos tanto *in vitro* como *in vivo*, tales modificaciones hemorreológicas podrían ser una posible causa de las manifestaciones clínicas de la hipertensión.

Debido a esto, se investigó *in vivo* si las modificaciones observadas en el contenido de tubulina de membrana de eritrocitos y la deformabilidad de dichas células, provocado por efecto del taxol y nocodazol, generan cambios en la presión arterial de ratas SHR y Wistar.

Para ello, ratas normotensas Wistar fueron tratadas con taxol con el propósito de aumentar los niveles de tubulina en la membrana y posteriormente se les midió la presión arterial sistólica (PAS) a diferentes tiempos luego de iniciado el tratamiento mediante el uso de dos métodos diferentes, el método directo y el indirecto "tail-cuff". Los días que se eligieron para realizar las mediciones fueron aquellos en los que anteriormente se demostró que ocurren cambios en el contenido de tubulina de membrana del eritrocito y en la deformabilidad celular. Como controles se utilizaron ratas Wistar sin tratamiento y ratas de la misma cepa inyectadas sólo con el vehículo de disolución del taxol.

Método directo

En la figura 31 se observan los valores de presión arterial de los tres grupos antes y después del tratamiento. Los valores obtenidos a través del método directo antes de la administración de la droga fueron similares para los tres grupos, midiéndose valores de 60 ± 5.6 mmHg para el grupo control, 59 ± 5.5 mmHg para el grupo vehículo y 64 ± 4 mmHg para el grupo taxol. Los valores basales de presión arterial de ratas Wistar fueron

menores a los esperados, posiblemente debido a que se usaron ratas hembras jóvenes de menos de 8 semanas de edad. La figura 31 muestra también que el taxol fue de efecto rápido, ya que cuando ratas Wistar fueron inyectadas con taxol la presión arterial aumentó hasta 81.6 ± 7.5 luego de 3 horas de iniciado el tratamiento, lo cual constituye un incremento del 28 % con respecto a su nivel basal, dicho valor es significativamente diferente cuando se compara con la presión arterial de ratas Wistar que no recibieron tratamiento o con ratas Wistar que recibieron solo el vehículo de la droga ($p < 0,05$).

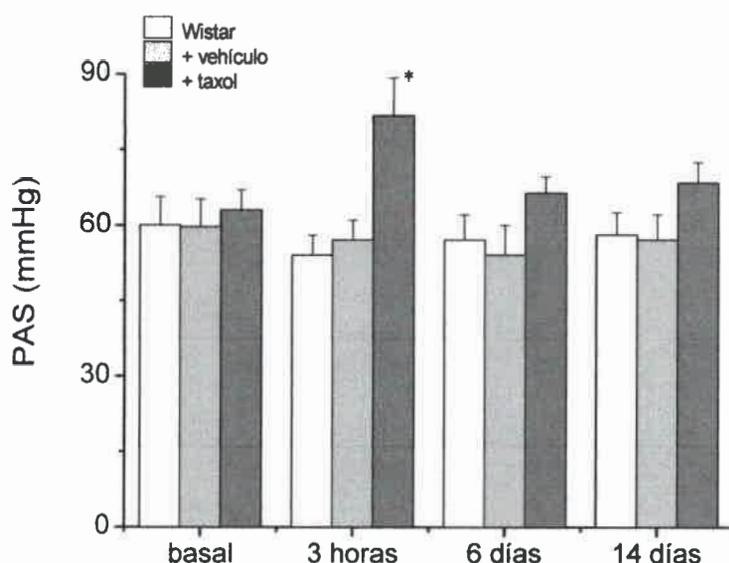


Figura 31: Efecto del taxol sobre la presión arterial sistólica (PAS) de ratas Wistar. A ratas Wistar hembras de 6 semanas de edad controles (□) y Wistar inyectadas intraperitonealmente con taxol 0,02 mM (■) o vehículo de inyección (■), se les determinó la PAS a diferentes tiempos post-inyección a través del método de medición directo. * Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos taxol y control o taxol y vehículo $p < 0.05$. Los valores corresponden al promedio \pm S.D, $n=5$.

Método indirecto

De acuerdo con los resultados obtenidos por el método directo, la figura 32 muestra un comportamiento similar de los valores de presión arterial cuando el experimento se realizó con ratas Wistar macho de más de 8 semanas de edad inyectadas con taxol y se usó el método directo “tail-cuff” para medir la presión. Antes de la

administración de la droga los valores para los tres grupos fueron 111 ± 5.65 mmHg para el grupo control, 124.5 ± 2.1 mmHg para el grupo vehículo y 110.6 ± 16.7 mmHg para los animales inyectados con taxol. Nuevamente se observa el efecto rápido de la droga, ya que la presión arterial de ratas inyectadas con taxol aumentó a 135.6 ± 3.5 luego de 3 horas, lo que constituye un aumento del 23 % con respecto a su nivel basal, este valor fue similar al observado con el método anterior y fue significativamente diferente al valor de presión arterial obtenido en ratas Wistar que no recibieron tratamiento o ratas Wistar que recibieron solo el vehículo.

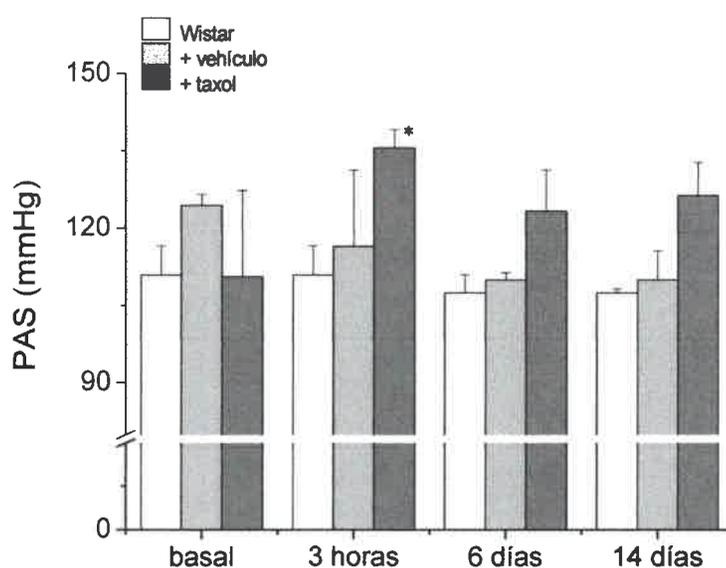


Figura 32: Efecto del taxol sobre la presión arterial sistólica (PAS) de ratas Wistar. A ratas Wistar machos de 8 semanas de edad controles (□) y Wistar inyectadas intraperitonealmente con taxol 0,02 mM (■) o vehículo de inyección (■), se les determinó la PAS a diferentes tiempos post-inyección a través del método de medición indirecto "tail-cuff". *Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos taxol y control o taxol y vehículo $p < 0.05$. Los valores corresponden al promedio \pm S.D, $n=5$.

En conjunto los resultados mostrados en las figuras 31 y 32 reflejan que, el efecto del taxol fue rápido y transitorio, ya que no se observaron cambios significativos a los 6 y 14 días luego del tratamiento. La presión arterial en este intervalo de tiempo retornó a sus valores basales, ya que no hay diferencias significativas entre los valores de ratas Wistar tratadas, no tratadas y las que recibieron vehículo. Estos resultados, aumento de

la presión arterial de ratas Wistar a las 3 horas post-tratamiento, se correlacionan con el aumento del contenido de tubulina en la membrana de los eritrocitos y la reducida deformabilidad de estas células.

Por otro lado, se hicieron mediciones de presión arterial en ratas SHR tratadas con nocodazol (+ nocodazol) con el propósito de disminuir los niveles de tubulina de membrana en los eritrocitos, como controles se utilizaron animales sin tratamiento (control) y animales a los cuales sólo se les administró el vehículo de dilución del nocodazol (+ vehículo), los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la figura 33. En este caso la medición de la presión arterial se llevó a cabo por el método indirecto tail-cuff, debido a que cuando las mediciones se realizaron mediante el método directo las ratas tratadas con nocodazol murieron durante la cirugía, probablemente a causa de un efecto combinado del nocodazol y la anestesia.

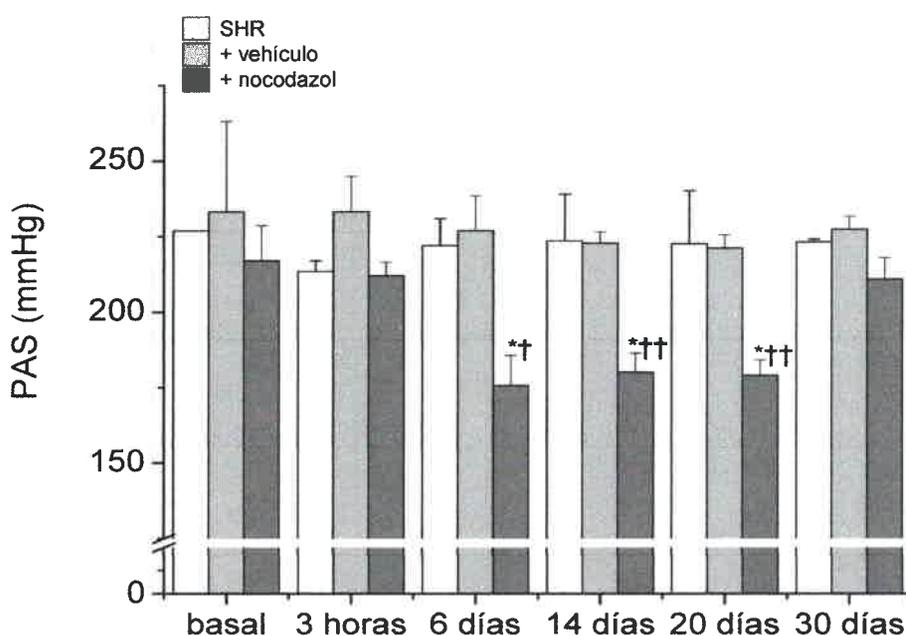


Figura 33: Efecto del nocodazol sobre PAS de ratas SHR. A ratas SHR machos de 8 semanas de edad controles (□) y SHR inyectadas intraperitonealmente con nocodazol 0,2 mM (■) o con vehículo de inyección (▒), se les determinó la PAS a diferentes tiempos post-inyección a través del método de medición indirecto "tail cuff". Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y nocodazol son señaladas con * $p < 0.05$ y aquellas entre los grupos vehículo y nocodazol son señaladas con † cuando $p < 0.05$ o †† cuando $p < 0.01$. Los valores corresponden al promedio \pm S.D, $n=5$.

Los valores de presión arterial antes de la administración de los tratamientos no fueron significativamente diferentes entre los tres grupos, los valores medidos fueron 227 ± 0 mmHg para el grupo control, 233.3 ± 29.9 mmHg para el grupo vehículo y 217.0 ± 11.7 mmHg para el grupo nocodazol. Tampoco se observaron cambios significativos en los valores de presión arterial a las 3 horas post-inyección cuando se compararon ratas de la misma cepa tratadas con nocodazol con aquellas que no recibieron tratamiento o que fueron inyectadas con el vehículo de dicha droga. Sin embargo, a los 6 días de iniciado el tratamiento, la presión arterial de las ratas tratadas con nocodazol disminuyó a un valor de 175.6 ± 10.0 mmHg. Dado que las medidas de presión arterial en los animales del grupo control y tratamiento no sufrieron cambios significativos con respecto a los valores basales, el tratamiento con nocodazol provocó una disminución de un 21 % con respecto al grupo control y de un 23 % con respecto al grupo vehículo ($p < 0,05$).

El análisis a los 14 y 20 días muestra que la disminución de los valores de presión arterial inducida por nocodazol se mantiene, mostrando que la droga tuvo un efecto perdurable en el tiempo (Fig. 33). Los valores de presión de las ratas SHR tratadas con nocodazol retornaron a sus valores basales a los 30 días post-tratamiento. Estos resultados indicarían que la disminución del contenido de tubulina en la membrana de los eritrocitos de ratas SHR que lleva a un aumento de la deformabilidad celular, se correlaciona con una disminución en los valores de presión arterial.

Sobre la base de los resultados expuestos se propone que modificaciones de los niveles de tubulina en la membrana de eritrocitos estarían implicados en las alteraciones de la deformabilidad de las células y en los valores de presión arterial observados luego del tratamiento, ya que cuando disminuyen los niveles de tubulina de membrana de los eritrocitos de ratas SHR, aumenta la deformabilidad de dichas células y disminuye la presión arterial. Por el contrario, si aumenta la tubulina de la membrana de eritrocitos en las ratas Wistar entonces disminuye la deformabilidad y aumenta la presión arterial. Estos resultados en conjunto con los expuestos anteriormente, en donde demostramos que durante el desarrollo de la hipertensión arterial en ratas SHR (3-8 semanas de vida) la tubulina migra a la membrana del eritrocito, estarían indicando una posible participación de la tubulina de membrana del eritrocito en el desarrollo de la hipertensión arterial.

*Conclusiones y
discusión*

- ✚ El ciclo de detirosinación/tirosinación está alterado en individuos hipertensos debido a que la segunda enzima involucrada en dicho ciclo, TTL, tiene baja expresión y menor capacidad de tirosinar tubulina.

- ✚ En eritrocitos de individuos hipertensos la Sed-tub es más estable que en individuos normotensos, dado que esta estructura es más resistente al desensamblaje inducido por frío y nocodazol. La mayor estabilidad de la Sed-tub es consistente con el aumento de tubulina acetilada y detirosinada en membrana producto de la translocación de la tubulina desde esta estructura a la membrana a través de la formación de un complejo con la NKA, enriqueciendo de esta manera a las membranas con una alta cantidad de tubulina y causando la inhibición de la enzima.

- ✚ La mayor capacidad de polimerización y menor dinamismo de los polímeros de tubulina en individuos hipertensos se debe a que la tubulina y las MAPs presentan características diferentes a las de individuos normotensos. De hecho, no solo se modifica la proporción de los diferentes isotipos de tubulina sino que además en individuos hipertensos el nivel de las diferentes MAPs, tales como LC3, MAP1 y MAP2, está alterado.

- ✚ Modificaciones del contenido de tubulina de membrana de los eritrocitos es capaz de alterar la deformabilidad de estas células. De hecho en individuos hipertensos el aumento de tubulina de membrana es responsable de la menor deformabilidad de los eritrocitos. Posiblemente estas alteraciones en la deformabilidad afectan el flujo de sangre y contribuyen al desarrollo de la hipertensión.

Tubulina y NKA en eritrocitos humanos

La NKA presente en la membrana de todas las células eucariotas (Lee y col., 2007), es la enzima involucrada en la expulsión del Na^+ fuera de la célula (Skou, 1957). En condiciones basales, a las concentraciones intracelulares predominantes de iones Na^+ y K^+ , la enzima realiza un trabajo sub-máximo. Cuando la concentración intracelular de Na^+ aumenta, la bomba es capaz de trabajar más rápidamente para expulsar el exceso Na^+ . Sin embargo, la NKA también está bajo el control de una gran cantidad de mecanismos regulatorios que forman parte de un área compleja y fisiológicamente importante, cubriendo una amplia gama de mecanismos que regulan la enzima incluyendo la dopamina, noradrenalina, proteína quinasa A, proteína quinasa C y elementos del citoesqueleto asociados a la membrana (Kaplan, 2002).

En nuestro laboratorio previamente se demostró la presencia de un nuevo mecanismo para la regulación de la actividad NKA, los resultados obtenidos tanto en células neurales como no-neurales demuestran que la tubulina es capaz de formar un complejo con la NKA, y como consecuencia se produce la inhibición de la actividad enzimática; la actividad luego puede ser restaurada cuando se disocia el complejo (Casale y col., 2001; 2003; 2005; Arce y col., 2008). Un requisito para que la tubulina interaccione con la enzima es que la tubulina esté acetilada (Santander y col., 2006), una modificación post-traducciona que ocurre en el residuo Lys 40 de la α -tubulina. Durante la formación del complejo la tubulina interacciona con el dominio 5 (CD5) de la subunidad α de la NKA (Zampar y col., 2009).

En eritrocitos de humanos con hipertensión arterial esencial y eritrocitos de ratas espontáneamente hipertensas Lyon (LSH) y Okamoto (SHR) se han observado alteraciones en el transporte de iones Na^+ y K^+ (De Mendonca y col., 1980), por lo tanto estas alteraciones, se consideran un marcador bioquímico característico de la hipertensión arterial esencial (Meyer y col., 1981). De este modo, la NKA ha sido involucrada en el mecanismo molecular que subyace a esta patología (Garay y col., 1980; Kim y col., 2008).

Estudios previos de microscopía electrónica de eritrocitos humanos realizados por van Deurs y Behnke (1973), muestran que estas células no tienen microtúbulos. Sobre la base de estos resultados muchos autores niegan la presencia de tubulina en eritrocitos humanos (Bennett, 1985; Cohen y col., 1990; Liao y col., 2000). Sin embargo, estudios de proteómica recientes realizados por Pasini y col. (2006) y Goodman y col. (2007)

demuestran que en los eritrocitos humanos están presente diferentes isoformas de tubulina como lo son la tubulina $\alpha 3$, $\alpha 6$ y $\beta 1$. De acuerdo con estos hallazgos en el presente trabajo, usando técnicas de centrifugación diferencial, inmunoprecipitación, inmunoblot e inmunofluorescencia, se demuestra no sólo que los eritrocitos humanos poseen tubulina sino que además ésta puede presentar diferentes modificaciones post-traduccionales, tales como acetilación, tirosinación y detirosinación. Se demostró también que en eritrocitos la tubulina se halla distribuida en tres fracciones subcelulares diferentes: membrana, citosol y una fracción sedimentable a 100 000 x g. Esta última fracción es similar a la banda marginal de microtúbulos, una estructura encontrada en eritrocitos nucleados de vertebrados no mamíferos y otros tipos de células sanguíneas, la cual posee características estructurales importantes (Cohen y col., 1982). A pesar de que en los eritrocitos humanos la tubulina de la fracción sedimentable está en forma polimerizada y que en presencia de drogas que alteran la estabilidad microtubular (nocodazol y taxol) se comporta de manera similar a los microtúbulos, no conocemos la estructura exacta de este polímero por tal motivo nos referimos a ella como tubulina sedimentable o "Sed-tub". La presencia de tubulina en diferentes fracciones subcelulares de eritrocitos humanos nos permiten especular sobre un posible mecanismo de regulación de la actividad NKA en estas células por tubulina (y/o Sed-tub). De hecho demostramos que en membranas de eritrocitos humanos la tubulina se asocia a la NKA de membrana.

La cuantificación de tubulina en las diferentes fracciones muestra que aunque el contenido total de tubulina es el mismo en eritrocitos de individuos hipertensos y normotensos, la distribución de esta proteína entre las diferentes fracciones subcelulares es diferente. De este modo, los eritrocitos de individuos hipertensos presentan un aumento en la cantidad de tubulina de membrana y una disminución en los niveles de tubulina de la fracción Sed-tub en comparación con los individuos normotensos. Sobre la base de estos resultados postulamos que en eritrocitos de individuos hipertensos ocurriría una translocación de la tubulina desde la fracción Sed-tub a la membrana celular.

El mecanismo por el cual ocurre la translocación es desconocido, sin embargo podría deberse a diversos factores. Una posibilidad es que haya algún componente del plasma que sea capaz de inducir la translocación de la tubulina o que dicho proceso se genere durante la maduración de los progenitores nucleados a eritrocitos maduros. Otra

posibilidad podría ser que alteraciones en la dinámica y estabilidad de los microtúbulos sean responsables de esta translocación.

Apoyando esta última hipótesis, nuestros resultados muestran que la fracción Sed-tub de eritrocitos de individuos hipertensos es altamente estable al desensamblaje inducido por nocodazol y por frío. Además en estas células la tubulina acetilada y la tubulina detirosinada, ambas isoformas marcadores de estabilidad microtubular (Westermann y Weber, 2003), aumentan en mayor proporción que la tubulina total en las membranas de estas células. Por lo tanto existiría en eritrocitos de individuos hipertensos una macroestructura (Sed-tub) de tubulina más estable que en individuos normotensos, ya que los microtúbulos estables son mejores sustratos para las enzimas responsables de la acetilación (Sasse y Gull, 1988, Westermann y Weber, 2003). Por otro lado, dado que la tubulina acetilada es indispensable para interactuar y formar un complejo con la NKA (Santander y col., 2006), el aumento de esta isoforma de tubulina en microtúbulos estables podría promover la interacción de la Sed-tub con las membranas a través la formación de un complejo con la NKA, enriqueciendo de ésta manera a las membranas con una alta cantidad de tubulina y causando la inhibición de la enzima. Esta idea es consistente con las observaciones de que el tratamiento de la fracción Sed-tub de eritrocitos normotensos con taxol provoca estabilización de esta estructura, incrementando el nivel de tubulina acetilada, detirosinada y tubulina total en la fracción de membrana y disminuyendo la actividad NKA, siendo estos resultados similares a los valores observados en eritrocitos de individuos hipertensos, en donde se observa que la tubulina forma mayor cantidad de complejo tubulina acetilada/NKA y como consecuencia la actividad enzimática está inhibida siendo un 75 % que en los controles normotensos. Estos resultados nos permiten además especular que alteraciones del sistema molecular que gobierna la dinámica de la fracción Sed-tub en los eritrocitos podría ser una causa de hipertensión.

Estabilidad de los polímeros de tubulina. TTL, detirosinación y MAPs

Se ha determinado en eritrocitos nucleados que la estabilidad y dinamismo de la banda marginal de microtúbulos se debe no solo a las proteínas MAPs, sino que también se debe considerar a los isotipos de tubulina que constituyen esta estructura (Trinczek y

col., 1993). De esta manera, los cambios en el contenido de los diferentes isotipos de tubulina en eritrocitos de individuos hipertensos en comparación con los eritrocitos de individuos normotensos, estarían contribuyendo al incremento en la estabilidad de la fracción Sed-tub. Probablemente alteraciones en la dinámica y estabilidad de los microtúbulos pueden provocar grandes cambios en el funcionamiento celular dado que modificaciones en estos parámetros han sido involucrados en diversas patologías tales como el cáncer (Peris y col., 2006). Otra función atribuida a las diferentes modificaciones post-traduccionales de la tubulina es que funcionan como marcadores temporo-espaciales de los microtúbulos indicando los sitios de unión de diferentes proteínas que regulan una variedad de eventos celulares, tales como diferentes MAPs, motores moleculares y proteínas de tráfico hacia el extremo positivo (Ikegami y Setou, 2010). Dentro de estas modificaciones el ciclo de tirosinación/detirosinación de la tubulina es uno de los más estudiados.

Debido a que el ARNm para la α -tubulina codifica para una tirosina en el extremo C-terminal de la proteína, la capacidad de tirosinación de una célula depende del equilibrio entre dos enzimas, la TTC1P (Argaña y col., 1978) que remueve ese residuo de aminoácido produciendo glu-tubulina, ya que expone un ácido glutámico C-terminal y la TTL que restaura la tirosina C-terminal para producir nuevamente tir-tubulina (Barra y col., 1973). El equilibrio entre las dos isoformas involucradas en este ciclo es esencial para el normal desarrollo de las células, ya que se ha demostrado que anomalías en el ciclo de tirosinación de tubulina están involucradas en la progresión de tumores (Peris y col., 2006).

El aumento de la estabilidad de la fracción Sed-tub, sería también un factor determinante del aumento en el contenido de tubulina detirosinada en los eritrocitos, ya que la estabilización de los microtúbulos aumenta la detirosinación de tubulina (Webster y col., 1987), dicha estabilidad está regulada por factores tales como proteínas MAPs y otras proteínas de unión, como CLIP-170, EB1 y Cap-Gly (Peris y col., 2006; Zhang y col., 2009; Whipple y col., 2010). No obstante, además de considerarse un marcador de estabilidad de microtúbulos, la tubulina detirosinada impide la unión de factores desestabilizantes promoviendo así la estabilidad de los microtúbulos (Peris y col., 2009), con lo cual no podemos descartar que el aumento de tubulina detirosinada en los eritrocitos de individuos hipertensos sea una causa y no una consecuencia de la mayor estabilidad de la fracción Sed-tub.

Whipple y col. (2010), demostraron que durante la transición del epitelio a mesenquima, proceso asociado con la invasión de tumores, hay una baja actividad TTL aumentando así el nivel de tubulina detirosinada; esto mejora la reinsertión de las células tumorales circulantes en el endotelio vascular durante la metástasis. Poniendo de manifiesto que el aumento de esta modificación postraducciona se asocia a diversas patologías.

En el presente trabajo se demostró una posible nueva función de la tubulina detirosinada en la regulación de la NKA, ya que el incremento de esta isoforma de tubulina en la membrana potencia el efecto inhibitorio de la tubulina acetilada sobre la actividad NKA, sugiriendo que el estado de tirosinación/detirosinación de la tubulina tiene un papel importante en la regulación de la actividad de la enzima en la hipertensión arterial esencial. De acuerdo con esto, nosotros encontramos en extractos citosólicos de eritrocitos de pacientes hipertensos y cerebro de ratas SHR diferentes componentes que hacen posible un aumento en la detirosinación de tubulina. Estos son:

- 1- La capacidad de tirosinar tubulina en extractos citosólicos de eritrocitos de pacientes hipertensos es 12 veces menor que la observada en los controles normotensos.
- 2- En la fracción citosólica de eritrocitos de individuos hipertensos y cerebro de ratas SHR hay una disminución en el contenido de la enzima TTL.
- 3- La tubulina de cerebro de ratas hipertensas muestra un dinamismo diferente ya que forma mayor cantidad de microtúbulos.
- 4- Los eritrocitos de pacientes hipertensos poseen una macroestructura altamente estable a agentes desensamblantes como el nocodazol y bajas temperaturas, lo que facilitaría la acción de la tubulina carboxipeptidasa provocando un aumento del contenido de tubulina detirosinada (Wheland y Weber, 1987; Webster y col., 1987).

Se ha determinado también que la tirosinación de α -tubulina en microtúbulos neuronales puede ser regulada por MAP1B, ya que la interacción entre MAP1B y TTL facilita la tirosinación de la α -tubulina principalmente en tubulina no polimerizada (Utreras y col., 2008). Por otro lado, se ha propuesto que MAP1B puede prevenir la detirosinación de tubulina sobre microtúbulos ensamblados (Goold y col., 1999). De acuerdo con esto, el aumento de tubulina detirosinada y la disminución en la cantidad de enzima TTL en eritrocitos humanos de individuos hipertensos y cerebro de ratas SHR

demostrados en el presente trabajo podrían estar relacionados a cambios en el contenido de diferentes MAPs.

Se ha demostrado que las MAPs juegan un papel importante en regular la estabilidad de los microtúbulos en los axones y las dendritas, en la determinación de la forma neuronal y en la regulación del equilibrio entre rigidez y la plasticidad de los procesos neuronales (Faller y col., 2009). Cuando se analizó el contenido de MAPs, en cerebros de ratas SHR se observó una marcada disminución del contenido de MAP1B tanto en homogenato total como unida a microtúbulos. En relación con las diferencias encontradas en el contenido de MAP1B en individuos hipertensos también se observó una marcada disminución en el contenido de MAP2AB y un incremento en los niveles de LC3 unida a microtúbulos. Mann y Hammarback (1994) inicialmente establecieron que la función primaria de la proteína LC3, la cadena liviana de MAP1B, es regular la unión de las cadenas pesadas MAP1A y MAP1B a los microtúbulos. Estudios posteriores demostraron que LC3 es capaz de estabilizar microtúbulos y suprimir la dinamicidad de los mismos directamente, ya que favorece los eventos de crecimiento sobre los de acortamiento. Es interesante destacar que el efecto de LC3 sobre la dinámica de los microtúbulos es independiente de su asociación con moléculas de cadena pesada (Mei y col., 2000). A pesar de que la LC3 fue descubierta como una MAP neuronal, esta cadena liviana también se expresa en tejidos no neuronales, por esta razón su efecto sobre la dinámica de los microtúbulos puede ser relevante en otros tejidos (Kabeya y col., 2000). No obstante, el efecto de LC3 en presencia de moléculas de cadena pesada también es importante (Togel y col., 1998; Mei y col., 2000; Noiges y col., 2002). De acuerdo con esto, los resultados obtenidos en el presente trabajo en ratas SHR sugieren que posiblemente en individuos hipertensos el aumento de LC3 unida a microtúbulos está regulada de una manera diferente que en individuos normotensos y por lo tanto, disminuye la cantidad de MAP1B unida a microtúbulos. Además, el aumento de la detirosinación de tubulina, la mayor capacidad de polimerización y la estabilidad de los microtúbulos, efectos observados en individuos hipertensos también pueden ser atribuidos al marcado aumento de LC3, tal como se observó en experimentos *in vitro* realizados por Faller y col. (2009). Debido a que las MAPs están descritas como proteínas estabilizantes de microtúbulos y dado que en el presente trabajo encontramos mayor contenido de LC3 pero contrariamente menor cantidad de MAP1A y MAP2AB, queda por establecer cual es el verdadero efecto de estas proteínas sobre la estabilidad de los polímeros de tubulina en la hipertensión. Lo que si queda

definido es que dichas proteínas no están en iguales cantidades en individuos hipertensos comparando con individuos normotensos.

En ratas SHR se observa una mayor capacidad para formar microtúbulos. Posiblemente esto se debe a una combinación entre las características de la tubulina y las MAPs asociadas, ya que tubulina purificada de ratas SHR recupera su capacidad de ensamblaje *in vitro* sólo en presencia de MAPs del mismo origen, mientras que en ratas normotensas la tubulina purificada tiene menor capacidad de formar microtúbulos independientemente del origen de las MAPs utilizadas.

En conjunto estos resultados sugieren que el aumento en el contenido de LC3 unida a los microtúbulos podría inducir una disminución en los niveles de MAP1B, estos cambios serían los responsables del diferente dinamismo de los microtúbulos y la mayor estabilidad de los mismos. Además estas alteraciones en el contenido de las MAPs y el dinamismo microtubular junto con la menor capacidad de tirosinación y baja expresión de TTL en individuos hipertensos contribuirían al aumento de los niveles de tubulina detirosinada en la membrana. Estos resultados están de acuerdo con los hallazgos de Utreras y col. (2008) quienes establecieron que la MAP1B regula la tirosinación de α -tubulina. En conclusión, los resultados mostrados apoyan la hipótesis planteada de que las alteraciones del sistema molecular que gobiernan la dinámica de la Sed-tub de tubulina en los eritrocitos tendrían un papel importante en la hipertensión.

Desordenes hemorreológicos en la hipertensión: participación de la tubulina de membrana en la deformabilidad del eritrocito

Los eritrocitos son las únicas células de mamíferos en las cuales la membrana plasmática es su único componente estructural, siendo responsable del transporte y las diferentes características mecánicas. Una importante característica de los eritrocitos es su capacidad para deformarse durante repetidos pasajes a través de estrechos capilares de la microvasculatura. La membrana celular muestra un comportamiento único ya que es altamente elástica, responde rápidamente al estrés aplicado por fluidos en la circulación y es muy resistente en términos estructurales (Mohandas y Gallagher, 2008). Estudios durante más de tres décadas en eritrocitos de individuos sanos y de pacientes con desordenes hereditarios han dilucidado procesos moleculares subyacentes al

funcionamiento normal y aberrante de la membrana celular de estas células (Monadas y col., 1983; Monadas y Chasis, 1993; Monadas y Evans, 1994; Discher, 2000; Delaunay, 2007). Los eritrocitos son tanto por sus propiedades mecánicas como por su abundancia los principales determinantes del comportamiento reológico de la sangre. La deformabilidad de los eritrocitos es un importante concepto en hemorreología y tiene una participación clave en el deterioro de la microcirculación en la hipertensión (Levy y col., 2008).

En eritrocitos de ratas SHR se ha encontrado una marcada y sostenida disminución de la deformabilidad que hasta la actualidad no ha podido ser explicada por cambios en el volumen corpuscular medio o en la concentración corpuscular media de hemoglobina, y se considera que puede ser causada por anomalías en la membrana del eritrocito (Aragon-Birlouez y col., 1984; Chabanel y col., 1987; Ariyoshi y col., 2010). En adición, otros investigadores han atribuido la disminución de la deformabilidad eritrocitaria en humanos con hipertensión arterial, a alteraciones en la composición lipídica de las membranas y a modificaciones de la actividad NKA o del transporte Na^+/K^+ (Levenson y Simon, 2000). De acuerdo con esto, en este trabajo se demuestra que modificaciones en el contenido de tubulina de membrana de los eritrocitos induce alteraciones en la deformabilidad de estas células. Como se mencionó anteriormente, este aumento de tubulina en la membrana de los eritrocitos se debe probablemente a una translocación de esta proteína desde la fracción Sed-tub a la membrana, donde forma el complejo con la NKA, que resulta en la inhibición de la actividad de la enzima. De hecho, cuando se indujo la estabilización de la fracción Sed-tub en eritrocitos de individuos normotensos por tratamiento de las células con taxol, aumentaron los niveles de tubulina acetilada, detirosinada y tubulina total en la fracción de membrana y disminuyó la actividad NKA y la deformabilidad de los eritrocitos, los valores obtenidos en estos parámetros luego del tratamiento fueron similares a los observados en los eritrocitos de individuos hipertensos en condiciones basales. Por otro lado, el tratamiento con nocodazol de eritrocitos de individuos hipertensos produce disminución de la tubulina de membrana y aumento de la deformabilidad de estas células, siendo este comportamiento similar al observado en eritrocitos de individuos normotensos.

Estos resultados fueron concordantes con datos obtenidos en experimentos *in vivo* en ratas SHR y Wistar, que demuestran que en ratas Wistar la administración intraperitoneal de taxol provocó aumento de tubulina en la membrana del eritrocito junto con una disminución de la deformabilidad de estas células hasta valores similares

a los observados en ratas SHR. Por otro lado, cuando las SHR fueron tratadas con nocodazol la disminución del contenido de tubulina en la membrana de los eritrocitos se correlacionó con un aumento en la deformabilidad de las células.

En conclusión, la modificación del contenido de tubulina de membrana de los eritrocitos sería capaz de alterar la deformabilidad de estas células. Esto es confirmado por las siguientes observaciones:

- 1- Eritrocitos de individuos hipertensos y SHR poseen un mayor contenido de tubulina en la membrana y baja deformabilidad con respecto a sus controles normotensos.
- 2- *In vitro* el aumento de los niveles de tubulina en la membrana de eritrocitos humanos provoca disminución de la deformabilidad celular y viceversa, la disminución del contenido de tubulina de membrana induce aumento de la deformabilidad de los eritrocitos.
- 3- El aumento *in vivo* de la tubulina de membrana en ratas Wistar por efecto del taxol causa disminución de la deformabilidad eritrocitaria y la disociación de la tubulina de membrana por nocodazol en SHR provoca un aumento de la deformabilidad de los eritrocitos.
- 4- La hipertensión arterial se asocia con una disminución en la deformabilidad de los eritrocitos (Ariyoshi y col., 2010) y el desarrollo de la enfermedad en SHR a los 42 días coincide con un significativo aumento de la tubulina de membrana de los eritrocitos y una disminución en la deformabilidad.

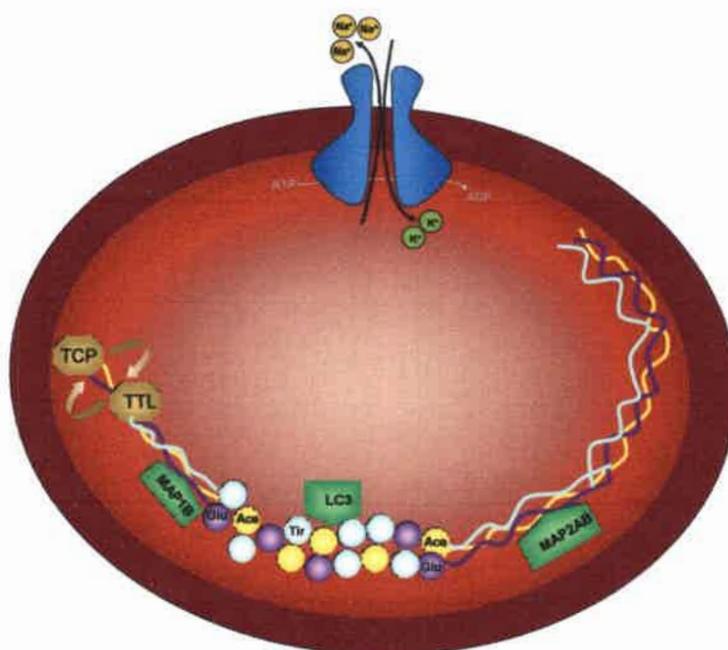
En ratas SHR el desarrollo de la hipertensión se inicia a las 3 semanas de vida y se establece totalmente entre las semanas 7 y 8 semanas. Durante el período pre-hipertensivo la deformabilidad de los eritrocitos disminuye gradualmente (Chabanel y col., 1987; Ariyoshi y col., 2010), aquí se demuestra que durante este período también ocurre una migración gradual de la tubulina a la membrana alcanzando un aumento máximo a las 7 semanas, esto apoya la hipótesis de que la tubulina podría ser el componente responsable de alteraciones en la deformabilidad que sufren los eritrocitos. De acuerdo con esto, observamos que modificaciones en el contenido de tubulina de membrana de eritrocitos de ratas se correlacionan con cambios en los valores de presión arterial sistólica. De hecho, cuando ratas Wistar fueron inyectadas con taxol, se observó que los valores de presión arterial sistólica aumentaron significativamente y este aumento fue correlativo con el incremento del contenido de tubulina en la membrana y

la menor deformabilidad de los eritrocitos observado anteriormente. Los parámetros mencionados sufren alteraciones a las 3 horas post-inyección y luego se reestablecen los valores normales. Por otro lado, en ratas SHR inyectadas con nocodazol la presión arterial sistólica disminuyó a los 6 días post-inyección y esta disminución se mantuvo hasta los 30 días, tiempo en el cual la PA retornó a sus valores basales. Estos resultados concuerdan parcialmente con la disminución del contenido de tubulina de membrana y la menor deformabilidad de estas células provocadas por nocodazol, ya que previamente el efecto de la droga sobre ambos parámetros fue visible sólo a los 14 días post-inyección. Tales observaciones no sólo concuerdan con los resultados descritos por Chabanel y col. (1987) y Ariyoshi y col. (2010) que demuestran que la marcada disminución de la deformabilidad de los eritrocitos en ratas SHR contribuye al desarrollo y mantenimiento de la hipertensión, sino que además aportaría evidencias para el esclarecimiento de las causas, hasta ahora desconocidas, que producen las modificaciones de la deformabilidad eritrocitaria.

A pesar de que no se sabe si la deformabilidad de los eritrocitos afecta directamente la presión arterial, esta claro que cambios en la estabilidad de los microtúbulos si afectan la presión. Ya que *in vivo*, el nocodazol fue capaz de disminuir la presión arterial, y el efecto opuesto fue generado por el taxol. El efecto de estas drogas se correlaciona inversamente con la deformabilidad de los eritrocitos. Esto nos permite especular que la deformabilidad de los eritrocitos estaría involucrada en la determinación de la presión arterial, aunque, dados los múltiples efectos de estas drogas sobre un amplio espectro de tipos celulares, no podemos descartar otros efectos del nocodazol y taxol sobre otros tejidos. Un hecho que nos hace suponer que existirían múltiples efectos de las drogas administradas es que la correlación encontrada entre deformabilidad, contenido de tubulina de membrana y disminución de la presión arterial sistólica en ratas SHR tratadas con nocodazol, se observó sólo a los 14 días post-inyección, después de este período la deformabilidad y la tubulina de membrana de los eritrocitos de ratas SHR vuelven a los valores normales, mientras que la presión arterial sistólica permanece baja hasta el día 20 post-inyección.

En conjunto, los resultados descritos en el presente trabajo de tesis nos permiten plantear un posible mecanismo de regulación de la NKA por tubulina acetilada y detirosinada en eritrocitos hipertensos (Fig. 34), en dicho mecanismo sugerimos que en individuos hipertensos la mayor estabilidad de la fracción Sed-tub, producto de la alteración en el contenido de las diferentes MAPs, tales como LC3, MAP1B y MAP2AB, conlleva cambios en el contenido de las diferentes isoformas de tubulina que forman parte de esta estructura, principalmente las isoformas detirosinada y acetilada, lo que promueve la translocación de la tubulina a la membrana y la formación de un complejo con la NKA inhibiendo de esta manera la actividad de la enzima. Estos cambios reducen la deformabilidad de las células y estas alteraciones reológicas influenciarían el flujo de la sangre lo que podría llevar a la oclusión de microvasos. Como consecuencia, estas alteraciones hemorreológicas podrían ser una posible causa del aumento de la presión arterial.

A)



B)

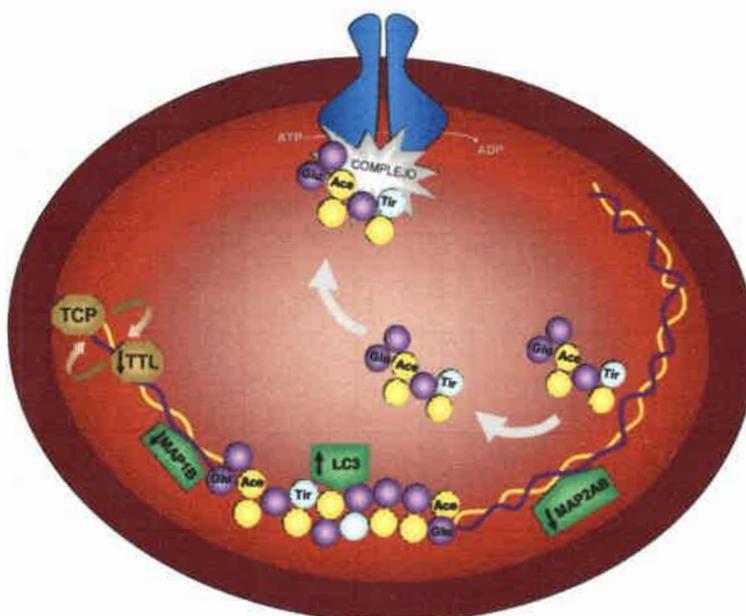


Figura 34: Representación esquemática del mecanismo de regulación de la actividad NKA por tubulina en eritrocitos de individuos normotensos e hipertensos. (A) En eritrocitos de individuos normotensos la tubulina se encuentra principalmente en la fracción Sed-tub. Consecuentemente no hay formación de complejo y se observa alta actividad NKA. (B) En eritrocitos de individuos hipertensos el aumento de tubulina acetilada y detirosinada promueven la translocación a la membrana, hay formación de complejo y se inhibe la actividad NKA. Transporte de Na^+ (círculos amarillos) y K^+ (círculos verdes) a través de la NKA. Estructura “Sed-tub” formada por tubulina detirosinada (Glu, círculos lavanda), acetilada (Ace, círculos amarillo claro) y tirosinada (Tir, círculos celestes). Proteínas de unión a microtúbulos: MAPs (pentágonos verdes). Ciclo de tirosinación/detirosinación: enzimas TTL y TCP (octágonos marrones).



*Referencias
bibliográficas*

- Aderounmu, A.F. and Salako, L.A. (1979). Abnormal cation composition and transport in erythrocytes from hypertensive patients. *Eur. J. Clin. Invest.* 9: 369-375.

- Al Bassam, J.; Ozer, R.S.; Safer, D.; Halpain, S. and Milligan, R.A. (2002). MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *J. Cell. Biol.* 157: 1187-1196.

- Alet, A.; Chiesa, M.; D'Arrigo, M.; Foresto, P.; Valverde, J. and Rasia, R. (2001). Hemorreología comparativa. Estudio en diabéticos e hipertensos. *Act. Bioq. Clin. Latinoamericana* 35: 63-68.

- Alonso, A.C.; Nuñez-Fernandez, M.; Beltramo, D.M.; Casale, C.H. and Barra, H.S. (1999). Na⁺,K⁺-ATPase was found to be the membrane component responsible for the hydrophobic behaviour of the brain membrane tubulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253: 824-827.

- Amante,L.; Ancona, A. and Forni, L.(1972). The conjugation of immunoglobulins with tetramethylrhodamine isothiocyanate. A comparison between the amorphous and the crystalline fluorochrome. *J Immunol Methods.* 1:289-301

- Ambrosini, E.; Costa, F.V.; Montebugnoli, L.; Tartagni, F. and Magnani, B. (1981). Increased intralymphocytic sodium content in essential hypertension. *Clin. Sci.* 61: 181-186.

- Aragon-Birlouez, I.; Montenay-Garestier, T. and Devynck, M.A. (1984). Further analysis of cell membrane changes in genetic hypertension in rats by diphenylexatriene fluorescence polarization. *Clin. Sci.* 66: 717-723.

- Arata, Y.; Geshi, E.; Nomizo, A.; Aoki, S. and Katagiri, T. (1999). Alterations in sarcoplasmic reticulum and angiotensin II receptor type 1 gene expression in spontaneously hypertensive rat hearts. *Jpn. Circ. J.* 63: 367-372.

- Arce, C.A.; Casale, C.H. and Barra, H.S. (2008). Submembraneous microtubule cytoskeleton: regulation of ATPases by interaction with acetylated tubulin. *FEBS J.* 275: 4664-4674.

- Argaraña, C.E.; Barra, H.S. and Caputto, R. (1978). Release of [¹⁴C]tyrosine from tubulinyl-[¹⁴C]tyrosine by brain extract. Separation of a carboxypeptidase from tubulin-tyrosine ligase. *Mol. Cell. Biochem.* 19: 17-21.

- Ariyoshi, K.; Maruyama, T.; Odashiro, K.; Akashi, K.; Fujino, T. and Uyesaka, N. (2010). Impaired erythrocyte filterability of spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circ. J.* 74: 129-136.

- Babitch, J. A. (1981). Synaptic plasma membrane tubulin may be an integral constituent. *J. Neurochem.* 37: 1394-1400.

- Bagrov, A.Y.; Agalakova, N.I.; Kashkin, V.A. and Fedorova, O.V. (2009). Endogenous cardiotonic steroids and differential patterns of sodium pump inhibition in NaCl-loaded salt-sensitive and normotensive rats. *Am. J. Hypertens.* 22: 559-563.

- Ball, W.J.; Schwartz, A. and Lessard, J.L.(1982). Isolation and characterization of monoclonal antibodies to (Na⁺ / K⁺)-ATPase. *Biochim Biophys Acta.* 719:413-23.

- Barra, H.S.; Arce, C.A.; Rodriguez, J.A. and Caputto, R. (1973). Incorporation of phenylalanine as a single unit into rat brain protein: reciprocal inhibition by phenylalanine and tyrosine of their respective incorporations. *J. Neurochem.* 21: 1241-1251.

- Becker, W. (1969). Determination of antisera titres using the single radial immunodiffusion method. *Immunochemistry.* 6:539-46

- Beltramo, D. M., Alonso A. del C., and Barra, H. S. (1992). Tyrosinated, detyrosinated and acetylated tubulin isotypes in rat brain membranes. Their proportions in comparison with those in cytosol. *Mol. Cel. Biochem.* 112: 173-180.

- Beltramo, D.M.; Nuñez, M.; Alonso, A. and Barra, H.S. (1994). The relationship of hydrophobic tubulin with membranes in neural tissue. *Mol. Cel. Biochem.* 141: 57-63.

- Bennett, V. (1985). The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 273-304.

- Bhattacharyya, B. and Wolff, J. (1975). Membrane-bound tubulin in brain and thyroid tissue. *J. Biol. Chem.* 250: 7639-7646.

- Blanco, A. (2006). Química Biológica. 8va. Edición. Editorial "El Ateneo". 9: 183-185.

- Bonnet, C.; Boucher, D.; Lazereg, S.; Pedrotti, B.; Islam, K.; Denoulet, P. and Larcher, J.C. (2001). Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation. *J. Biol. Chem.* 276: 12839-12848.

- Boon, N.A.; Harper, C.; Aronson, J.K. and Grahame-Smith, D.G. (1985). Cation transport functions in vitro in patients with untreated essential hypertension: A comparison of erythrocytes and leucocytes. *Clin. Sci.* 68: 511-515.

- Boudier, H.A. and Ambrosio, G. (2000). Microcirculation and Cardiovascular Disease. *London: Lippincott, Williams and Wilkins Ed.* 64-65.

- Bouvier, M.; Szatkowski, M.; Amato, A. and Attwell, D. (1992). The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions. *Nature* 360: 471-474.

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principles of dye-protein binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

- Burton, P.R. and Himes, R.H. (1979). Electron microscope studies of pH effects on assembly of tubulin free of associated proteins. Delineation of substructure by tannic acid staining. *J. Cell. Biol.* 77: 120-133.

- Cabrales, P. (2007). Effects of erythrocyte flexibility on microvascular perfusion and oxygenation during acute anemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293: 1206-1215.

- Campetelli, A.N.; Previtali, G.; Arce, C.A.; Barra, H.S. and Casale, C.H. (2005). Activation of the plasma membrane H-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by glucose is mediated by dissociation of the H⁺-ATPase-acetylated tubulin complex. *FEBS J.* 272: 5742-5752.

- Casale, C.H.; Alonso, A.C. and Barra, H.S. (2001). Brain plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase is inhibited by acetylated tubulin. *Mol. Cell. Biochem.* 216: 85-92.

- Casale, C.H.; Previtali, G. and Barra, H.S. (2003). Involvement of acetylated tubulin in the regulation of Na⁺,K⁺-ATPase activity in cultured astrocytes. *FEBS Lett.* 534: 115-118.

- Casale, C.H.; Previtali, G.; Serafino, J.J.; Arce, C.A. and Barra, H.S. (2005). Regulation of acetylated tubulin/Na⁺,K⁺-ATPase interaction by L-glutamate in non-neural cells: involvement of microtubules. *Biochim. Biophys. Acta* 1721: 185-192.

- Chabanel, A.; Schachter, D. and Chien, S. (1987). Increased rigidity of red blood cell membrane in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 10: 603-607.

- Chien, S.; Dormandy, S.; Ernst, E. and Matai, A. (1987). Physiological and pathophysiological significance of hemorheology. *Clin. Hemorheol.* 125-164.

- Cohen, W.D.; Bartelt, D.; Jaeger, R.; Langford, G. and Nemhauser, I. (1982). The cytoskeletal system of nucleated erythrocytes. I. Composition and function of major elements. *J. Cell. Biol.* 93: 828-838.

- Cohen, W.D.; Cohen, M.F.; Tyndale-Biscoe, C.H.; VandeBerg, J.L. and Ralston, G.B. (1990). The cytoskeletal system of mammalian primitive erythrocytes: studies in developing marsupials. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 16: 133-145.

- Cook, T.A.; Nagasaki, T. and Gundersen, G.G. (1998). Rho guanosine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid. *J. Cell. Biol.* 141: 175-185.

- de Mendonca, M.; Grichois, M.L.; Garay, R.P.; Sassard, J.; Ben-Ishay, D. and Meyer, P. (1980). Abnormal net Na⁺, and K⁺ fluxes in erythrocytes of three varieties of genetically hypertensive rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 4283-4286.

- de Néchaud, B.; Wolff, A. ; Jeantet, C. and Bourre, J. M. (1983). Characterization of tubulin in mouse brain myelin. *J. Neurochem.* 41: 1538-1544.

- De Witt, N.D.; dos Santos, C.F.; Allen, K.E. and Slayman CW. (1998). Phosphorylation region of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. Role in protein folding and biogenesis. *J. Biol. Chem.* 273: 21744-21751.

- Dehmelt, L. and Halpain, S. (2004). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Gen. Biol.* 6: 204-209.

- Delaunay, J. (2007). The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. *Blood Rev.* 21: 1-20.

- Desai, A. and Mitchison, T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13: 83-117.

- Diez-Silva, M.; Dao, M.; Han, J.; Lim, C.T, and Suresh, S. (2010). Shape and biomechanical characteristics of human red blood cells in health and disease. *MRS Bull.* 35: 382-388.

- Discher, D.E. (2000). New insights into erythrocyte membrane organization and microelasticity. *Curr. Opin. Hematol.* 7: 117-122.

- Drewes, G.; Ebnet, A. and Mandelkow, E.M. (1998). MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *TIBS.* 23: 307-311.

- Eichenlaub-Ritter, U. and Tucker, J.B. (1984). Microtubules with more than 13 protofilaments in the dividing nuclei of ciliates. *Nature* 307: 60-62.

- Erdine, S. and Aran, S.N. (2004). Current status of hypertension control around the world. *Clin. Exp. Hypertens.* 26: 731-738.

- Ernst, E. (1987). Influence of regular physical activity on blood rheology. *Eur. Heart J.* 8: 59-62.

- Euteneuer, U. and McIntosh, J.R. (1981). Polarity of some motility-related microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 372-376.

- Faller, E. and Brown, D. (2009). Modulation of microtubule dynamics by the microtubule associated protein MAP1A. *J. Neurosci. Res.* 87: 1080-1089.

- Fink, J.K.; Jones, S.M.; Esposito, C. and Wilkowski, J. (1996). Human microtubule-associated protein 1a (MAP1A) gene: genomic organization, cDNA sequence, and developmental- and tissue-specific expression. *Genomics.* 35:577-85.

- Foresto, P.; D'Arrigo, M.; Carrera, L.; Etcheper, R.; Valverde, J. and Rasia, R. (2000). Evaluation of red blood aggregation in diabetes in computerized image analysis. *Medicina* 60: 570-572.

- Foresto, P.; D'Arrigo, M.; Filippini, F.; Gallo, R.; Barberena, L.; Racca, L.; Valverde, J. y Rasia, R. (2005). Evaluación de alteraciones hemorreológicas en pacientes hipertensos. *Medicina* 65: 121-125.

- Fukushima, N.; Furuta, D.; Hidaka, Y.; Moriyama, R. and Tsujiuchi, T. (2009). Posttranslational modifications of tubulin in the nervous system. *J. Neurochem.* 109: 683-693.

- Garay, R.P.; Dagher, G.; Pernollet, M.G.; Devynck, M.A. and Meyer, P. (1980). Inherited defect in a Na⁺,K⁺-co-transport system in erythrocytes from essential hypertensive patients. *Nature* 284: 281-283.

- Gelfand, V.I. (1991). Microtubule dynamics: mechanism, regulation and function. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 7: 93-116.

- Gobel, B.; Schulte, A.; Weisser, B.; Glanzer, K.; Vetter, H. and Dusing, R. (1991). Arterial blood pressure. Correlation with erythrocyte count, hematocrit and haemoglobin concentration. *Amer. J. Hypertension* 4: 14-19.

- Goedert, M.; Ghetti, B. and Spillantini, M.G. (2000). Tau gene mutations in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17). Their relevance for understanding the neurodegenerative process. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 920: 74-83.

- Goodman, S.R.; Kurdia, A.; Ammann, L.; Kakhniashvili, D. and Daescu, O. (2007). The human red blood cell proteome and interactome. *Exp. Biol. Med.* 232: 1391-1408.

- Goold, R.G.; Owen, R. and Gordon-Weeks, P.R. (1999). Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *J. Cell. Sci.* 112: 3373-3384.

- Gozes, I. and Littauer, U. (1979). The alpha-subunit of tubulin is preferentially associated with brain presynaptic membranes. *FEBS Lett.* 99: 86-90.

- Gundersen, G.G.; Kalnoski, M.H. and Bulinski, J.C. (1984). Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo. *Cell* 38: 779-789.

- Haggarty, S.J.; Koeller, K.M.; Wong, J.C.; Grozinger, C.M. and Schreiber, S.L. (2003). Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 4389-4394.

- Halpain, S. and Dehmelt, L. (2006). The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Gen. Biol.* 7: 224.1-224.7.

- Hammond, J.W.; Cai, D. and Verhey, K.J. (2008). Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 20: 71-76.

- Hargreaves, A.J. and Avila, J. (1985). Localization and characterization of tubulin-like proteins associated with brain mitochondria: the presence of a membrane-specific isoform. *J. Neurochem.* 45: 490-496.

- Heidemann, S.R.; Zieve, G.W. and McIntosh, J.R. (1980). Evidence for microtubule subunit addition to the distal end of mitotic structures in vitro. *J. Cell Biol.* 87: 152-159.

- Hubbert, C.; Guardiola, A.; Shao, R.; Kawaguchi, Y.; Ito, A. and Nixon, A. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417: 455-458.

- Ikegami, K. and Setou, M. (2010). Unique post-translational modifications in specialized microtubule architecture. *Cell. Struc. Funct.* 35: 15-22.

- Infante, A.S.; Stein, M.S.; Zhai, Y.; Borisy, G.G. and Gundersen, G.G. (2000). Detyrosinated (Glu) microtubules are stabilized by an ATP-sensitive plus-end cap. *J. Cell Sci.* 113: 3907-3919.

- Kabeya, Y.; Mizushima, N.; Ueno, T.; Yamamoto, A.; Kirisako, T.; Noda, T.; Kominami, E.; Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19: 5720-5728.

- Kaech, S.; Ludin, B. and Matus, A. (1996). Cytoskeletal plasticity in cells expressing neuronal microtubule-associated proteins. *Neuron* 17: 1189-1199.

- Kaplan, J.K. (2002). Biochemistry of Na⁺,K⁺-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 511-535.

- Khalil, R.A. (2006). Dietary salt and hypertension: new molecular targets add more spice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290: 509-513.

- Kim, M.; Kwon, J.; Suh, S.; Suh, J.; Jung, J.; Lee, S.; Kim, Y.; Cho, M.; Oh, G. and Lee, K. (2008). Transgenic overexpression of translationally controlled tumor protein induces systemic hypertension via repression of Na⁺,K⁺-ATPase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 44: 151-159.

- Kirschner, M.W. and Mitchison, T. (1986). Microtubule dynamics. *Nature* 324: 621.

- Kosachunhanun, N.; Hunt, S.C.; Hopkins, P.N.; Williams, R.R.; Jeunemaitre, X.; Corvol, P.; Ferri, C.; Mortensen, R.M.; Hollenberg, N.K. and Williams, G.H. (2003). Genetic determinants of nonmodulating hypertension. *Hypertension* 42: 901-908.

- Kreis, T.E. (1987). Microtubules containing detyrosinated tubulin are less dynamic. *EMBO J.* 6:2597-606.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- Larcher, J.C.; Boucher, D.; Lazereg, S.; Gros, F. and Denoulet, P. (1996). Interaction of kinesin motor domains with alpha- and beta-tubulin subunits at a tau-independent binding site. Regulation by polyglutamylation. *J. Biol. Chem.* 271: 22117-22124.

- Lavoie, J.L.; Lake-Bruse, K.D. and Sigmund, C.D. (2004). Increased blood pressure in transgenic mice expressing both human renin and angiotensinogen in the renal proximal tubule. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 286: 965-971.

- Lee, K.G.; Kerr, L.M. and Cohen, W.D. (2007). Molecular organization and in vivo function of the cytoskeleton of amphibian erythrocytes. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 64: 621-628.

- Lee, K.G.; Kerr, L.M. and Cohen, W.D. (2007). Molecular organization and in vivo function of the cytoskeleton of amphibian erythrocytes. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 64: 621-628.

- Lee, V.M.; Goedert, M. and Trojanowski, J.Q. (2001). Neurodegenerative tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 1121-1159.

- Levenson, J. y Simon, A. (2000). Reología sanguínea y riesgo cardiovascular. *AVFT.* 19: 05-10.

- Levy, B.I., Schiffrin, E.L.; Mourad, J.J.; Agostini, D.; Vicaut, E.; Safar, M.E. and Struijker-Boudier, H.A. (2008). Impaired tissue perfusion: a pathology common to hypertension, obesity, and diabetes mellitus. *Circulation* 118: 968-976.

- Levy, B.I., Schiffrin, E.L.; Mourad, J.J.; Agostini, D.; Vicaut, E.; Safar, M.E. and Struijker-Boudier, H.A. (2008). Impaired tissue perfusion: a pathology common to hypertension, obesity, and diabetes mellitus. *Circulation* 118: 968-976.

- Liang, M.; Tian, J.; Liu, L.; Pierre, S.; Liu, J.; Shapiro, J. and Xie, Z.J. (2007) Identification of a pool of non-pumping Na⁺-K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 282: 10585-10593.

- Liao, E.C.; Paw, B.H.; Peters, L.L.; Zapata, A.; Pratt, S.; Do, C.; Lieschke, G. and Zon, L. (2000). Hereditary spherocytosis in zebrafish riesling illustrates evolution of erythroid β -spectrin structure, and function in red cell morphogenesis and membrane stability. *Development* 127: 5123-5132.

- Lijnen, P.; M'Buyamba-Kabangu, J.; Fagard, R.; Staessen, J. and Amery, A. (1990). Erythrocyte concentrations and transmembrane fluxes of sodium and potassium in essential hypertension: Role of intrinsic and environmental factors. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 4: 321-333.

- Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D. and Darnell, J. (2002). *Biología Celular y Molecular. 4ta. Edición. Editorial "Panamericana".* Capítulo 15: 591.

- Luft, F.C. (2001). Molecular genetics of salt-sensitivity and hypertension. *Drug Metab. Dispos.* 29: 500-504.

- Mann, S.S. and Hammarback, J.A. (1994). Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J. Biol. Chem.* 269: 11492-11497.

- Mann, S.S. and Hammarback, J.A. (1996). Gene localization and developmental expression of light chain 3: a common subunit of microtubule-associated protein 1A (MAP1A) and MAP1B. *J. Neurosci. Res.* 43: 535-544.

- Margolis, R.L. and Wilson, L. (1978). Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro. *Cell* 13: 1-8.

- Mas, C. (1999). Tubulina tirosina ligasa de rata: aislamiento del ADNc, análisis de su expresión e influencia en el ciclo celular. *Tesis doctoral. Universidad Nacional de Córdoba.*

- Mei, X.; Sweatt, A.J. and Hammarback, J.A. (2000). Regulation of microtubule-associated protein 1B (MAP1B) subunit composition. *J. Neurosci. Res.* 62: 56-64.

- Meneton, P.; Jeunemaitre, X.; de Wardener, H.E. and MacGregor, G.A. (2005). Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases. *Physiol. Rev.* 85: 679-715.

- Meyer, H.E.; Mandelkow, E.M. and Mandelkow, E. (1995). Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J. Biol. Chem.* 270: 7679-7688.

- Meyer, P.; Garay, R.P.; Nazaret, C.; Dagher, G.; Bellet, M.; Broyer, M. and Feingold, J. (1981). Inheritance of abnormal erythrocyte cation transport in essential hypertension. *Br. Med. J.* 282: 1114-1117

- Mialhe, A.; Lafanechère, L.; Treilleux, I.; Peloux, N.; Dumontet, C.; Brémond, A.; Panh, M.H.; Payan, R.; Wehland, J.; Margolis, R.L. and Job, D. (2001). Tubulin

detyrosination is a frequent occurrence in breast cancers of poor prognosis. *Cancer Res.* 61: 5024-5027.

- Mogensen, M.M.; Tucker, J.B. and Stebbings, H. (1989). Microtubule polarities indicate that nucleation and capture of microtubules occurs at cell surfaces in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 108: 1445-1452.

- Mohammadi, K.; Kometiani, P.; Xie, Z. and Askari, A. (2001). Role of protein kinase C in the signal pathways that link Na^+/K^+ -ATPase to ERK1/2. *J. Biol. Chem.* 276: 42050-42056.

- Mohandas, N. and Chasis, J.A. (1993). Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin. Hematol.* 30: 171-192.

- Mohandas, N. and Evans, E. (1994). Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23: 787-818.

- Mohandas, N. and Gallagher, P.G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* 112: 3939-3948.

- Mohandas, N.; Chasis, J.A. and Shohet, S.B. (1983). The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape. *Semin. Hematol.* 20: 225-242.

- Monesterolo, N.E.; Santander, V.S.; Campetelli, A.N.; Arce, C.A.; Barra, H.S. and Casale, C.H. (2008). Activation of PMCA by calmodulin or ethanol in plasma membrane vesicles from rat brain involves dissociation of the acetylated tubulin/PMCA complex. *FEBS J.* 275: 3567-3579.

- Mori, T.; Nishimura, H.; Ueyama, M.; Kubota, J. and Kawamura, K. (1995). Comparable effects of angiotensin II and converting enzyme blockade on

hemodynamics and cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circ. J.* 59: 624-630.

- Nesher, M.; Shpolansky, U.; Rosen, H. and Lichtstein, D. (2007). The digitalis-like steroid hormones: New mechanisms of action and biological significance. *Life Sci.* 80: 2093-2107.

- Nogales, E.; Wolf, S. and Downing, K. (1998). Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391: 199-203.

- Noiges, R.; Eichinger, R.; Kutschera, W.; Fischer, I.; Nemeth, Z. and Wiche, G. (2002). Propst F: Microtubule-associated protein 1A (MAP1A) and MAP1B: light chains determine distinct functional properties. *J. Neurosci.* 22: 2106-2114.

- Nuñez, M.; Beltramo, D.; Alonso, A. and Barra, H. S. (1997). *Mol. Cel. Biochem.* 170: 91-98.- Maccioni, R.B and Cambiazo, V. (1995). Role of Microtubule-Associated Proteins in the Control of Microtubule Assembly. *Physiological reviews.* 75: 835-856.

- Palazzo, A.F.; Cook, T.A.; Alberts, A.S. and Gundersen, G.G. (2001). mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nature Cell. Biol.* 3: 723-729.

- Panda, D.; Samuel, J.C.; Massie, M.; Feinstein, S.C. and Wilson, L. (2003). Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four repeat tau: implications for the onset of neurodegenerative disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 9548-9553.

- Pasini, M.E.; Kirkegaard, M.; Mortensen, P.; Lutz, H.U. Thomas, A.W. and Mann, M. (2006). In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood* 108: 791-801.

- Paturle-Lafanechère, L.; Eddé, B.; Denoulet, P.; Van Dorselaer, A.; Mazarguil, H.; Le Caer, J.P.; Wehland, J. and Job, D. (1991). Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochem.* 30: 10523-10528.

- Peris, L.; They, M.; Fauré, J.; Saoudi, Y.; Lafanechère, L.; Chilton, J.K.; Gordon-Weeks, P.; Galjart, N.; Bornens, M.; Wordeman, L.; Wehland, J.; Andrieux, A. and Job, D. (2006). Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J. Cell Biol.* 174: 839-849.

- Peris, L.; Wagenbach, M.; Lafanechère, L.; Brocard, J.; Moore, A.T.; Kozielski, F.; Job, D.; Wordeman, L. and Andrieux, A. (2009). Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J. Cell Biol.* 185: 1159-1166.

- Piperno, G. and Fuller, M.T. (1985). Monoclonal antibodies specific for an acetylated form of alpha-tubulin recognize the antigen in cilia and flagella from a variety of organisms. *J Cell Biol.* 101: 2085-2094.

- Rodríguez-Iturbe, B.; Romero, F. and Johnson, R. (2007). Pathophysiological mechanisms of salt-dependent hypertension. *Am J Kidney Dis.* 50: 665-72.

- Roychowdhury, S. and Rasenick, M.M. (2008). Submembraneous microtubule cytoskeleton: regulation of microtubule assembly by heterotrimeric G proteins. *FEBS J.* 275: 4654-4663.

- Rüdiger, M.; Wehland, J. and Weber, K. (1994). The carboxy-terminal peptide of detyrosinated alpha tubulin provides a minimal system to study the substrate specificity of tubulin-tyrosine ligase. *Eur. J. Biochem.* 220: 309-320.

- Rykdelski, D.; Kropp, D. and Duran, N.N. (1981). Hypertension and the Na⁺-K⁺ pump. *Fed. Proc.* 40: 611.

- Sabbatini, M.E.; Vatta, M.S.; Vescina, C.; Gonzales, S.; Fernandez, B. and Bianciotti, L.G. (2003). NPR-C receptors are involved in C-type natriuretic peptide response on bile secretion. *Regul Pept.* 116:13-20.

- Salvador, J.M. and Mata, A.M. (1996). Purification of the synaptosomal plasma membrane (Ca²⁺/Mg²⁺)-ATPase from pig brain. *Biochem. J.* 315: 183-187.

- Santander, V.S.; Bisig, C.G.; Purro, S.A.; Casale, C.H.; Arce, C.A. and Barra, H.S. (2006). Tubulin must be acetylated in order to form a complex with membrane Na(+),K(+)-ATPase and to inhibit its enzyme activity. *Mol. Cell. Biochem.* 291: 167-174.

- Sasse, R. and Gull, K. (1988). Tubulin pos-translational modifications and the construction of microtubule organelles in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell. Sci.* 70: 577-589.

- Savarí, F.D. (2007). Reología de la sangre. *ETAS Hemodinámica* 11: 113-132.

- Saxton, W.M.; Stemple, D.L.; Leslie, R.J.; Salmon, E.D.; Zavortink, M. and McIntosh, J.R. (1984) Tubulin dynamics in cultured mammalian cells. *J. Cell Biol.* 99: 2175-2186.

- Schoenfeld, T.A.; McKerracher, L.; Obar, R. and Vallee, R.B. (1989). MAP1A and MAP1B are structurally related microtubule associated proteins with distinct developmental patterns in the CNS. *J. Neurosci.* 9: 1712-1730.

- Schulze, E. and Kirschner, M. (1986). Microtubule dynamics in interphase cells. *J. Cell Biol.* 102: 1020-1031.

- Schwartz, A.; Lindenmayer, G. and Allen J. (1975). The sodium-potassium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharm Rev.* 27: 3-314.

- Seki, J. (1994). Flow pulsation and network structure in mesenteric microvasculature of rats. *Am. J. Physiol.* 266: 811-821.

- Shelanski, M.L.; Gaskin, F. and Cantor, C.R. (1973). Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70: 765-768.

- Shen, Q.; Zheng, X.; McNutt, M.; Guang, L.; Sun, Y.; Wang, J.; Gong, Y.; Hou, L. and Zhang, B. (2009). NAT10, a nucleolar protein, localizes to the midbody and regulates cytokinesis and acetylation of microtubules. *Exp. Cell. Res.* 315: 1653-1667.

- Shi, Z.; Du, G.; Wei, X.; Zhang, L.; Chen, J. and Zhao, R. (2005). Cysteamine increases expression and activity of H⁺,K⁺-ATPase of gastric mucosal cells in weaning piglets. *World J. Gastroenterol.* 42: 6707-6712.

- Skalak, R.; Hanss, M. and Chien, S. (1983). Indices of filterability of red blood cell suspensions. *Biorheology* 20: 311-316.

- Skou, J.C. (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerve. *Biochim. Biophys. Acta* 23: 394-401.

- Sloboda, R.D. and Rosenbaum, J.L. (1982) Purification and assay of microtubule associated proteins (MAPs). *Methods Enzymol.* 85: 409-416.

- Sloboda, R.D.; Dentler, W.L. and Rosenbaum, J.L. (1976). Microtubule-associated proteins and the stimulation of tubulin assembly in vitro. *Biochemistry.* 15:4497-505.

- Strocchi, P.; Brown, B.A.; Young, J. D.; Bonventre, J. A. and Gilbert, J. M. (1981). The characterization of tubulin in CNS membrane fractions. *J. Neurochem.* 37: 1295-1307.

- Sudhakar, K.; Sujatha, M.; Devi, C.V. and Reddy, P.P. (1998). Erythrocyte sodium and Na⁺,K⁺-ATPase activity in untreated hypertensives and their first degree relatives. *Indian J. Biochem. Biophys.* 35: 382-384.

- Teng, J.; Takei, Y.; Harada, A.; Nakata, T.; Chen, J. and Hirokawa, N. (2001). Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. *J Cell Biol.* 155: 65-76.

- Tian, J.; Cai, T.; Yuan, Z.; Wang, H.; Liu, L.; Haas, M.; Maksimova, E.; Huang, X.Y. and Xie, Z.J. (2006). Binding of Src to Na⁺-K⁺-ATPase forms a functional signaling complex. *Mol. Biol. Cell.* 7: 317-326.

- Tilney, L.G.; Bryan, J.; Bush, D.J.; Fujiwara, K.; Mooseker, M.S.; Murphy, D.B. Snyder, D.H. (1973). Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J. Cell Biol.* 59:

- Tögel, M.; Wiche, G. and Propst, F. (1998). Novel features of the light chain of microtubule-associated protein MAP1B: microtubule stabilization, self interaction, actin filament binding, and regulation by the heavy chain. *J. Cell Biol.* 143: 695-707.

- Trinczek, B.; Marx, A.; Mandelkow, E. M.; Murphy, D.B. and Mandelkow, E. (1993). Dynamics of microtubules from erythrocyte marginal bands. *Mol. Biol. Cell* 4: 323-335.

- Trivedi, N.; Marsh, P.; Goold, R.G.; Wood-Kaczmar, A. and Gordon-Weeks, P.R. (2005). Glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation of MAP1B at Ser1260 and Thr1265 is spatially restricted to growing axons. *J. Cell. Sci.* 118: 993-1005.

- Utreras, E.; Jiménez-Mateos, E.M.; Contreras-Vallejos, E.; Tortosa, E.; Pérez, M.; Rojas, S.; Saragoni, L.; Maccioni, R.; Avila, J. and González-Billault, C. (2008). Microtubule-Associated Protein 1B interaction with Tubulin Tyrosine Ligase contributes to the control of microtubule tyrosination. *Dev. Neurosci.* 30: 200-210.

- van Deurs, B. and Behnke, O. (1973). The microtubule marginal band of mammalian red blood cells. *Z. Anat. Entwicklungsgesch* 143: 43-47.

- Voller, A.; Bidwell, D.E. and Bartlett, A. (1976). Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull World Health Organ.* 53:55-65.

- Walters, B. B. and Matus, A. I. (1975). Tubulin in postsynaptic junctional lattice *Nature* 257: 496-498.

- Wang, J.G.; Staessen, J.A.; Messaggio, E.; Nawrot, T.; Fagard, R.; Hamlyn, J.M.; Bianchi, G. and Manunta, P. (2003). Salt, endogenous ouabain and blood pressure interactions in the general population. *J. Hypertens.* 21: 1475-1481.

- Webster, D.R.; Gundersen, G.G.; Bulinski, J.C. and Borisy, G.G. (1987). Assembly and turnover of detyrosinated tubulin in vivo. *J. Cell Biol.* 105: 265-276.

- Westermann, S. and Weber, K. (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nature Rev.* 4: 938-947.

- Wheland, J. and Weber, K. (1987). Turnover of the carboxy-terminal tyrosine of α -tubulin and means of reaching elevated levels of detyrosination in living cells. *J. Cell Sci.* 88: 185-203.

- Whipple, R.A.; Matrone, M.A.; Cho, E.H.; Balzer, E.M.; Vitolo, M.I.; Yoon, J.R.; Ioffe, O.B.; Tuttle, K.C.; Yang, J. and Martin, S.S. (2010). Epithelial-to-mesenchymal transition promotes tubulin detyrosination and microtentacles that enhance endothelial engagement. *Cancer Res.* 70: 8127-8137.

- Whitesall, S.E.; Hoff, J.B.; Vollmer, A.P. and D'Alecy, L.G.D. (2004). Comparison of simultaneous measurement of mouse systolic arterial blood pressure by radiotelemetry and tail-cuff methods. *Am J Physiol* 286: 2408-2415.

- Xavier, F.E.; Davel, A.P.; Fukuda, L.E. and Rossoni, L.V. (2009). Chronic ouabain treatment exacerbates blood pressure elevation in spontaneously hypertensive rats: the role of vascular mechanisms. *J. Hypertens.* 27: 1233-1242.

- Xia, L.; Hai, B.; Gao, Y.; Burnette, D.; Thazhath, R.; Duan, J.; Bré, M.H.; Levilliers, N.; Gorovsky, M.A. and Gaertig, J. (2000). Polyglycylation of tubulin is essential and affects cell motility and division in *Tetrahymena thermophila*. *J. Cell Biol.* 149: 1097-1106.

- Yamel, J.; Baker, K. and Sweetnan, P. (1991). Fibrinogen, viscosity and whit blood cell count are mayor risk factors for ischemic heart disease. *Circulation* 83: 836-844.

- Zampar, G.G.; Chesta, M.E.; Carbajal, A.; Chanaday, N.L.; Díaz, N.M., Casale, C.H. and Arce, C.A. (2009). Acetylated tubulin associates with the fifth cytoplasmic domain of Na(+)/K(+)-ATPase: possible anchorage site of microtubules to the plasma membrane. *Biochem J.* 422: 129-137

- Zhang, T.; Zaal, K.J.; Sheridan, J.; Mehta, A.; Gundersen, G.G. and Ralston, E. (2009). Microtubule plus-end binding protein EB1 is necessary for muscle cell differentiation, elongation and fusion. *J. Cell Sci.* 122: 1401-1409.



U N R C
Biblioteca Central



71180

71180