



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

“Rol del canal de protones operado por voltaje (HVCN1) en la homeostasis ácido-base de células tumorales T humanas y su impacto en la apoptosis”

Tesista: Farm. Agustín Asuaje

Directora: Prof. Dra. Verónica Milesi

Codirector: Prof. Dr. Guillermo Docena

Año: 2018

Publicaciones y premios

Parte del trabajo presente en esta tesis formó parte de las siguientes publicaciones en revistas internacionales con referato:

- **“The inhibition of voltage-gated H⁺ channel (HVCN1) induces acidification of leukemic Jurkat T cells promoting cell death by apoptosis”** Agustín Asuaje; Paola Smaldini; Pedro Martín; Nicolás Enrique; Alejandro Orłowski; Ernesto Alejandro Aiello; Carlos González León; Guillermo Docena; Verónica Milesi. *Pflügers Arch -Eur J Physiol.* 2016:251-261. doi:10.1007/s00424-016-1928-0.
- **“Diphenhydramine inhibits voltage-gated proton channels (Hv1) and induces acidification in leukemic Jurkat T cells-New insights into the proapoptotic effects of antihistaminic drugs.”** Agustín Asuaje; Pedro Martín; Leandro Díaz Zegarra; Nicolás Enrique; Paola Smaldini; Guillermo Docena; Verónica Milesi. *Channels (Austin).* 2017;6950(May). doi:10.1007/s00424-016-1928-0.

Fue parte de las siguientes presentaciones a congresos:

- Título del trabajo: **“Involvement of Voltage Gated Proton Channel (Hv) inhibition in leukemic Jurkat T cells apoptosis”** Autores: Agustín Asuaje, Pedro Martín, Alejandro Orłowsky, Paola Smaldini, Alejandro Aiello, Carlos González León, Guillermo Docena, Verónica Milesi. Evento: IV LASID Meeting, LXIII Argentinean Society for Immunology Meeting and II French Society for Immunology Meeting. Año 2015.
- Título del trabajo: **“El Canal de Protones Voltaje Operado (Hv1) como estructura relevante para la viabilidad de las células T Jurkat. Disrupción de la homeostasis ácido base e inducción de apoptosis”** Autores A. Asuaje, P. Smaldini, A. Orłowski, P. Martín, N. Enrique, L. Díaz Zegarra, C. González León, G. Docena y V. Milesi. Evento: Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología. Año 2016. **Disertación Oral.**

- Título del trabajo: “**Voltage Gated Proton Channel (Hv) as essential structure in leukemic Jurkat T cells pH homeostasis and survival**” Autores A. Asuaje, N. Enrique, P. Martín, A. Orłowski, EA. Aiello, P. Smaldini, , G. Docena y V. Milesi. Evento: 4th anual meeting of the International Society of Cancer Metabolism (ISCAM). 19-21 de Octubre, Bertinoro-Italia. **Disertación Oral. Trabajo elegido para Travel grant.**

Y recibió el siguiente premio:

- **Premio SAFIS 2016 al mejor trabajo en Fisiología** “El Canal de Protones Voltaje Operado (Hv1) como estructura relevante para la viabilidad de las células T Jurkat. Disrupción de la homeostasis ácido base e inducción de apoptosis” en la Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología 2017. Autores: A. Asuaje, P. Smaldini, A. Orłowski, P. Martín, N. Enrique, L. Díaz Zegarra , C. González León, G. Docena y V. Milesi.

Otros trabajos

El inicio del trabajo de formación doctoral fue enmarcado en el plan de tesis titulado “*Vasculopatías asociadas a diabetes: incubación de los vasos sanguíneos del cordón umbilical como modelo de estudio de las alteraciones vasculares inducidas por la diabetes*”, fruto de ello se realizó la siguiente presentación a congreso:

- Título del trabajo: “**Patología vascular diabética: alteración de la respuesta contráctil ante estímulos despolarizantes en las arterias del cordón umbilical de neonatos de madres diabéticas. Rol de los canales de K⁺**”. Autores A. Asuaje, M. Nuñez, M. Machuca, P. Moviglia, I. Castagnasso, L. Cittadini, F. Miralles, L. Llinares, C. Degaudencio, Laura Alvarez, Verónica Milesi. Evento: Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología realizada en la Facultad de Farmacia y Bioquímica y en la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, los días 9 y 10 de octubre de 2014 en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Resumen publicado en Actas del Congreso.

Estadías en otros laboratorios

- Lugar de trabajo: **Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) - Universidad de Valladolid (España).**
Duración: 6 meses. Desde octubre de 2012 a marzo de 2013 (inclusive).
Dirección: Dra. Ma. Teresa Pérez García.
- Lugar de trabajo: **Centro Interdisciplinario de Neurociencias de Valparaíso (Chile).**
Fecha: entre el 7 al 21 de diciembre de 2014.
Dirección: Dr. Carlos González León.
- Lugar de trabajo: **Dipartimento di Biologia e Biotechnologie “L. Spallanzani” - Università degli studi di Pavia (Italia).** Aquí se realizaron los experimentos de medición de calcio intracelular presentados en esta tesis.
Duración: 3 meses. Octubre a diciembre de 2017.
Dirección: Prof. Dr. Francesco Moccia.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Verónica por darme la oportunidad de formarme en su laboratorio, brindándome a la vez que el apoyo necesario las libertades para que el doctorado sea una etapa creativa de formación integral. Y sobre todo, por mostrar que es posible generar un ámbito donde el trabajo comprometido se puede realizar con amigos y compañeros. Este agradecimiento lo hago extensivo a todos aquellos que compartieron conmigo mi paso por el Laboratorio de Canales Iónicos (ex-GINFIV).

A Guillermo, Paola y todo el IIFP por darme la posibilidad de comenzar un nuevo camino en mi tesis doctoral. A Alejandro Aiello, Ale Orłowski y Romina Di Mattia del CIC por el apoyo dado con los experimentos de pHi. A Carlos González, y su grupo, por motivarnos a estudiar la función del canal Hv1. Al grupo de Francesco Moccia y Daniela Montagna por la buena predisposición que mostraron durante mi estadía en Pavía.

A todos mis compañeros de la Facultad que tanto durante el doctorado como en la etapa de grado me permitieron crecer muchas más fuera de las aulas que dentro. Por compartir muchos de mis mejores momentos. A mis compañeros de la cátedra de Farmacología. A Erika, quien supo ser mi compañía en el día a día durante gran parte del tiempo que tomó esta tesis. A mis amigos de la vida, que por más que pasen años sin verlos y a quienes les dediqué menos del tiempo que se merecen siempre están en las buenas y en las malas.

A la Universidad pública y gratuita, verdadero motivo de orgullo como argentino, sin la cual muchos como yo no podríamos acceder ciertos saberes que mundialmente se reservan a unos pocos. También quiero agradecer a todos aquellos que han contribuido a que tanto el sistema educativo como de ciencia y técnica haya avanzado, al menos durante un período, en un sentido más inclusivo.

Y principalmente a mi familia por el apoyo constante e incondicional que siempre me dio.

Índice

1.	Introducción	1
1.1	Canal de protones operado por voltaje (Hv1)	2
1.1.1	Características biofísicas	4
1.1.2	Localización y funciones fisiológicas salientes	10
1.1.3	Farmacología	17
1.2	Homeostasis celular ácido-base	21
1.2.1	Fisiología general de la homeostasis ácido-base y transportadores de protones	21
1.2.2	Regulación del pH en células T	26
1.3	Cáncer y pH: alteraciones en la homeostasis del pH celular	28
1.3.1	Efecto Warburg	28
1.3.2	Transportadores de protones en el contexto tumoral y su relevancia como blancos terapéuticos	33
1.3.3	Hv1 en células tumorales: un extrusor pasivo de H ⁺ ignorado hasta la fecha	37
1.3.4	Rol del pH en el mecanismo de apoptosis: un nexo relevante para el diseño de estrategias terapéuticas	38
1.4	Dinámica del calcio intracelular en el desarrollo tumoral	43
2.	Hipótesis y Objetivos	44
3.	Materiales y Métodos	46
3.1	Cultivo celular	47
3.1.1	Cultivo de células T Jurkat	47
3.1.2	Obtención de células mononucleares de sangre periférica	47
3.1.3	Realización de estímulos en condiciones de cultivo	47
3.2	Electrofisiología	48
3.3	Determinación de pH intracelular (pH _i) por Fluorescencia en cubeta	55
3.4	Determinaciones por Citometría de flujo	56
3.4.1	pH _i	57
3.4.2	Especies reactivas del oxígeno (ROS)	62
3.4.3	Apoptosis	62

3.4.4	Ciclo Celular	64
3.5	Determinaciones de Calcio citoplasmático	65
3.6	Análisis estadístico de los datos	68
3.7	Reactivos	69
4.	Resultados	70
4.1	Caracterización electrofisiológica de las corrientes de protones en células T Jurkat	71
4.2	Modulación del pH_i de células T Jurkat por inhibición del canal Hv1 a tiempos cortos	81
4.3	Modulación del pH_i de células T Jurkat por inhibición del canal Hv1 a tiempos largos en condiciones de cultivo	85
4.4	Modulación de la producción de ROS en condiciones de inhibición del canal Hv1 en células T Jurkat	94
4.5	Efectos de la inhibición del canal Hv1 en la inducción de apoptosis de las células T Jurkat	95
4.6	Efecto de la inhibición del canal Hv1 en células mononucleares derivadas de sangre periférica de individuos voluntarios sanos	103
4.7	Efectos del bloqueo del canal Hv1 sobre la dinámica del calcio intracelular	106
5.	Discusión	113
6.	Conclusiones	123
7.	Bibliografía	126

Sección 1

Introducción

1.1 Canal de protones operado por voltaje (Hv1)

Los canales de H^+ operados por voltaje forman parte de una familia de canales iónicos cuya probabilidad de apertura y cierre depende del potencial de membrana y del gradiente de pH establecido a los lados de la membrana celular. Hasta la fecha, estos canales de protones comparten un grupo de propiedades distintivas:

- conductancia unitaria extremadamente pequeña
- marcada dependencia de la temperatura tanto de la conductancia unitaria del canal como de su probabilidad de apertura
- conducción selectiva por los H^+
- aumento de la probabilidad de apertura del canal por despolarización de la membrana celular y por incremento del pH extracelular (pH_e) o disminución del pH intracelular (pH_i) ausencia de inactivación.

La existencia de un canal de H^+ operado por voltaje fue propuesta por primera vez por Woody Hastings y col. en 1972 en el marco de la descripción del mecanismo de bioluminiscencia en dinoflagelados, el cual consta de un acoplamiento entre la generación de un potencial de acción en vesículas específicas del microorganismo y un cambio abrupto del pH de las mismas que desencadena una reacción bioluminiscente [1]. Una década más tarde los experimentos llevados a cabo por R. Thomas y B. Meech en neuronas de caracol aportaron la primera evidencia electrofisiológica de dichos canales [2]. Desde los primeros hallazgos funcionales del canal de protones y hasta la identificación del gen que lo codifica, hubo una gran expansión en el número de reportes de células y especies que lo expresan, sus propiedades fueron sistemáticamente exploradas y se siguió progresando en el entendimiento de su mecanismo de acción y funciones fisiológicas.

Una década después de su caracterización en neuronas de caracol, las corrientes mediadas por el canal fueron identificadas por primera vez en mamíferos, en particular en células del epitelio alveolar de rata [3]. Dos años más tarde, se puso en evidencia la funcionalidad del canal en diferentes tipos de células humanas aisladas [4]–[6] y en líneas celulares [7]. Esto significó un cambio en el marco de estudio de la funcionalidad

del canal generando un enfoque más antropocéntrico. El número de especies en las cuales la presencia de este canal fue confirmada mediante medidas electrofisiológicas aumentó desde 2 en 1984, a 5 en 1994 [8], hasta 11 en el 2003 [9] habiendo desde ese entonces hasta hoy pocos reportes adicionales entre los cuales se incluye la especie *Danio rerio* (pez cebra) [10].

En 2006, se identificó el gen que codifica el canal de protones en humano [11], en ratón y en el invertebrado marino *Ciona intestinalis* [12], y al menos en otras 24 especies se hallaron genes homólogos [13]. A la fecha se ha encontrado solo un gen por especie. Sin embargo, se ha sugerido que podrían existir cuatro isoformas diferentes basándose principalmente en las diferencias en las cinéticas de activación de las corrientes mediadas por dicho canal [14], [15]. No obstante, en todas las células estudiadas provenientes de tejidos de ratones knock-out al gen del canal no se observan corrientes de H^+ [16]–[21], lo cual sugiere que en los tejidos murinos sólo el gen identificado codifica para estos canales.

Al momento no se cuenta con una nomenclatura sistemática para los canales de H^+ . El nombre oficial aprobado por el comité para la nomenclatura de genes HUGO (HGNC) es para el gen humano *HVCN1* (en letras itálicas por convención), y a la proteína le corresponde el mismo nombre pero sin el formato itálico, HVCN1. Los primeros grupos de investigación que identificaron los genes para el canal, llamaron al producto proteico humano Hv1 [11], al producto de ratón mVSOP y a la proteína de *Ciona intestinalis* CiVSOP [12]. La H en Hv1 es debido a la especie iónica transportada (H^+), no por humano, por lo que a la variante humana en algunos reportes se le agrega una h inicial (hHv1). La v subíndice (o minúscula) indica que la especie es activable por voltaje y el 1 indica que es la primer isoforma del canal en la especie. La nomenclatura VSOP proviene de las siglas en inglés de *voltage sensor only protein* (proteína con sólo el sensor de voltaje) y se debe a que el canal VSOP se asemeja mucho a la estructura del dominio sensor de voltaje (en inglés *voltage sensor domain VSD*) de canales iónicos operados por voltaje selectivos al K^+ , o al Na^+ entre otros. Dado que en este trabajo de Tesis Doctoral el modelo de estudio utilizado son sólo células humanas, y por simplicidad, utilizaremos la nomenclatura Hv1 (en lugar de HVCN1) para referirnos al canal de H^+ operado por pH y voltaje.

Las propiedades electrofisiológicas generales de los productos de expresión del canal Hv1 en sistemas de expresión heteróloga resultaron cuasi idénticas a aquellas obtenidas de canales presentes en sistemas nativos, incluyendo las propiedades distintivas 1 a 5 detalladas en el primer párrafo. Una diferencia interesante encontrada entre los dos sistemas, de causa desconocida hasta la fecha, es la dependencia de la probabilidad de apertura con el voltaje. Esta se sitúa en un rango de voltaje de valores más negativos para los canales Hv1 estudiados en sistemas de expresión heteróloga, en comparación con los canales Hv1 estudiados en sistemas nativos [22].

1.1.1 Características biofísicas

El canal Hv1 es extremadamente selectivo al ión H^+ y posee una estructura típica dada por cuatro (S1-S4) segmentos transmembrana (TM) [11], [12], unidos por pequeños segmentos de unión entre las hélices, con ambos dominios C y N terminales intracelulares (>50 residuos). Llamativamente, este canal no posee un dominio de poro, como se observa en la mayoría de los canales iónicos. Sin embargo, el Asp¹¹² posicionado en el TM S1 ha sido identificado como un residuo crítico para el filtro de selectividad del canal [23], siendo universalmente conservado entre las especies que expresan este canal, no encontrándose ni siquiera mutaciones conservativas como una sustitución por Glu.

En la cara extracelular del canal existen dos residuos de histidina (His¹⁴⁰ y His¹⁹³), que se ha demostrado son críticos para la sensibilidad que el canal posee al efecto inhibitor del ión Zn^{2+} [11], [24]. His¹⁴⁰ está ampliamente conservada en la mayoría de las especies, e His¹⁹³ se encuentra conservada en mamíferos y aves, mientras que en las especies acuáticas que presentan una mínima sensibilidad al Zn^{2+} este residuo se encuentra sustituido por Asp o Glu.

El segmento S4 de los canales operados por voltaje posee aminoácidos cargados, mayoritariamente argininas, fundamentales en la funcionalidad del dominio sensor de voltaje (VSD). Si bien hay diferencias, la similitud del VSD entre el canal Hv1 y los canales iónicos operados por voltaje, como los canales de K^+ o de Na^+ , es notable. El canal

Hv1 posee tres cargas positivas que se mueven en respuesta al cambio de voltaje de la membrana celular. A diferencia de lo que ocurre en otros canales operados por voltaje, donde el movimiento del VSD genera la apertura de la región formadora del poro del canal, en el caso del Hv1 (que no posee dominio de poro) se postula que el movimiento del segmento S4 genera una vía hidrofílica de conducción de H⁺ que involucra también a las regiones de transmembrana (S1–S4).

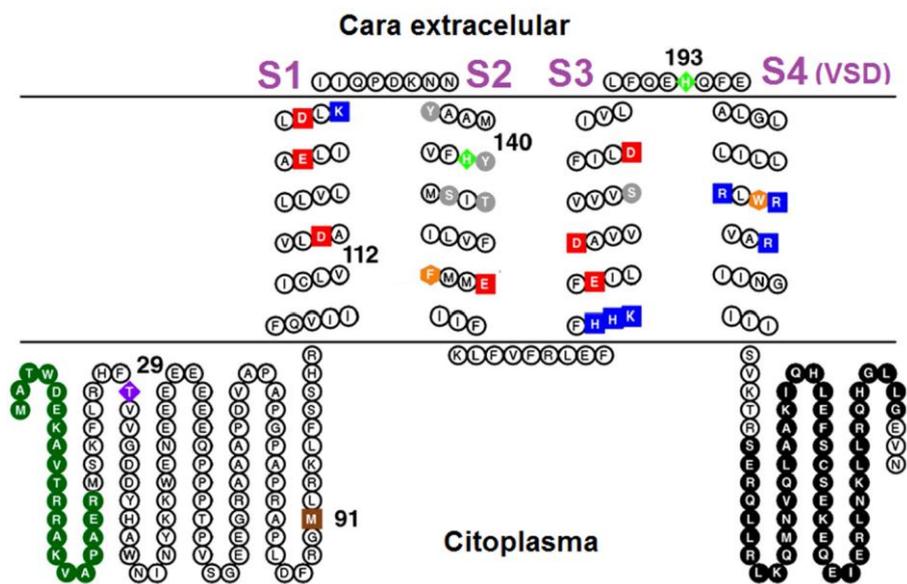


Figura 1.1.1.1 Secuencia aminoacídica y esquema topológico del canal Hv1 humano. Dentro de los dominios transmembrana los residuos ácidos se ilustran en rojo, los básicos en azul, los aromáticos en naranja y aquellos polares en gris. Se indican aminoácidos específicos según su función, comenzando desde el extremo N terminal: la delección 1-20 (en verde) produce la isoforma corta propia de células B malignas; Thr29 es el sitio de fosforilación por la protein quinasa C (PKC) lo cual deriva en la potenciación del canal; M91T es la primera mutación identificada en el canal; Asp112 es crucial para la selectividad por los protones; His140 y His193 coordinan la unión del zinc; los tres residuos de Arg en el segmento S4 son críticos para el dominio sensor de voltaje y el extremo C terminal posee una extensa región *coiled-coil* (en negro) que permite la unión del dímero. Adaptado de T.E. DeCoursey y col. 2016 [25].

Solo algunos de los aproximadamente 100 aminoácidos que conforman el dominio N terminal del Hv1 han sido relacionados con funciones particulares. Para resaltar, el residuo Thr²⁹ se encuentra conservado en la mayoría de las especies, y ha sido identificado como el sitio de fosforilación responsable del modo de “apertura intensificada” (en inglés *enhanced gating mode*) reportado en fagocitos activados [26].

En el año 2008, tres grupos independientes aportaron evidencias que indicaban que el canal de H⁺ existe como un dímero funcional [27]–[29], al menos en los sistemas de expresión heteróloga utilizados. Luego Petheo y col. [30] lograron evidenciar en sistemas nativos la presencia de dímeros mediante *western blots* de membranas de neutrófilos y eosinófilos humanos, evitando la disrupción de los mismos por altas temperaturas, detergentes o proteasas. Se postula que los dímeros se mantienen por interacciones de hélices superenrolladas (del inglés *coiled-coil interactions*) entre los dominios intracelulares C terminal [27]–[29]. Por otro lado, se ha logrado también la expresión funcional del monómero, mediante la remoción, por mutación, de los dominios C terminal [24], [27] o mediante la construcción de quimeras utilizando segmentos C terminales de proteínas monoméricas como CiVSP [28]. Estas evidencias muestran que el canal Hv1 es funcional como monómero y como dímero, donde cada monómero posee su vía de conducción de H⁺ independiente. Además, se observó que la cinética de activación de la corriente mediada por el dímero es más lenta que la mediada por el monómero [24], [27], [28], [31], [32] y que la activación del canal requiere menor despolarización en el dímero que en el monómero. Sin embargo el conocimiento es nulo acerca de la relevancia fisiológica de la expresión funcional del dímero o del monómero en sistemas nativos.

Por otro lado, se ha reportado que el dímero del canal Hv1 posee una mayor sensibilidad al ión Zn²⁺ que el monómero [24]. Se propone que los dos residuos responsables de la interacción con el Zn²⁺ (His¹⁴⁰ e His¹⁹³) [11] se orientan en la interfase entre ambos monómeros formando el sitio de alta afinidad con el catión bivalente [24].

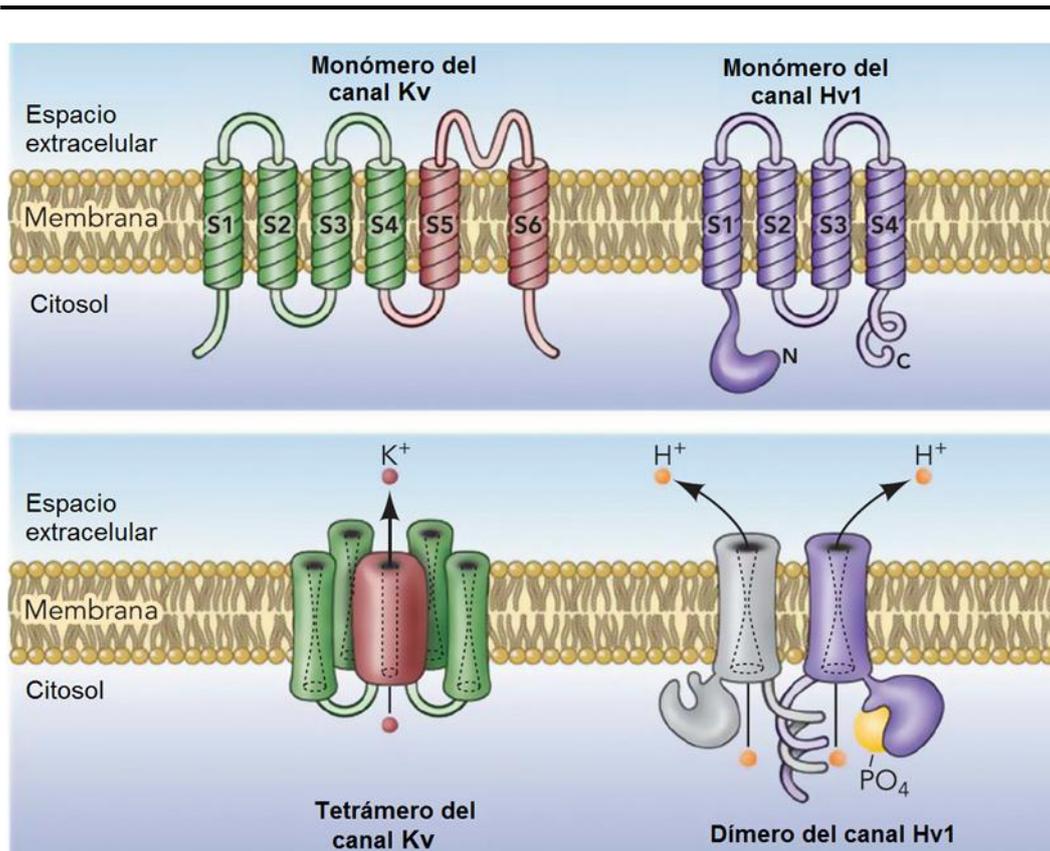


Figura 1.1.1.2 Esquemización de la estructura del canal Hv1 en la membrana plasmática y su comparación con un canal de potasio voltaje operado. *Adaptado de T.E. DeCoursey 2013 [33].*

Dado que las propiedades de conducción de protones fueron reproducidas mediante la purificación de la proteína Hv1 y su reconstitución en liposomas [34], al momento no hay evidencia científica que indique que sea necesaria alguna proteína accesoria para el funcionamiento del canal Hv1.

Conductancia unitaria minúscula:

A la fecha, sólo se cuenta con un reporte de corrientes de protones en la configuración de canal único (*single channel*) de la técnica de patch-clamp. En condiciones de sellos de excepcional resistencia ($\sim 5 \text{ T}\Omega$), se observaron corrientes de canal único de una amplitud de 7-16 fA que permitieron calcular una conductancia unitaria de 100 fS, la más pequeña reportada hasta la fecha para un canal iónico [35].

Por otro lado utilizando la metodología de análisis de varianza (o *noise analysis*) se estimó una conductancia unitaria de $\sim 15\text{fS}$ a pH fisiológico, valor que varía con el pH intracelular (pH_i) pero no con el extracelular (pH_e) [35]. Estos valores de conductancia unitaria se encuentran 3 órdenes de magnitud por debajo de la mayoría de los canales iónicos lo cual puede interpretarse por la baja concentración en la que se encuentran los protones permeantes [9], siendo en la mayoría de las células la $[\text{H}^+]_i$ 10^6 veces menor que la $[\text{K}^+]_i$ o la $[\text{Na}^+]_e$.

Extraordinaria dependencia de la probabilidad de apertura y de la conductancia del canal con la temperatura:

Byerly y Suen [36] compararon la dependencia de la magnitud de corrientes de H^+ y K^+ con la temperatura en neuronas de *Lymnaea*, observando que las primeras poseen una dependencia con la temperatura mucho mayor que las de K^+ . Luego, para las corrientes de protones, se reportaron valores entre 2-3 para el Q_{10} (cambio ante un incremento de 10°C en la temperatura) que indican una dependencia particular respecto a la que poseen los canales iónicos por mera su naturaleza proteica [36]–[38]. La cinética de apertura del canal muestra una dependencia con la temperatura aún mayor que la observada para la magnitud de corriente [37], [38], encontrándose valores entre 6-9 de Q_{10} cuando en la mayoría de los canales iónicos se encuentran alrededor de 3.

Perfecta selectividad iónica:

Una de las características más distintivas del canal Hv1 es su enorme selectividad por los iones H^+ . Las determinaciones más conservadoras reportan valores alrededor de 10^6 para la relación de permeabilidades entre el H^+ y el Na^+ ($P_{\text{H}^+}/P_{\text{Na}^+}$) [7], [39]–[43]. Por otro lado, la evaluación de la selectividad iónica realizada determinando el potencial de reversión de la corriente (V_{rev}) con soluciones salinas compuestas por sucrosa isotónica a pH constante, muestra que aun cuando se reemplaza un 90% de los iones no hay un cambio en el V_{rev} indicando una extrema selectividad al único ión permeante, el H^+ [23]. Estas observaciones apoyan fuertemente la idea de que el mecanismo de permeación del H^+ a través del canal incluye pasos de protonación/deprotonación, acordes a la selectividad observada.

Dependencia del voltaje

Otra característica elemental de los canales Hv1 es la dependencia de su actividad con el voltaje de la membrana. Estos canales, se activan con la despolarización mediando una corriente saliente de cargas positivas que tiende a hiperpolarizar la membrana celular. Al igual que los canales de K^+ rectificadores tardíos, las corrientes de H^+ en el estado estacionario tienen una rectificación saliente consecuencia de una fuerte dependencia de la probabilidad de apertura del canal con el voltaje.

La cinética de apertura es una de las características que distinguen a los canales Hv1 de diferentes especies, particularmente en mamíferos, donde se ha observado tienen una cinética mucho más lenta que las de otros canales operados por voltaje, presentando constantes de activación (τ_{act}) en el rango de las decenas de segundos a 22 °C [6], [44]–[46].

Las evidencias experimentales que existen hasta la fecha indican que los canales Hv1 no presentan inactivación dependiente del voltaje. Sin embargo, cuando se evocan corrientes de H^+ demasiado prolongadas (~20 seg.) se puede observar un decaimiento de la corriente que se asemeja al proceso de inactivación (ver por ej. figura 4.1.1 y en [3], [5], [7], [47], [48] entre otros). No obstante, el estudio metódico de esta característica muestra que este comportamiento es una inactivación aparente debida a un aumento del pH_i en la proximidad de la membrana [49]. La misma corriente mantenida en el tiempo produce un cambio en la concentración de H^+ que modifica su gradiente de concentración y reduce la fuerza impulsora, produciendo una disminución de la magnitud de la corriente cada vez mayor de forma similar a lo que ocurre cuando los canales presentan un estado inactivado.

Sensibilidad al pH

Una propiedad fundamental de los canales Hv1 es la sensibilidad al pH, tanto del pH_i como del pH_e , que presenta la probabilidad de apertura. La figura 1.1.1.3 muestra las curvas que relacionan la conductancia global de la membrana a los H^+ (G_{H^+}) con el V_m . Siendo la G_{H^+} la resultante del producto de N (número de canales presentes en la membrana), la P_o (probabilidad de apertura) y g (conductancia unitaria). Como se puede observar, en todas las células estudiadas las curvas $G_{H^+} - V_m$ se corren hacia potenciales

más negativos cuando aumenta el pH_e o disminuye el pH_i . Cherny y col. [50], [51] han realizado un riguroso estudio de la mencionada dependencia de la G_{H^+} con el pH en células del epitelio alveolar de rata encontrando que el voltaje en el cual las corrientes comienzan a ser apreciables (voltaje umbral “ $V_{threshold}$ ”) disminuye en 40 mV con el incremento de cada unidad en el gradiente de protones (ΔpH), así sea por la disminución en el pH_i como el aumento del pH_e . Posteriormente esta relación cuantitativa fue corroborada en la mayoría de las células estudiadas [9]. A pesar de que este comportamiento es crítico para la función del canal, los determinantes estructurales no fueron identificados hasta el momento. Esta propiedad del canal tiene como consecuencia que el canal se abre solo cuando el gradiente electroquímico es favorable a la salida espontánea de protones [52], por lo cual se puede considerar al canal como un estricto extrusor pasivo de H^+ .

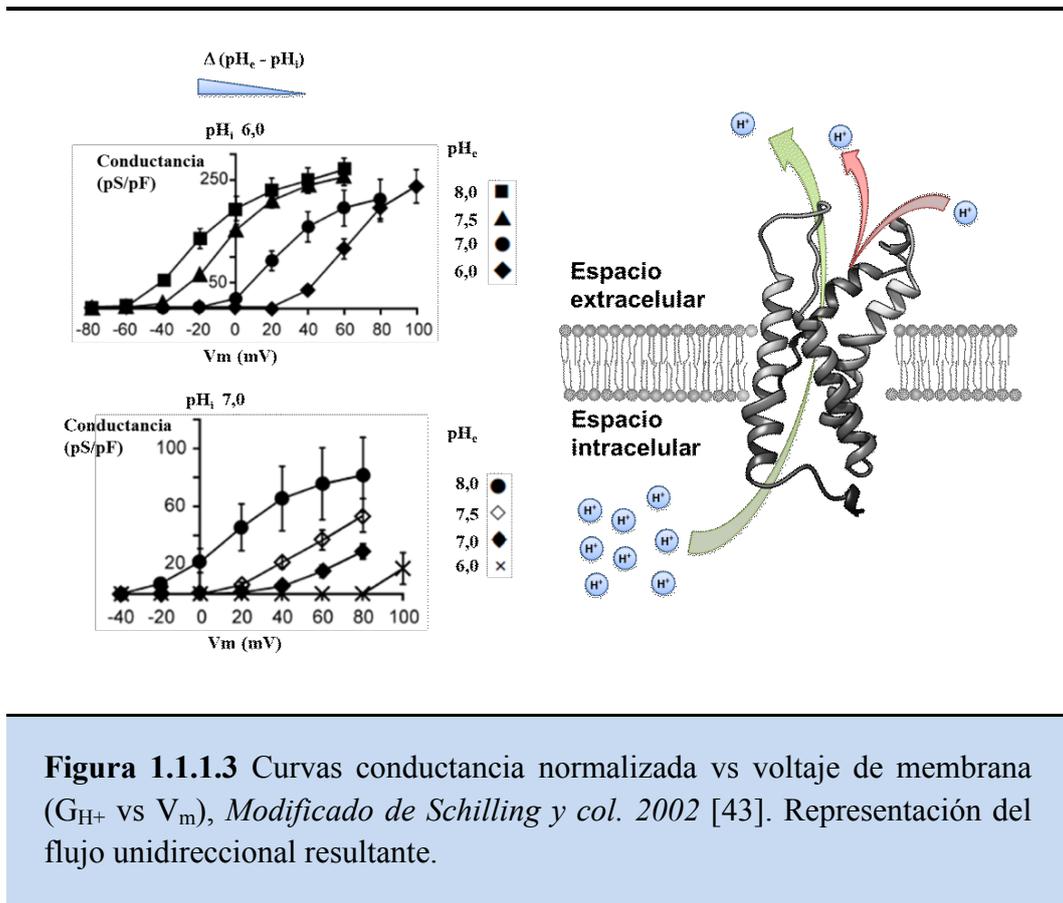


Figura 1.1.1.3 Curvas conductancia normalizada vs voltaje de membrana (G_{H^+} vs V_m), Modificado de Schilling y col. 2002 [43]. Representación del flujo unidireccional resultante.

1.1.2 Localización y funciones fisiológicas salientes

El gen HVCN1 humano se encuentra en el cromosoma 12 (12q24.11) con una longitud de 41.127 pb, encontrándose entre los genes PPP1CC y TCTN1 sin que haya

indicios de un agrupamiento temático de genes (*thematic gene cluster*) en los alrededores del gen ([53], NCBI). Aún es escaso el conocimiento acerca de la localización, tamaño y estructura de la región promotora del gen *HVCN1* y su regulación transcripcional. Sólo un trabajo describe la regulación del gen *Hvcn1* en macrófagos de ratón expuestos a LPS (lipopolisacáridos) prediciendo un sitio de unión a Nf- kB cercano al promotor de *Hvcn1*. Además, el silenciamiento por RNAi del elemento coactivador, del Nf- kB, Bcl3 (*B-cell lymphoma 3-encoded protein*) llevó a una reducción de la expresión del canal Hv1, indicando que el complejo Nf- kB/Bcl3 puede participar del control transcripcional de *Hvcn1* [54]. Por otro lado, los datos de co-inmuno precipitación y secuenciación de cromatina (ChIP-Seq) disponibles en el repositorio genómico de la University of California Santa Cruz UCSC [55] proveen información de los probables sitios de unión de factores de transcripción corriente arriba (*upstream*) del gen HVCN1 tales como: Pol2, GATA2, CTCF, NF-kB, Rad21, SMC3, ZNF263, SRF, c-fos, c-myc, y FOXA1 ([53], National Center for Biotechnology Information NCBI). Resulta interesante la coincidencia de factores de transcripción predichos para HVCN1 y NOX2 (NADPH oxidasa), dentro de los cuales figura Nf- kB, ambos relacionados con la producción de ROS ([53], NCBI).

Al momento se conocen tres variantes transcripcionales, las variantes 1 y 2 codifican para la misma proteína de 273 aminoácidos (isoforma 1) mientras que la variante 3 codifica para una proteína de 253 aminoácidos, más corta en el extremo N terminal (isoforma 2) (NCBI). DeCoursey y col. han demostrado que esta isoforma truncada se expresa diferencialmente en células B tumorales presentando características distintivas [56] (que serán resumidas en la sección 1.3.3).

Las características biofísicas del canal Hv1 explican una de sus funciones salientes, relacionada con la extrusión pasiva de protones. Los canales Hv1 ofrecen, a la célula que lo expresa, una vía de pasaje de H⁺ que permite la regulación del pH_i sin gasto de energía metabólica. En este sentido se ha comprobado que la función del canal es muy importante en la recuperación del pH_i de diversos tipos celulares luego de ser sometidos a cargas ácidas: neutrófilos y basófilos humanos [57]–[59], microglía y mastocitos de ratón [60], [61], células del epitelio alveolar de rata [62], osteoclastos de conejo [63], [64], neuronas del hipocampo y microglía de rata [65]–[68].

Otro tipo celular donde los canales Hv1 mostraron tener una relevancia fisiológica es en la capacitación espermática. En el ser humano el pH_i del espermatozoide es bajo y lo mantiene en un estado quiescente hasta que entra en el órgano reproductor femenino donde se produce la fase final de maduración [69]. En el estado quiescente, los canales Hv1 son imposibilitados de revertir la acidificación intracelular dado que el fluido seminal cuenta con la mayor concentración de Zn^{2+} del organismo [70], estimada en 2,2 mM [71]. En el oviducto femenino, se produce la alcalinización del pH_i del espermatozoide debido a que los mismos se exponen a un ambiente más alcalino y además se remueve el Zn^{2+} extracelular por formación de complejos con las proteínas del medio [72]. La remoción del Zn^{2+} posibilita la apertura de los canales Hv1 [73] que permite el eflujo de H^+ y el aumento del pH_i , estimulando la actividad metabólica y la motilidad del espermatozoide [69]. Un hecho que apoya la importancia de este mecanismo es que se ha reportado que la expresión de mRNA de *HVCN1* es 18 veces menor en varones con infertilidad respecto de varones fértiles [74].

Por sus características, también el canal Hv1 podría contribuir al establecimiento del potencial de membrana celular. Este rol fue demostrado en fibroblastos cardíacos [75] y en eosinófilos humanos activados [76]. En el caso de los eosinófilos humanos se propone que durante el estallido respiratorio, cuando la membrana se despolariza debido a la actividad de la NADPH oxidasa (ver más adelante) el canal contribuye al mantenimiento del potencial de membrana en condiciones fisiológicas [77]. También en células epiteliales del tracto respiratorio humano la expresión del canal fue corroborada, tanto en líneas celulares como cultivos primarios [78]. En estas células, en contraste con las células fagocíticas, el impacto de G_{H^+} en el V_m es mínimo [78]. Los datos experimentales indican que en las células del epitelio respiratorio el canal responde a cambios del pH_e y su actividad contribuiría a la regulación del mismo [79]. Hay reportes que proponen que este canal podría funcionar acoplado al canal CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) neutralizando la eventual alcalinización de las secreciones de las vías aéreas [78].

La función fisiológica del canal Hv1 descrita con mayor detalle en la literatura es durante la producción de radicales libres mediada por la activación de la NADPH oxidasa en células fagocíticas (denominado estallido respiratorio debido al abrupto consumo de O_2 que se produce durante dicho proceso) donde el canal Hv1 presenta un rol tanto en la regulación del pH como en el potencial de la membrana celular. El canal

se expresa en todas las células del sistema inmune, y en particular en macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y otros leucocitos y funciona asociado al complejo NADPH oxidasa (Nox2) cumpliendo un rol importante en la eliminación de bacterias y otros microorganismos. La presencia de patógenos, péptidos quimiotácticos, ésteres de forbol, ácido araquidónico y otros estímulos induce, en dichas células, la activación del complejo NADPH oxidasa. Esto implica el ensamblado de seis componentes principales que se encuentran separados en condiciones de reposo [80], [81]. Las vías intracelulares involucradas confluyen en la proteína quinasa C (PKC) la cual fosforila los componentes del complejo permitiendo su ensamblado y activación, esta quinasa a su vez activa al canal Hv1 permitiendo la producción de ROS de forma coordinada [81], [82].

La activación de la NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática produce ión superóxido (O_2^-), que es liberado al espacio extracelular, y H^+ liberados hacia el citosol (ver figura 1.1.2.1). Además, genera una corriente de electrones a través de la membrana por translocación desde el NADPH intracelular [83]–[85]. Estas corrientes de electrones son sensibles al potencial de la membrana celular y se anulan completamente a valores alrededor de +200 mV. Por lo tanto, las consecuencias inmediatas de la actividad del complejo NADPH oxidasa en dichas células son la despolarización de la membrana y el aumento de la concentración de H^+ en el citoplasma. Por cada electrón que es translocado queda un protón en el citosol, mientras que el O_2^- producido se dismuta a H_2O_2 [86] y consume protones para formar $HOCl + H_2O$ mediante la acción de mieloperoxidasas, alcalinizando así el compartimento extracelular. Tal es la magnitud de la actividad del complejo NADPH, que se han calculado velocidades de despolarización de $\sim 1,1V/s$ en neutrófilos y de $1,1kV/s$ en eosinófilos [9]. De no mediar la corriente compensatoria a través del Hv1, tanto la despolarización de la membrana como la asimetría de protones producidas por la actividad de la enzima contribuirían a su autolimitación [83], [87]. Por otro lado, numerosos estudios demostraron que el ión Zn^{2+} , inhibidor del canal Hv1, es capaz de reducir notoriamente la actividad del complejo NADPH oxidasa [18], [57], [83], [88] sin afectar las corrientes de electrones [83], [85]. En concordancia, se observó que la producción de ROS disminuyó significativamente en experimentos de *downregulation* del canal Hv1 con siRNA [89] así como en aquellos llevados a cabo con ratones

deficientes en el canal Hv1 (KO) [16], [18], [20], [21], [61]. La figura 1.1.2.1 esquematiza el mecanismo completo.

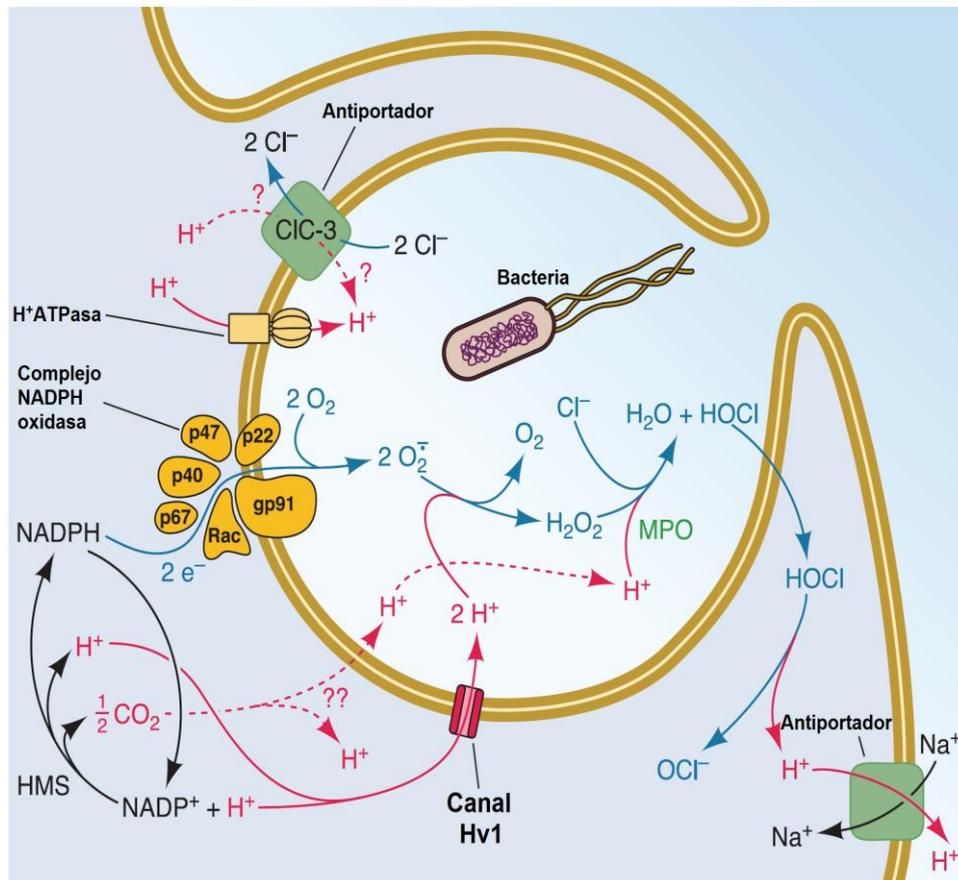


Figura 1.1.2.1 Esquemática del rol propuesto para el canal Hv1 en la producción de ROS en granulocitos durante el estallido respiratorio. Modificado de DeCoursey T.E. 2010 [17].

En la mayoría de las células fagocíticas se ha reportado que, durante el estallido respiratorio, el canal Hv1 se encuentra en el modo de apertura intensificada en el cual la cinética de activación de la corriente de H^+ es de 2 a 5 veces más rápida mientras que la cinética de desactivación es de 3 a 6 veces más lenta [45], [58], [76], [90]–[92]. Además la conductancia máxima aumenta 2-4 veces y la curva que relaciona su dependencia con el potencial de la membrana se corre 30 mV hacia valores más negativos. Prácticamente todos los estímulos que activan el complejo NADPH oxidasa inducen el modo de apertura intensificada del canal: PMA, ácido araquidónico, ácido oleico, péptidos quimiotácticos (fMLP, LTB4, IL-5, IgE) y LPS [40], [45], [58], [90], [91], [93], [94].

La mayoría de estos agonistas son capaces de estimular la proteína quinasa C (PKC), siendo el phorbol miristato acetato (PMA) un activador directo de la quinasa y el más potente inductor del modo de apertura intensificada. En el mismo sentido, esta inducción puede ser prevenida, e incluso revertida por el tratamiento con inhibidores de PKC [26], [93], [94]. Como resaltamos en las características estructurales del canal, se ha demostrado que la Thr²⁹ es el residuo fosforilado por la PKC involucrado en inducir tal estado del canal [26]. Esta apertura intensificada se traduce en una mayor eficiencia en el funcionamiento del complejo NADPH oxidasa, ya que evita con mayor eficiencia la aparición de los factores que autolimitan la actividad enzimática. Si bien este comportamiento fue descrito en varios tipos celulares (principalmente células fagocíticas), en otros tipos celulares donde se expresa el canal Hv1 como el epitelio alveolar, células HEK-293 y células COS-7 transfectadas con hHv1, no se observa la activación intensificada descrita para el estímulo PMA [90]. Esto podría sugerir ciertos prerrequisitos para acceder a dicho modo de activación del canal, como por ejemplo la expresión de determinadas isoformas de la PKC. Al momento no hay reportes que describan el modo de apertura intensificada en linfocitos T ni otras proteínas que regulen la actividad del canal Hv1.

Si bien basófilos y eosinófilos comparten un cierto desarrollo en común, sus funciones son marcadamente distintas. Los eosinófilos, poseen una actividad NADPH oxidasa mayor a cualquier célula humana [45], [95] y la función del canal está relacionada con la producción de ROS dirigida a la eliminación de patógenos. Los basófilos no presentan actividad detectable de dicha enzima [96] pero poseen grandes corrientes de protones mediadas por el canal Hv1 cuya función se relaciona con la liberación de histamina que producen en respuesta a la unión de alérgenos a IgE [97], [98]. Esta liberación, inducida *in-vitro* tanto por IgE o PMA, provoca la acidificación de los basófilos la cual se acentúa notoriamente en presencia de Zn²⁺ (bloqueante del canal Hv1), el cual también inhibe dicha liberación [58]. En paralelo la estimulación de basófilos con anticuerpos IgE resultó en el incremento de las corrientes de protones [58].

Por otro lado, en las células B se encontró que el canal Hv1 se asocia al receptor BCR, co-localizando luego de la activación. En ratones *knock-out* (KO) para el canal Hv1 la activación de linfocitos B se encuentra claramente afectada, lo cual se encontró relacionado a la disminuida producción de ROS. De esta manera la actividad del canal

Hv1 es crítica para la activación dependiente de ROS de las vías PI3k y Akt [16], determinante para la función de las mencionadas células (ver figura 1.1.2.2).

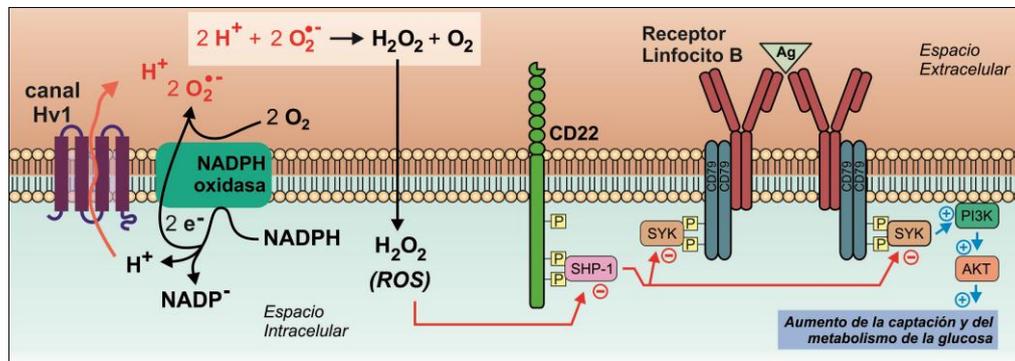


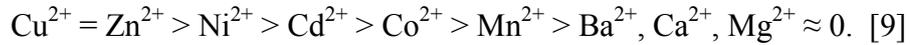
Figura 1.1.2.2 Esquematización del rol propuesto para el canal Hv1 en la activación de linfocitos B posterior a la estimulación del receptor de células B (BCR). Modificado de T.E. DeCoursey 2013 [33]

En linfocitos B, las corrientes de H^+ fueron reportadas ser casi 100 veces mayores a las corrientes que se observan en las células T [43] y a la fecha poco se conoce de la función fisiológica del canal Hv1 en linfocitos T. En 1996 Káldi y col. [99] reportaron flujos de protones activados por ácido araquidónico y sensibles a Cd^{2+} y Zn^{2+} en linfocitos T humanos, provenientes de amígdalas, que no expresaban los componentes del complejo NADPH oxidasa indispensables como son $gp91_{phox}$ y $p22_{phox}$. Posteriormente se aportaron evidencias electrofisiológicas de la expresión del canal Hv1 en linfocitos $CD3^+$ (T) de sangre periférica aunque como dijimos la densidad de corriente fue 100 veces menor que en células B y al menos 30 veces menor que en células leucémicas de origen T como las células Jurkat [43].

Coherente con lo anteriormente descrito, trabajos realizados con ratones KO para el gen *Hvcn1* mostraron una reducida producción de ROS por el complejo NADPH oxidasa [16], [18], [20], [21], [61] lo cual derivó en, una menor capacidad de eliminar infecciones por *S. aureus* [21], una menor activación de células B [16], una mayor cantidad (60%) de linfocitos T activados en condiciones de reposo (tanto $CD4^+$ como $CD8^+$) [100] y un menor daño oxidativo generado por la microglía durante el accidente cerebrovascular isquémico [61].

1.1.3 Farmacología

Los primeros inhibidores identificados para el canal Hv1 fueron una serie de metales divalentes con el siguiente orden de potencia:



Como es de esperar estos iones interactúan con diversas proteínas, sin embargo el Zn^{2+} inhibe las corrientes de protones con una potencia mucho mayor que para otros canales iónicos. Por ejemplo, la inhibición que produce en los canales Hv1 es 80 veces más potente con respecto a la inhibición producida en los canales de calcio. Por lo que se estableció a la inhibición por Zn^{2+} como prueba de rigor para identificar una conductancia de H^+ como corriente mediada por el canal Hv1 (entendido por muchos autores como el *gold standard*). Al momento son muy escasos los reportes de corrientes mediadas por canales Hv1 insensibles a los cationes divalentes [101], [102]. En 1999 Cherny y col., midiendo corrientes de H^+ en células de epitelio alveolar de rata, realizaron un estudio detallado del mecanismo de bloqueo por Zn^{2+} . Encontraron que existe una importante competencia entre el Zn^{2+} y el H^+ por la accesibilidad de un sitio de unión extracelular [103]. Esta inhibición depende fuertemente del pH_e e involucra la unión del Zn^{2+} a dos sitios protonables con un $\text{pKa} \sim 7$ que previenen la apertura del canal [103]. Años más tarde se obtuvo la secuencia del canal encontrando dos residuos de histidina, His^{140} y His^{193} , potencialmente responsables de este mecanismo [11]. Este planteo fue apoyado en 2014 por evidencias cristalográficas del canal que muestran como ambos residuos coordinan la unión del catión [104]. Si bien es sabido que el ion Zn^{2+} interviene en numerosos procesos celulares, aún hoy en día es la herramienta de uso en numerosos trabajos de investigación para poner en evidencia las funciones del canal Hv1 en distintos tipos celulares [62], [65], [75]. Además se utiliza para indagar la estequiometría del canal ya que, como mencionamos anteriormente, el dímero es mucho más sensible al Zn^{2+} que el monómero [24].

Desafortunadamente el canal Hv1 no cuenta aún con toxinas o péptidos inhibitorios de gran afinidad y selectividad como existe para muchos otros canales iónicos. Es sabido que los dominios sensibles al voltaje (VSD) suelen ser susceptibles a la inhibición por toxinas presentes en venenos, particularmente aquellos que presentan homología en los segmentos S3 y S4 llamados *paddle motif*. La hanatoxina proveniente del veneno de la tarántula *Grammostola spatulata* tiene particular afinidad por tal

dominio estructural, por lo que es capaz de inhibir numerosos canales iónicos dependientes del voltaje. El canal Hv1 comparte el *paddle motif* y es capaz de ser inhibido por hanatoxina produciendo un corrimiento en la relación conductancia-voltaje (G_{H^+} - V_m) del canal hacia valores más positivos [105]. Si bien esta toxina puede ser de utilidad para los estudios biofísicos del canal Hv1 y para el desarrollo de nuevos compuestos, su falta de selectividad hace que tenga un uso limitado para el estudio de su rol fisiológico.

Un número importante de bases débiles como la 4-aminopiridina [106], [107] (y el amiloride [39], entre otros, inhiben con distinta potencia las corrientes de protones mediadas por el canal Hv1. En la mayoría de los casos se propone que la inhibición se debe gracias a la permeación de dichos compuestos en su forma neutra que una vez en el citosol logran alcalinizar el interior celular, reduciendo las corrientes de H^+ por un aumento del pH_i , sin interactuar directamente con el canal [9]. Sin embargo, el grupo de Song y col. ha reportado que otras bases débiles disminuyen las corrientes mediadas por el canal Hv1 sin modificar la concentración de H^+ intracelular ni la relación G_{H^+} - V_m , sugiriendo un mecanismo distinto para estas sustancias. Estas bases débiles pertenecen a distintos grupos farmacológicos como antidepresivos (imipramina, amitriptilina, desipramina y fluoxetina) [108], antipsicóticos (clorpromazina, haloperidol y clozapina)[109] y antihistamínicos (difenhidramina y clorfeniramina)[110]. Estas últimas drogas se han estudiado con un ΔpH importante (pH_e 7,3 y pH_i 5,5), lo cual hace que las drogas en su especie cargada se concentren en el interior celular unas 63 veces respecto a al valor que alcanzaría con un gradiente de H^+ simétrico [111]. Por lo tanto los IC_{50} reportados en el rango micromolar deben ser multiplicados por 63 para estimar la potencia a un $pH \sim 7,3$. En este sentido resulta interesante comparar la inhibición de la corriente reportada para la clorpromazina por Song y col. [109] con un IC_{50} de 2,2 μM en *whole-cell* (WC, $\Delta pH = 1,8$) y los registros reportados por DeCoursey y col.[111] en macroparches *inside-out* con un pH simétrico donde concentraciones tan altas como 1mM reducen las corrientes aproximadamente un 50%. Se puede pensar que esta enorme diferencia puede deberse a la concentración de la base en el interior celular en condiciones WC y de pH_i ácido, como también puede indicar que parte del efecto inhibitor se debe a mecanismos indirectos que no involucran la interacción con el canal y dependientes de factores intracelulares que se pierden en la configuración de macroparche.

Los compuestos derivados del 2-guanidinobenzimidazol (2GBI) son, hasta la fecha, los únicos inhibidores selectivos reportados para el canal Hv1, esta estructura base fue propuesta por Hong y col. en el año 2013 en función de sus propiedades estructurales similares a las de otros inhibidores de canales operados por voltaje [112] (ver figura 1.1.3).

En un estudio posterior los mismos autores proponen una familia de derivados que fueron ensayados directamente sobre la corriente de H^+ mediada por el canal Hv1 expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*. El estudio, basado en resultados de mutagénesis puntual del canal, concluye que el 2GBI inhibe al canal en el estado abierto mediante interacciones puntuales con restos aminoacídicos claves para la permeación de los H^+ . El modelo propone que cuando el VSD se mueve ante el estímulo despolarizante, el 2GBI accede al dominio intracelular del canal y uno de los átomos de nitrógeno del imidazol establece uniones no covalentes con D112 en el segmento S1. Esta unión estabiliza la interacción del compuesto con el canal, permitiendo que los demás átomos del grupo imidazol interactúan con S181 en S3 y R211 in S4. Los autores sugieren que, teniendo en cuenta que se ha demostrado que D112 es fundamental para la selectividad que el canal presenta a los H^+ , el 2GBI interactuando directamente con este residuo, podría cambiar el valor de su pKa a valores incompatibles con una permeación eficaz de los mismos. Alternativamente, el inhibidor podría interrumpir los puentes de hidrogeno que se establecen entre los H^+ del agua del vestíbulo y D112, un evento que se propone fundamental para la permeación a través de este canal que no posee una estructura de poro canónica [113].

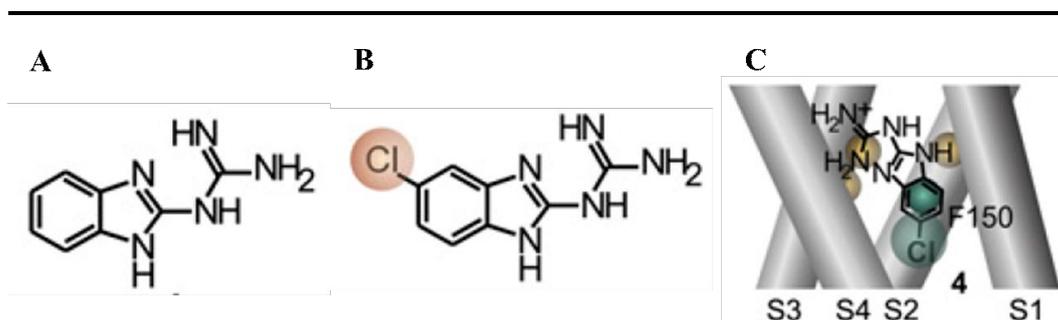


Figura 1.1.3. Estructuras de los inhibidores desarrollados por Hong y col. A, 2-guanidinobenzimidazol (2GBI) B, 5-cloro-2-guanidinobenzimidazole (Cl-GBI). C, Modelo de interacción entre el Cl-GBI y el canal Hv1 propuesto por los autores [113].

El 2GBI entonces, debe alcanzar el medio intracelular para poder efectivamente inhibir el canal. La estructura del cristal publicada hace unos pocos años muestra la existencia de una pequeña cavidad en la región donde se ubican F150 y D112 seguido por una constricción. F150 y D112 están localizados cerca entre ellos y consistente con el modelo de interacción planteado para el 2GBI. Los autores proponen que en dicha cavidad se ubica el 2GBI impidiendo la permeación y que la constricción puede explicar por qué el 2GBI no puede llegar a su sitio de acción desde el medio extracelular. Este mecanismo llevo a Hong y col. a la búsqueda de análogos estructurales del 2GBI que tuviesen una mayor lipofilidad, de manera de poder adicionar el compuesto en el medio extracelular garantizando una concentración eficaz en el medio intracelular. Luego de varias estrategias de búsqueda de sustituyentes que disminuyeran la polaridad del compuesto los mismos autores demostraron que el derivado clorado era el óptimo (Cl-GBI) [113].

DeCoursey y col. postulan [111] que el hecho de que el canal posea las porciones extracelulares relativamente pequeñas, dos *loops* extracelulares con menos de una docena de aminoácidos, dificulta el hallazgo de inhibidores selectivos y anticuerpos que se unan desde el lado extracelular. Lo cual en este último caso sería de gran utilidad tanto si tuviesen un efecto sobre la función del canal como para el estudio a nivel celular por técnicas como citometría de flujo o microscopía. Por otro lado, el particular mecanismo de permeación del canal y sus singularidades estructurales ya comentadas, dificultan el hallazgo de nuevos compuestos activos.

1.2 Homeostasis celular ácido-base

1.2.1 Fisiología general de la homeostasis ácido base y transportadores de protones

Virtualmente toda proteína depende del pH para mantener su estructura y función, y los eventos de protonación – deprotonación definen la carga de las superficies biológicas y son parte integral de numerosas reacciones metabólicas [114]. También la fuerza derivada del gradiente de protones (ϕ_{H^+}) es clave para la generación y conversión de la energía celular. Por lo tanto no es extraño pensar que el pH intracelular esté estrictamente regulado y que varíe entre los diferentes compartimentos celulares.

El pH de la célula es regulado en múltiples niveles y los compartimentos celulares, gracias a su capacidad buffer (β), son protegidos de cambios rápidos y localizados de pH. La capacidad buffer total (β_{total}) consiste en dos componentes: $\beta_{intrínseca}$ y $\beta_{HCO_3^-}$. $\beta_{intrínseca}$ es provista por numerosos ácidos y bases débiles intracelulares, incluyendo grupos fosfatos y residuos aminoacídicos de diferentes proteínas citosolicas [115]. Es de remarcar que los valores de pKa de la mayoría de los grupos ionizables se encuentran alejados de la neutralidad, por lo que $\beta_{intrínseca}$ es comparativamente baja a pH fisiológicos (10-20 mM a 7,2), aumentando a valores más extremos de pH (por ejemplo 40 mM a pH 6,4) [116]. El segundo componente de la capacidad buffer total, la $\beta_{HCO_3^-}$, contribuye con 29 mM a la capacidad buffer total a un pH de 7,1 [117] a una presión parcial de CO_2 fisiológica ($P_{CO_2} \sim 37$ mmHg). En conjunto ambos componentes reducen el impacto de perturbaciones agudas en el pH intracelular, pero son incapaces de contraponerse a cargas ácidas prolongadas. En ausencia de otros procesos regulatorios, la continua generación metabólica de equivalentes ácidos y el continuo transporte de iones que modifican el pH (principalmente H^+ , OH^- y HCO_3^-) sobrepasaría prontamente la capacidad buffer celular. Por lo tanto una serie de mecanismos dinámicos y sostenidos en el tiempo se hacen necesarios para asegurar la homeostasis del pH a largo plazo, es así que la evolución ha dotado a la célula eucariota con diversos mecanismos para esta función en cada compartimento celular, los cuales frecuentemente resultan redundantes [115].

En condiciones fisiológicas el pH extracelular (pH_e) es ligeramente alcalino (7,3-7,4); y el pH citosólico (pH_i) menor que dicho valor (7,2). Dos propiedades celulares dan base a la tendencia del citosol a acidificarse: en primer lugar el potencial de membrana generalmente hiperpolarizado, con el interior celular negativo respecto al extracelular, brinda una fuerza impulsora importante para la entrada de protones y la salida de bases negativamente cargadas, como el HCO_3^- . En segundo lugar, diversas reacciones metabólicas vitales para la célula, como la producción de ATP por la glicólisis en el citoplasma o la fosforilación oxidativa en la mitocondria, generan H^+ como productos de la reacción, que aumentan cuando se incrementa la actividad celular [118]. La acumulación gradual de H^+ es compensada mediante su extrusión continua a través de la membrana plasmática. A continuación se describen los principales mecanismos que contribuyen a la homeostasis ácido-base del citosol celular. En ciertos casos este transporte es activo, acoplándose directa o indirectamente a la hidrólisis de ATP. En general, en la mayoría de las células de mamíferos los transportadores activos de H^+ que se acoplan en forma directa a la hidrólisis de ATP, como las **H^+ -ATPasas**, no participan en forma importante en la regulación del pH_i basal. Sin embargo el transporte activo de H^+ que se realiza mediante el acoplamiento al transporte de otros sustratos, a través de intercambiadores iónicos, constituye un mecanismo de gran relevancia para dicha función en diferentes y variados tipos celulares [117].

Los **intercambiadores Na^+/H^+** acoplan directamente el transporte a través de la membrana de iones H^+ y Na^+ . Estos están formados por complejos homodiméricos y constituyen un mecanismo altamente conservado evolutivamente que protege a las células de una acidificación excesiva. Los mamíferos cuentan con al menos once genes ortólogos que se expresan ubicuamente o en forma tejido específica. De todos los transportadores de este tipo, la isoforma 1 del intercambiador Na^+/H^+ (NHE1, *Na⁺-H⁺ exchanger 1*) ha sido la más estudiada y utilizada como modelo del mecanismo de funcionamiento de esta familia. Esta estructura se encuentra presente en la membrana plasmática de la mayoría de las células, siendo la principal responsable de la homeostasis del pH_i . El NHE1, junto con otros NHEs de membrana plasmática, utilizan selectivamente el gradiente electroquímico del Na^+ (generado por la Na^+/K^+ ATPasa) para expulsar H^+ en contra de gradiente en forma electroneutra. La función de este transportador involucra también un sitio intracelular sensor del pH que le otorga sensibilidad a la concentración de H^+ y funciona extruyendo H^+ hasta que el valor del

pH_i se estabiliza a valores óptimos para las actividades e interacciones proteicas cercanos a 7,2 [117]. Por otro lado, cuando la concentración citosólica de H⁺ aumenta, la actividad del transportador se incrementa abruptamente alcanzando su máxima velocidad en una unidad de pH aproximadamente, minimizando así la exposición del citoplasma a un exceso de ácido [119], [120]. Además, la sensibilidad intrínseca del NHE1 a la acidificación intracelular, puede ser alterada por diversas señales endógenas o exógenas (hormonas, mitógenos o estímulos físicos) que modulan su estado de fosforilación [121], [122] y su asociación a factores de anclaje [123], [124]. En particular, es interesante señalar que su asociación a proteínas de anclaje provoca un cambio de conformación del dominio regulatorio carboxi-terminal del NHE1, que aumenta la afinidad por los H⁺. Si bien el mecanismo preciso no es conocido, se ha observado que esto produce un aumento agudo en el pH_i que genera un ambiente permisivo para la progresión de diversos procesos celulares que incluyen cambios en la geometría celular [125], adhesión [126], migración [127], [128], quimiotaxia [129], [130] y proliferación celular [131], [132].

Otro mecanismo involucrado en la extrusión de H⁺ es el llevado a cabo por los **transportadores de monocarboxilatos (MCTs, *monocarboxylate transporters*)** que median el co-transporte de ácidos monocarboxílicos (mayoritariamente lactato) con H⁺ [133]. Esto resulta fundamental en células que efectúan un metabolismo anaeróbico en condiciones fisiológicas, o en condiciones patológicas como inflamación y procesos tumorales. El metabolismo anaeróbico produce la acumulación citosólica de lactato generando un gradiente favorable a su salida al espacio extracelular junto con protones. En el músculo, por ejemplo, el eflujo de H⁺-lactato contribuye en un 40% a la recuperación del pH_i luego de la acidosis isquémica (acumulación de equivalentes ácidos durante la falta de oxígeno) [134]. Sin embargo, como la acumulación de lactato es sólo limitada a ciertos tipos celulares los MCTs no representan un mecanismo general de control y regulación del pH_i en condiciones fisiológicas [117].

Con un mecanismo más complejo los **co-transportadores de bicarbonato** también contribuyen a la eliminación de H⁺ del medio citosólico. Hay seis isoformas de co-transportadores Na⁺/HCO₃⁻ (NBCs, *sodium bicarbonate cotransporter*) predominantes en las células de mamíferos que acoplan el ingreso de sodio a favor de su gradiente electroquímico con la entrada de bicarbonato en contra del suyo. Las células de mamíferos se encuentran inmersas en un medio extracelular que contiene típicamente

alrededor de 25 mM de HCO_3^- disponible para su transporte, y la actividad de estos transportadores tiende a alcalinizar el citosol debido a que el HCO_3^- que ingresa a la célula reacciona con un H^+ y produce ácido carbónico que es convertido a CO_2 y H_2O por la anhidrasa carbónica (CA) intracelular. El CO_2 producido puede salir de la célula por difusión simple y reaccionar con agua en el exterior celular, generando nuevamente HCO_3^- más un H^+ (reacción catalizada por la CA extracelular) dando lugar a un ciclo en el cual se produce la extrusión neta de protones [135], [136].

Finalmente, y a pesar de que la continua producción de equivalentes ácidos por reacciones metabólicas requiere la continua expulsión de protones, las células también han desarrollado mecanismos para facilitar el ingreso de equivalentes ácidos en circunstancias fisiológicas particulares. El más común de estos mecanismos es el intercambio de Cl^- por HCO_3^- llevado a cabo por los **intercambiadores de aniones** (AEs, *anion exchangers*) como las proteínas SLC (*solute carrier family*). La actividad de estos transportadores tiene cuatro funciones principales: el control del pH, la secreción de ácidos, la secreción de bases y el transporte de NaCl. La acción simultánea de sistemas de transporte acidificantes y alcalinizantes le permite a la célula tener un ajuste fino del pH_i . Así, una sobre-alcalinización generada por los mecanismos extrusores de protones puede ser compensada por mecanismos que ingresan equivalente ácidos, los cuales disminuyen su actividad a medida que el pH intracelular se vuelve más ácido. Por lo tanto frecuentemente se observa que la acción coordinada del AE2 (que es inhibido por pH ácidos) y del NHE1 (que se activa a pH ácidos pero se frena con los alcalinos) resulta en el mantenimiento de valores de pH_i muy cercanos a 7,2 [137].

Respecto a las particularidades de la regulación del pH en cada compartimento celular, el conocimiento es menor en comparación al que describe la dinámica general de la célula. En el avance de este aspecto, la posibilidad de contar con sondas detectoras direccionadas a cada compartimento particular tiene una gran influencia. En este sentido es poco lo que se conoce acerca de la regulación del pH en el núcleo celular, quizás porque la mayoría de las investigaciones consideran este compartimento en equilibrio con el citosol. La envoltura nuclear posee abundantes poros permeables a moléculas del tamaño de una molécula pequeña (aprox. 9 nm de diámetro) [138], por lo tanto resulta lógico pensar que la membrana nuclear represente una barrera difusa al transporte de protones.

Otra es la situación en las vías relacionadas con el procesamiento y secreción de proteínas. Aquí el estado de protonación-desprotonación es una estrategia para regular las interacciones entre las moléculas producidas y las proteínas, así las vías secretorias a nivel intracelular presentan un estricto control del pH intraluminal. Mientras que el pH del retículo endoplasmático (RE) es prácticamente neutro, similar al pH_i , los compartimentos corriente abajo se vuelven cada vez más ácidos. El *cis*-Golgi es significativamente más ácido ($pH \sim 6,7$) que el RE volviéndose más marcada la acidificación en las siguientes cisternas del complejo, alcanzando valores $\sim 6,0$ en la red del *trans*-Golgi y llegando a $pH \sim 5,2$ en los gránulos secretores. Las bombas de protones V-ATPasas son las estructuras descritas como responsables de introducir los protones en el lumen del RE, así los antibióticos macrólidos (los cuales son inhibidores específicos de estas bombas) han mostrado disipar el gradiente de pH a lo largo de todos los compartimentos de las vías secretorias [139]. Sin embargo, es aún motivo de debate cómo se genera la acidificación gradual de los compartimentos de la vía siendo la V-ATPasa la única estructura asociada al ingreso de H^+ . Entre varios efectores propuestos como determinantes en este mecanismo hay reportes que describen a una conductancia de H^+ voltaje dependiente y sensible al Zn^{2+} como principal responsable [140], siendo el canal Hv1 un posible candidato estructural.

De forma similar se postula que en la gradual acidificación observada en las vías endocíticas [141], donde el pH dentro de las vesículas puede llegar a valores de 4,5-4,7, el canal Hv1 pueda estar involucrado. Por otro lado, los peroxisomas, al igual que el RE presentan una alta permeabilidad a los H^+ sin presentar diferencias de pH con el citosol [142].

Particular importancia presenta la dinámica del pH mitocondrial. A diferencia del lumen de los compartimentos de las vías secretorias, la matriz mitocondrial es marcadamente alcalina ($pH \sim 8,0$) debido a la extrusión de protones a través de la membrana interna por los componentes de la cadena transportadora de electrones [143]. Junto con el potencial eléctrico (negativo en el interior) generado por el transporte electrogénico de protones, el gradiente de pH transmembranal constituye la fuerza protón-motriz utilizada por la H^+ -ATP sintasa (F_1F_0 -ATPasa) para producir ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. Dicho potencial actúa regulando las concentraciones de iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} a través de la actividad de diversos transportadores [144], [145]. De estos, el Ca^{2+} de la matriz actúa como modulador de diversas deshidrogenasas del

ciclo de ácidos tricarboxílicos, sincronizándose de esta manera la producción de energía con las necesidades celulares [146], [147]. Por otro lado, la alteración del pH mitocondrial ha sido descrito como un factor determinante en la “vía intrínseca de la apoptosis” [148] como se detallará en la sección 1.3.4.

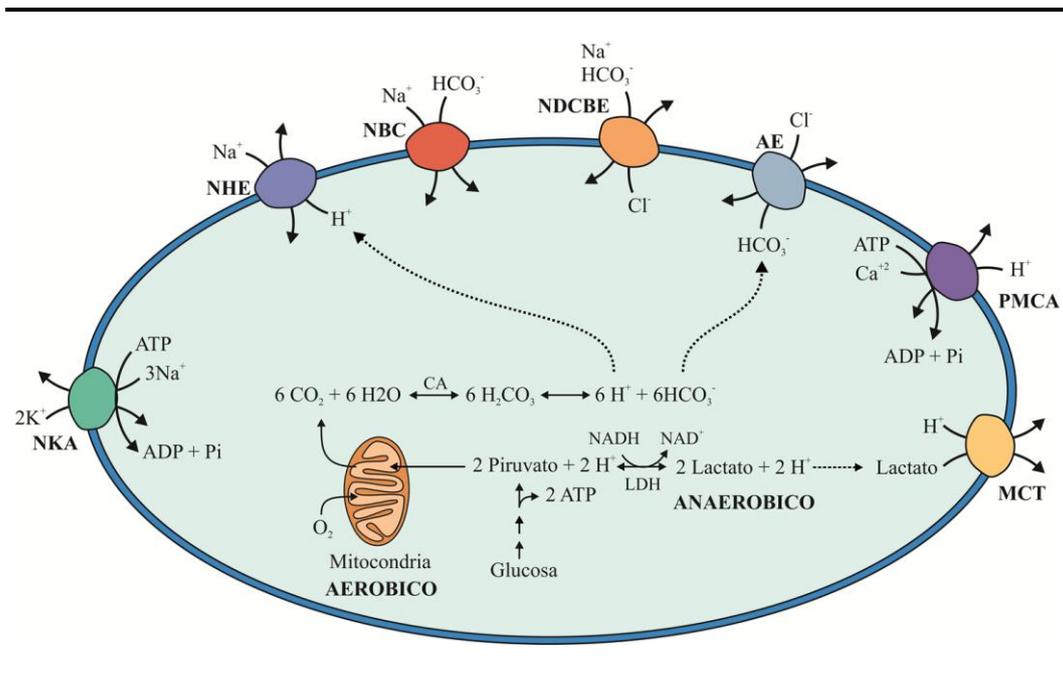


Figura 1.2.1. Representación de los mecanismos celulares responsables de la homeostasis ácido-base en relación al metabolismo celular.

1.2.2 Regulación del pH en células T

Al momento son pocos los trabajos centrados en el estudio de los determinantes de la homeostasis ácido base de células linfoides, siendo la mayoría de ellos de principios de la década del 80 con el aporte de fundamental de tres grupos diferentes. El primer registro del gradiente de pH transmembranal fue realizado en linfocitos humanos de sangre periférica por Deutsch y col. en 1979 [149], posteriormente los mismos autores corroboraron que estas células son capaces de mantener constante su pH_i en un valor de 7,17 mientras varía el pH_e entre 6,8 y 7,4 [150]. Casi en simultáneo, Gerson y col. demostraron que la alcalinización intracelular (valores cercanos a 7,5) correlaciona con el aumento de la proliferación de linfocitos B y T inducida por mitógenos, con el

avance en el ciclo celular, y con el aumento de volumen celular [151], [152]. Poco después Grinstein y col. aportan por primera vez registros dinámicos de pH_i en timocitos de rata poniendo en evidencia la actividad del intercambiador NHE, y caracterizando su sensibilidad al pH, a las concentraciones de Na^+ intra y extracelular y su sensibilidad a amiloride (bloqueante del intercambiador NHE) [153], [154]. En estos últimos trabajos, los autores registran la recuperación del pH_i luego de exponer a las células a una carga ácida, observando que se reduce prácticamente a cero en ausencia de Na^+ extracelular o en presencia de amiloride. Este resultado sugiere que el intercambio Na^+/H^+ es prácticamente el único mecanismo para revertir la acidificación en dichas células.

1.3 Cancer y pH: alteraciones en la homeostasis del pH celular.

1.3.1 Efecto Warburg

Durante la década de 1920, Otto Warburg y colegas observaron por primera vez que los tumores consumían una gran cantidad de glucosa comparado con lo observado en los tejidos circundantes. Además, esta glucosa era captada a gran velocidad y fermentada para producir lactato y H^+ incluso en presencia de oxígeno y de mitocondrias plenamente funcionales, por lo que se lo llamó “glucólisis aeróbica” (*aerobic glycolysis*) y posteriormente “efecto Warburg” [155], [156]. Luego, el bioquímico inglés Herbert Crabtree, extendió las observaciones de Warburg estudiando la heterogeneidad de la glucólisis en los tumores, corroborando las observaciones previas pero notando que existe una considerable variabilidad habiendo tumores que realizan una importante actividad respiratoria mitocondrial (fosforilación oxidativa) [157]. Por unidad de glucosa, la glucólisis es una forma ineficiente de generar ATP comparado con lo obtenido por la respiración mitocondrial [158], [159], sin embargo la velocidad del metabolismo glucolítico es mayor tal que la producción de lactato a partir de glucosa ocurre 10-100 veces más rápido que la oxidación completa de la molécula de glucosa a CO_2 . De hecho, la cantidad de ATP producido en un tiempo dado es comparable entre ambas formas de metabólicas [160]. Cálculos teóricos apoyan la hipótesis de que las células con una mayor tasa de producción de ATP, a pesar del menor rendimiento, pueden tener una ventaja selectiva al competir por nutrientes escasos con las células inmunes y del estroma [161], [162]. Por otro lado, ciertos cálculos empíricos indicarían que la cantidad de ATP requerido para el crecimiento celular y la división puede ser menor que la requerida para el funcionamiento y mantenimiento normal de una célula [159], [163] por lo que la demanda de ATP nunca alcanzaría valores limitantes durante el crecimiento tumoral.

El efecto Warburg ha sido extensamente estudiado y corroborado en distintos tipos tumorales y células proliferativas durante las últimas décadas [164]–[167], incluyendo a las células leucémicas [158]. Se postula como un evento temprano en la oncogénesis siendo una consecuencia inmediata de la mutación de oncogenes, tales como *KRAS* en cáncer de páncreas y *BRAF* en melanoma; por lo que se desarrolla no solo en la etapa de invasión sino en los inicios y primeras etapas de las lesiones [168],

[169] Por otro lado se sabe que en condiciones totalmente distintas a las del entorno tumoral, las levaduras en fase exponencial de crecimiento desarrollan un efecto tipo Warburg [170]. Sin embargo, aún no hay consenso en cuáles son los estímulos necesarios para dar origen a este remodelamiento metabólico en las células tumorales, siendo aún hoy motivo de investigación y debate en la comunidad científica. A pesar de ello, se considera a este fenómeno como una característica saliente y particular del cáncer (*cancer hallmark*, ver figura 1.3.1).

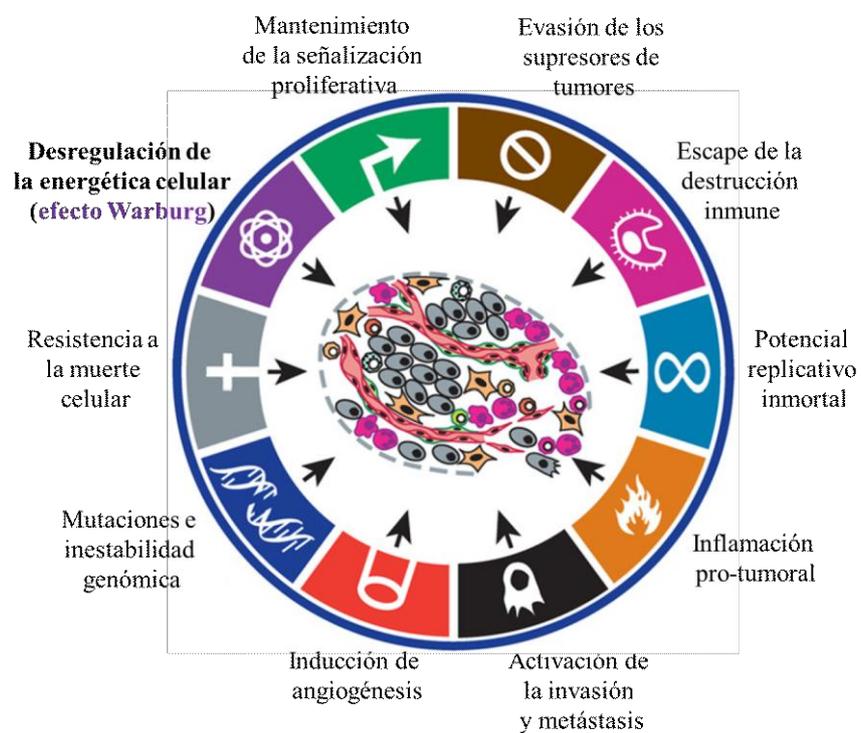


Figura 1.3.1. Esquematación de los *cancer hallmarks* propuestos por Hanahan y Weinberg donde se incluye el efecto Warburg como la desregulación de la energética celular. *Adaptado de Hanahan y Weinberg 2011 [171].*

Un aspecto de actual debate respecto al efecto Warburg es la potencial ventaja que otorga al crecimiento del tumor debido a sus efectos sobre el microentorno. Por un lado, la alta tasa de captación de glucosa por las células tumorales genera una escasa disponibilidad de glucosa en el microentorno tumoral y origina una competencia entre el

tumor y los linfocitos que lo infiltran (TIL, *tumor infiltrating lymphocytes*). La mayor capacidad glucolítica ya mencionada del tumor, limita la glucosa que los TILs requieren para ejecutar la respuesta necesaria. En sintonía con esta propuesta se observó que la inhibición de la glucólisis tumoral mejora el suministro de glucosa a los TILs aumentando la capacidad de respuesta inmunológica montada contra el tumor [172], [173].

Por otro lado, el exceso de lactato es extruido a una alta tasa por la célula tumoral mediante transportadores del tipo MCT (cuya particularidad en este contexto detallaremos más adelante), encontrándose en grandes cantidades en el exterior celular. Diversos trabajos han mostrado que el lactato exportado de las zonas más hipóxicas de los tumores sólidos es introducido por las células cercanas a la vasculatura las cuales, debido a su disponibilidad de oxígeno, lo utilizan como fuente prioritaria de energía por medio de la fosforilación oxidativa [174]–[177].

En forma similar al lactato, el exceso de H^+ es también extruido produciendo una importante acidificación extracelular. Esta acidificación ha sido evaluada *in-vivo* observándose valores de pH en el microentorno de alrededor de 6 [178], [179]. Los beneficios de esta acidificación, producto de la reprogramación metabólica tumoral, parecen tener múltiples efectos pro-tumorales a la hora de modificar la interfase tumor-estroma [180], [181]. Diversas evidencias apoyan la idea de que esta particularidad en el pH extracelular promueve la capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales. El cultivo de células tumorales durante tiempos prolongados en medios ácidos (pH 6,8), aumenta la migración e invasividad [182]. Coherente con este hallazgo se ha reportado que la misma maniobra aumenta la expresión de proteasas relacionadas con la capacidad migratoria e invasiva como MMP2, MMP9, Catepsina B y Catepsina L [183], siendo estas últimas activables a pH ácidos. Otros miembros de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) involucradas en la migración celular, por ejemplo MMP3, mostraron una actividad óptima a pH entre 5,75 y 6,25, siendo este comportamiento atribuido a un residuo de histidina en el *loop* de unión a sustrato [184]. Además, se ha demostrado que el microentorno ácido favorece la evasión inmune [185], [186] y contribuye a la resistencia a los tratamientos antineoplásicos [187]–[189].

En relación a este trabajo de tesis, si bien las anteriores observaciones fueron realizadas mayoritariamente en tumores sólidos, la acidificación extracelular ha

mostrado aumentar la proliferación, invasión y quimioresistencia de células T Jurkat derivadas de sangre periférica de un paciente con leucemia aguda linfoblástica [190].

Más allá de permitir la acidificación del microentorno tumoral, los mecanismos de extrusión de H^+ son indispensables para evitar la acidificación intracelular que generaría la acumulación del exceso de H^+ que produce la glicolisis. Más aún, numerosas evidencias indican que estos mecanismos son altamente eficientes logrando que el pH_i de las células tumorales alcance valores de pH_i más alcalinos que el de las células normales [191], [192]. El estudio de la regulación fisiológica del pH_i mostró tempranamente que diversos tipos celulares desarrollan una alcalinización intracelular ante estímulos proliferativos como la fertilización misma o diversos factores de crecimiento, siendo el intercambiador NHE1 la estructura más relacionada con este fenómeno [193]. Posteriormente se observó la existencia de un umbral de pH_i (7,1-7,2) debajo del cual los factores de crecimiento fallaban en estimular la entrada en el ciclo celular y la progresión por la fase G1 en fibroblastos quiescentes en G0 [194]. Se demostró que dichas observaciones se debían a que los bajos pH_i impedían la activación de la vía de mTORC1 lo cual posteriormente también se corroboró en células derivadas de cáncer mamario [195]. Estas observaciones resultan importantes a la hora de vincular el aumento en el pH_i observado en las células tumorales con su mayor capacidad proliferativa, a lo cual también se puede agregar que esta particularidad en el pH_i puede servirle a estas células como una forma de evadir la iniciación de la apoptosis como describiremos posteriormente.

En sintonía con lo mencionado, Pouyssegur y col. en 1984 demostraron que en células tumorales, la inhibición del intercambiador NHE1 produce la muerte celular debida a la acidificación intracelular que se genera, efecto que denominaron “*H⁺ suicide technique*” [196]. Si bien este hecho fue observado en diversos tipos de tumores, la diversidad de mecanismos reguladores del pH_i , y las diferentes isoformas de cada uno, han hecho que no siempre el bloqueo de los transportadores de H^+ derive en una caída del pH_i suficiente para desencadenar la muerte celular.

Además, se observó que la estrategia de inhibición de la extrusión de H^+ para disminuir la capacidad proliferativa depende del tipo de metabolismo celular. Pouysségur y col. han evaluado los efectos de la supresión en la expresión del intercambiador NHE1 en tres variantes de fibroblastos tumorales: una deficiente en la

glucólisis, otra deficiente en la fosforilación oxidativa y una *wild type* con ambas vías bioenergéticas activas. Los *xenografts* producidos en ratones a partir de este último tipo de células (wild type) mostraron una regresión del 80% luego de la supresión del NHE1. Más aún, los tumores originados de células deficientes en la fosforilación oxidativa fueron abolidos por la supresión del intercambiador. Contrariamente, los tumores desarrollados a partir de las células deficientes en glucólisis no mostraron regresión significativa luego de la supresión del NHE1 [192], [197].

Por otro lado, el efecto Warburg también tiene implicancias en las vías de señalización de células tumorales [159], [198], particularmente en la generación y modulación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y en la regulación del estado de la cromatina [199]. Una excesiva cantidad de ROS puede provocar el daño de ácidos nucleicos y de la membrana celular, entre otros efectos deletéreos; a su vez insuficiente cantidad de ROS puede afectar la actividad de efectores claves de diversas vías de señalización relacionadas con la proliferación celular como lo son PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) y otras tirosin fosfatasas [159].

El estado de condensación de la cromatina, al modular la expresión génica, es responsable de la regulación de diversas funciones celulares muchas de las cuales son críticas para el fenotipo proliferativo. Este estado está determinado, entre otras cosas, por el balance de acetilación-desacetilación de histonas lo cual se relaciona estrechamente con el metabolismo. Mientras que la acetilación depende en buena parte de la disponibilidad de acetil-CoA (generado por el ciclo de los ácidos tricarbónicos), diversas desacetilasas están moduladas por los niveles de NAD⁺ [200]–[202] lo cual establece un claro vínculo entre el estado de condensación de la cromatina con el estatus nutricional celular.

En resumen, resulta evidente que el efecto Warburg impacta en numerosos aspectos de los procesos biológicos a nivel celular así como en la forma en que el tumor existe en su microentorno. Así es que los múltiples factores involucrados hacen difícil discernir los causantes del efecto de las consecuencias derivadas del mismo. Pese a que este efecto cuenta con casi un siglo de estudio, a la fecha continua siendo un interesante marco de estudio para la comprensión de los procesos tumorales y sus estrategias terapéuticas. En particular, en este trabajo, nos focalizamos en la comprensión de los mecanismos de regulación del pH en la biología tumoral.

1.3.2 Transportadores de protones en el contexto tumoral y su relevancia como blancos terapéuticos.

Intercambiadores Na^+/H^+ . De los miembros de la familia NHE, el NHE1 ha sido el más vinculado con el desarrollo tumoral y su inhibición con la muerte de diferentes líneas celulares [203]–[205]. Esto no ha mostrado ser de relevancia en la monoterapia con inhibidores del transportador, esta aparente resistencia puede estar relacionada con la co-expresión de otras isoformas del NHE insensibles a los inhibidores utilizados [206]. No obstante, el bloqueo de dicho intercambiador ha mostrado un sinergismo con diversos agentes quimioterápicos como el paclitaxel [207]. La inhibición del NHE1 fue postulada con entusiasmo para disminuir el daño isquémico en el tratamiento post infarto del miocardio, por lo que el inhibidor cariporide avanzó hasta la fase III de los estudios clínicos [208], [209]. Sin embargo su desarrollo clínico ha caído en abandono dados los pobres resultados de eficacia y los notables efectos adversos, debidos probablemente a su ubicua expresión en el organismo [210]. Este resultado disminuyó notablemente el interés de esta estructura reguladora del pH_i como blanco en otras patologías como el cáncer. Otro aspecto que parece ser pasado por alto, o no encuentra explicación a la hora de plantear esta estructura como blanco, es el hecho que la acidificación extracelular propia del microentorno tumoral disminuiría la actividad del NHE al alterar la fuerza impulsora para el transporte de H^+ .

Anhidrasas carbónicas (CA) y Transportadores de HCO_3^- . La familia de estas enzimas, que catalizan la conversión de CO_2 a H^+ y HCO_3^- , comprende 16 isoformas que tienen un rol fundamental en el transporte de gases y en la regulación del pH [136]. De los miembros de la familia de las CA, la isoforma IX (*en inglés CAIX*) representa un blanco molecular único dada su expresión casi exclusiva por las células tumorales en su superficie extracelular, con la excepción de determinadas zonas del tracto gastrointestinal. Luego de su clonado se encontró que su expresión estaba fuertemente inducida por HIF (*hipoxia induced factor*) [211], derivando luego en su uso como marcador de mal pronóstico en diversos tipos de cáncer [212]. Diversos autores describen la actividad de esta enzima como un determinante tanto del pH_e [213] como del pH_i tumoral [214], [215], siendo de importancia para el desarrollo del tumor junto a la otra isoforma extracelular CAXII [216]. Si bien estudios iniciales de *knock-down*, con RNAi contra CAIX, mostraron retrasar el crecimiento tumoral *in-vitro* [217], no se logró la muerte celular probablemente debido a la expresión concomitante de CAXII

[216]. Esto también puede deberse a que el grado de acidificación intracelular logrado no es suficiente para lograr la muerte, dado que incluso la reducción de la expresión de CAIX y CAXII conjunta logró reducir el pH_i sólo a $\sim 6,9$ en células de adenocarcinoma LS174 expuestas a un pH_e tan ácido como 6,0 [218].

Trabajos más recientes muestran resultados más prometedores respecto al uso de CAIX como blanco. En el modelo murino 4T1 de cáncer de mama metastásico, la disminución en la expresión de CAIX, por RNAsi, provocó la regresión tumoral y la supervivencia del 100% de los ratones con una reducida recurrencia del tumor primario del 20% sin casi desarrollo de metástasis [219]. Estos resultados fueron emulados por el uso del inhibidor de CAIX CAI17, pero lamentablemente los mismos no pudieron reproducirse en el modelo de *xenograft* de células humanas MDA-MB-231 [220]. La mayoría de los estudios preclínicos más recientes buscan evaluar la combinación de tratamientos tradicionales con la inhibición de CAIX. En este sentido la reducción en la expresión de CAIX ha mostrado mejorar el efecto de la radioterapia tanto *in vitro* como *in vivo* en experimentos de *xenograft* [221], [222], así como potencia los efectos de la terapia anti-angiogénica de bevacizumab en *xenografts* de células HT29 y U87 [223]. Estos resultados, entre otros, dieron lugar a que la CAIX sea el blanco molecular de diversos compuestos que al 2017 formaban parte de cuatro estudios clínicos, dos de ellos finalizados mostrando ambos seguridad en el tratamiento y uno de ellos logrando la estabilización de carcinoma metastásico renal en asociación con el interferón- $\alpha 2a$ [224].

A la fecha, el mecanismo postulado por el cual las CA modulan el pH intracelular y extracelular involucra la presencia en la membrana plasmática de un transportador de bicarbonato, los equivalentes de HCO_3^- producidos por la CA (por formación de H_2CO_3 a partir de H_2O y CO_2) son ingresados a la célula por el transportador dejando del lado extracelular a los H^+ . En el interior celular el HCO_3^- es neutralizado por equivalentes de H^+ , el H_2CO_3 producido es disociado por la CA intracelular generando H_2O y CO_2 que difunde afuera de la célula. De esta forma se genera un ciclo que deriva en la extrusión neta de protones [117], y el conjunto de proteínas involucradas fue apodado *transport metabolon* [225]. De esa manera la importancia de las CA en el desarrollo tumoral se hace, de alguna forma o grado, transitiva a los transportadores de HCO_3^- involucrados. Pese a ello, poca es la evidencia que puede puntualizar sobre determinadas proteínas, dentro de esta amplia familia de

transportadores, con el rol arriba mencionado en condiciones patológicas [117]. Al momento el transportador electroneutro NBCN1 (también denominado SLC4A7) ha sido el más relacionado, habiéndose identificado como relevante para la regulación del pH_i en aislados clínicos de cáncer de mama [226] y líneas celulares como MCF7 [227].

Transportadores de monocarboxilato. Como ya se describió previamente es una característica compartida por una amplia mayoría de tumores la producción excesiva de lactato por el uso predominante de la glucólisis aeróbica.

En el transporte de lactato participa predominantemente la familia de transportadores de monocarboxilato (MCTs). Esta familia incluye 14 miembros diferentes, de los cuales sólo cuatro se encuentran en membrana, de estos MCT1 y MCT4 son aquellos involucrados en la patología tumoral. MCT1 se encuentra implicado tanto en la extrusión como en la entrada de lactato a la célula y ha sido vinculado en el intercambio de metabolitos entre las células tumorales y las del estroma [228]. En comparación al MCT1, el MCT4 posee una muy baja afinidad por el piruvato, lo cual hace que el transportador funcione como un exportador selectivo de lactato, optimizando la reducción realizada por la enzima lactato deshidrogenasa [229], [230]. Por ende no resulta extraño que el MCT4 se encuentre en tejidos glucolíticos como los tumores hipóxicos de rápido crecimiento [231]. La inhibición simultánea de MCT1 y MCT4 ha mostrado tener resultados tanto *in-vitro* como *in-vivo* en modelos de adenocarcinoma de colon y cáncer de páncreas [232]. Los MCTs no funcionan estrictamente como reguladores del pH_i en el sentido que no son activados por cambios en dicho parámetro, sin embargo contribuyen al mantenimiento de la alcalinidad intracelular ya que cotransportan el lactato con un protón. El agregado de inhibidores del MCT1 a células puramente glucolíticas carentes de MCT4 produce un rápido descenso en el pH_i que deriva en el arresto del crecimiento celular [232]. Los inhibidores de MCTs también han mostrado generar acidificación intracelular en células derivadas de neuroblastomas y melanomas [233], [234]. En el mismo sentido, la expresión ectópica de MCT4 en fibroblastos transformados con $\text{HRAS}^{\text{G12V}}$ resultó en tumores con un pH_i más alcalino, lo cual fue monitoreado *in-vivo* por espectroscopía NMR [235]. De igual manera la expresión de MCT4 en células tumorales deficientes en la fosforilación oxidativa aumentó su pH_i y produjo un aumento en su capacidad tumorigénica [232], [236].

Por otro lado, se ha propuesto que tanto el MCT1 y el MCT4 podrían funcionar en conjunto (*metabolon-like*) con las CA tanto intra como extracelulares. En estos modelos se hipotetiza que las CA podrían potenciar el gradiente de difusión de H^+ en la vecindad de los MCT mediante un efecto tipo antena que involucraría los residuos de histidina de las cadenas laterales [237], [238]. Es decir que las tasas aumentadas de transporte de lactato y H^+ a través de los MCT dependería de los mencionados residuos de histidina y no de la actividad catalítica de la CA. Esta propuesta sugiere que las estructuras reguladoras del pH_i funcionarían de forma cooperativa y coordinada.

Al igual que en el caso del intercambiador NHE1, el transportador MCT4 fue identificado como una estructura relacionada con el proceso de metástasis. Diversos trabajos muestran que el MCT4 co-localiza con integrinas beta1 en los bordes de progresión de las células en migración [239], [240].

Bombas de H^+ . Como se describió anteriormente es característico de los tumores sólidos la inversión del gradiente de pH , al contrario que en las células normales el interior celular es más alcalino que el medio extracelular. Este hecho lleva a pensar en la importancia del transporte activo primario de protones, también denominadas bombas de protones (ya se mencionaron mecanismos de transporte activo secundario en el caso de los intercambiadores de H^+ con otros iones). Si bien se ha propuesto que las bombas son parte importante de la batería de proteínas reguladoras del pH_i fisiológico [241], poca es la evidencia que demuestre la localización de las mismas en la membrana plasmática [192]. A comienzo de los años '90 un trabajo generó el interés en la bomba V-ATPasa (típicamente expresada en las vesículas intracelulares) basado en el efecto de sus inhibidores en la actividad de la bomba plasmalema [242], sin embargo posteriormente el mismo grupo reportó que no fue posible encontrar tal estructura en la membrana plasmática de un importante número de líneas celulares [243] lo cual derivó en calificar las observaciones iniciales como un epifenómeno del rápido reciclado de las endomembranas. Más recientemente se reportó la sobreexpresión de la bomba V-ATPasa en la membrana plasmática de células de carcinoma hepatocelular (HCC) respecto de los hepatocitos normales, pudiendo el inhibidor bafilomicina reducir el crecimiento tumoral en *xenograft* murinos de HCC [244].

Pese a que las evidencias preclínicas sigan siendo motivo de debate, los inhibidores de la bomba de protones (PPI, de las siglas en inglés *proton pump inhibitors*) como el omeprazol y sus congéneres, son los compuestos que se encuentran más avanzados en los estudios clínicos para el tratamiento de diversas neoplasias comparado con el resto de las estructuras reguladoras del pH_i . A pesar de la similitud estructural entre las V-ATPasas y las H^+/K^+ ATPasas, sigue siendo poco claro si el efecto anti-tumoral de los PPI se debe a una acción sobre las primeras ya que la inhibición *in-vitro* se logra sólo a altas concentraciones [245]. De cualquier manera los PPI parecen ser muy indicados para el uso en la terapia anti-neoplásica ya que su característica activación de profármaco a principio activo ocurre a pH ácidos como los que se encuentran en el microentorno tumoral [241].

1.3.3 Hv1 en células tumorales: un extrusor pasivo de H^+ ignorado hasta la fecha

A la fecha es escaso el conocimiento de la función de este canal iónico en un contexto fisiopatológico comparado con la comprensión de la función de otros canales iónicos operados por voltaje. Sin embargo, en los últimos años han surgido evidencias acerca de la relación entre la expresión del canal Hv1 y la malignidad de tumores de diverso origen. Pese a ello, la amplia mayoría de los trabajos de revisión que describen el rol entre las estructuras reguladoras del pH_i en el cáncer ignoran a este canal [191][224][246].

El primero de los reportes fue realizado por Wang y col. en 2011 donde estudiaron seis líneas celulares provenientes de tumores mamarios. Allí describen la correlación entre mayor expresión del canal Hv1 y un mayor fenotipo proliferativo y metastásico, a su vez la inhibición de la expresión del canal por siRNA produjo una menor migración en el ensayo de herida en monocapa [247]. Un año más tarde los mismos autores lograron confirmar en aislados clínicos la correlación mencionada, dado que la sobreexpresión del canal se vio acompañada de una menor sobrevida [248]. Posteriormente los mismos resultados fueron reproducidos en líneas celulares y aislados clínicos de cáncer colorectal [249].

En un trabajo posterior el mismo grupo estudió la función del canal en un panel de líneas celulares provenientes de gliomas humanos encontrando que la línea de mayor capacidad metastásica, SHG-44, presenta una mayor expresión del canal. En el mismo

reporte han demostrado que el Zn^{2+} logra reducir notablemente la capacidad migratoria e invasiva de las mismas. El mismo tratamiento logró disminuir la viabilidad celular (en el ensayo de MTT) así como redujo el tamaño de los tumores *in vivo* en el modelo de *xenograft* murino [250]. Pese a que el título del trabajo en cuestión menciona la inducción de apoptosis, los ensayos realizados (MTT) no logran discernir entre la misma e inhibición del crecimiento, por lo que las conclusiones respecto a los mecanismos involucrados son imprecisas. Posteriormente Ribeiro-Silva y col. registraron el canal Hv1 en células T98G de glioblastoma humano, viendo que también el Zn^{2+} producía la muerte celular (captación de yoduro de propidio) a concentraciones entre 0,1 y 0,5 mM [251].

En el mismo sentido, en células leucémicas de origen B (principalmente de aislados clínicos de leucemias linfocíticas crónicas), Hondares y colaboradores han demostrado que la isoforma del canal Hv1 truncada (variante transcripcional 3 de 253 aminoácidos) presenta una expresión mucho mayor comparado con la isoforma 1 (variante transcripcional 1 de 273 aminoácidos), la cual es mayoritaria en células B normales. La isoforma truncada (ver sección 1.1.1) presenta el modo de probabilidad de apertura aumentada pudiendo generar un mayor flujo de H^+ , lo cual permite una mayor producción de ROS intracelulares. Como se mencionó previamente (sección 1.1.2) la producción de ROS es crítica para la activación de las mencionadas células por vía del BCR, en sintonía con esto los autores lograron comprobar que la isoforma truncada permite una mayor proliferación de las células B malignas por dicha vía de señalización [56].

En células leucémicas de origen T se sabe que las células Jurkat presentan una mayor densidad de corriente mediada por el canal Hv1 comparadas con linfocitos T no tumorales [43]. Sin embargo, previo al desarrollo de este trabajo de tesis, se desconocían implicancias funcionales de dicho hecho.

1.3.4 Rol del pH en el mecanismo de apoptosis: un nexo relevante para el diseño de estrategias terapéuticas

Como se mencionó anteriormente la resistencia a la muerte celular programada es uno de los *cancer hallmarks*, la apoptosis es la modalidad más conocida de este tipo

de muerte teniendo un importante vínculo con la acidificación intracelular, el cual se resume a continuación.

Apoptosis es el término que tradicionalmente se utilizó para referirse a la muerte celular programada inicialmente diferenciada, por características morfológicas, de otras formas de muerte no programada como la necrosis. A medida que el estudio del proceso de muerte progresó hacia una mayor descripción de los eventos moleculares involucrados, la clasificación de la muerte celular programada excedió a la llamada apoptosis e incorporó diversas variantes de la misma. Sin embargo, la descripción canónica de los procesos apoptóticos sigue siendo dividida en dos vías: la *vía extrínseca* en la cual el proceso es disparado por la interacción de un ligando exógeno con un receptor de muerte, y la *vía intrínseca* en la cual la iniciación se da por la integración de señales de daño en la mitocondria la cual libera una serie de factores de iniciación del proceso apoptótico (ej. citocromo c). Ambas vías involucran la función de Cistein-Aspartato proteasas (*Caspasas*), las cuales en condiciones normales permanecen como pro-caspasas siendo activadas por proteólisis, a grandes rasgos se dividen en caspasas iniciadoras (activan a otras enzimas caspasas) y caspasas ejecutoras (las cuales degradan determinados componentes celulares). La iniciación de la muerte celular por ambas vías ha sido asociada con una etapa de clara acidificación intracelular [252] lo cual despierta los siguientes interrogantes:

¿Cuál es el origen de esta acidificación asociada a la apoptosis y qué estructuras están involucradas?

Se ha demostrado que ante estímulos que desencadenan ambas vías de la apoptosis (radiación UV, staurosporina, etopósido, arsénico, anticuerpos anti-FAS, privación de factores de crecimiento, etc.), la acidificación intracelular ha mostrado ser tanto dependiente como independiente de la actividad de caspasas [253] lo cual da la idea que es un fenómeno general y no particular de una subrutina específica de la apoptosis. Respecto a la ruta de receptores de muerte, los cambios en el pH_i han sido estudiados principalmente en los eventos apoptóticos post-activación de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) con el Fas-ligando [254]–[256] y se vio que ocurren luego de la activación de caspasas [257]. En este sentido el agregado de antiCD95 a células T Jurkat produce una significativa disminución del pH_i una hora luego del estímulo, indicando que la acidificación es un evento temprano en este tipo de

apoptosis [256]. Petit y col. han sugerido que, como esta acidificación es inhibida tanto por la sobreexpresión de Bcl-2 como por ciclosporina A y ácido bongkrek (dos inhibidores del poro de transición mitocondrial), la disfunción mitocondrial podría ser causante de este cambio en el pH_i . Sin embargo estas organelas podrían no representar la única fuente de protones en la muerte inducida por FasLigando; de hecho se ha propuesto que alteraciones en el funcionamiento de los mecanismos reguladores del pH_i puedan contribuir a la mencionada acidificación [253], [258]. En este sentido se ha demostrado que la acidificación citosólica luego del estímulo de receptores de muerte (Fas/Apo-1) se debe, al menos en parte, a la inhibición del intercambiador Na^+/H^+ NHE [259]. Se ha sugerido que esta inhibición puede estar relacionada con el estado de fosforilación del transportador [260]–[262] así como con el descenso de los niveles de ATP, conocido modulador del NHE [262], [263]. Así mismo también se ha reportado el clivado del transportador NHE por caspasas [264].

A diferencia de la acidificación observada luego de la estimulación de los receptores de muerte, que se ha demostrado ser caspasas dependiente, la caída en el pH_i con estímulos apoptóticos dependientes de la mitocondria parece ser caspasas independiente [253]. Varios estudios han reportado que el uso de inhibidores de caspasas de amplio espectro (como el zVAD) no afectan la acidificación pero sí la concreción de la muerte por apoptosis [148], [265]. También se ha demostrado que la acidificación precede la activación de caspasas en células que atraviesan la apoptosis en respuesta a estímulos de muerte dependientes de la mitocondria (Bax, staurosporina y radiación UV) [148]. Dado que la sobreexpresión de Bcl-2 mostró prevenir la acidificación, se ha propuesto que la mitocondria es responsable de tal fenómeno [148], [266]. De acuerdo con esto se ha demostrado que ante diversos estímulos dependientes de la mitocondria se induce la alcalinización de la mitocondria y la acidificación del citosol, permitiendo la liberación de citocromo c y la activación de caspasas, siendo tanto esto último como los cambios en el pH_i prevenibles por el uso de inhibidores de la bomba $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATPasa}/\text{H}^+$ (como la oligomicina) [148]. Más allá de estos resultados que ponen en relieve la importancia de la mitocondria y la mencionada bomba en el desarrollo de la acidificación, diversos trabajos describen una baja en la actividad del intercambiador NHE luego de la agresión celular con diversos agentes químicos [267], [268], proponiéndose como mecanismos un cambio en el estado de fosforilación del

intercambiador y la caída del ATP intracelular al igual que en la vía extrínseca discutida anteriormente.

¿Cuál es el rol de esta acidificación en la cascada apoptótica?

Si bien hay consenso en la literatura en que la acidificación intracelular es un fenómeno asociado a la apoptosis, algunos autores sugieren que es un fenómeno temprano disparador [253] mientras que otros estudios sugieren que la disminución del pH_i tiene un rol facilitador más que disparador de la cascada apoptótica [253], [269]. El origen y las implicancias de la disminución del pH_i sobre los fenómenos de muerte celular no son aún bien comprendidos y para describirlos es necesario especificar qué tipo celular es el modelo de estudio. En cuanto a las dianas relevantes en este mecanismo, diversos estudios han demostrado que las caspasas son estructuras blanco de la acidificación intracelular, especialmente aquellas activadas por la liberación del citocromo c desde la mitocondria como caspasa 9 de tipo iniciadora [148], [252] y caspasa 3 de tipo ejecutora [270], [271]. En el caso de las primeras se ha visto que la eficacia de su activación *in-vitro* por el citocromo c tiene un pH óptimo de 6,3-6,8 y que la activación del apoptosoma (complejo de activación de caspasas compuesto por oligómeros del citocromo c, Apaf-1 y procaspasa 9) ocurre a una mayor velocidad a pH ácido; esta dependencia del pH podría servir como un mecanismo para evitar la activación inadecuada de caspasas citosólicas por la liberación accidental de pequeñas cantidades de citocromo c durante la duplicación mitocondrial [148]. En el caso de la caspasa 3, se conoce que tal mecanismo de seguridad existe demostrándose que la inactividad de la procaspasa 3 es mantenida por un tripéptido Asp-Asp-Asp que es removido luego de la acidificación, en tales condiciones se ha observado una mayor maduración autocatalítica así como una mayor activación proteolítica por caspasa 9 [270]. A pesar de que pHs alcalinos han mostrado inhibir la activación de caspasa 3, una vez activada, la actividad de esta enzima no se afecta por la elevación del pH hasta 7,8 y que el efecto inhibitorio puede ser superado por mayores concentraciones de citocromo c [271]. Estas observaciones sugieren que el grado de activación de caspasas depende de la importancia relativa de las variaciones del pH_i y el grado de liberación de citocromo c.

Otra estructura propuesta como blanco de modulación por el pH_i fue la endonucleasa DNAsa II la cual se activa a pH por debajo de 7,0 [272], [273] y está

involucrada en la degradación nucleosomal característica de la apoptosis que da lugar al típico escalonamiento de los geles de ADN (*DNA ladder*). Además, otras endonucleasas se han descrito como dependientes de pH ácidos [274], [275]. Estas nucleasas pueden localizarse tanto en el núcleo como en el citoplasma, translocando al núcleo luego de la activación [274].

Sumado a lo ya descrito, la actividad de oncogenes, genes supresores de tumores (ej. p53), proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) y proteínas de la familia Bcl-2 relacionadas con el balance pro/anti-apoptosis también se ha reportado tienen dependencia con el pH. En particular, la actividad formadora de poro de Bax es ocho veces mayor a pH 4,0 que a pH 7,5 [276]; esto da un indicio de una marcada dependencia de Bax con el pH. Por otro lado, es importante mencionar que el pH intracelular es regulador de la actividad de las diversas estructuras que regulan la dinámica del calcio pudiendo la acidificación intracelular aumentar $[Ca^{2+}]_i$, [253], [263] y de aquellas que determinan el estado redox celular, ambos factores involucrados en el balance pro/anti-apoptosis.

1.4 Dinámica del calcio intracelular en el proceso tumoral

Es ampliamente conocido que los niveles de calcio intracelular son señalizadores de múltiples procesos a nivel celular, por lo que no resulta extraño que la dinámica del calcio intracelular en células tumorales sea un intenso campo de estudio. Procesos claves para el establecimiento del fenotipo tumoral como la proliferación celular, apoptosis, invasión y metástasis se encuentran relacionados con modificaciones en la regulación de la concentración del calcio intracelular [277]. Es así que los transportadores responsables de la homeostasis de dicho ión presentan alteraciones en la expresión y/o función en diversos modelos de tumores, y diversas estrategias farmacológicas han sido planteadas focalizando a dichas estructuras como probables estructuras blanco [278].

El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, debido a la inhibición de mecanismos extrusores de Ca^{2+} citoplasmático (bombas e intercambiadores) o a la activación de vías de liberación y entrada de Ca^{2+} , puede predisponer o disparar por sí mismo el proceso de apoptosis celular. De manera inversa se ha planteado como estrategia la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ con el objetivo de atenuar el potencial proliferativo de la célula tumoral [278]. Dada la diversidad de mecanismos involucrados en la homeostasis del calcio es posible hipotetizar que ciertas estructuras involucradas presenten, como la mayoría de las proteínas, una dependencia de su actividad con el pH. De hecho, diversos transportadores de Ca^{2+} han sido descritos como dependientes del pH [279]–[282]. De esta manera podemos imaginar un escenario con dos variables (concentración de Ca^{2+} y de H^+) que pueden verse fuertemente interrelacionadas a nivel intracelular, un ejemplo es el cambio simultáneo de ambas variables descrito en células T ante diversos estímulos (aumento de Ca^{2+} y acidificación)[283]. En este trabajo se indagó sobre la relación entre la actividad del canal Hv1 en la dinámica del calcio intracelular.

Sección 2

Hipótesis y objetivos

La **hipótesis general** sobre la cual se sustentan los objetivos del trabajo realizado es que la función del canal Hv1 es relevante en la homeostasis del pH_i basal en células tumorales. En estas células, la sobreexpresión de mecanismos extrusores de H^+ se hace necesaria para dar respuesta al aumento en la producción de especies ácidas que genera el cambio metabólico que experimentan. De esta manera una inhibición de la actividad del canal desencadenaría una acidificación intracelular perniciosa para las células que lo sobreexpresan. En este marco la función de este canal sería, no sólo complementar a la enzima NOX en la producción de ROS, sino de gran relevancia en la regulación homeostática del pH intracelular.

El **objetivo general** del trabajo es poner en evidencia el rol regulador del canal Hv1 en el pH_i y su impacto en la sobrevivencia celular.

Para ello se formularon los siguientes **objetivos específicos**:

- Ratificar la actividad del canal Hv1 en el modelo de estudio de células tumorales de origen T, células Jurkat, por medio del registro y caracterización de las corrientes mediadas por el canal mediante técnicas electrofisiológicas.
- Analizar el efecto de diferentes inhibidores del canal sobre las corrientes de protones en las células T Jurkat.
- Estudiar el efecto de los inhibidores del canal Hv1 sobre el pH_i basal, en la misma escala temporal en las cuales estas drogas manifiestan su efecto inhibitorio de las corrientes de protones. Analizar su participación en la recuperación del pH_i ante estímulos acidificantes agudos.
- Evaluar el efecto a largo plazo que producen los mismos inhibidores sobre el pH_i de células T Jurkat en condiciones de cultivo celular.
- Determinar la influencia de la inhibición del canal sobre los niveles de ROS intracelular que producen las células T Jurkat en condiciones de cultivo celular.
- Conocer cuáles son las consecuencias de la inhibición del canal en la sobrevivencia de células T Jurkat, en comparación con linfocitos T periféricos de voluntarios sanos.
- Explorar la interrelación entre cambios en el pH_i y la dinámica del $[\text{Ca}^{2+}]_i$, el cual es un establecido mediador tanto en procesos proliferativos como de muerte celular.

Sección 3

Materiales y métodos

3.1 Células utilizadas y cultivo celular

3.1.1 Cultivo de células T Jurkat

Las células Jurkat se cultivaron en botellas plásticas de 25 ml utilizando medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bobino (SFB) sin antibióticos en estufa con una atmósfera húmeda de CO₂ al 5% a 37°C. Al ser células que crecen en suspensión procedimos a repicarlas por dilución con el medio mencionado tres veces por semana, manteniendo siempre la concentración de células entre 0,5 y 3x10⁶ células por ml. En todos los experimentos utilizamos células en pasajes dentro del rango 5 a 40.

3.1.2 Obtención de células mononucleares de sangre periférica

Para la obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) utilizamos muestras de *buffy-coat* (capa leucocitaria producto de la centrifugación de sangre entera) provenientes del Instituto de Hematología de la Pcia. de Bs.As. y procedimos según el siguiente protocolo: colocamos 20 ml de reactivo de Ficoll en un tubo falcon de 50 ml, dejando que adquiera temperatura ambiente. Por separado preparamos una solución con 15 ml de *buffy coat* más 15 ml de PBS estéril que se agregó al tubo con Ficoll muy lentamente por la pared. El total se sometió a centrifugación durante 30 min. a 400 g a temperatura ambiente. Luego diluimos la capa blanca correspondiente a las PMBC en medio base DMEM y volvimos a centrifugar por 5 minutos a 500 g a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en medio completo y se utilizó para los ensayos correspondientes.

3.1.3 Realización de estímulos en condiciones de cultivo

Para los experimentos en los que realizamos tratamientos con drogas, cultivamos las células en placas de 96 pocillos (greiner – cellstar) partiendo de una concentración inicial de 0,5x10⁶ (salvo que se indique lo contrario) colocando 200 µl de células por pocillo. Con el fin de obtener en simultáneo todas las células tratadas en diferentes condiciones, los tiempos de estímulos están definidos como las horas de tratamiento previa finalización del experimento. Se tomó como control en todos los casos la exposición de las células al solvente (DMSO o medio DMEM, según la droga en

estudio) durante el tiempo ensayado más prolongado. La figura 3.1.2 esquematiza el curso temporal de los estímulos realizados en células T Jurkat. En los ensayos realizados con PBMC se estudiaron los estímulos sólo a 17 hs, debido a la menor viabilidad de las células que no permite cultivarlas por 48 hs.

Se eligieron las concentraciones de drogas utilizadas para los ensayos en cultivo (pH_i, apoptosis y ciclo celular) tomando en cuenta aquellas que mostraron efectos sobre las corrientes en los experimentos de *patch-clamp*. Sin embargo, no es posible estimar las concentraciones efectivas en la vecindad del canal Hv1 en condiciones de cultivo, debido a la complejación con componentes del medio y a que la permeabilidad de las drogas depende de diversos factores entre ellos el pH (el cual a diferencia de los experimentos de electrofisiología no se controla).

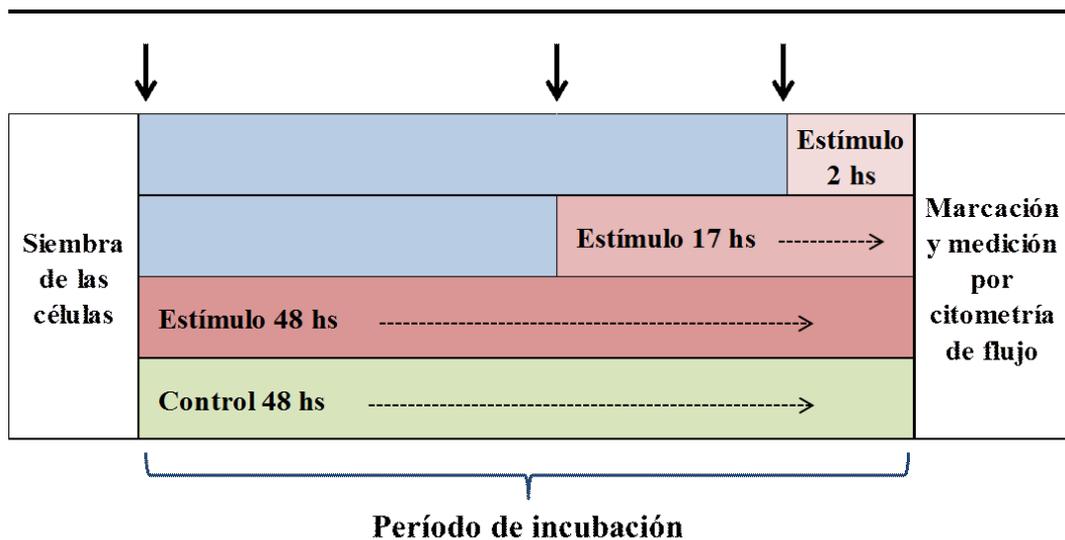


Figura 3.1.2. Esquema del curso temporal de los estímulos realizados en células T Jurkat.

3.2 Electrofisiología

La técnica de *patch-clamp* aplicada en modo de fijación de voltaje (conocida en inglés como *voltage-clamp*) permite medir corrientes iónicas de membrana manteniendo el potencial de la membrana celular en valores fijos. Mientras que, si se

aplica en el modo de fijación de corriente (en inglés, *current-clamp*) es posible medir el potencial de membrana en función del tiempo (sin estímulo o aplicando un estímulo fijo de corriente). Es, por lo tanto, la técnica ideal para estudiar en tiempo real los eventos bioeléctricos que se producen a nivel celular debido a la actividad de canales iónicos, intercambiadores iónicos electrogénicos y receptores ionotrópicos. Estableciendo condiciones adecuadas para cada caso particular, es posible estudiar la función de dichas estructuras en forma aislada identificando los iones que transportan la corriente a través de las mismas, la magnitud, la cinética, su sensibilidad a estímulos de diferente tipo y su perfil farmacológico. Además la técnica tiene gran versatilidad, dado que las diferentes configuraciones en las que se puede trabajar permiten registrar la corriente macroscópica o corriente de *whole-cell* (WC, célula completa), o la corriente de canal único o *single-channel* correspondiente a una única proteína (canal, intercambiador o receptor).

La técnica consiste en la aproximación de una pipeta de vidrio a la superficie de la membrana de la célula elegida, utilizando para este fin un micromanipulador. Seguidamente se aplica una succión desde la pipeta, estableciendo un sello de alta resistencia de aproximadamente 10 G Ω (en inglés, *Giga-seal*) entre el vidrio de la misma y la membrana celular.

La pipeta de vidrio, la cual es descartable y se utiliza una por cada célula, se coloca en un dispositivo (conocido en inglés como *holder*) que tiene un electrodo de Ag/AgCl el cual se sumerge en la solución que contiene la pipeta de vidrio. Este dispositivo está conectado físicamente a un amplificador operacional, el cual en el modo de fijación de voltaje (*voltage clamp*) mide el potencial de membrana celular, lo compara con el valor de potencial deseado por el operador y aplica una corriente igual y de sentido contrario que permite fijar el valor de potencial celular en el buscado. Se utilizan pipetas de vidrio WPI PG52165-4 (*World Precision Instruments*), que se fabrican en el momento de realizar los experimentos con un equipo de calentamiento y estiramiento controlado (*Micropipette puller PP-83, Narishige Scientific Instrument*). En este trabajo utilizamos pipetas de entre 2-4 M Ω de resistencia, cuya punta tiene un área de aproximadamente 1,5 μm^2 .

En la figura 3.2.1 se presenta un esquema donde se muestra cómo se accede a la configuración *Whole-Cell* utilizada en esta tesis desde la configuración de *Cell-Attached*:

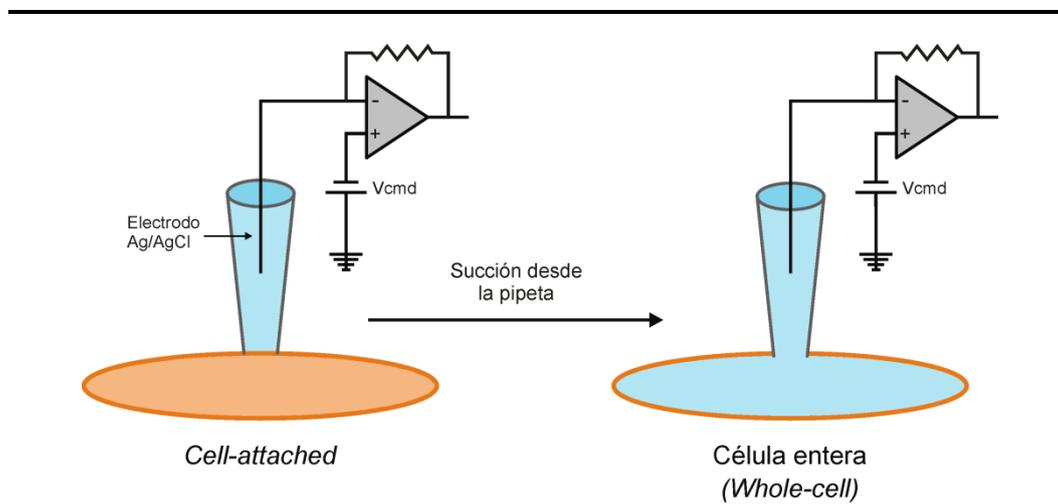


Figura 3.2.1. Acceso a la configuración de *patch clamp whole-cell* (WC) desde *cell-attached* (CA). El esquema eléctrico mostrado hace referencia a las características del amplificador operacional utilizado. V_{cmd} : voltaje establecido externamente.

En la configuración de CA se mantiene la integridad de la célula, de manera que tanto la solución de la pipeta como la del baño están en contacto con la cara extracelular de la membrana. Esta configuración permite registrar las corrientes de los canales iónicos presentes en la porción de membrana bajo la punta de la pipeta al formar el sello de alta resistencia. Además, en las condiciones de CA se conservan todas las interacciones y regulaciones intracelulares de la célula sellada. Esta técnica aplicada a las células T Jurkat permitiría registrar la corriente iónica durante las aperturas de los canales en forma individual, pero dada la extremadamente baja conductancia de los canales Hv1 las corrientes mediadas por los mismos se estiman ser del orden de los femtoAmperes (fA, 10^{-15} Amperes) y no pueden detectarse debido a que se encuentra muy por debajo de la amplitud del ruido normal de una unidad de *patch clamp*. Por lo tanto en este trabajo utilizamos la configuración WC, la cual además de ser la adecuada para este tipo de canales de baja conductancia, nos permite controlar la composición del medio intracelular de manera de poder aislar la corriente mediada por canales Hv1 en condiciones de pH_i controlado.

Una vez obtenido el sello de alta resistencia en la configuración de CA, se puede lograr el pasaje a la configuración de WC realizando una presión negativa (succión) desde la pipeta, la cual logra retirar la porción de membrana delimitada por el sello de alta resistencia. De esta manera, la solución de la pipeta dializa la célula y se establece una conexión eléctrica entre el electrodo y el interior intracelular (ver esquema en la figura 3.2.1).

Utilizando las soluciones detalladas a continuación, se pueden obtener condiciones de registro donde las corrientes son atribuibles a los iones H^+ ya que es el único ión permeante. Como se puede observar, las soluciones se encuentran fuertemente tamponadas con el objetivo de que las mismas corrientes de protones no produzcan un cambio en el pH en la proximidad del canal alterando de esta manera la fuerza impulsora para las mismas.

- Solución Extracelular (**SE**) (el número indica la concentración de cada compuesto expresada en mM): HEPES 100; EGTA 1; $MgCl_2$ 2; NMDG 90; pH ajustado a 7,8 con HCl.
- Solución Intracelular (**SI**) (el número indica la concentración de cada compuesto expresada en mM): MES 100; EGTA 1; $MgCl_2$ 2; NMDG 90; pH ajustado a 7,8 con HCl.

Observamos las células con un microscopio invertido (Televal 3 - Zeiss Jena), dentro de una caja de Faraday para filtrar los ruidos eléctricos del ambiente. La señal de corriente iónica fue registrada en función del tiempo con un amplificador *Axopatch 200A* (*Axon Instruments*) y se filtró adecuadamente con un filtro de tipo *Bessel* de 4 polos a una frecuencia de 2 kHz. Se digitalizó con una plaqueta digitalizadora *Digidata 1440* (*Axon Instruments*) con una frecuencia de muestreo de 10 kHz.

Las soluciones ensayadas fueron perfundidas por gravedad, a una velocidad aproximada de 1 ml/min, con una pipeta multivía colocada en la proximidad de la célula investigada. Las distintas drogas ensayadas fueron agregadas a las soluciones utilizadas en el día del experimento y, en los casos que correspondiera, a la solución extracelular que se utiliza en la condición control se le agrega el solvente en el cual se disolvió la

droga. Luego de ensayar un protocolo en una célula, reemplazamos la cámara de Petri experimental por otra conteniendo una nueva alícuota de células. Todos los experimentos electrofisiológicos fueron realizados a temperatura ambiente, 20-22 °C.

La figura 3.2.2 inferior esquematiza el protocolo de fijación de voltaje que se utilizó para el estudio de las corrientes macroscópicas del canal Hv1, en el cual partiendo de un potencial de reposo de -40mV se aplicaron pulsos de voltaje de 4 segundos de duración y en incrementos de a 10 mV desde un potencial de -60 hasta +60 mV. El período de tiempo entre pulsos fue de 13 seg. para evitar la depleción de protones en el interior celular dando tiempo a la diálisis de la célula con buffer proveniente de la pipeta. En la parte superior de la figura 3.2.2 se muestra un ejemplo de las corrientes iónicas evocadas por dicho protocolo de voltaje. En forma superpuesta se observan los registros de la corriente correspondiente a cada pulso.

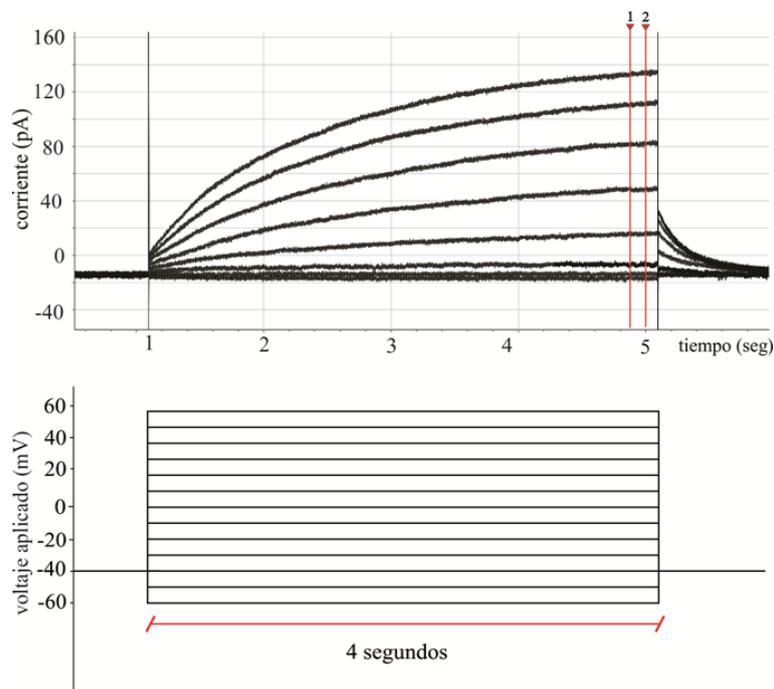


Figura 3.2.2. Arriba: Visualización de un registro característico de las corrientes de protones mediadas por el canal Hv1 en el programa de análisis Clampfit, donde se observa el posicionamiento de los cursores que utilizamos para calcular la corriente al final del pulso. Abajo: protocolo de voltaje utilizado para estudiar las corrientes de Hv1 en la configuración de *whole cell*.

Posteriormente, analizamos los registros de corriente utilizando el programa Clampfit 10.7 (Molecular Devices) y obtuvimos varios parámetros (valor de corriente, cinética, conductancia) que permiten caracterizar el tipo de canal iónico responsable de mediar la corriente.

Medimos la magnitud de la corriente máxima como la media de los valores de corriente correspondientes a un intervalo de 100 msec al final del pulso (se ilustra en la figura 3.2.2 superior con el posicionamiento de los cursores).

En el mismo registro, realizamos también el análisis de la cinética de activación de la corriente para cada voltaje mediante el ajuste de las corrientes a una ecuación exponencial estándar de un solo componente:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-t/\tau_{act}} + C$$

Mediante el método de Chebyshev obtuvimos el parámetro cinético de la corriente evocada por cada voltaje, τ_{act} (τ_{act}), que permiten caracterizar el tiempo necesario para que la corriente alcance el 67% de su valor máximo (figura 3.2.3).

Por otro lado, en la parte final del protocolo de voltaje que se representa en la figura 3.2.3 con el recuadro se midió la corriente máxima o corriente pico. A esta región de la corriente se la denomina corriente de cola y permite estimar la dependencia de la conductancia de la membrana (G) para el canal con el potencial de la membrana. Resumidamente, la corriente mediada por un ión x (I_x) es igual a:

$$I_x = N \cdot P_o \cdot g (V_m - E_x)$$

donde N es el número de canales presente en la célula, P_o es la probabilidad de apertura del canal, g es la conductancia unitaria del canal, V_m es el voltaje aplicado y E_x es el valor de potencial de equilibrio electroquímico para el ión x. Teniendo en cuenta lo anterior, el fundamento de este procedimiento es que la cinética de deactivación de los

canales es mucho más lenta que la velocidad con la que cambia el potencial aplicado; por lo tanto, en los instantes inmediatamente posteriores a la finalización de cada pulso (donde medimos la corriente pico), los canales se encuentran con una probabilidad de apertura (P_o) correspondiente al voltaje aplicado (V_m del pulso) pero con la fuerza impulsora idéntica para todos los pulsos (V_m de reposo – E_x , ver protocolo de voltaje en la figura 3.2.2). De esta manera podemos obtener $G_x = N \cdot P_o \cdot g$ correspondiente a cada V_m aplicado. Con estos valores normalizados por el valor máximo de G_x , (G_{max}) se puede construir la relación G_x/G_{max} vs V_m que refleja la dependencia de G con el potencial de membrana, característica muy importante para un canal operado por voltaje.

En los experimentos donde se probó el efecto de drogas sobre las corrientes mediadas por el canal Hv1 se utilizaron concentraciones que permitan ver un efecto claro tomando como referencia datos de registros en otras líneas celulares [103], [110], [113].

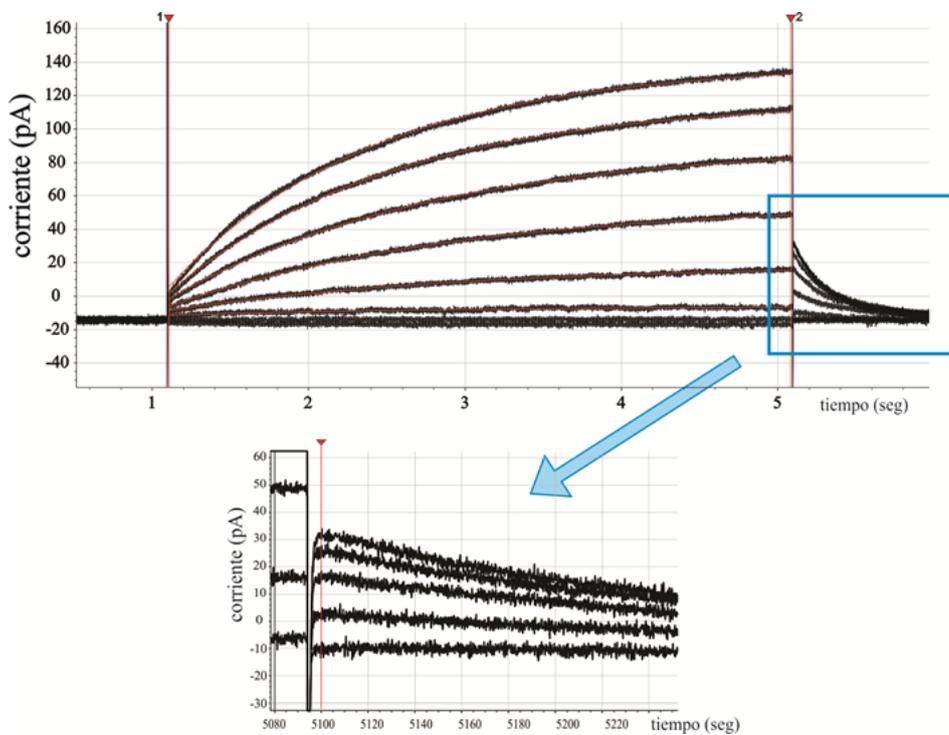


Figura 3.2.3. Visualización de corrientes de cola, en el programa de análisis Clampfit, utilizadas para la construcción de las curvas G/G_{max} .

3.3 Determinación de pH_i por Fluorescencia en cubeta

Para este tipo de determinación usamos la sonda de pH, BCEF-AM (2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(6)-carboxifluoresceína acetoximetilester). El BCEF-AM permea fácilmente la membrana plasmática y una vez en el citosol, las esterasas intracelulares hidrolizan la unión ester perdiendo la capacidad de permear a través de la membrana celular, de manera que las células quedan cargadas con BCECF. Esta molécula es fluorescente y tiene la capacidad de unir H^+ en forma reversible cambiando la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de protones. En particular, cuando la molécula es excitada con una longitud de onda de 440 nm la intensidad de fluorescencia emitida no varía con el pH, mientras que si se excita a 500 nm la misma aumenta cuando el pH aumenta.

En este protocolo experimental, las células T Jurkat fueron incubadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de BCEF-AM durante 20 minutos a 37 °C. Dicho tiempo es suficiente para que la sonda ingrese a las células y se produzca la hidrólisis del grupo ester. Luego, las células fueron separadas por centrifugación (112 g, 5 min), resuspendidas en solución buffer HEPES y reincubadas por 15 minutos en solución buffer HEPES libre de sonda para completar la hidrólisis de la misma. Posteriormente lavamos con la misma solución y resuspendimos a una concentración de 2×10^7 células/ml. Alícuotas de 50 μl de esta suspensión se diluyeron en 2 ml de solución buffer HEPES y colocaron en cuvetas termostalizadas y con agitación permanente. La suspensión de células fue excitada alternadamente a 503 y 440 nm, colectándose la fluorescencia emitida a 535 nm. Utilizamos el cociente (Ratio) de la emisión correspondiente a cada longitud de excitación para evaluar los cambios relativos en el pH_i . La estimación mediante el Ratio (método *ratimétrico*) permite independizar la medida de otros factores como por ejemplo la concentración y distribución de la sonda en el interior celular. De este modo realizamos la medición del pH_i en función del tiempo mediante un espectrofluorómetro Aminco-Bowman series II (Silver Spring, Maryland, USA).

En todos los experimentos esperamos el tiempo necesario para que el valor de pH_i basal (línea de base de la señal) logre un valor estable. En esas condiciones se procedió al agregado de los inhibidores del canal $Hv1$: Zn^{2+} (1 mM nominal) y Cl-GBI (200 μM). Luego del agregado de los mismos registramos la señal durante 15 minutos y posteriormente agregamos ácido propiónico 10 mM (neutralizado a $pH=7,4$). El

agregado del ácido propiónico genera una acidificación intracelular muy rápida que se recupera en el tiempo poniendo en evidencia la actividad de uno o más mecanismos de extrusión de H^+ propios de cada célula. La velocidad de dicha recuperación, equivalente al eflujo de protones (H^+ mM/min) en respuesta a la carga ácida, la calculamos en cada caso (control y en presencia de los inhibidores del canal Hv1) realizando el ajuste lineal del primer minuto inmediato al punto de mayor acidificación.

Solución buffer HEPES (mM): 133 NaCl; 5 KCl; 1,2 $MgSO_4$; 0,8 $MgCl_2$; 10 glucosa; 1,35 $CaCl_2$ y 10 HEPES, el pH fue ajustado a 7,4 con NaOH. En los experimentos que se utilizaron soluciones libres de sodio, el NaCl fue reemplazado por cloruro de colina en la misma concentración y el pH fue ajustado con KOH.

3.4 Determinaciones por Citometría de Flujo

Para evaluar el impacto que produce la inhibición del canal Hv1 a tiempos mayores a una hora sobre diferentes parámetros celulares utilizamos un equipo FACS Calibur BD. Los cambios en el pH intracelular, la producción de ROS y la muerte celular fueron analizados luego de incubar a las células T Jurkat durante 2, 17 y 48 horas en diferentes condiciones experimentales. Esta técnica nos permitió estudiar la respuesta de poblaciones celulares, obteniendo los valores individuales del parámetro analizado para cada una de las células que componen la muestra. Además esta metodología permite evaluar varios parámetros en simultáneo, por lo que resulta una técnica muy versátil y robusta. En la figura 3.4 esquematizamos la estructura del citómetro donde se puede observar que cada célula de la población es analizada en forma individual por los detectores de la señal.

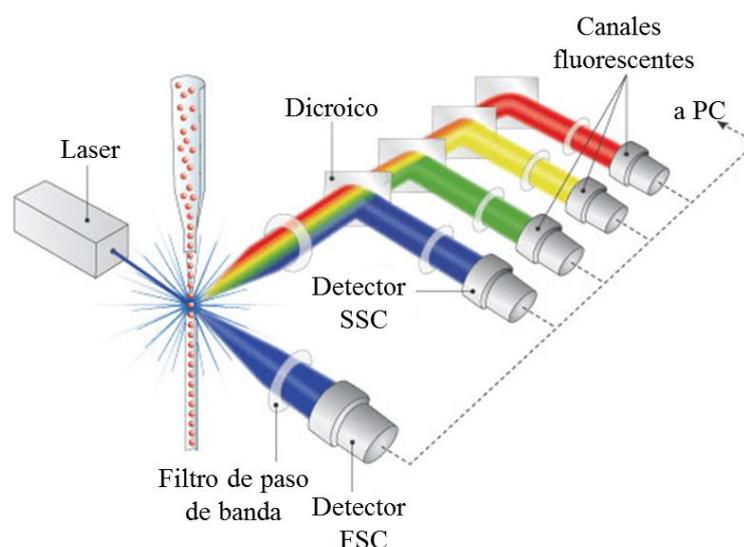


Figura 3.4 Esquema ilustrativo de los componentes básicos de excitación y detección de la señal en un citómetro de flujo.

A continuación detallamos los protocolos específicos para cada parámetro evaluado.

3.4.1 *pHi*

El procedimiento utilizado es una adaptación del protocolo presente en *Current Protocols in Cytometry (1997)*[284]. El mismo se basa también en el uso de la sonda sensible al pH, BCECF-AM. A diferencia de las mediciones dinámicas descritas en el punto 3.4, en este caso hicimos uso de la dependencia del espectro de emisión del BCECF con el pH (ver figura 3.4.1.1 A) de forma tal de excitar la sonda con el láser de argón (488 nm) y adquirir la fluorescencia emitida en los canales FL1 (530/30) y FL3 (670LP). Si bien el espectro de emisión no cuenta con un punto isoestérico con el cambio de pH como lo tiene el espectro de excitación, el cociente FL1/FL3 guarda una clara dependencia con el pH (figuras 3.4.1.1B y C). También en este caso utilizamos el Ratio que permite la normalización de factores dependientes de la sonda (ej. concentración de la sonda entre células).

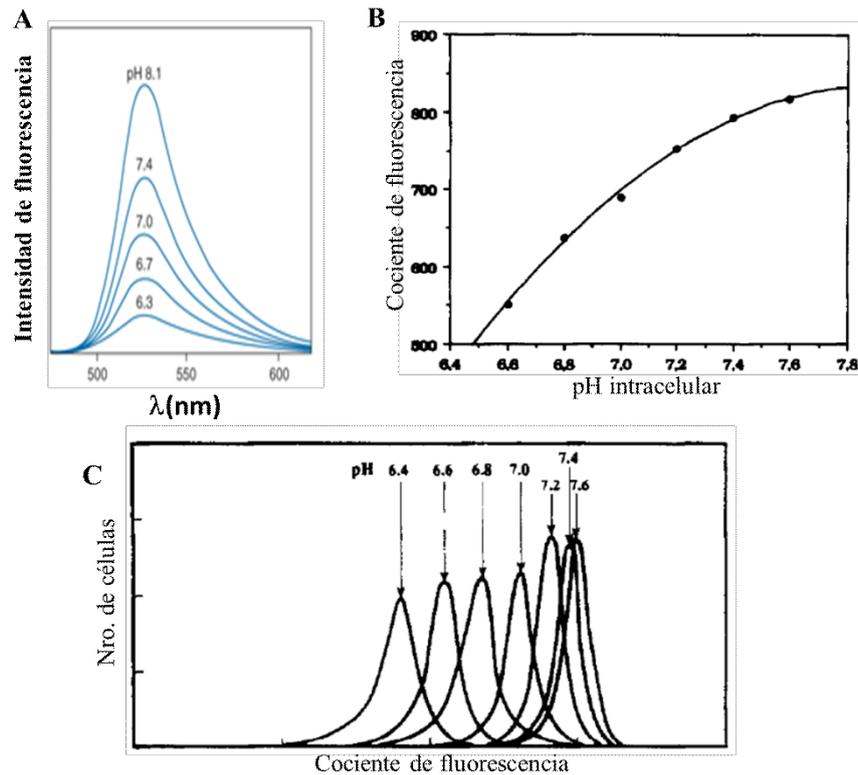


Figura 3.4.1.1 Propiedades ópticas de la sonda BCECF para su uso en citometría de flujo. **A**, Espectro de emisión a diferentes pH. Modificado de *Molecular Probes - Invitrogen* [285]. **B**, Relación entre el cociente (*Ratio*) de emisión de dos canales vs el pH_i. **C**, Histogramas representando la distribución de células a diferentes pH_i respecto del cociente antes mencionado (**B** y **C** obtenidos de Franck et al. [286]).

Las células provenientes del cultivo en placas de 96 pocillos fueron pasadas a tubos de citometría (un tubo por pocillo) los cuales fueron centrifugados (5 min a 112 g) y el sobrenadante descartado para remover el suero en el momento de la carga de la sonda. Las células fueron resuspendidas en su correspondiente solución de carga, la cual mantiene los estímulos de cada condición, para luego incubarlas durante 15-20 min en estufa a 37°C. Pasado este tiempo se centrifugaron nuevamente para eliminar el remanente de sonda y se resuspendieron en HDFBS (ver soluciones) complementado con el estímulo correspondiente en cada caso. Luego de 10 min de estabilización se procedió a la adquisición en el citómetro de flujo tomando al menos 20.000 eventos por muestra.

Con el objetivo de obtener valores absolutos de pH_i se realizó una curva de calibración con el método del punto pseudo nulo (en inglés *pseudo null point*) desarrollado por Eisner y col. [287], el cual se basa en la adición de ácidos y bases permeables de determinados pK_a en diferentes proporciones que fijan temporalmente el pH_i de las células (la tabla 3.4.1.1 detalla la composición de las soluciones utilizadas). Para ello en cada experimento se destinaron entre 10 y 12 pocillos de células sin tratamiento, que fueron cultivadas y cargadas en las mismas condiciones que las células estudiadas. Luego de la centrifugación final estas células fueron resuspendidas en 100 μl de solución HDFBS e inmediatamente antes de la adquisición se agregó en cada tubo 100 μl de las soluciones detalladas en el tabla 3.4.1.1, registrándose al menos dos tubos por cada pH .

Los archivos generados por el programa de adquisición fueron analizados con el programa de distribución gratuita *Flowing Software 2.5.1* desarrollado por la Universidad de Turku [288], utilizándose el programa *FlowJo V10* sólo para la producción de los gráficos. La curva de calibración se realizó excluyendo los detritos celulares y calculando la razón FL1/FL3 (Ratio) para cada muestra de pH s definidos. Se obtuvo un histograma con su correspondiente media geométrica y se realizó el ajuste de la misma vs su pH con una ecuación polinomial de orden dos (figura 3.4.1.2).

Una vez construida la curva de calibración en cada experimento se calculó el pH_i representativo de cada muestra problema utilizando la media geométrica del histograma FL1/FL3 y la ecuación de ajuste obtenida previamente. Para el cálculo del porcentaje de células por debajo de determinado pH_i umbral (7,0 y 6,8) se asignó el correspondiente Ratio umbral utilizando la misma curva, luego se calculó en cada muestra el porcentaje de células por debajo del mismo.

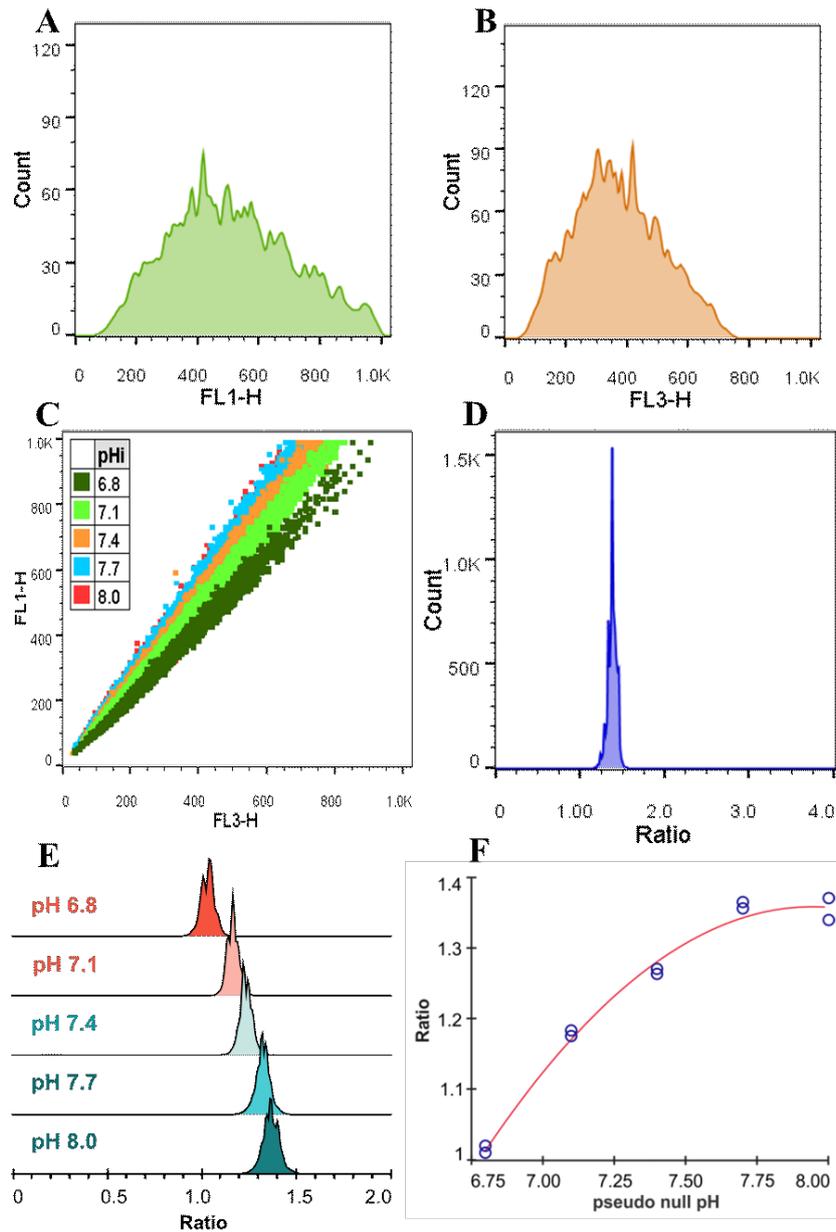


Figura 3.4.1.2. Construcción de la curva de calibración para la cuantificación del valor absoluto del pH_i . **A** y **B**, histogramas de la intensidad de fluorescencia de los canales FL1 y FL3. **C**, representación en diagrama de puntos (*dot-plot*) de la intensidad de ambos canales para cinco muestras a pH s con los que se construyó la curva de calibración (tratadas con las soluciones de la tabla 3.5.1.1). **D**, histograma de la razón FL1/FL3 construido con los datos de las figuras A y B. **E**, histogramas correspondientes a cada punto de la curva. **F**, curva de calibración representando la media geométrica de cada población representada en E por duplicado, la curva en rojo representa el ajuste realizado con una ecuación polinomial de segundo orden.

Soluciones:

- HEPES 10 mM (en mM): 10 HEPES; 133,5 NaCl; 4 KCl; 1,2 NaH₂PO₄·H₂O; 1,2 MgSO₄; 11 α-D-glucose; 2 CaCl₂·2H₂O y agua destilada. pH ajustado a 7,4 con NaOH.
- HDFBS: a la solución anterior HEPES 10 mM se la suplementó con 10% SFB.
- BCECF-AM: los viales conteniendo 50 µg fueron disueltos en 50 µl de DMSO para obtener una solución 1mg/ml, manteniéndose al abrigo de la luz a -20°C.
- Soluciones de carga: las células fueron cargadas en soluciones 2µg/ml BCECF-AM en HEPES 10 mM. A su vez se realizó el agregado de las drogas o solventes utilizados para cada condición de estímulo en igual concentración, de forma tal de evitar efectos compensatorios en el pH durante el proceso de carga.
- Ácido n-butírico 1M (BA): se agregaron 4,6ml de ácido n-butírico 10,9 M (pKa=4.82) a 40ml de agua destilada, luego se tituló con NaOH hasta pH=7.4 y enrasó a 50ml.
- Trimetilamina (TMA): se agregaron 12,3 ml de trimetilamina 4,06 M (pKa=9,8) a 40ml de agua destilada, luego se tituló con HCl hasta pH=7.4 y enrasó a 50ml.
- HEPES 10 mM (en mM): 10 HEPES; 133,5 NaCl; 4 KCl; 1,2 NaH₂PO₄·H₂O; 1,2 MgSO₄; 11 α-D-glucosa; 2 CaCl₂·2H₂O y agua destilada. pH ajustado a 7,4 con NaOH.
- HDFBS: a la solución anterior HEPES 10 mM se la suplementó con 10% SFB.

Solución	Relación BA ^a /TMA ^b (mM)	HDFBS ^{d,e} (ml)	BA ^{a,d} (µl)	TMA ^{b,d} (µl)	pH ^c pseudo nulo
1	1/16	8.98	60	960	8.0
2	1/4	9.7	60	240	7.7
3	1	9.88	60	60	7.4
4	4	9.7	240	60	7.1
5	16	8.98	960	60	6.8

Tabla 3.4.1.1 Composición de las soluciones utilizadas para la construcción de la curva de calibración. **a**, solución de ácido butírico 1 M. **b**, solución de trimetilamina 1 M. **c**, calculado según ecuación de Eisner [287]. **d**, volumen necesario para 10 ml de solución. **e**, HDFBS es la solución HEPES 10 mM suplementada con 10% SFB.

3.4.2 ROS

Para los ensayos de producción de ROS se trataron las células con las diferentes concentraciones de ZnCl₂, Cl-GBI y DMSO por dos horas en las mismas condiciones de cultivo que los ensayos donde se determinó el pH_i descritos en el párrafo anterior (3.4.1).

Una vez finalizado el tratamiento, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS. Posteriormente fueron incubadas con diacetato de diclorodihidrofluoresceína 5 µM (DCF-2DA disuelto en DMSO) durante 30 minutos a 37 °C. Luego de la carga con la sonda, las células se lavaron y se centrifugaron durante 10 minutos a 112 g, finalmente fueron resuspendidas en 1 ml de PBS. El contenido intracelular de ROS se evaluó mediante citometría de flujo, analizando como mínimo 20.000 eventos por condición. El contenido de ROS, surge de la media geométrica del histograma de intensidad de fluorescencia correspondiente a cada tratamiento. Los datos se analizaron usando el programa FlowJo V10.

Solución PBS: NaCl 8 g/l; KCl 0,2 g/l; Na₂HPO₄ 1,44 g/l; KH₂PO₄ 0,24 g/l; pH=7,4.

3.4.3 Apoptosis

Para la detección de células apoptóticas en las condiciones de cultivo antes mencionadas utilizamos el ensayo de doble marcación con anexina V (aV) conjugada al isotiocianato de fluoresceína (FITC) y yoduro de propidio (IP) (Kit). La anexina V es un péptido con gran afinidad por la fosfatidilserina la cual en condiciones fisiológicas se encuentra predominantemente en la parte intracelular de la bicapa fosfolipídica. En las primeras etapas del proceso apoptótico (sea por vía intrínseca o extrínseca) dicha asimetría es abolida por la acción de scramblasas generando una exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular [289]. De esta manera sirve como señal de reconocimiento y es detectada, en estos ensayos, por su unión a la aV unida al FITC cuya fluorescencia que es detectada por el citómetro. Por otro lado, el IP es un agente fluorescente intercalante del ADN, que por estar cargado positivamente no entra en las células viables y sí lo hace en aquellas que han perdido la integridad de la membrana plasmática, lo cual es propio de las fases finales del proceso apoptótico o de un proceso necrótico. Por lo tanto, la detección simultánea de ambos parámetros permite reconocer el estadio de muerte de las células analizadas.

Luego de la incubación de los cultivos celulares con los estímulos correspondientes, transferimos las células de cada pocillo a tubos de citometría, centrifugamos durante 5 min a 112 g y lavamos una vez con el Buffer de Binding 1X (BB, contenido en el kit). Luego resuspendimos las células en 100 μ l de BB conteniendo 1 μ l de la solución comercial aV-FITC. Posteriormente, se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y al abrigo de la luz, se centrifugaron durante 5 min a 112 g y resuspendieron en 200 μ l de BB conteniendo 2 μ l de la solución comercial de IP. En esas condiciones evaluamos el contenido de aV-FICT e IP por citometría de flujo.

En cada ensayo se registraron, como controles de la técnica, tubos conteniendo una mezcla de células control (viables) y células tratadas 17 hs con 1 μ M de staurosporina (inductor validado de apoptosis), estos tubos se dividieron entre sin marca, marcados sólo con aV-FITC, sólo con IP y con ambas marcas (los resultados se pueden ver en la figura 3.4.3). Estos fueron utilizados para la compensación de la intensidad de fluorescencia entre canales del citómetro, y para el posicionamiento de los cuadrantes (*gating*) correspondientes para delimitar valores de las células viables, apoptóticas y necróticas.

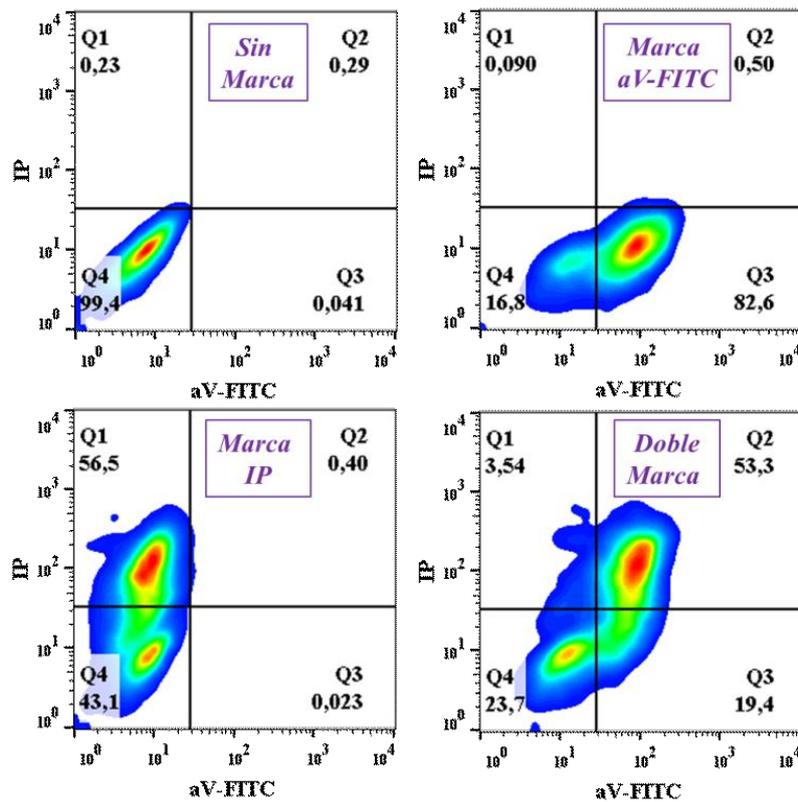


Figura 3.4.3 Mezcla de células viables más células tratadas con staurosporina ($1\mu\text{M}$ por 17h), utilizadas como control de la técnica para el posicionamiento de los cuadrantes que determinan el porcentaje de células apoptóticas. Los gráficos de densidad de eventos (variante del *dot plot*) representan con colores la frecuencia de eventos según su posicionamiento acorde a la intensidad de emisión en los dos canales. Se ilustra de menor a mayor densidad con los colores azul, verde, amarillo y rojo.

3.4.4 Ciclo Celular

Para los ensayos de evaluación de ciclo celular tratamos las células de igual manera que en los ensayos anteriores. Una vez transcurrida la incubación, trasferimos las células a tubos eppendorf y centrifugamos 5 minutos a 112 g. El sobrenadante fue descartado y el pellet de células remanentes resuspendidas en $100\mu\text{l}$ de PBS. Luego fijamos las células mediante el agregado de 1 ml de metanol frío gota a gota con agitación constante y las conservamos a -20°C por un período de al menos 12 hs. Posteriormente, las células fueron centrifugadas durante 5 minutos a 250 g e incubadas con ribonucleasa A ($0,2\text{ mg/ml}$ disuelta en PBS) por 30 minutos a 37°C . Finalmente,

agregamos yoduro de propidio (IP) 50 $\mu\text{g/ml}$ y determinamos la distribución del ciclo celular por citometría de flujo. Para el análisis contamos un mínimo de 10.000 eventos para cada condición.

Para el análisis de los datos usamos el programa FlowJo V10, excluyendo los dobletes mediante el correspondiente *gating* en los *dot-plot* del área vs el ancho de la señal del canal FL2 (IP). La cuantificación de los porcentajes de cada fase del ciclo celular la realizamos mediante el ajuste univariado utilizando una modificación del *Watson Pragmatic Algorithm* [290]. El porcentaje de células subdiploides (sub2N) se determinó estableciendo una región (*gating*) por debajo del pico 2N.

3.5 Determinaciones de Calcio citoplasmático

Los ensayos de determinación de la concentración de Ca^{2+} intracelular los realizamos en el laboratorio del Prof. Francesco Moccia, en el Departamento de Ciencias Fisiológicas y Farmacológicas de la Universidad de Pavia (Italia), con quien nuestro laboratorio tiene colaboración científica.

Para estimar el nivel de Ca^{2+} citoplasmático utilizamos una técnica fluorimétrica, cuyo fundamento se basa en el empleo de la sonda Fura, que posee propiedades fluorescente dependientes de la unión con el Ca^{2+} (figura 3.5.1). El Fura-2 fluoresce emitiendo luz a una longitud de onda de 510 nm, presentando máxima excitación a 363 nm para la forma libre y 335 nm para la forma unida al Ca^{2+} . A fines experimentales, se selecciona la longitud de onda de 380 nm para cuantificar la forma libre y 340 nm para la forma unida al Ca^{2+} .

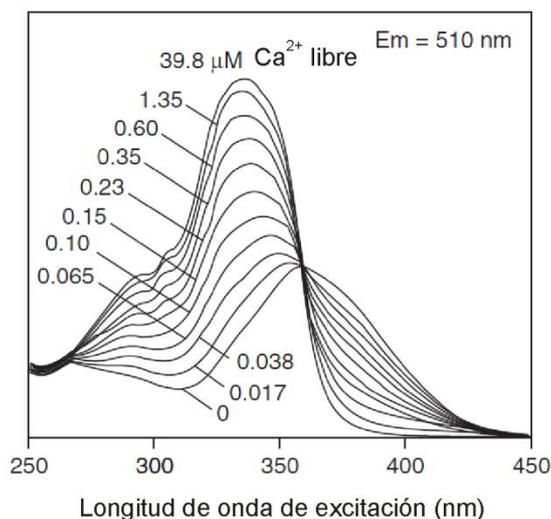


Figura 3.5.1. Espectro de absorción (o excitación) del Fura-2, medido a distintas concentraciones de Ca^{2+} libre. Se observa que existe un corrimiento de la longitud de onda de máxima absorción de fura-2, desplazándose desde los 363 nm, para la forma no unida al Ca^{2+} , hacia los 335 nm para la forma unida al Ca^{2+} . Modificado de *Molecular Probes - Invitrogen* [285].

En estos experimentos se trabajó con células T Jurkat y con linfocitos T CD3+ provenientes de voluntarios sanos provistos por la Dra. Daniela Montagna del Hospital San Mateo de Pavia, Italia. Estos últimos fueron purificados de sangre periférica y posteriormente criopreservados hasta el momento de uso.

Ambos tipos celulares fueron tratados de la misma manera. Previo a los registros, tomamos una alícuota de células en medio DMEM 10% SFB y agregamos Fura-2 en su forma de acetoximetil éster (Fura-2-AM) a una concentración de 1 μM . Incubamos las células durante 45 min. manteniéndolas al abrigo de la luz a 37°. Luego de este tiempo, colocamos alícuotas de 50 μl en placas de Petri tratadas previamente con fibronectina y las dejamos en reposo durante 15 min a fin de facilitar la adherencia de las células, posteriormente lavamos con la solución PSS para remover el exceso de Fura-2-AM. Esta sustancia, en forma análoga a lo descrito para la sonda de pH_i , permea la membrana celular y gracias a la actividad de esterasas intracelulares, se concentra en el citoplasma celular en su forma desesterificada (FURA-2). Cada placa de Petri fue luego montada en un microscopio de epifluorescencia (*Zeiss, Axiolab*)

equipado con una lámpara de mercurio de 100 W. El preparado se visualizó gracias a un objetivo de inmersión en agua (*Zeiss 63X Achromplan*) y excitamos las células con luz filtrada a través de un filtro infrarrojo, un filtro neutro y un filtro de longitud de onda de 340 o de 380 nm, (*Chroma Technology, Brattleboro*) los cuales se cambian en forma alternada cada 2 segundos con una rueda de filtros (*Lambda 10, Sutter Instrument*). La luz emitida fue filtrada para seleccionar la de 510 nm antes de ser colectada por una cámara de alta sensibilidad (*Extended-ISIS Camera, Photonic Science, Millham, Reino Unido*). En la figura 3.5.2 se esquematiza la disposición de los elementos del equipo.

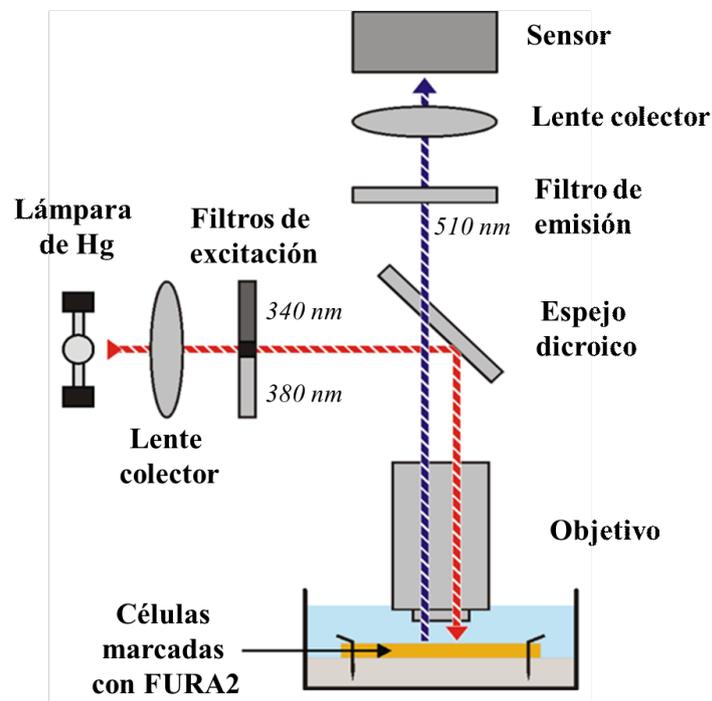


Figura 3.5.2. Esquema de la disposición de los elementos utilizados en el equipo de medición de Ca^{2+} intracelular por medidas fluorimétricas.

Con un programa desarrollado en el laboratorio controlamos la cámara, los filtros y el obturador y se midió en forma continua la fluorescencia emitida por un número discreto de regiones de interés (ROIs, del inglés *regions of interest*) las cuales corresponden a diferentes células (figura 3.5.3). Las soluciones se aplicaron con pipetas Pasteur volcándolas desde el objetivo del microscopio y se removieron gracias a una bomba de vacío conectada *ad hoc*. Las soluciones utilizadas con drogas e indicadores fueron preparadas en el día del experimento y descartadas al finalizar el mismo para

garantizar que no existiese degradación con el paso de los días. Los datos obtenidos del Ratio de fluorescencia en función del tiempo para cada ROI fueron procesados y analizados posteriormente con el programa GraphPad Prisma 5.

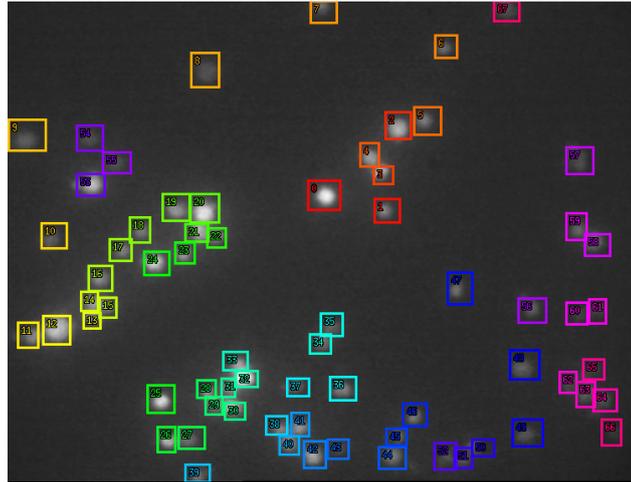


Figura 3.5.3. Captura de un experimento de medida de Ca^{2+} intracelular, donde se muestra las áreas de interés (ROIs) escogidas para cuantificar de ellas la relación de fluorescencia F340/F380.

3.6 Análisis estadístico de los datos

En todas las gráficas los resultados fueron expresados como la media \pm error standard de la misma. Se realizaron prueba t de Student para comparar entre 2 grupos, mientras que la comparación entre múltiples grupos se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA seguido de un test de Holm–Šidák para comparaciones respecto del control) siendo de una vía en los casos donde sólo se evaluó una variable (por ej. concentración) y de dos vías para dos variables (ej. concentración y tiempo). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas en los casos en que el valor de p fue menor a 0,05. Para el análisis de datos se utilizó el programa SigmaStat 3.5.

3.7 Reactivos

A continuación se detalla la procedencia de los reactivos utilizados.

- Molecular probes - Life technologies: BCEF-AM, Fura-2-AM y DCF-2DA.
- Anedra: NaCl, KCl, MgSO₄, MgCl₂, CaCl₂, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ y α -D-glucosa.
- Sigma-Aldrich: HEPES, EGTA, DMSO, yoduro de propidio (IP), ácido n-butírico, NMDG, fibronectina y staurosporina.
- eBiosciences-Invitrogen: anexina V (aV) conjugada al isotiocianato de fluoresceína (FITC) y yoduro de propidio (IP) (Kit comercial No. Cat. 88-8005).
- Riedel-de Haën: Metanol.
- Kodak chemicals: Trimetilamina.
- Internegocios: suero fetal bobino (SFB).
- Laboratorio MicroVet SRL: medio DMEM.
- GE Healthcare: Ficoll-Paque.

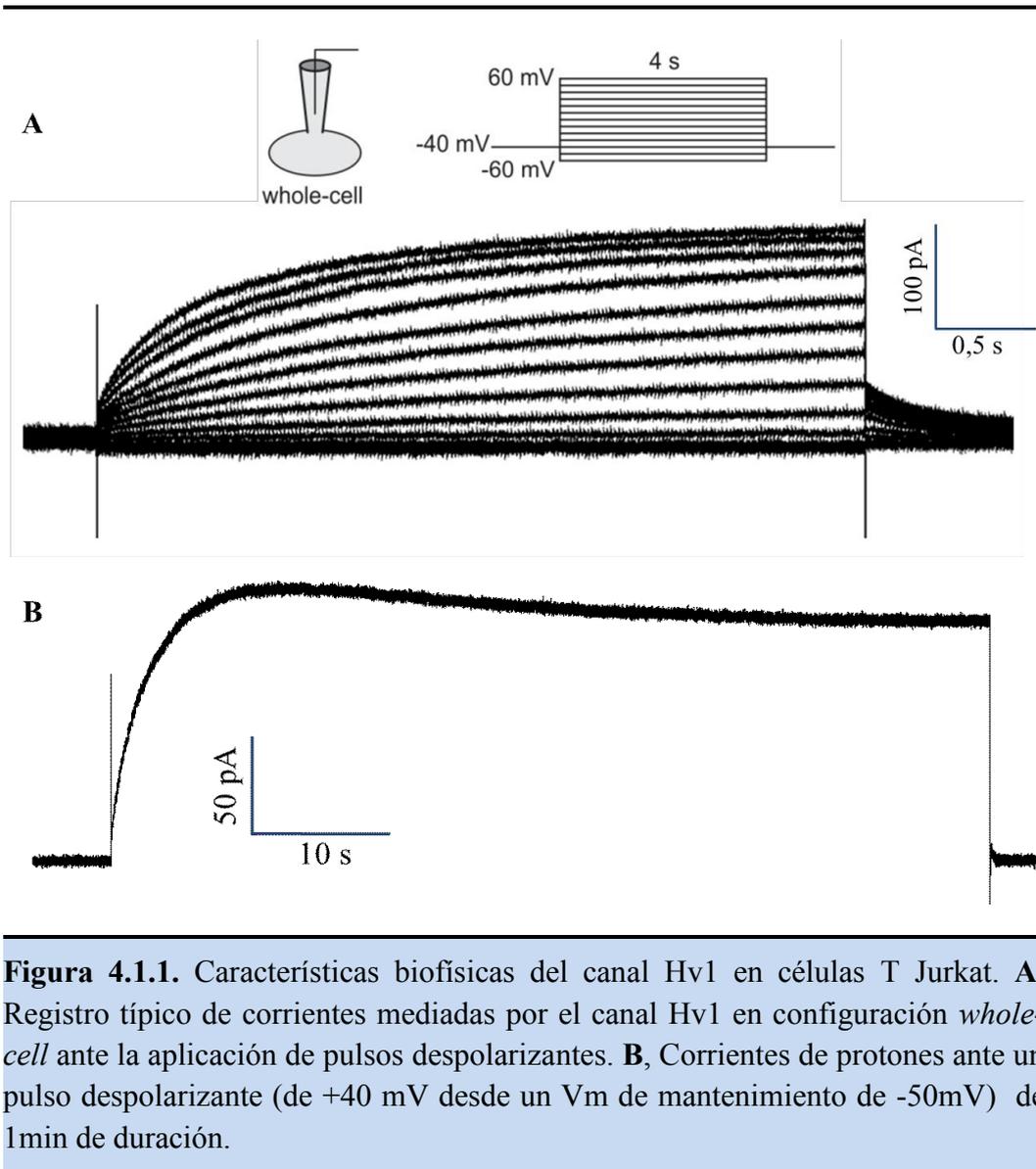
Sección 4

Resultados

4.1 Caracterización electrofisiológica de las corrientes de protones en células T Jurkat.

Como primer objetivo de este trabajo de tesis doctoral se planteó corroborar en las células T Jurkat que utilizaremos para este estudio, la actividad del canal de H⁺ sensible al voltaje y al pH (Hv1) mediante la técnica de *Patch Clamp*. Las propiedades electrofisiológicas de las corrientes registradas se compararon con los resultados reportados en el trabajo publicado por Schilling y col. que reporta la presencia de corrientes iónicas mediadas por este tipo de canal en linfocitos T normales y tumorales [43].

Para el registro de la corriente, se trabajó en condiciones de *whole-cell* y se realizaron estímulos de fijación de voltaje de una duración de 4 segundos desde un potencial de mantenimiento de -60 mV, en incrementos de a 10 mV para el rango de -60 a +60 mV. Se utilizaron soluciones extracelulares e intracelulares (ver sección 3.2 de materiales y métodos) con un Δ pH de 1,5, siendo el interior celular más ácido que el extracelular, ya que se conoce que en estas condiciones la magnitud de la corriente es mayor. En la figura 4.1.1A se muestran las corrientes salientes (positivas) típicas obtenidas. Una de las particularidades de las corrientes mediadas por el canal Hv1 es que presentan una cinética muy lenta de activación, lo cual justifica el uso de pulsos de voltaje prolongados en el tiempo, en este caso de 4 segundos. En la figura 4.1.1B se puede observar la corriente evocada mediante un pulso de voltaje desde -50 a +40 mV aplicado durante un minuto. La corriente alcanza el estado estacionario (constante) recién alrededor de los 17s, lo cual constituye una peculiaridad de este tipo de corrientes iónicas que inicialmente dio lugar a la controversia acerca de si se trataba de una canal iónico o de un intercambiador de protones.



Sensibilidad al voltaje

Por otro lado, a partir de la medición de la magnitud de las llamadas corrientes de cola (figura 4.1.2A), las cuales corresponden al período inmediato posterior a la repolarización de la membrana luego del pulso despolarizante, analizamos la dependencia del voltaje del canal en nuestras condiciones de registro. Debido a que el voltaje aplicado cambia mucho más rápido que la probabilidad de apertura de los canales, las corrientes de cola reflejan la probabilidad de apertura de los canales al final del pulso de cada potencial aplicado pero con la misma fuerza impulsora (correspondiente al V_m de mantenimiento). Mediante la normalización de cada corriente por la máxima obtenida, se obtuvo la conductancia (G/G_{\max}) para cada voltaje.

La figura 4.1.2B muestra la relación entre la conductancia macroscópica normalizada y el voltaje, donde se corrobora que el canal se activa con la despolarización de la membrana celular con un valor medio ($V_{1/2}$) de -15,1 mV muy similar al valor reportado en la literatura en iguales condiciones [43]. La evaluación de la conductancia nos permite ver la dependencia de la actividad del canal con el voltaje sin influencia de la fuerza impulsora, siendo el $V_{1/2}$ (voltaje en el cual se alcanza la mitad de la conductancia máxima) un valor característico de cada canal en condiciones determinadas.

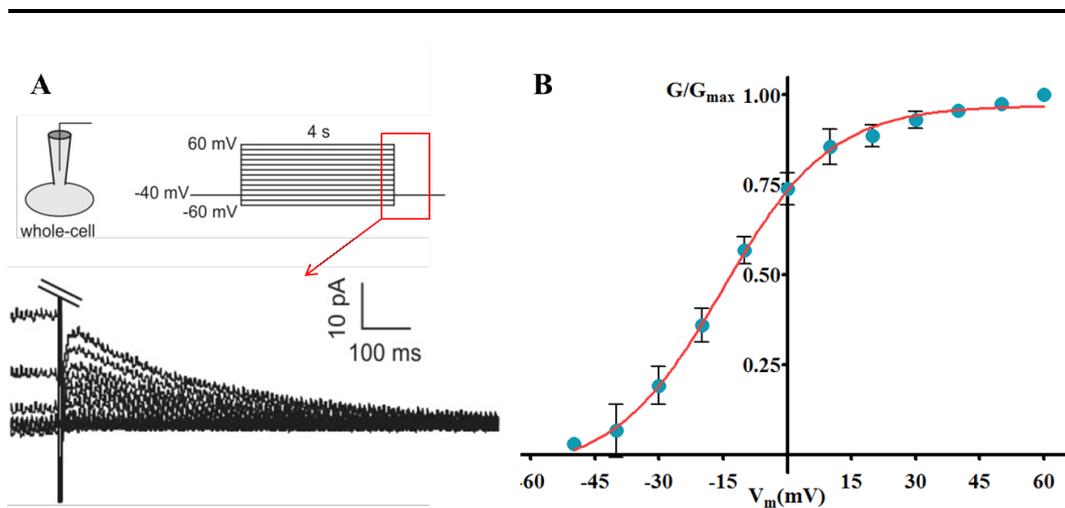


Figura 4.1.2. Dependencia de la conductancia macroscópica del canal Hv1 con el voltaje en células T Jurkat. **A**, corrientes de cola utilizadas para construir la curva G/G_{max} vs V_m midiendo la magnitud del pico en cada pulso y normalizando por la corriente de mayor magnitud. **B**, relación de la conductancia macroscópica y el voltaje construida a partir de los trazos expuestos en A.

Mediante el ajuste monoexponencial del período de inicio de la corriente evocada por cada pulso de voltaje aplicado (Figura 4.1.3A), se obtuvo el parámetro τ de activación (τ_{act}). El valor de τ es igual al tiempo necesario para alcanzar el 63% de la corriente máxima correspondiente a cada potencial. Este valor permite estimar cuantitativamente la cinética de cambio en la probabilidad de apertura del canal en respuesta al voltaje. Como se puede observar en la figura 4.1.3 B, la τ_{act} cambia con el voltaje, tal como se espera de un canal sensible al voltaje como el Hv1.

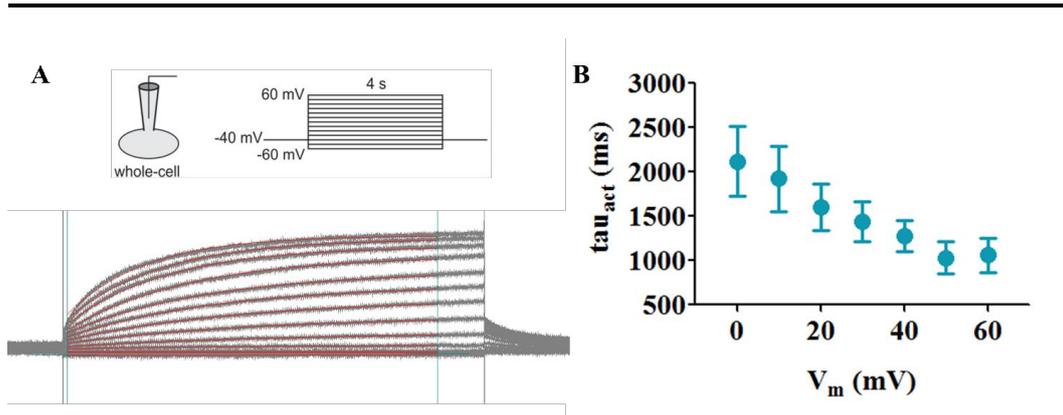


Figura 4.1.3. A, Ajuste monoexponencial de la cinética de activación de corrientes equivalentes a la de la figura 4.1.1 A. B, Valores del parámetro τ_{act} de activación para cada uno de los voltajes en los que las corrientes se diferencian de cero, $n=12$.

En la tabla 4.1.1 se muestran los valores de τ_{act} para la activación obtenidos en nuestras condiciones experimentales y los descriptos por Schilling y col. [43] para registros con igual gradiente de pH entre el intra y extracelular (ΔpH de 1,5). Como se puede observar, el intervalo de valores obtenidos abarca los valores previamente reportados para este tipo celular.

$V_m(mV)$	Valores obtenidos (ms)	Schilling y col. (ms)
0	2121 ± 396	2374
20	1603 ± 259	1521
40	1276 ± 176	1151
60	1059 ± 195	1068

Tabla 4.1.1. Cuadro comparativo de los valores de τ_{act} obtenidos de los ajustes ilustrados en la figura 4.4.3 con aquellos de bibliografía [43].

Sensibilidad al pH

La sensibilidad al pH es una propiedad del canal Hv1 caracterizada por una marcada dependencia de la magnitud de la corriente con el gradiente de pH de transmembrana. Se evaluó en condiciones de *whole-cell* mediante el mismo protocolo de fijación de voltaje descrito anteriormente. Se registró la corriente con una solución intracelular de pH fijo (6,3) y una solución extracelular (SE) de pH 7,8 que luego, sobre la misma célula, se reemplazó por una SE de pH igual al intracelular, anulando de esta manera el gradiente de concentración de H^+ a los lados de la membrana. En estas condiciones, la fuerza impulsora de la corriente es sólo el V_m aplicado. La relación corriente-voltaje (I-V) obtenida (Figura 4.1.4) se corre drásticamente hacia la derecha, mucho más de lo esperado debido a la disminución de la fuerza impulsora. Este resultado está de acuerdo con las propiedades típicas del canal, que contribuyen a corroborar la identidad de estas corrientes como mediadas por canales de tipo Hv1.

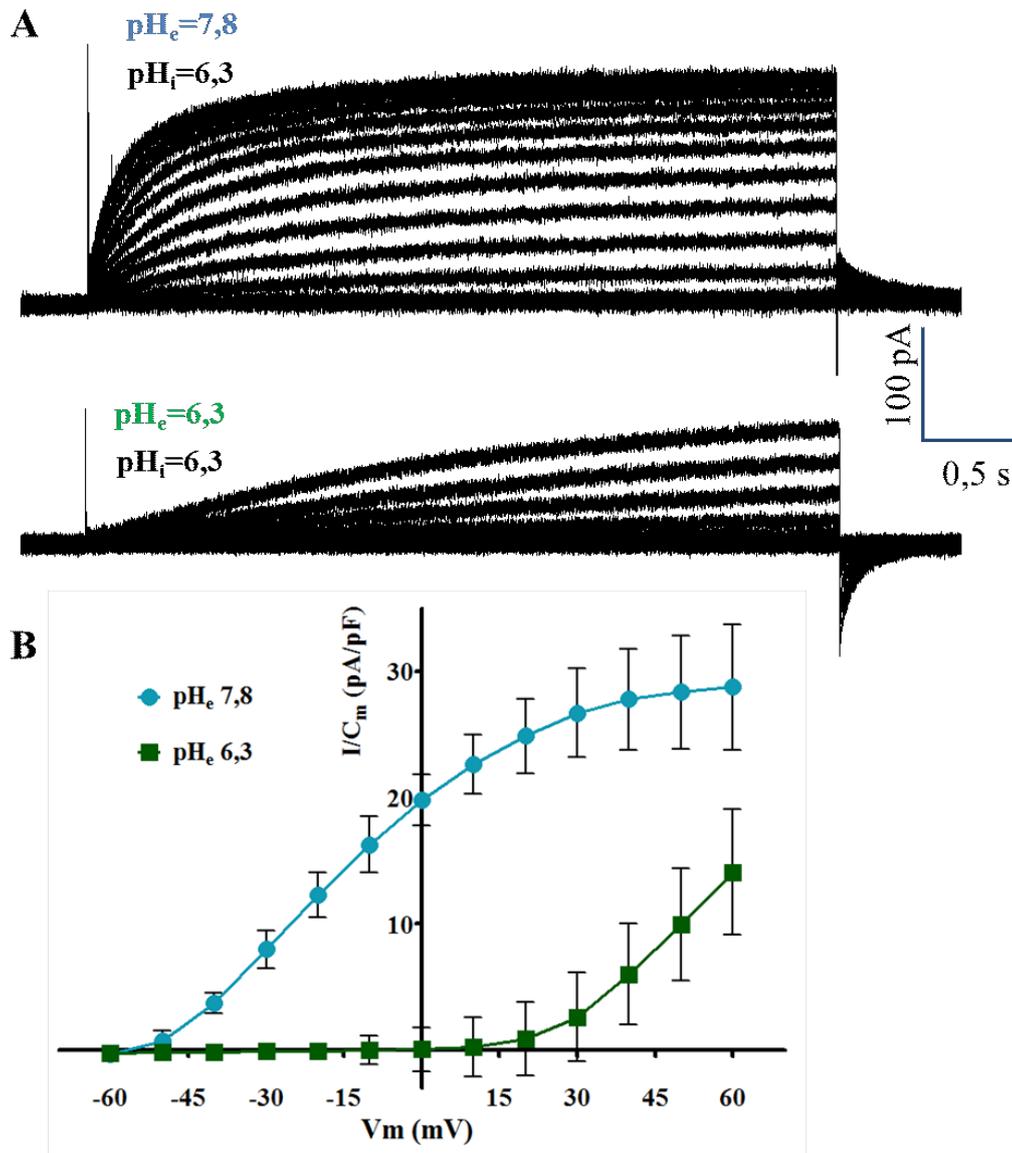


Figura 4.1.4 Dependencia de las corrientes Hv1 con el pH_e . Ambos registros fueron realizados con un $\text{pH}_i=6,3$ variando entre ellos el pH extracelular. La figura inferior representa la relación corriente normalizada $I(\text{pA}/C_m(\text{pF}))$ versus voltaje V_m (mV). Diferencias estadísticamente significativas para V_m mayores a -40 mV ($p<0.05$). $n = 3$.

Sensibilidad a inhibidores del canal Hv1

En esta serie experimental, se evaluó la sensibilidad de las corrientes de H^+ a una serie de inhibidores conocidos del canal Hv1, como forma de confirmar la relación de las mismas con el canal en cuestión y la actividad de los inhibidores en las células T Jurkat para el uso de las mismas drogas en experimentos posteriores.

Los cationes divalentes han sido los primeros inhibidores del canal utilizados. Se ha reportado que los mismos tienen el siguiente orden de potencia para inhibir al canal Hv1: $Zn^{2+} \cong Cu^{2+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+} > Ba^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+} \cong 0$. Al ser el Zn^{2+} más potente y relativamente menos tóxico que el Cu^{2+} ha sido el inhibidor más utilizado en electrofisiología para corroborar la presencia del canal considerándolo como el “*gold-standard*” de los inhibidores. En nuestro estudio se utilizaron concentraciones nominales de 3 mM de $ZnCl_2$ dado que el uso de EGTA en las soluciones genera una reducción en la concentración efectiva, por lo que dicha concentración nominal equivale a 250 μM de Zn^{2+} libre. Esta concentración, produce la abolición de las corrientes como se puede observar en la figura 4.1.5.

En cuanto al mecanismo de acción, se propone que el Zn^{2+} actúa desde el lado extracelular, coordinando con grupos histidina e interfiriendo con la estabilización del sensor de voltaje en el estado abierto del canal (ver sección 1.1.3).

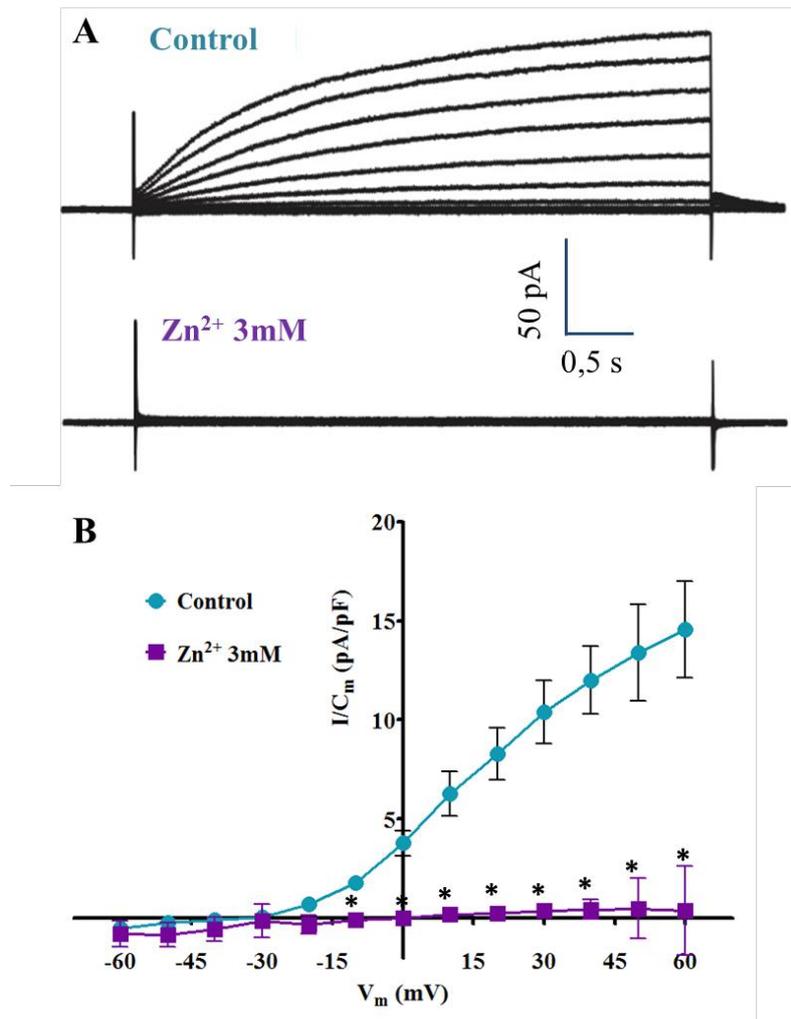


Figura 4.1.5 Bloqueo de las corrientes mediadas por Hv1 con Zn²⁺. **A**, Registros típicos mostrando el bloqueo por 3 mM Zn²⁺ nominal (equivalente a 250 μM de Zn²⁺ libre). **B**, Curvas de densidad de corriente versus voltaje en condiciones control y con Zn²⁺. Diferencia estadísticamente significativas por test t de Student para V_m mayores a -10mV (p<0.05). n = 8-10.

El grupo de Francesco Tombola ha desarrollado una familia de inhibidores específicos del canal derivados del 2-guanidinobenzimidazol (2GBI) los cuales han demostrado tener diferentes potencias actuando todos por unión al dominio sensor de voltaje (VSD) en el lado intracelular del canal [113]. Del grupo de moléculas que presentaron mayor potencia, se seleccionó para su uso en este trabajo al derivado clorado 5-chloro-2-guanidinobenzimidazol (Cl-GBI), ya que tiene una mayor permeabilidad que su predecesor 2GBI lo cual lo hace más apropiado para los ensayos en células en cultivo. La actividad del Cl-GBI había sido reportada en sistemas de

expresión heteróloga en oocitos de *Xenopus laevis*, así como en líneas celulares que expresan el canal Hv1 (BV1, RAW264.7 y THP1). Sin embargo, no se había ensayado su efectividad en células T Jurkat. Por lo tanto, aquí ensayamos este compuesto en diferentes concentraciones demostrando que el mismo inhibe las corrientes de H^+ en células T Jurkat de manera parcialmente reversible. En la figura 4.1.6 se muestran los resultados globales de esta serie experimental.

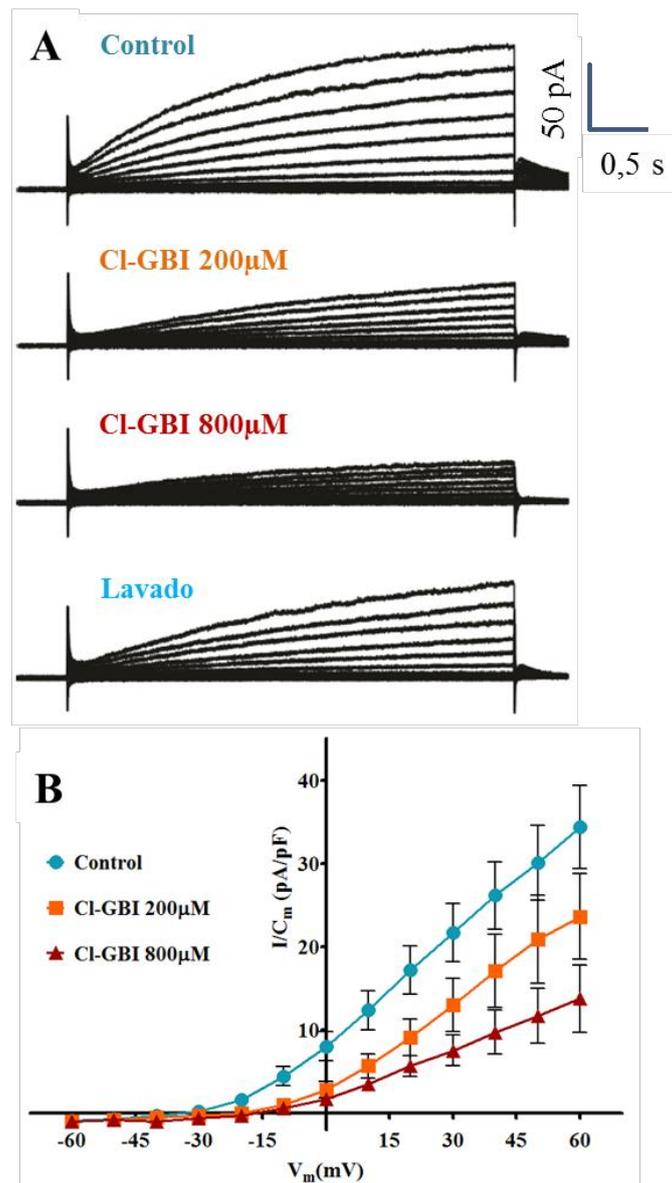


Figura 4.1.6 Bloqueo de las corrientes mediadas por Hv1 con Cl-GBI. **A**, Registros típicos mostrando el bloqueo con 200 y 800 μ M de Cl-GBI, y un lavado posterior. **B**, Curvas de densidad de corriente media versus voltaje. Ambas concentraciones mostraron diferencias estadísticamente significativas a partir de -10 mV respecto al control ($p < 0,05$). $n = 4-8$.

Recientemente, Jiwon Kim y Jin-Ho Song describieron que las corrientes mediadas por Hv1 en células BV2 de microglia de ratón eran inhibidas por los antihistamínicos de primera generación difenhidramina y clorfeniramina [110]. El efecto reportado es relativamente inmediato (máximo a los 5 min.) y revierte con el lavado de la droga, pero no existe a la fecha bibliografía que describa el mecanismo de acción de estas drogas sobre el canal. Por lo tanto, y considerando que estas drogas pueden tener un efecto indirecto mediado por los receptores histamínicos H1 [291], evaluamos en las células T Jurkat el efecto de histamina, difenhidramina y difenhidramina más histamina, directamente sobre las corrientes evocadas por voltaje mediadas por los canales Hv1. En la figura 4.1.7 se puede observar que la difenhidramina tiene un efecto inhibitorio de la corriente Hv1 en las células T Jurkat que no se modifica por el agregado de histamina. Tampoco hemos observado que la histamina por sí sola afecte las corrientes. Por lo tanto, coherente con lo reportado por Kim y col. este resultado valida para las células T Jurkat el uso de difenhidramina como inhibidor del canal, probablemente mediante un efecto independiente de su acción antagonista de los receptores histamínicos.

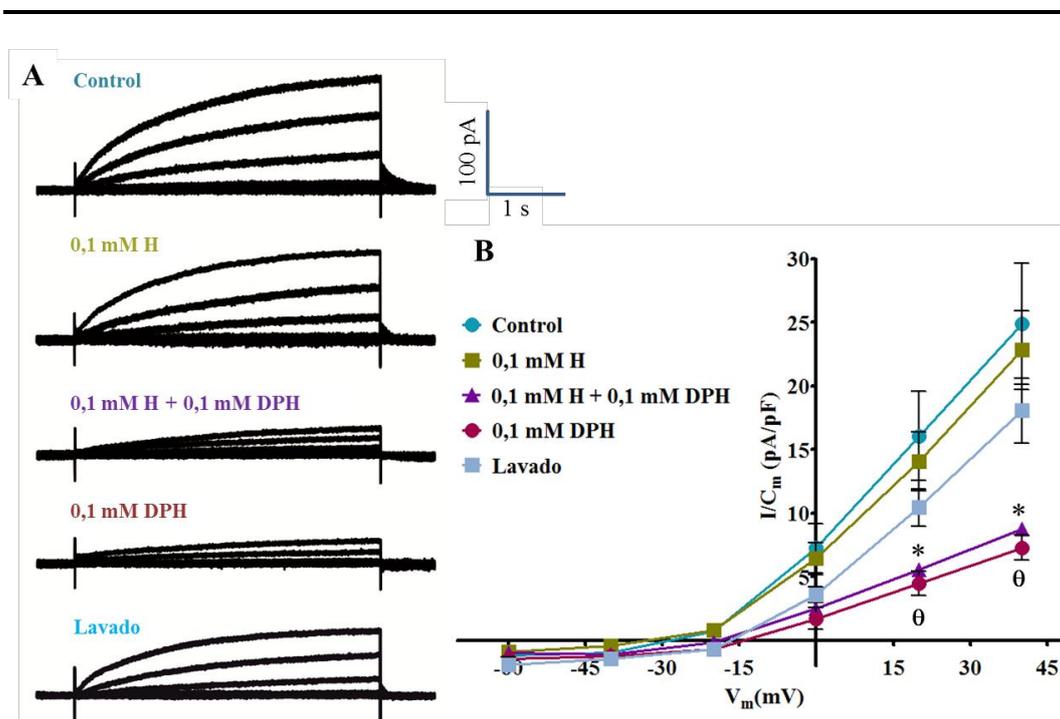


Figura 4.1.7 Bloqueo de las corrientes mediadas por Hv1 con difenhidramina (DPH) en presencia o ausencia de histamina (H). A, Registros típicos mostrando los efectos de 0,1 mM de H; 0,1 mM DPH; la

combinación de ambas, y un lavado posterior. **B**, Curvas de densidad de corriente versus voltaje para las condiciones en A. * y θ indican diferencias estadísticamente significativas respecto del control ($p < 0.05$). $n = 4-8$.

4.2 Modulación del pH intracelular de células T Jurkat por inhibición del canal Hv1 a tiempos cortos.

Luego de haber corroborado en las células T Jurkat la actividad del canal Hv1 y confirmado el efecto de sus inhibidores, se buscó conocer si el canal Hv1 es responsable de la regulación del pH intracelular (pH_i) en condiciones basales. En base a la hipótesis de trabajo planteada, la elevada producción de especies ácidas propia de una célula tumoral podría ser compensada por la actividad del canal Hv1 mediante la extrusión pasiva de H^+ . A pesar que la actividad del canal Hv1 ya había sido reportada en las células T Jurkat [43], su rol en la regulación del pH_i no ha sido estudiado hasta el momento. En este trabajo, mediante el uso de la técnica de fluorimetría en cubeta (ver detalle en materiales y métodos, sección 3.3) se realizó la medición continua del pH_i en función del tiempo con el objetivo de poner en evidencia el impacto de la actividad del canal en condiciones basales y en la recuperación luego de una carga ácida. Para esto se evaluó el efecto de los compuestos Cl-GBI y Zn^{2+} sobre la línea de base del registro, así como sobre la velocidad inicial de recuperación posterior a una carga intracelular ácida (inducida por el agregado al medio de un ácido permeable como lo es el ácido propiónico, en soluciones ajustadas a pH 7,4). Esta maniobra experimental se realizó en ausencia y presencia de ambos bloqueantes.

Teniendo en cuenta que existen otros mecanismos de extrusión de H^+ a nivel celular, como el NHE y el NBC, inicialmente este experimento se llevó a cabo utilizando soluciones extracelulares carentes del ión Na^+ (reemplazado en forma isotónica con cloruro de colina) para evitar que el efecto de la inhibición del canal quede eventualmente compensado por la actividad de los transportadores asociados a dicho ión. Los resultados presentados en la figura 4.2.1 muestran que, inmediatamente luego del agregado de cada uno de los inhibidores, se produce un descenso en el valor del pH_i basal que resulta estadísticamente significativo luego de los 15 min; a su vez las células reducen aproximadamente cinco veces su capacidad de recuperar el pH_i basal luego del pulso con ácido propiónico.

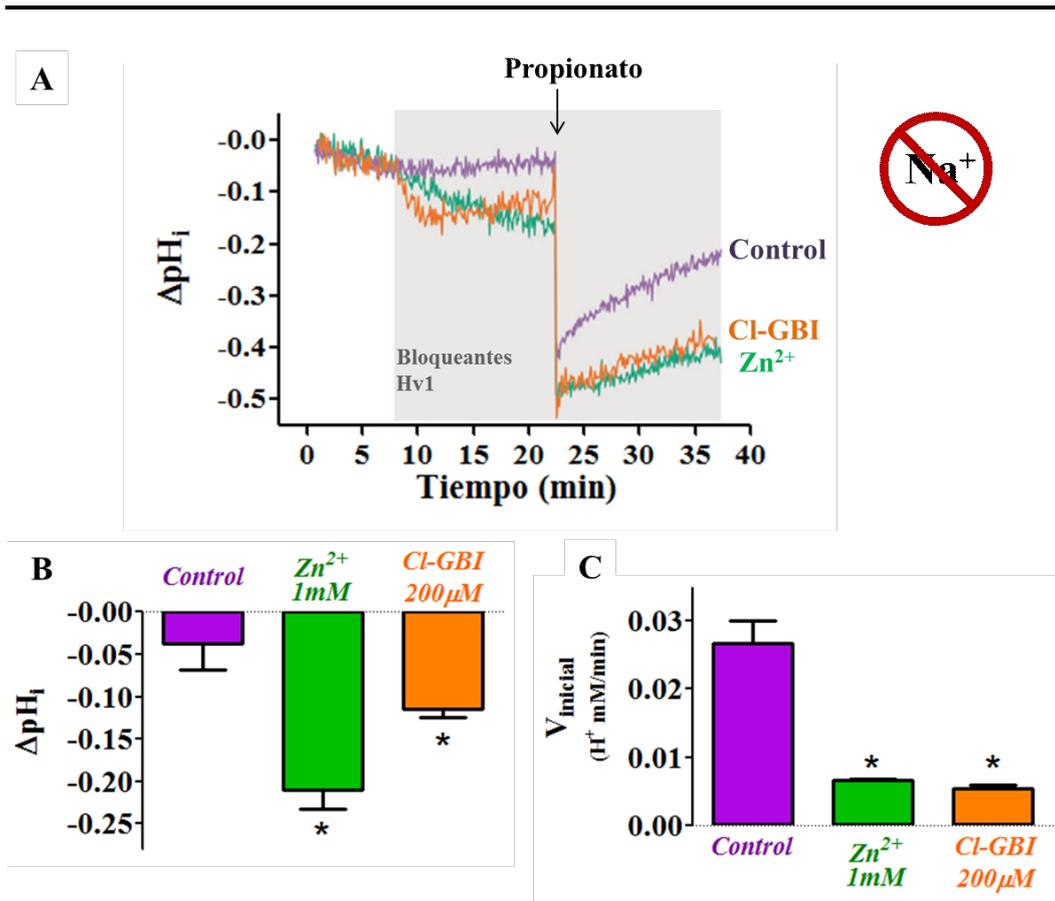


Figura 4.2.1 Efectos agudos del bloqueo del canal Hv1 sobre el pH_i en ausencia de sodio extracelular. **A**, experimentos representativos del registro continuo mediante fluorimetría en cubeta, la zona sombreada indica la presencia de los bloqueantes en cada caso. **B**, valores medios del cambio de pH_i basal (medido como la diferencia entre el instante previo al agregado de cada bloqueante y el instante previo al agregado de propionato). **C**, valores medios de la recuperación del pH_i luego de la carga ácida para cada condición (medido como la pendiente del minuto posterior al agregado del propionato). $n=6$ en todos los casos. * indica diferencia estadísticamente significativa respecto del control, $p<0,05$.

Este resultado muestra que la inhibición del canal, participa en la regulación del pH_i basal en las células T Jurkat y contribuye a la recuperación del pH_i luego de una carga ácida.

Posteriormente, se buscó reproducir los mismos resultados en soluciones extracelulares con concentración fisiológica de sodio (140 mM), de forma de saber si el canal Hv1 contribuye a la regulación del pH_i incluso cuando otros transportadores vinculados a la regulación del mismo se encuentran funcionales. Para esto, de la misma

manera que en la serie anterior, se evaluó el cambio generado por los compuestos Cl-GBI y Zn^{2+} sobre la línea de base del registro, así como sobre la velocidad inicial de recuperación de la carga ácida. En la figura 4.2.2 se observan los resultados obtenidos utilizando Zn^{2+} y Cl-GBI. Como se puede ver, en ambos casos el pH_i basal disminuye indicando que la inhibición de los canales Hv1 tiene un rol funcional en la regulación del pH_i basal aún en condiciones donde otros transportadores de H^+ podrían estar ejerciendo este rol. La velocidad de recuperación del pH_i ante la carga ácida, en esta condición también se enlentece en presencia de Cl-GBI. Comparando estos resultados con los de la figura 4.2.1 (sin Na^+) vemos que la velocidad de recuperación en la condición control (trazos violetas) es cuatro veces mayor, lo cual indicaría que los transportadores reguladores del pH_i vinculados con el sodio se encuentran funcionales. Sin embargo estos transportadores de H^+ no logran compensar la inhibición de los canales Hv1 derivando en una caída en el pH_i , sugiriendo que estos tienen un impacto relevante en la regulación del pH_i que se suma a la función de los transportadores de H^+ clásicos como el NHE. En el caso del Zn^{2+} no se pudo determinar la recuperación de la carga ácida, ya que utilizando las soluciones con Na^+ se encontró la dificultad de que el agregado de $ZnCl_2$ produjo luego de unos minutos la formación de precipitados. Esto se evidenció como la aparición de ruido en los registros, incluso bajando la concentración a 0,25 mM de Zn^{2+} , probablemente debido a un cambio en la fuerza iónica de la solución. Por lo que en este caso para la condición de Zn^{2+} sólo fue posible medir la caída inmediata del pH_i basal.

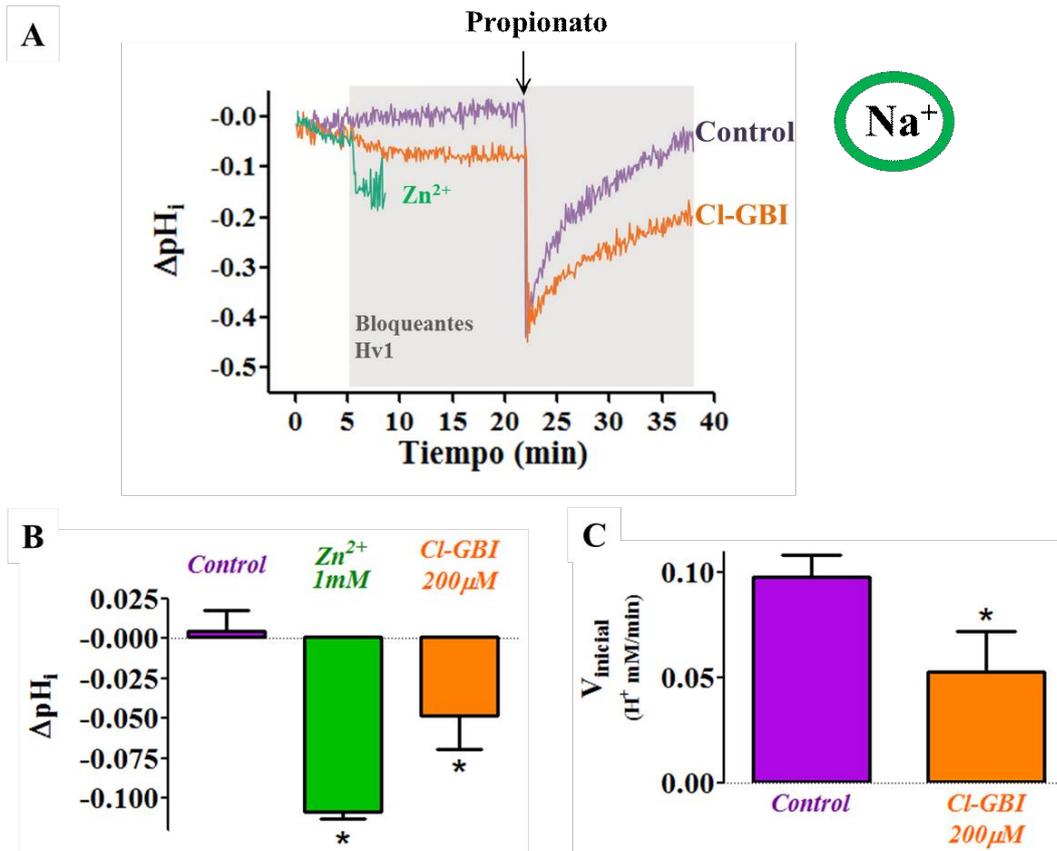


Figura 4.2.2 Efectos agudos del bloqueo del canal Hv1 sobre el pHi **en presencia de sodio extracelular**. **A**, experimentos representativos del registro continuo mediante fluorimetría en cubeta, la zona sombreada indica la presencia de los bloqueantes en cada caso. **B**, valores medios del cambio de pHi basal (medido como la diferencia entre el instante previo al agregado del bloqueante y el instante previo al agregado de propionato). **C**, valores medios de la recuperación del pHi luego de la carga ácida para los registros control y con 200 μM Cl-GBI (medido como la pendiente del minuto posterior al agregado del propionato). n=6 en todos los casos.* implica diferencia estadísticamente significativa respecto del control, p<0,05.

4.3 Modulación del pH intracelular de células T Jurkat por inhibición del canal Hv1 a tiempos largos en condiciones de cultivo.

Partiendo de la base de los resultados anteriores que indican que la inhibición del canal Hv1 tiene implicancias directas en la regulación del pH_i a tiempos cortos, y que la actividad de otros transportadores no logra compensar completamente el efecto que genera la disminución de la actividad del canal, se buscó evaluar si la acidificación intracelular se mantiene, se intensifica o se compensa a tiempos más largos. Mediante esta serie experimental se evaluó la posibilidad de que a tiempos más largos haya respuestas compensatorias que no se evidencian a tiempos cortos, y a su vez se evaluaron también los efectos de los inhibidores del canal Hv1 en condiciones de cultivo celular donde el sistema buffer del medio extracelular es $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ (ver sección 3.4.1 de materiales y métodos). En estas condiciones las estructuras celulares reguladoras del pH_i asociadas al bicarbonato (como la anhidrasa carbónica y el NBC) podrían ser funcionales. Para ello se trataron las células T Jurkat con distintas concentraciones de Zn^{2+} , Cl-GBI y se incluyó también en este ensayo a la difenhidramina. Se incubaron las células durante 2, 17 y 48 horas y se determinó el pH_i por citometría de flujo (ver detalles en materiales y métodos). En la figura 4.3.1A se pueden observar histogramas representativos del efecto de la incubación por 2 horas con 200 y 800 μM de Cl-GBI comparados con la población de células tratadas durante el mismo tiempo con 0,8 % de DMSO (solvente del Cl-GBI). Para cada población el gráfico muestra la cantidad de células en función del cociente (Ratio) de las intensidades de emisión fluorescente de la sonda BCECF. Este cociente decrece cuando el pH_i disminuye. Los valores medios de pH_i de la población celular, se obtuvieron a partir de la curva de calibración realizada en cada experimento y se muestran en la figura 4.3.1B.

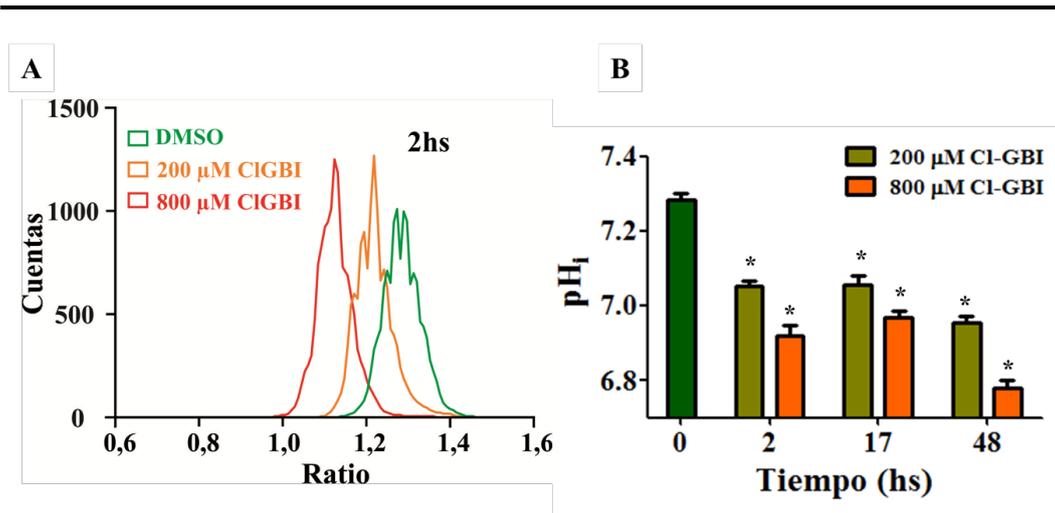


Figura 4.3.1 A, Histogramas representativos que ilustran el cambio de pH_i (Ratio) a las dos horas de inhibición del canal Hv1 en células T Jurkat con Cl-GBI (200 y 800 μM comparado con el control (DMSO). B, Evolución temporal de la acidificación inducida por bloqueo con el compuesto Cl-GBI a dos concentraciones: valores medios del pH_i ± SEM para cada población (n=8, 4 experimentos independientes). El valor ilustrado a t=0 corresponde al de la población tratada solo con DMSO durante 48 hs (control de solvente). * indica diferencia estadísticamente significativa respecto del control (p<0,05).

Estos resultados muestran que la acidificación que se produce a tiempos cortos con 200 μM de Cl-GBI (ver sección 4.2), aumenta alcanzando un valor entorno a 7 a las 2 hs de incubación, que se mantiene a las 17 hs y baja a un valor de aproximadamente 6,8 luego de 48 hs. Observamos también que un aumento en la concentración de Cl-GBI a 800 μM incrementa el efecto acidificante observado.

Si se analizan los valores de pH_i de cada célula tomando 2 valores de pH_i umbral (7,0 y 6,8) surge que el tratamiento con 800 μM de Cl-GBI produce ya desde las 2 hs un porcentaje importante de células que poseen valores por debajo de 6,8 que aumenta en el tiempo. El mismo efecto se observa para la concentración de 200 μM pero con el umbral de pH más alto (7,0). Estos datos se ilustran en la figura 4.3.2.

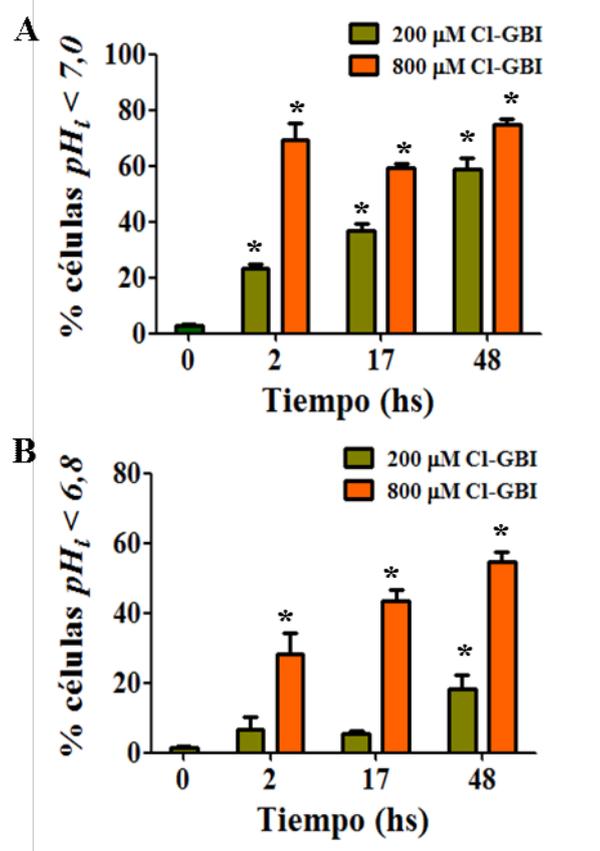


Figura 4.3.2. Representación del porcentaje de células por debajo de valores umbrales de $pH_i = 7,0$ (A) y $pH_i = 6,8$ (B), datos provenientes de los mismos experimentos cuya media se ilustra en la Figura 4.3.1B. * indica diferencia estadísticamente significativa respecto del control ($p < 0,05$).

La figura 4.3.3 muestra los resultados del tratamiento en cultivo con tres concentraciones de $ZnCl_2$ durante los mismos tiempos en los que se evaluó el efecto del CI-GBI. Las concentraciones de Zn^{2+} son nominales dado que es difícil calcular la concentración de Zn^{2+} libre en el medio de cultivo, ya que este ión se une a las proteínas del suero y a otros eventuales quelantes presentes en el medio de cultivo [292]. La condición control resulta de la sola adición de medio al cultivo, dado que las soluciones stocks de $ZnCl_2$ se realizaron en medio DMEM. La figura 4.3.3A muestra histogramas representativos de poblaciones de células tratadas en cultivo con tres concentraciones de $ZnCl_2$ durante 2 hs. Se puede ver que 0,1 mM produce un sutil corrimiento del Ratio hacia la izquierda, que se hace más notable con 0,5 y 1 mM. En el panel 4.3.3B se ilustran los valores medios para cada condición a diferentes tiempos, estos muestran que

hay diferencias significativas entre la acidificación inducida por concentraciones nominales 0,5-1 mM de Zn^{2+} con respecto al control, no habiendo diferencias significativas entre las dos a ninguno de los tiempos ensayados.

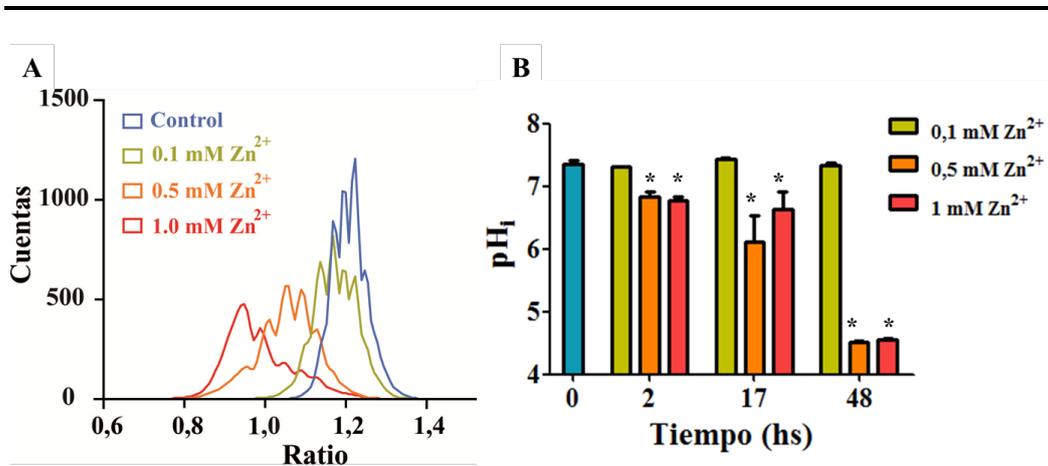


Figura 4.3.3 A, Histogramas representativos que ilustran el cambio de pH_i (Ratio) a las dos horas de bloqueo del canal Hv1 en células T Jurkat con Zn²⁺ (0,1; 0,5 y 1 mM) comparado con la condición control. B, Evolución temporal de la acidificación inducida por la inhibición del canal Hv1: valores medios del pH_i de cada población ± SEM (n=2-10 correspondientes a 2-4 experimentos independientes según tiempos y concentraciones). Los valores ilustrados a t=0 corresponden a las poblaciones tratadas solo con agregado de medio de cultivo a 48 hs. * indica diferencia estadísticamente significativa respecto del control (p<0,05).

En este caso, cuando se analizan los valores de pH_i de cada célula tomando los 2 valores de pH_i umbral (7 y 6,8; figuras 4.3.4 A y B respectivamente), surge que a las dos concentraciones de Zn²⁺ que mostraron efecto ya desde las 2 hs hay un porcentaje similar de células acidificadas por debajo de ambos umbrales el cual crece en función del tiempo, alcanzando el 100% a las 48 hs para ambas concentraciones. En concordancia con lo observado en los valores medios de pH_i, para las células tratadas con 0,1 mM de Zn²⁺ el porcentaje de células acidificadas a todos los tiempos no difiere del control. Por otro lado observamos que para el tiempo de 17 hs el efecto acidificante de 0,5 mM tiene una tendencia a ser mayor que el que produce 1 mM, este aparente efecto paradójico puede deberse a efectos inespecíficos del Zn²⁺ que presenten otra cinética temporal.

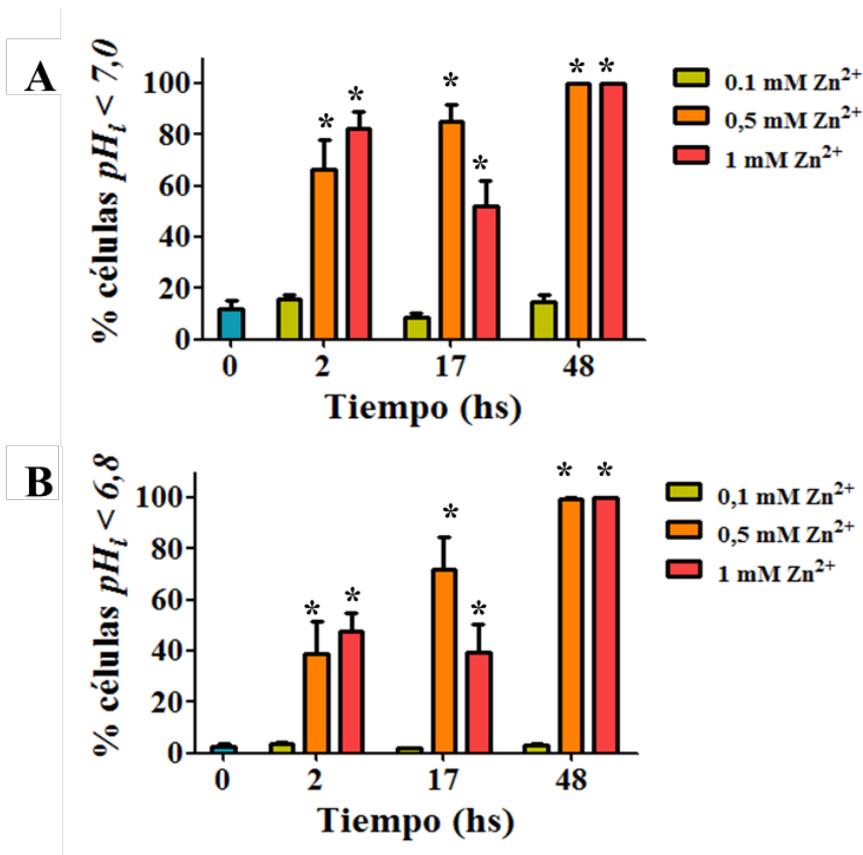


Figura 4.3.4. Representación del porcentaje de células por debajo de valores umbrales de $pH_i = 7,0$ (A) y $pH_i = 6,8$ (B), datos provenientes de los mismos experimentos cuya media se ilustra en la Figura 4.3.3B. * indica diferencia estadísticamente significativa respecto del control ($p < 0,05$).

De forma análoga a lo mostrado para los dos anteriores inhibidores, la figura 4.3.5 muestra el efecto en el pH_i de la inhibición del canal Hv1 por acción de la difenhidramina. El análisis estadístico de los tres parámetros evaluados (pH_i y el porcentaje de células acidificadas por debajo de los valores umbral 7,0 y 6,8) muestra un efecto significativo de la concentración y el tiempo, coherente con lo observado para la relación entre el bloqueo del canal Hv1 y la acidificación intracelular. Sin embargo, a comparación con el efecto del Cl-GBI donde gran parte de la acidificación producida es evidente ya a las dos horas de incubación, el efecto de la difenhidramina se hace más pronunciado a tiempos más largos. Tal es así que si realizamos un análisis comparativo de los valores medios de pH_i con la condición control el efecto a 0,5 mM es significativo a las 48 hs y a las dos horas lo son sólo los correspondientes a 1mM. Pero,

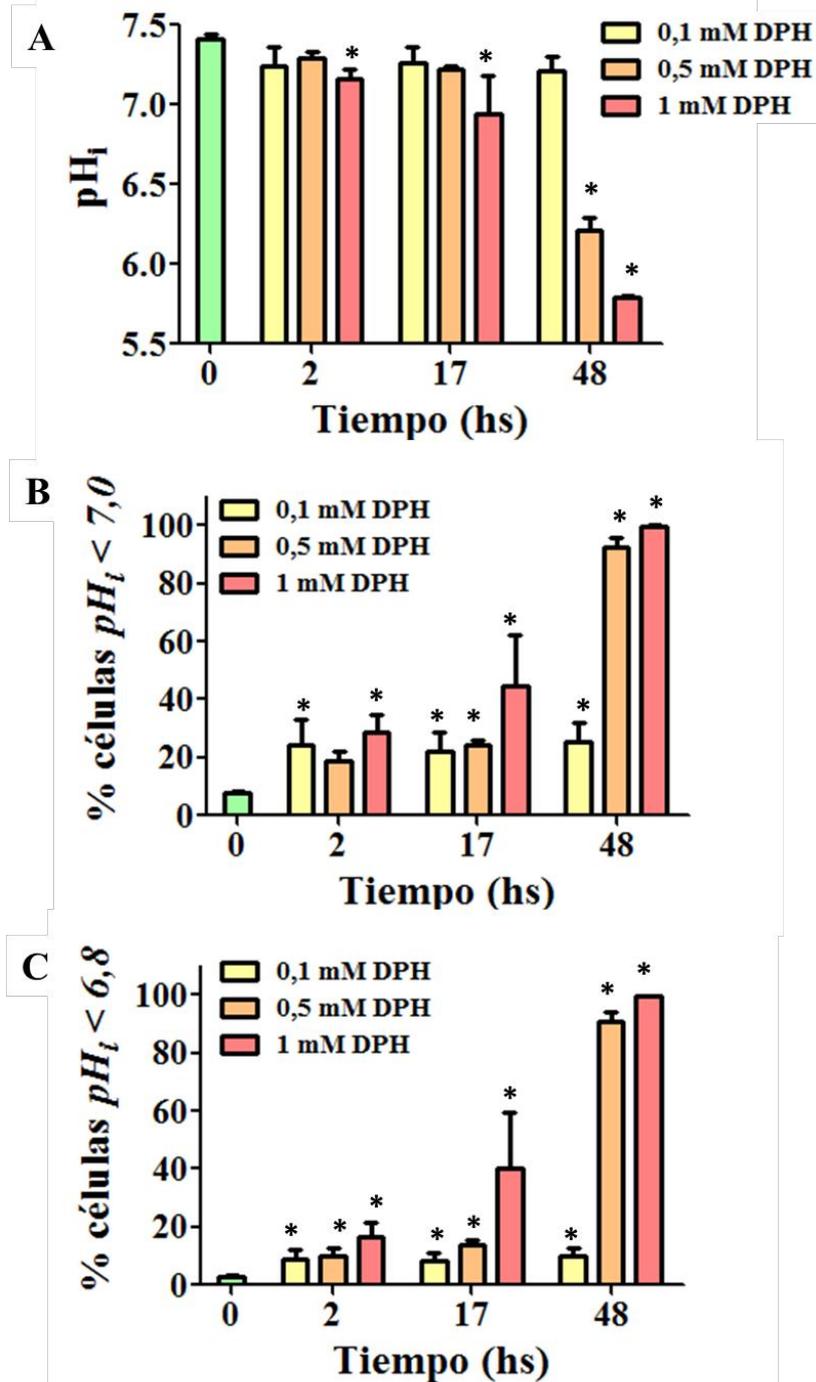


Figura 4.3.5 Evolución temporal de la acidificación inducida por inhibición del canal Hv1 en células T Jurkat con difenhidramina (DPH 0,1; 0,5 y 1 mM) comparado con su control (medio DMEM). **A**, Representación del valor medio de $pH_i \pm SEM$ en función del tiempo de incubación. **B** y **C** Representación del porcentaje de células por debajo del valor umbral (7,0 y 6,8 respectivamente). $n=2-4$, dos experimentos independientes. * indica diferencia estadísticamente significativa respecto del control ($p<0,05$).

cuando se analizan los porcentajes de células acidificadas por debajo de los dos valores umbral, se encuentra que en todos los tiempos ensayados la mayoría de las condiciones difiere del control. Esta diferencia respecto a los dos bloqueantes anteriormente estudiados, podría deberse a diferencias en el mecanismo de acción. Por un lado, vale tener en cuenta que la difenhidramina es una base débil con un $pK_a=8,98$, lo cual podría implicar que a tiempos cortos prevalezca un efecto alcalinizante por sobre la acidificación producida por el bloqueo. Por el otro, mientras que para el Cl-GBI y el Zn^{2+} se han descrito mecanismos de acción que involucran la unión directa al canal (ver sección 1.1.3), en el caso de la difenhidramina no hay mecanismo descrito. Una posibilidad es que la inhibición del canal sea indirecta, habiendo otros mediadores responsables del efecto que puedan desencadenar respuestas compensatorias o que tengan una cinética de inhibición a largo plazo distinta de los inhibidores directos.

Para descartar un posible efecto de la DPH sobre la señalización histaminérgica que afecte el pH_i de las células T Jurkat, se realizaron tratamientos de 24hs con difenhidramina, en las concentraciones utilizadas previamente, en presencia o ausencia de $100 \mu M$ de histamina. En la figura 4.3.6 se puede observar que la difenhidramina modifica significativamente el pH_i con un efecto concentración-respuesta, el cual es independiente de la presencia de histamina, descartando así un efecto de la señalización histaminérgica en el control del pH_i . Además, estos resultados conjuntamente con los mostrados en la figura 4.1.5, sugieren que si el efecto de la difenhidramina sobre el canal $Hv1$ es indirecto, no involucra receptores $H1$. El tiempo utilizado para esta serie fue elegido para poder comparar los datos con aquellos reportados por Jangi y col., los cuales muestran el efecto pro-apoptótico de la difenhidramina en la misma línea celular [293].

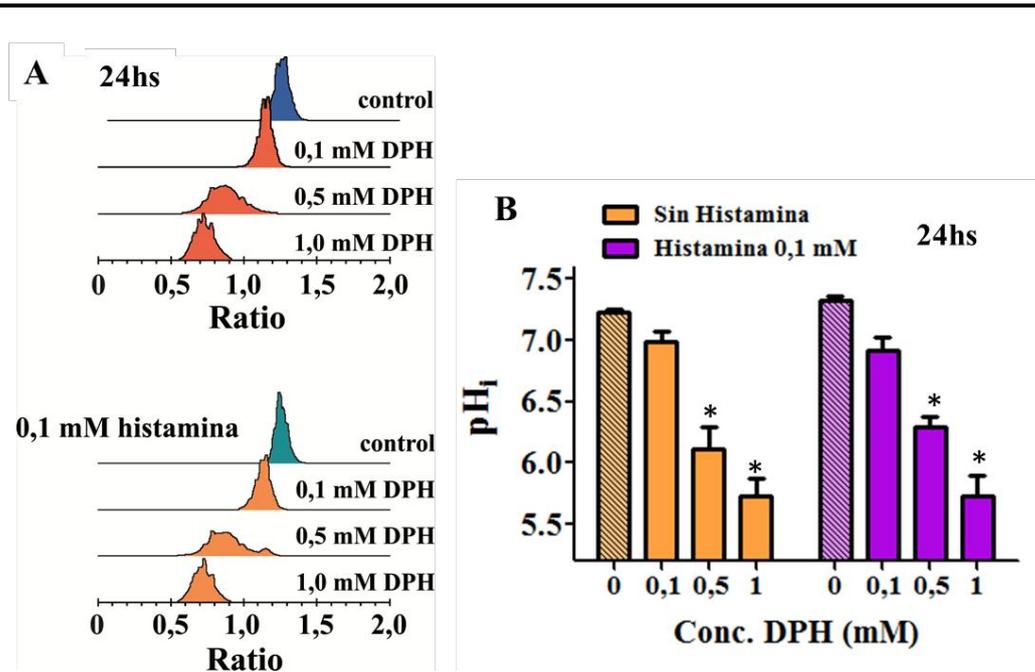


Figura 4.3.6 Impacto de la co-administración de histamina con difenhidramina a un único tiempo de incubación de 24hs. **A**, Histogramas representativos de cada tratamiento. **B**, Representación del valor medio de $\text{pH}_i \pm \text{SEM}$ para cada tratamiento. (n= 5-6). * indica diferencia estadísticamente significativa respecto del control, para las tres concentraciones ensayadas no hubo diferencia en las poblaciones con y sin histamina ($p < 0,05$).

En la sección 4.2 se evidenció la importancia de los transportadores de protones asociados al sodio en la regulación del pH_i de las células T Jurkat, lo cual es coherente con la expresión ubicua del intercambiador NHE1 anteriormente reportada. En este punto se buscó poner en evidencia el rol de dicha estructura en el mantenimiento del pH_i a tiempos largos, utilizando el mismo tratamiento con el que se estudió el canal Hv1. Para esto se usó el inhibidor 5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amiloride (EIPA) a dos concentraciones (10 y 100 μM) (figura 4.3.7).

Como puede observarse en la figura 4.3.7A la concentración más baja de EIPA no produce acidificación en forma significativa a ningún tiempo ensayado, mientras que la concentración más alta produce una marcada acidificación intracelular a partir de las 2 hs de tratamiento. Del análisis estadístico del porcentaje de células acidificadas por debajo de los valores umbral 7,0 y 6,8 surge que ya a las 2 hs de tratamiento con la concentración mayor de EIPA alrededor del 80 % de las células muestran un pH_i menor

a 6,8 (4.3.7B). Este comportamiento, donde gran parte del efecto es desarrollado al tiempo más corto como se ha visto con el Cl-GBI, puede interpretarse nuevamente como la resultante de interferir directamente con la actividad de un transportador de protones sin efectos adicionales.

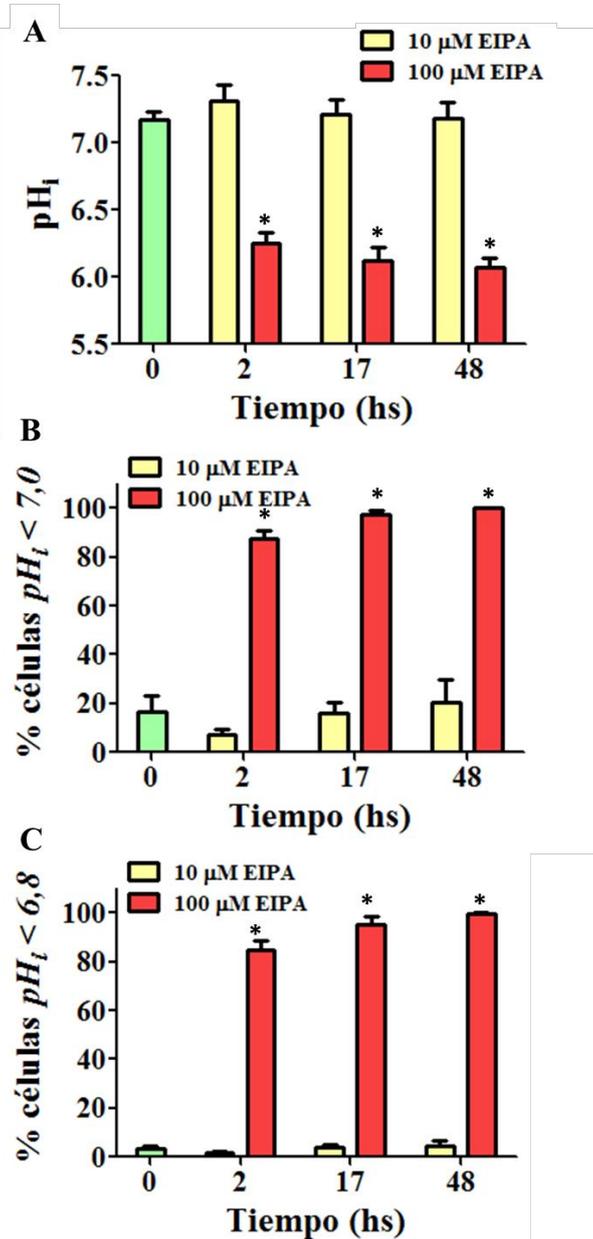


Figura 4.3.7 Evolución temporal del efecto de la inhibición del intercambiador NHE1 en células T Jurkat mediante el agregado de EIPA. **A**, Representación del valor medio de $pH_i \pm SEM$ para cada tratamiento. **B** y **C**, Representación del porcentaje de células por debajo de los valores umbral (7,0 y 6,8, respectivamente). $n=4$, dos experimentos independientes. * indica diferencia estadísticamente significativa respecto del control ($p < 0,05$).

4.4 Modulación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en condiciones de inhibición del canal Hv1 en células T Jurkat.

Dada la relación funcional entre el canal Hv1 y la enzima NADPH oxidasa en la producción de ROS, se evaluó si la inhibición del canal Hv1 afecta también los niveles de ROS. Este efecto se evaluó por citometría de flujo utilizando la sonda diclorofluoresceína (DCF) que reconoce ROS (ver sección materiales y métodos).

En la figura 4.4.1 se muestran histogramas representativos del efecto, sobre la producción intracelular de ROS, del tratamiento por 2 hs de células T Jurkat en cultivo con distintas concentraciones de Cl-GBI (4.4.1A) y de Zn²⁺ (4.4.1B).

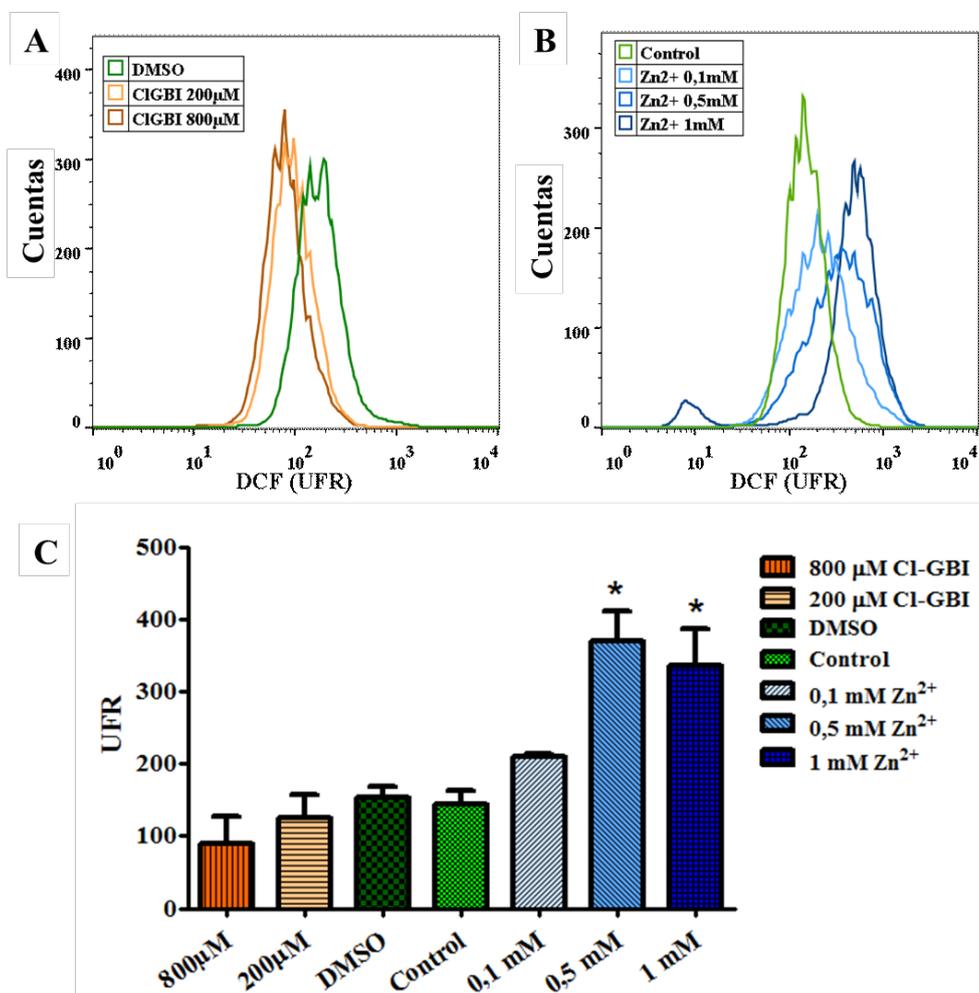


Figura 4.4.1 Influencia de la inhibición del canal Hv1 en la producción de ROS en células T Jurkat. **A**, Histogramas representativos luego de 2hs de cultivo con dos concentraciones de Cl-GBI y su control (DMSO 0,8 %). **B**, Histogramas representativos luego de 2 hs de cultivo con tres concentraciones de Zn²⁺ y su

control (medio DMEM). C, Representación de los valores medios \pm SEM de producción de ROS para las diferentes intervenciones realizadas. Valores expresados en *unidades de fluorescencia relativa* (UFR) de diclorofluoresceína (DCF). * indica diferencia significativa respecto del control ($p < 0,05$). $n=4$, dos experimentos independientes.

El gráfico de barras de la figura 4.4.1C esquematiza los valores medios de cada población. Como se puede observar, en este caso encontramos efectos diferentes entre los inhibidores del canal Hv1. Mientras que el Zn^{2+} produce un aumento significativo de ROS en forma concentración dependiente, el Cl-GBI muestra una tendencia de disminución de los niveles de ROS que no alcanza significancia estadística.

4.5 Efectos de la inhibición del canal Hv1 en la inducción de apoptosis de las células T Jurkat.

Una vez establecido que la actividad del canal Hv1 en las células T Jurkat tiene un efecto en la regulación del pH_i , estudiamos el efecto de su inhibición en la inducción de apoptosis. Mantuvimos las mismas condiciones experimentales en las cuales se caracterizó el efecto de los inhibidores sobre el pH_i a largo plazo (sección 4.3). Evaluamos por citometría de flujo la muerte celular cuantificando la externalización de fosfatidilserina con Anexina V (aV) como indicador temprano del proceso de apoptosis, y la captación celular de yoduro de propidio (IP) como indicador del proceso de necrosis u apoptosis tardía (ya que la permeabilidad de este compuesto depende de la integridad de la membrana plasmática celular).

En la figura 4.5.1A se muestran los gráficos (*dot-plots*) representativos del efecto de 200 μ M de Cl-GBI en las células T Jurkat a los tres tiempos de incubación ensayados (2, 17 y 48 hs), siendo el gráfico superior izquierdo representativo de la condición control (DMSO). Dentro de cada *dot-plot* el cuadrante inferior izquierdo (aV^-IP^-) corresponde a células viables, mientras que el correspondiente a aV^+IP^- muestra la frecuencia de células apoptóticas tempranas y el cuadrante superior derecho (aV^+IP^+) corresponde a células necróticas. El incremento de esta última subpoblación puede ser el resultado final de un proceso de muerte que sigue una vía apoptótica o necrótica, por lo que priorizaremos en este análisis a las células aV^+IP^- . En el gráfico de barras que

muestra los valores medios del porcentaje de células en cada cuadrante, podemos observar que la incubación con Cl-GBI produce un aumento de células aV⁺IP⁻ (como también de las aV⁺IP⁺). Ambas concentraciones de Cl-GBI produjeron un aumento significativo a los tres tiempos de incubación comparados con la condición control. El gráfico muestra que para la concentración 200 μM el porcentaje de la subpoblación aumenta con el tiempo, mientras que para 800 μM esta disminuye porque, a expensas de la misma, crece la subpoblación aV⁺IP⁺ (apoptóticas tardías).

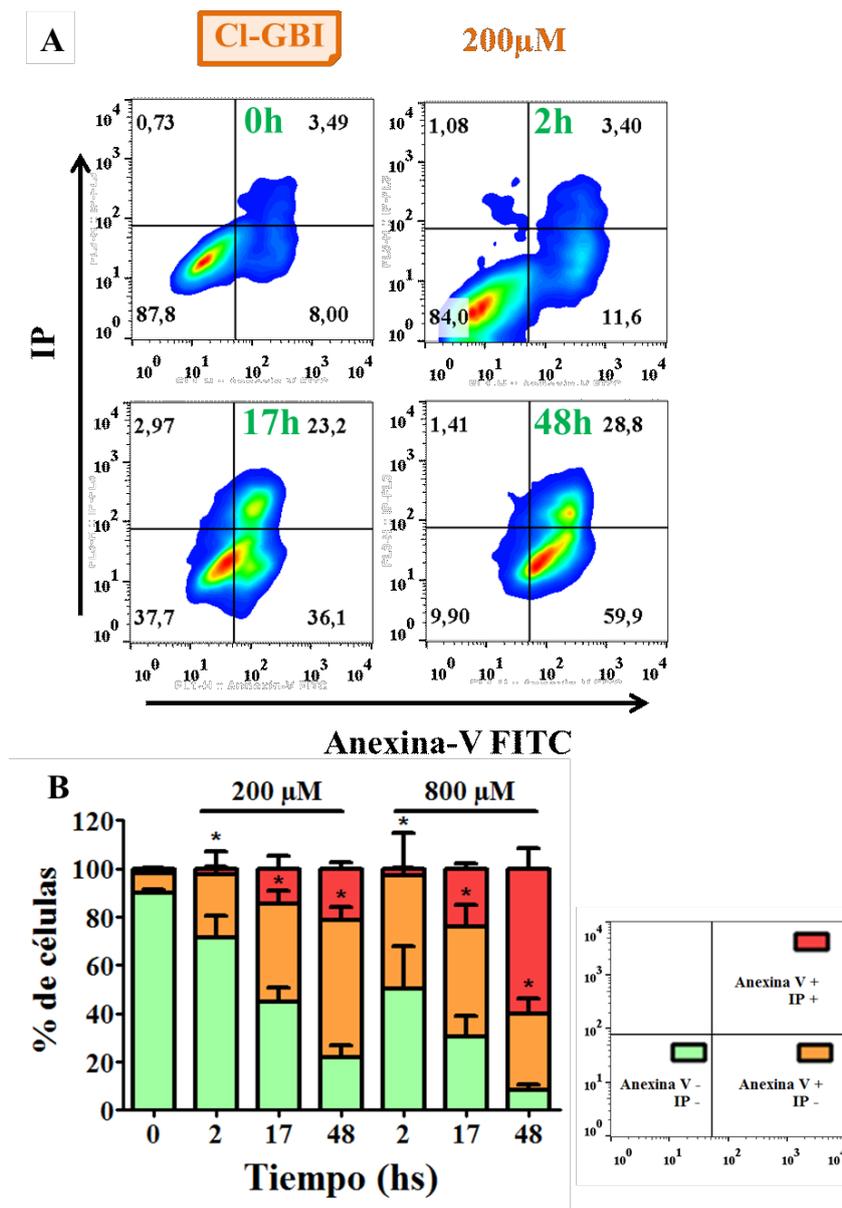


Figura 4.5.1 Efecto de la inhibición del canal Hv1 por Cl-GBI sobre la inducción de apoptosis en las células T Jurkat. A, *Dot-plots* representativos de los ensayos

de marcación con Anexina V/ Ioduro de propidio (IP) para la concentración de 200 μM a cuatro tiempos de incubación. El control DMSO 0,8% está representado como el valor a tiempo 0 hs. **B**, Representación del porcentaje de células en cada cuadrante, según los colores representados en el esquema de la derecha, para cada uno de los tiempos y concentraciones ensayados. * indica diferencia significativa respecto del valor control de la sub-población aV^+IP^- ($p < 0,05$). $n = 6$, 3 experimentos independientes.

La figura 4.5.2 muestra imágenes de las células T Jurkat al microscopio óptico donde se puede observar cómo el cultivo con el inhibidor Cl-GBI altera la formación de cúmulos propia del crecimiento normal de las células, lo cual es de esperarse cuando las células atraviesan el proceso de apoptosis.

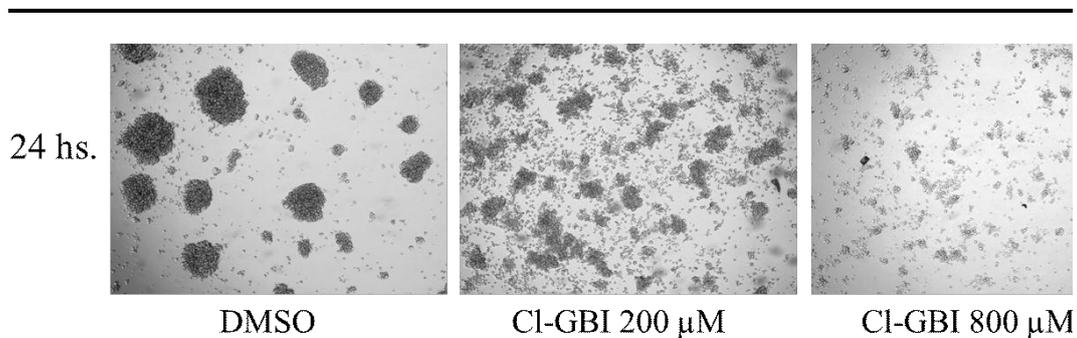


Figura 4.5.2 Imágenes al microscopio óptico (40X) de las células T Jurkat en cultivo 24 hs luego del agregado de DMSO 0,8% (control de solvente) y las dos concentraciones de Cl-GBI utilizadas.

A continuación, también estudiamos el efecto del Zn^{2+} y de la difenhidramina en la inducción de la apoptosis de las células T Jurkat a tres concentraciones diferentes (0,1; 0,5 y 1 mM).

En la figura 4.5.3A se muestran los gráficos (*dot-plots*) representativos del efecto de 0,5 mM de Zn^{2+} a los tres tiempos de incubación, siendo el gráfico superior izquierdo representativo de la condición control (medio DMEM). En el gráfico de barras los valores medios del porcentaje de células de cada cuadrante, muestran que las tres concentraciones de Zn^{2+} a las dos horas de tratamiento aumentan significativamente la frecuencia de células aV^+IP^- , derivando luego en un aumento casi completo de la subpoblación aV^+IP^+ con 0,5 y 1 mM.

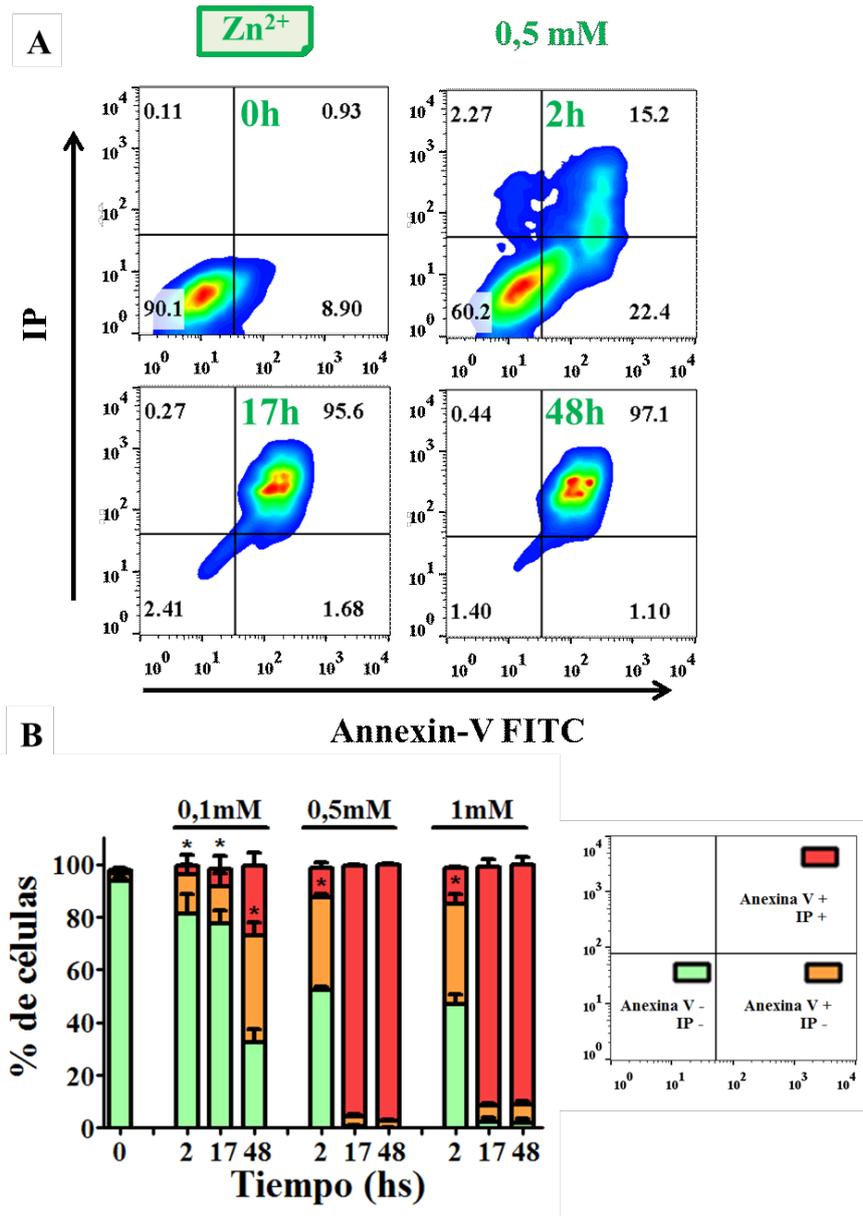


Figura 4.5.3 Efecto de la inhibición del canal Hv1 por Zn²⁺ sobre la inducción de apoptosis en las células T Jurkat. **A**, *Dot-plots* representativos de los ensayos de marcación con Anexina V/ Ioduro de propidio (IP) para la concentración de 0,5 mM nominal a los tres tiempos de incubación. El control con medio DMEM está representado como el tiempo 0 hs. **B**, Representación del porcentaje de células en cada cuadrante, según los colores representados en el esquema de la derecha, para cada uno de los tiempos y concentraciones ensayados. * indica diferencia significativa respecto del valor control de la sub-población aV⁺IP⁻ (p<0,05). n=4, 2 experimentos independientes.

En la figura 4.5.4 se muestran los resultados correspondientes a los efectos de la difenhidramina.

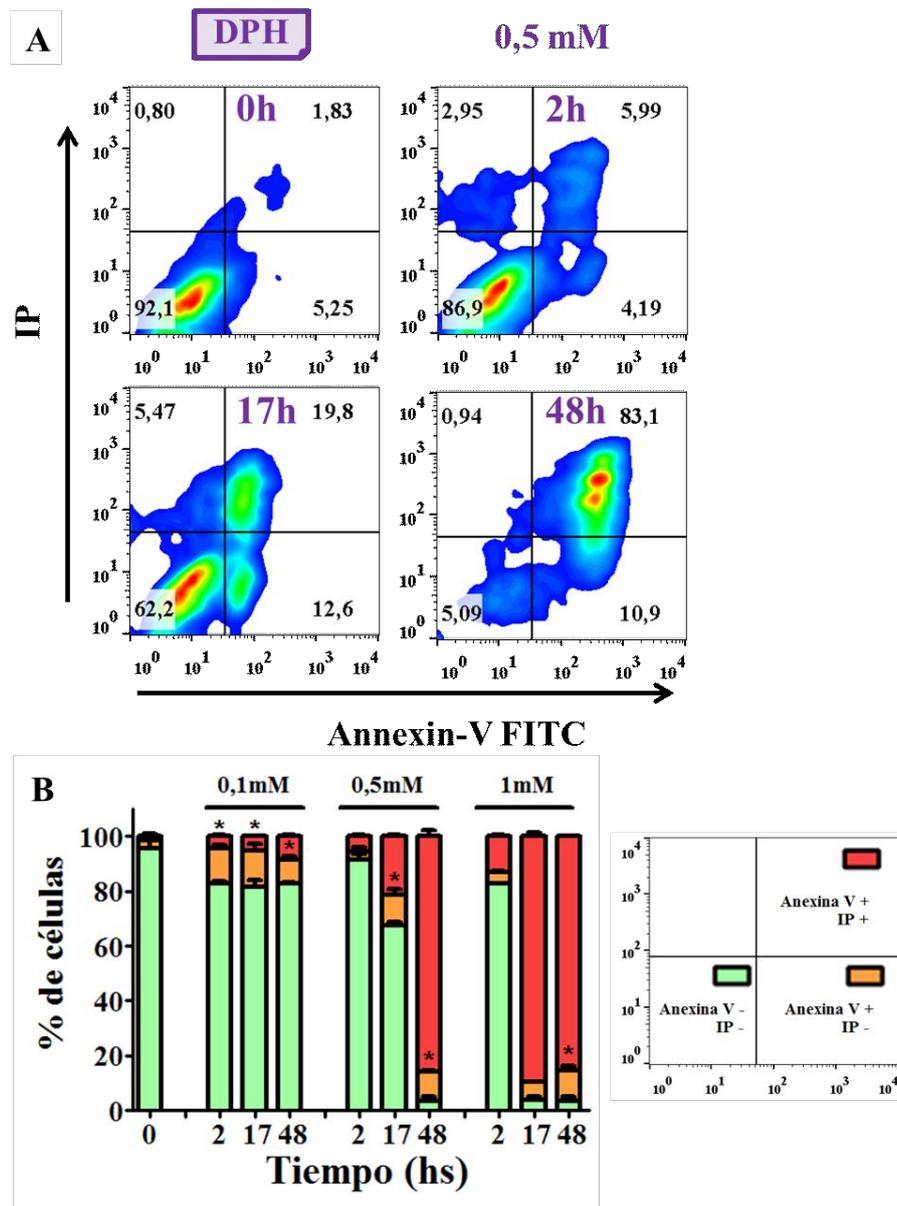


Figura 4.5.4 Efecto de la inhibición del canal Hv1 por difenhidramina sobre la inducción de apoptosis en las células T Jurkat. **A**, *Dot-plots* representativos de los ensayos de marcación con Anexina V/ Ioduro de propidio (IP) para la concentración de 0,5 mM nominal a los tres tiempos de incubación. El control con medio DMEM está representado como el tiempo 0 hs. **B**, Representación del porcentaje de células en cada cuadrante, según los colores representados en el esquema de la derecha, para cada uno de los tiempos y concentraciones ensayados. * indica diferencia significativa respecto del valor control de la subpoblación aV^+IP^- ($p < 0,05$). $n=4$, 2 experimentos independientes.

El análisis de los resultados muestra que difenhidramina produce un aumento claro de la subpoblación aV^+IP^+ , siendo precedido en este caso por un aumento de células aV^+IP^- menos pronunciado que con los tratamientos anteriores, evidenciándose la inducción de muerte celular principalmente en el porcentaje de células necróticas.

Con el fin de analizar si la acidificación inducida por un mecanismo diferente a la inhibición del canal Hv1 es capaz de inducir apoptosis, se sometió a las células T Jurkat al bloqueo del intercambiador Na^+/H^+ mediante la incubación con el inhibidor EIPA (en las mismas condiciones en las cuales se estudió su influencia en el pH_i a tiempos largos, sección 4.3). En la figura 4.5.5 se muestran los resultados obtenidos donde se puede observar que la concentración de $10 \mu M$ no produce muerte celular de ningún tipo, dado que no hay cambios en las poblaciones aV^+IP^- ni aV^+IP^+ . En contraste, $100 \mu M$ de EIPA produce un drástico aumento de la población aV^+IP^+ resultando en la muerte de casi la totalidad de las células a las 17 h. En este caso los resultados no evidencian un proceso de muerte celular que sigue una vía apoptótica, sino más bien por un proceso necrótico.

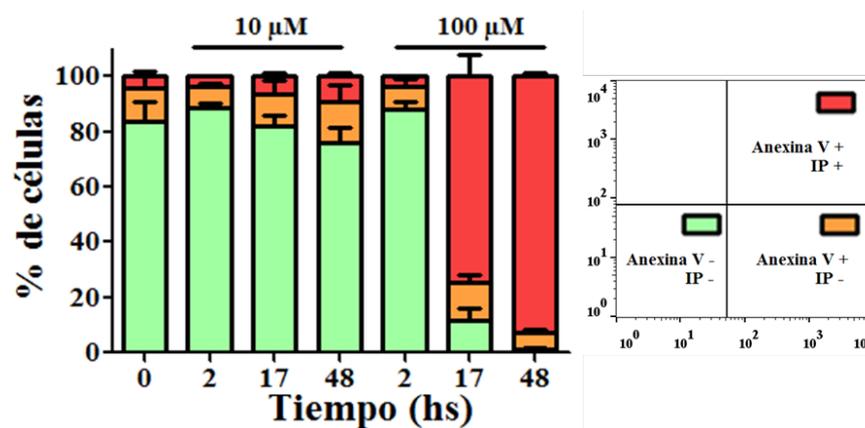


Figura 4.5.5 Efectos en la inducción de apoptosis de las células T Jurkat ante la inhibición del intercambiador NHE1 con EIPA. Representación del porcentaje de células en cada cuadrante, según los colores representados en el esquema de la derecha, para cada uno de los tiempos y concentraciones. $n=4$, 2 experimentos independientes.

A fin de evaluar el efecto de la inhibición del canal Hv1 en otra característica de etapas más tardías de la apoptosis, analizamos de la pérdida de ADN mediante la cuantificación de poblaciones sub-diploides por citometría de flujo. La cuantificación

relativa de la cantidad de ADN dentro de cada célula nos permite identificar poblaciones diploides (2N, asociadas a las fases G1/G0), poblaciones tetraploides (4N, asociadas a las fases G2/M), poblaciones intermedias (fase S) y, de ser evidente el proceso apoptótico, poblaciones sub-diploides (sub2N).

La figura 4.5.6 muestra los resultados obtenidos a partir de células tratadas con 200 y 800 μM CI-GBI a 17 y 48 hs. No se evaluó el tiempo de 2 hs dado que se consideró un tiempo insuficiente para evidenciar la pérdida de ADN o modificaciones en fases del ciclo. En A se muestran los histogramas representativos de los tratamientos de incubación en condiciones control (con solvente DMSO 0,8%) y con ambas concentraciones de CI-BGI durante 17 hs. En el histograma en condiciones control se observan claramente dos picos de diferente intensidad de fluorescencia que corresponden a las poblaciones 2N (izq.) y 4N (der.). Mientras que en los obtenidos de las células tratadas se observa la aparición de una subpoblación apoptótica sub2N, representándose en B los porcentajes obtenidos para ambas concentraciones y tiempos. Allí se puede ver una clara diferencia con el control (DMSO) a ambas concentraciones y tiempos.

Por otro lado, en el histograma correspondiente al tratamiento con 200 μM de CI-GBI, se observa un aumento en la intensidad del pico correspondiente a la población 4N que indica un mayor número de células en las fases G2/M. En C se presentan los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular, obtenidos por el ajuste de los histogramas para cada uno de los tratamientos. Se excluyó la subpoblación sub2N del 100 %, dado que no representa una fase del ciclo celular. Se puede observar que el mencionado incremento en el porcentaje de células en la fase G2/M (4N) se produce a expensas de una disminución en la fase G1/G0 (2N).

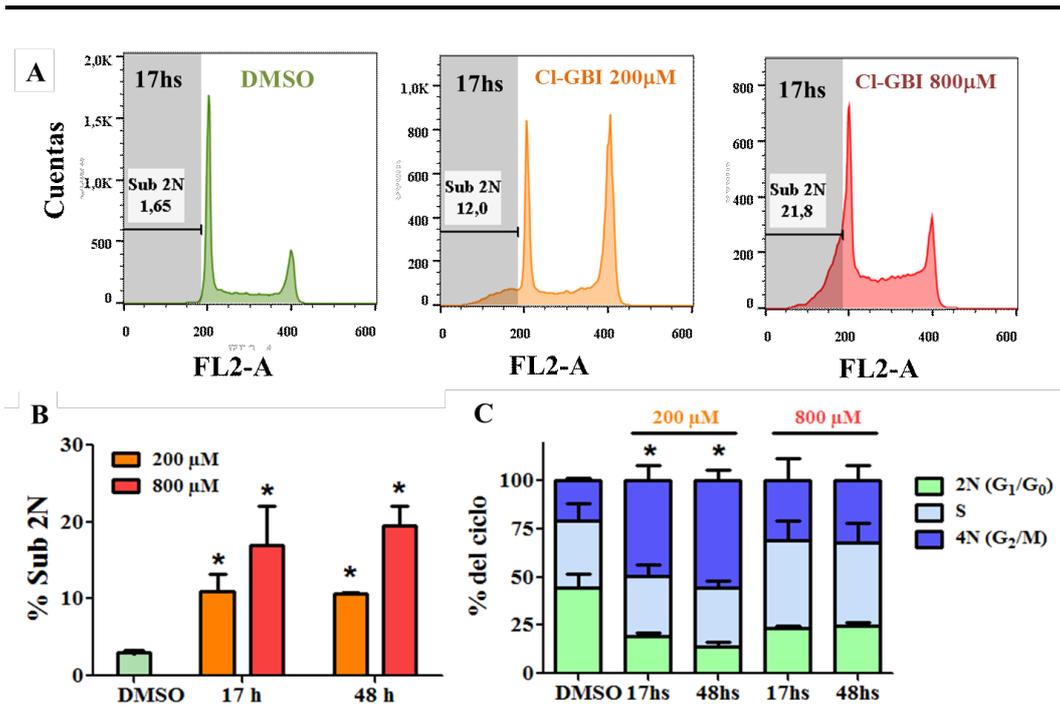
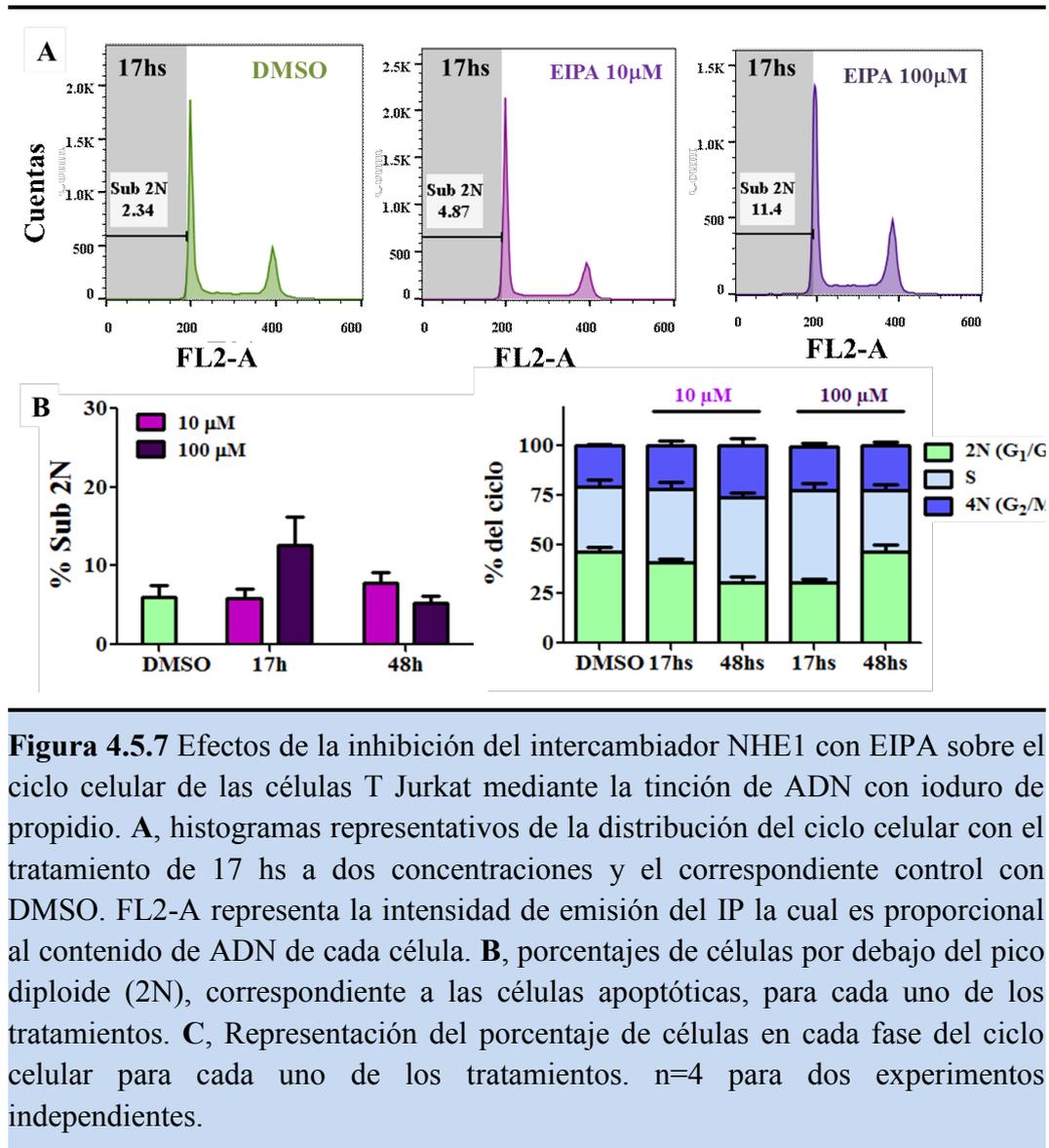


Figura 4.5.6 Efectos de la inhibición del canal Hv1 con Cl-GBI sobre el ciclo celular de las células T Jurkat mediante la tinción de ADN con yoduro de propidio. **A**, histogramas representativos de la distribución del ciclo celular con el tratamiento de 17 hs a dos concentraciones y el correspondiente control con DMSO. FL2-A representa la intensidad de emisión del IP la cual es proporcional al contenido de ADN de cada célula. **B**, porcentajes de células por debajo del pico diploide (2N), correspondiente a las células apoptóticas, para cada uno de los tratamientos. **C**, Representación del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular para cada uno de los tratamientos. * indica diferencia significativa respecto al control ($p < 0,05$). $n=4$ para dos experimentos independientes.

Con el objetivo de poder comparar si dos mecanismos de acidificación distintos producen el mismo efecto sobre el ciclo celular, se realizó el mismo ensayo con las dos concentraciones de EIPA previamente utilizadas. Los resultados ilustrados en la figura 4.5.7 muestran que no hay diferencias significativas en el ciclo celular, mostrándose sólo una tendencia a aumentar la subpoblación sub2N con el tratamiento con EIPA 100 μM a 17hs.



4.6 Efecto de la inhibición del canal Hv1 en células mononucleares derivadas de sangre periférica de individuos voluntarios sanos.

Una vez establecida la evidencia que relaciona la inhibición del canal Hv1 con el pH_i y con la inducción de apoptosis en el modelo de células leucémicas T Jurkat, se investigó el efecto en la inducción de muerte celular de linfocitos T periféricos humanos de manera tal de poder comparar con el equivalente no tumoral.

Para estos ensayos se purificaron células mononucleares (PBMC) a partir de *Buffy coats* provenientes del Instituto de Hemoterapia de la Pcia de Bs.As. mediante separación con *Ficoll-Paque*. La fracción celular enriquecida en células mononucleares fue incubada durante 17 hs en las mismas condiciones de cultivo que las utilizadas en

los ensayos con células T Jurkat en presencia y ausencia de los inhibidores del canal Hv1. Las células fueron posteriormente analizadas por citometría de flujo mediante el empleo de un anticuerpo anti-CD3- APC (para identificar linfocitos T), Anexina V e yoduro de propidio para identificar las células apoptóticas y necróticas, respectivamente. En la figura 4.6.1 se muestran los resultados correspondientes a estos ensayos para los linfocitos T CD3+ así como para el resto de las células que conforman la muestra (CD3-).

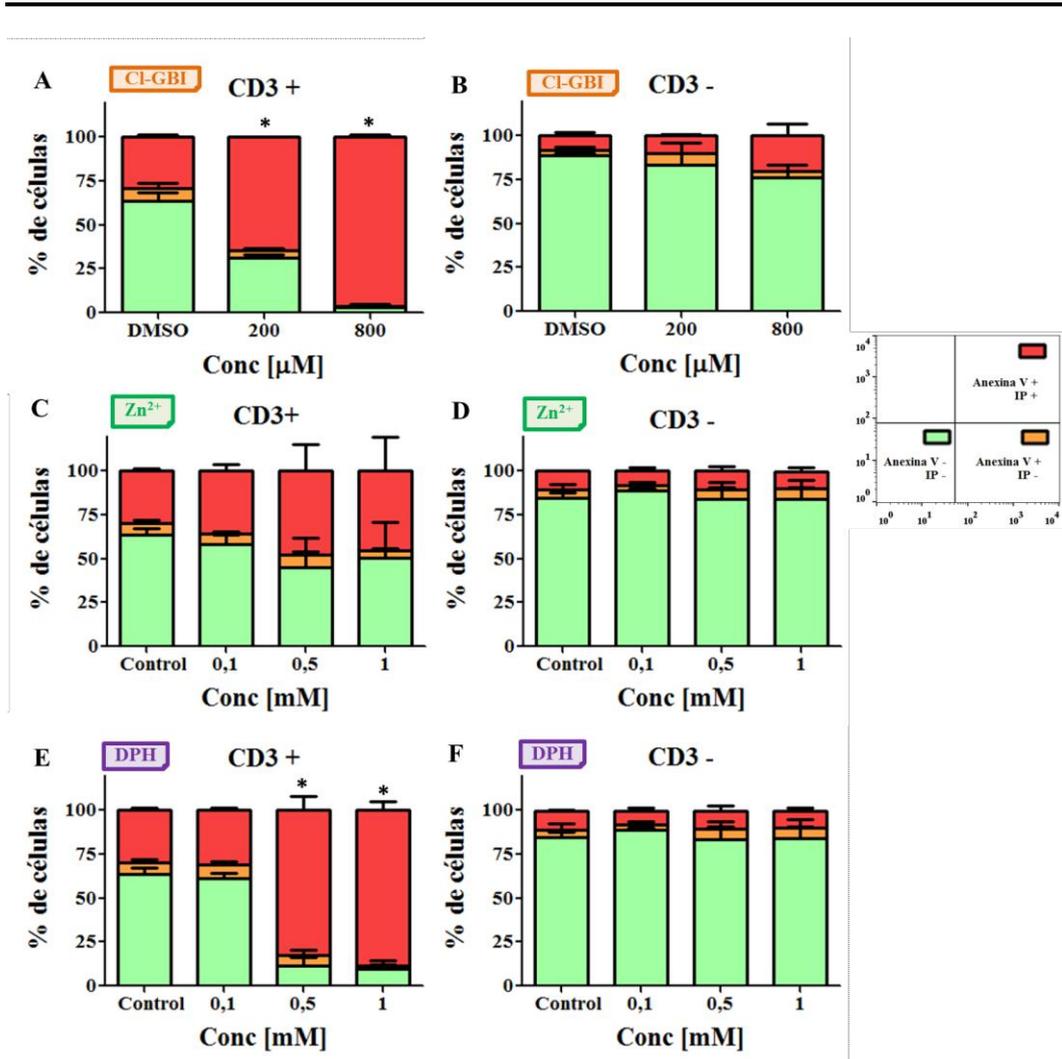


Figura 4.6.1 Efectos del bloqueo del canal Hv1 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Representación del porcentaje de células en cada cuadrante, según los colores representados en el esquema de la derecha, para cada concentración. Resultados obtenidos en células CD3+ (con Cl-GBI en **A**, Zn²⁺ en **C** y DPH en **E**) y CD3- (con Cl-GBI en **B**, Zn²⁺ en **D** y DPH en **F**). En todos los casos n=4 para dos experimentos independientes. * indica diferencia significativa respecto al control (p<0,05).

Se puede observar que el Cl-GBI, en forma concentración dependiente, induce un aumento significativo de la población de células aV^+IP^+ que no está precedida por un incremento de células aV^+IP^- . Esto es indicativo de que la inhibición del canal en las células $CD3^+$ induce la muerte celular por un proceso de necrosis. Sin embargo, en las células $CD3^-$ no se observa tal efecto. Los datos de los tratamientos con Zn^{2+} muestran la misma tendencia, pero de menor magnitud y sin alcanzar significancia estadística. La figura 4.6.1 muestra también los valores obtenidos para los tratamientos con difenhidramina, donde se puede observar que a concentraciones mayores a 0,1 mM se induce un notable incremento de la población necrótica aV^+IP^+ para las células $CD3^+$ (figura 4.6.1E) llegando por encima del 80%. En este caso, al igual que con Cl-GBI, no observamos efecto necrótico en las células $CD3^-$ (figura 4.6.1F).

También incluimos en estos ensayos la inhibición del NHE1 con EIPA. En la figura 4.6.2 se muestran los resultados correspondientes, donde también se observa un efecto necrótico selectivo sobre las células $CD3^+$. Al igual que lo observado en las células T Jurkat la concentración de EIPA de 10 μM no produce efecto alguno.

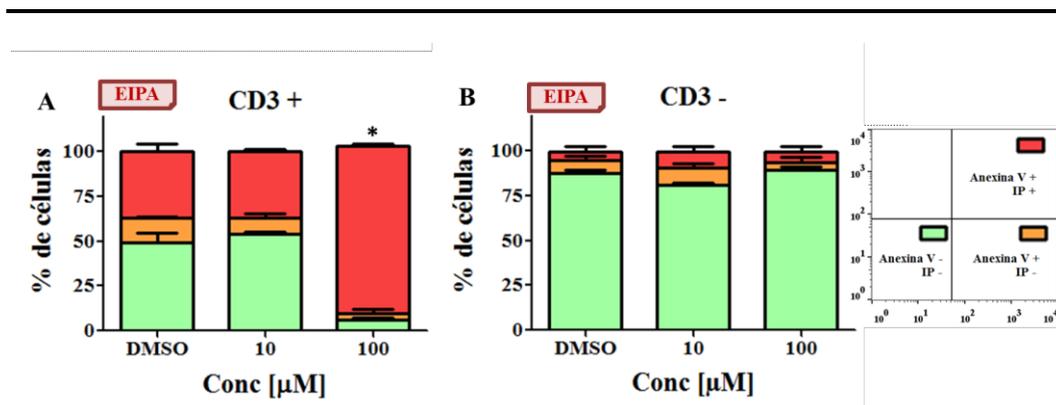


Figura 4.6.2 Efectos del bloqueo del co-transportador NHE1 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Representación del porcentaje de células en cada cuadrante, según los colores representados en el esquema de la derecha, para cada uno de los tiempos y concentraciones. Resultados obtenidos en células $CD3^+$ (A) y $CD3^-$ (B). $n=4$ para dos experimentos independientes. * indica diferencia significativa respecto al control ($p < 0,05$).

4.7 Efectos del bloqueo del canal Hv1 sobre la dinámica de calcio intracelular.

Dada la relación existente entre la dinámica del pH_i y de la concentración de calcio intracelular, evaluamos si el bloqueo del canal Hv1 induce cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células T Jurkat y los linfocitos T periféricos CD3^+ . Este estudio indaga sobre posibles roles del canal Hv1 en la dinámica de los niveles de calcio citoplasmático, el cual posee una gran relevancia en procesos claves para el desarrollo tumoral, como lo son la proliferación y muerte celular. Estos experimentos se realizaron por microscopía de fluorescencia empleando FURA-2 cuya fluorescencia refleja los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (ver detalles en materiales y métodos).

En la mayoría de la células expuestas al inhibidor Cl-GBI, el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fue la respuesta más frecuentemente observada tanto en las células Jurkat como en los linfocitos T normales. La figura 4.7.1 muestra registros representativos de este efecto en las células Jurkat (A) y en los Linfocitos T_{control} (B) y los valores de las respuestas obtenidas en todas las células analizadas (C).

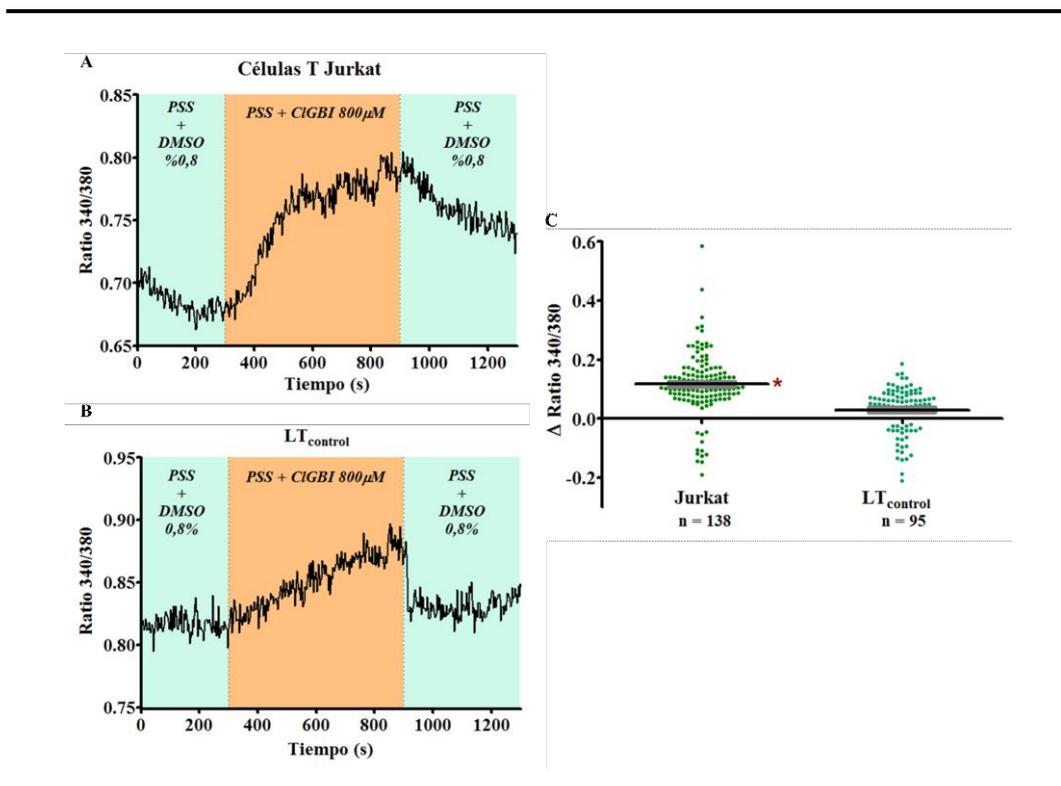


Figura 4.7.1 Registros representativos de la respuesta prevalente en los niveles de calcio intracitoplasmático de células T Jurkat (A) y linfocitos T control (B) al bloqueo del canal Hv1 con Cl-GBI 800 μM en presencia de calcio extracelular 1,4 mM (sol. PSS). En ambos casos el cociente de intensidad de fluorescencia a

longitudes de onda 340 y 380 nm es proporcional a $[Ca^{2+}]_i$. En las figuras se representa el valor del cociente de la intensidad de emisión fluorescente del indicador (Ratio 340/380) versus tiempo. En C se representan los valores individuales de las respuestas para ambos tipos celulares junto con sus valores medios (en negro) y el SEM (gris). * indica diferencia significativa respecto a los $LT_{control}$ ($p < 0,05$).

Si realizamos un análisis de los resultados discriminando por el tipo de respuesta que se observa en cada célula individual, vemos que si bien el efecto mayoritario fue el descrito en la figura 4.7.1, existe un pequeño porcentaje de células que no responden y otro donde la $[Ca^{2+}]_i$ disminuye. En la figura 4.7.2 se describe, en porcentaje, esta heterogeneidad de la respuesta al estímulo. Los valores medios de cambio en el ratio 340/380 de cada subpoblación se representan en los gráficos de barras de la figura, y como se puede observar, en las células T Jurkat tanto el porcentaje de células que responden con un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ como la magnitud del aumento son significativamente mayores que en los linfocitos T normales. Sin embargo, si comparamos la magnitud de la respuesta de descenso en la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por el Cl-GBI esta es igual para ambos tipos celulares.

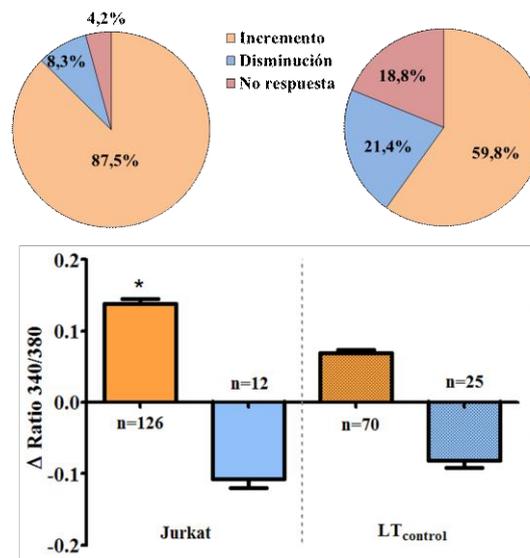


Figura 4.7.2 Efecto del bloqueo del canal Hv1 con Cl-GBI 800 μ M en los niveles de calcio intracitoplasmáticos de células T Jurkat (Izq.) y linfocitos T control (Der.) en **presencia de calcio extracelular 1,4 mM (sol. PSS)**. Los gráficos de torta (arriba) representan la distribución de células entre aquellas que no

responden (rojo), responden con un incremento (naranja) y aquellas que responden con una disminución de $[Ca^{2+}]_i$ (celeste). Los gráficos de barras (abajo) representan la magnitud de la respuesta para cada tipo de subpoblación. * indica diferencia significativa respecto a los $LT_{control}$ ($p < 0,05$). Resultados de dos (Jurkat) y tres ($LT_{control}$) experimentos independientes.

Estas diferencias en la respuesta al inhibidor del canal Hv1, entre los dos tipos celulares, nos llevaron a indagar con más detalle el origen del aumento del calcio intracelular. En primer lugar investigamos si el aumento de calcio intracelular era generado por un influjo de calcio desde el espacio extracelular. Para ello, se realizó el mismo experimento de la serie anterior pero utilizando soluciones extracelulares libres de calcio ($0 Ca^{2+}$). De manera equivalente a lo representado para la condición con calcio extracelular (PSS), la figura 4.7.3 muestra registros representativos del efecto más frecuente generado por el agregado del inhibidor Cl-GBI sobre las células T Jurkat (A) y $LT_{control}$ (B). En la figura 4.7.3C se encuentran los valores de las respuestas obtenidas en todas las células analizadas; y en la figura 4.7.4 se detalla la distribución de células y la magnitud de las respuestas.

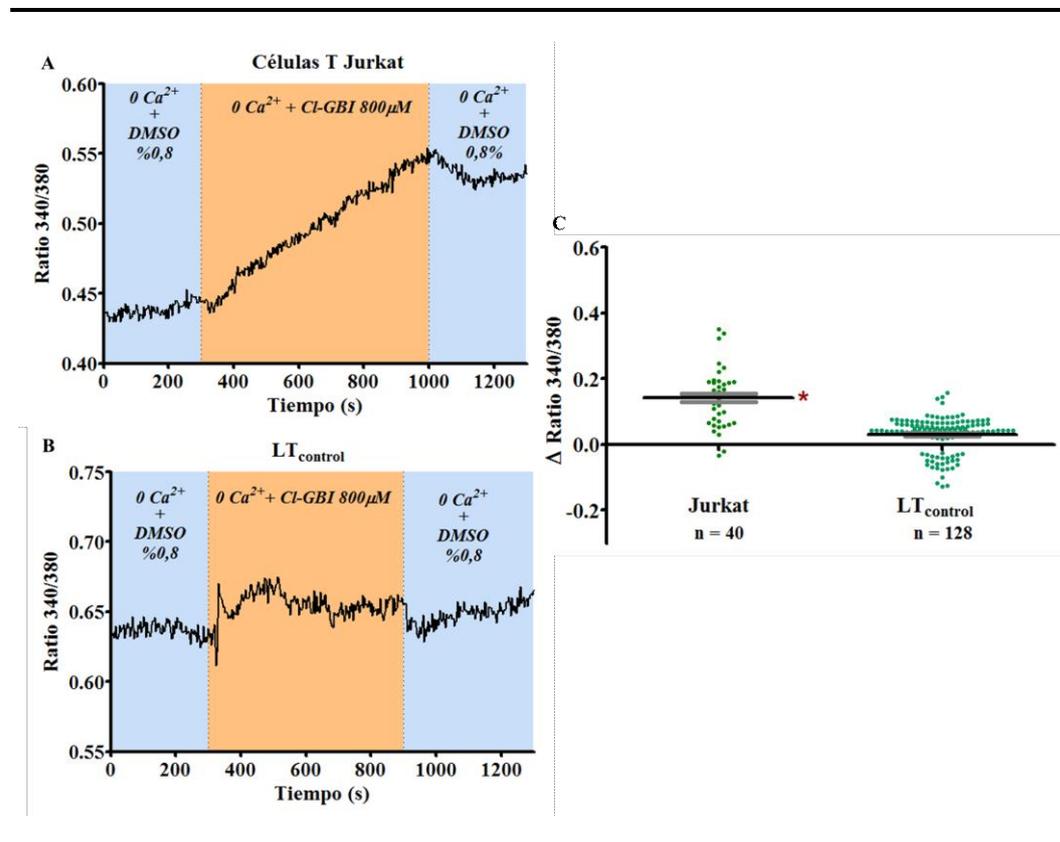


Figura 4.7.3 Registros representativos de la respuesta prevalente en los niveles de calcio intracitoplasmático de células T Jurkat (A) y linfocitos T control (B) al bloqueo del canal Hv1 con **Cl-GBI 800 μ M en ausencia de calcio extracelular**. En ambos casos el cociente de intensidad de fluorescencia a longitudes de onda 340 y 380 nm es proporcional a $[Ca^{2+}]_i$. En C se representan los valores individuales de las respuestas para ambos tipos celulares junto con sus valores medios (en negro) y el SEM (gris). * indica diferencia significativa respecto a los $LT_{control}$ ($p < 0,05$).

En ambos tipos celulares el aumento de calcio sigue siendo la respuesta mayoritaria y de magnitud similar a la correspondiente a la condición con calcio extracelular (PSS). Por lo tanto descartamos que la inhibición del canal Hv1 genere indirectamente un influjo de calcio desde el exterior celular y planteamos que los depósitos intracelulares podrían ser los responsables del aumento de calcio observado.

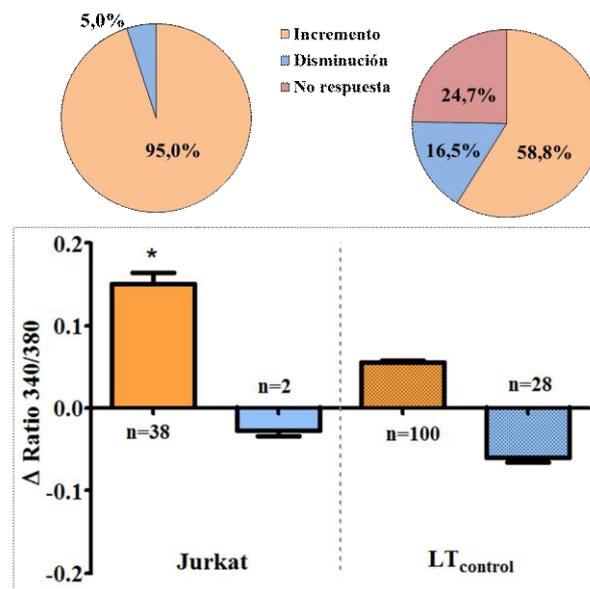


Figura 4.7.4 Efecto del bloqueo del canal Hv1 mediante el agregado de Cl-GBI 800 μ M en los niveles de calcio intracitoplasmáticos de células T Jurkat (Izq.) y linfocitos T control (Der.) en **ausencia de calcio extracelular ($0 Ca^{2+}$)**. Los gráficos de torta (arriba) representan la distribución de células entre aquellas que no responden (rojo), responden con un incremento (naranja) y aquellas que responden con una disminución de $[Ca^{2+}]_i$ (celeste). Los gráficos de barras (abajo) representan la magnitud de la respuesta para cada tipo de subpoblación. * indica diferencia significativa respecto a los $LT_{control}$ ($p < 0,05$). Resultados de dos (Jurkat) y tres ($LT_{control}$) experimentos independientes.

A continuación estudiamos el rol de los depósitos del retículo endoplásmico (RE) en el movimiento de Ca^{2+} inducido por el bloqueo del Hv1 mediante la aplicación de Cl-GBI $800 \mu\text{M}$ luego del tratamiento con ácido ciclopiazónico (CPA) $30 \mu\text{M}$ en 0 Ca^{2+} extracelular. El CPA es un inhibidor de la bomba calcio ATPasa del retículo endoplasmático (*SERCA*) encargada de reintroducir el calcio desde el citosol. Dado que la mayoría de los tipos celulares presentan corrientes de fuga de Ca^{2+} del RE, el bloqueo de este transportador (en ausencia de calcio extracelular) es una estrategia clásica para producir la depleción del RE. De esta manera el efecto del Cl-GBI posterior a la respuesta al CPA no contará con el componente reticular. La figura 4.7.5 muestra un registro típico del experimento mencionado junto con los valores obtenidos, los cuales se comparan con los propios de la figura 4.7.4 (en 0 Ca^{2+}). Así, se puede ver que la respuesta post-CPA no difiere de 0 ($0,14 \pm 0,01$ en 0 Ca^{2+} vs $0,01 \pm 0,01$ en 0 Ca^{2+} post-CPA). Estos resultados consolidan la idea de que el incremento de calcio citosólico, posterior al bloqueo del canal Hv1, proviene de los depósitos del RE al menos en las células T Jurkat.

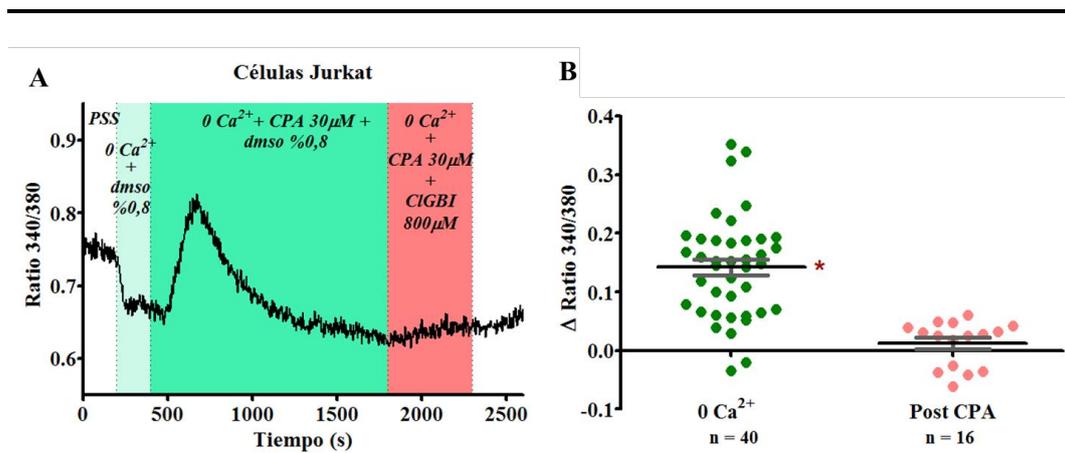


Figura 4.7.5 Efecto del bloqueo del canal Hv1 mediante el **agregado de Cl-GBI $800 \mu\text{M}$** en los niveles de calcio intracitoplasmáticos de células T Jurkat **luego de** la depleción de calcio del retículo endoplasmático mediante el agregado de **CPA $30 \mu\text{M}$ en ausencia de calcio extracelular**. A la izquierda se muestra un registro representativo obtenido y a la derecha los valores individuales, allí se compara con los obtenidos para el Cl-GBI en condición 0 Ca^{2+} de la figura 4.7.4. * indica que ambas poblaciones difieren significativamente entre sí, a su vez la población Post CPA no difiere de cero ($p < 0,05$).

Dadas las evidencias que indican que la respuesta al bloqueo del canal $Hv1$ es dependiente del calcio del RE y que en los diferentes experimentos realizados las células $LT_{control}$ mostraron respuestas de menor magnitud que las células T Jurkat, estudiamos en forma comparativa la capacidad del retículo para generar un aumento de la concentración de calcio citosólica en ambos tipos celulares. Para ello se agregó al medio extracelular CPA $30 \mu M$, en ausencia de calcio extracelular, y se midió el valor del pico de la respuesta obtenida. La figura 4.7.6 muestra registros representativos de los experimentos en ambos tipos celulares (A y B) y los valores de las respuestas (C).

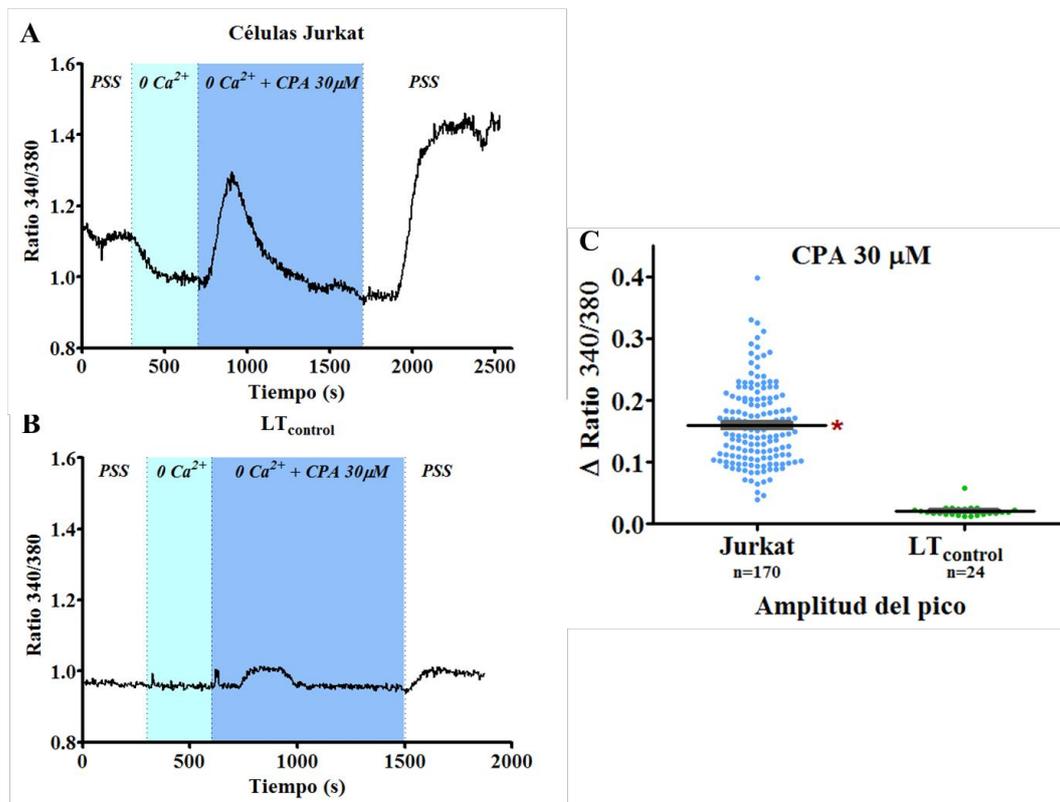


Figura 4.7.6 Registros representativos de la respuesta en los niveles de calcio intracitoplasmático de células T Jurkat (A) y $LT_{control}$ no tumorales (B) al bloqueo de la SERCA mediante CPA $30 \mu M$. Esta respuesta es indicativa de los depósitos de calcio en el retículo endoplasmático. En C se representan los valores de todas las células evaluadas, siendo la línea negra la media de la población y las líneas grises el error. * indica diferencia significativa respecto a los $LT_{control}$ ($p < 0,05$). Resultados de dos (Jurkat) y un ($LT_{control}$) experimento/s independiente/s.

La diferencia en la liberación de calcio del RE entre las células T Jurkat y los linfocitos T normales se asemeja, en magnitud y signo, a la observada en ambos tipos celulares ante el bloqueo del canal Hv1 por Cl-GBI (figura 4.7.3). Por lo tanto, consideramos que la diferencia en los depósitos del RE podría explicar, al menos en parte, la desigualdad entre ambos tipos celulares al tratamiento con Cl-GBI.

Sección 5

Discusión

Los resultados presentados en este trabajo muestran en primer lugar que las células tumorales T Jurkat que se utilizaron para el estudio evocan corrientes iónicas de H^+ con las propiedades distintivas de las corrientes mediadas por los canales Hv1 reportadas en la literatura [9], [43], [50]. Un aspecto particular del canal que lo diferencia del resto de los canales voltaje operados es la lenta cinética de activación evidenciada en los valores de *tau* de activación obtenidos en el rango de segundos, en sintonía con lo observado por Schilling y col. para este tipo celular [43]. Corroboramos que la cinética de activación depende del voltaje de la membrana, de manera que a mayor despolarización de la misma, la probabilidad de apertura del canal alcanza más rápidamente su valor estacionario. En cuanto a la conductancia macroscópica que posee la membrana de estas células para el canal Hv1, la curva G/G_{max} vs V_m obtenida para un ΔpH de 1,5 unidades, refleja que en esas condiciones la probabilidad de apertura del canal depende del voltaje, y muestra que a partir de los -20 mV la membrana tiene una conductancia significativa a los H^+ que aumenta con la despolarización y alcanza un valor del 50 % de la máxima a los 15,1 mV ($V_{1/2}$). También se observa que la dependencia de la corriente (y por ende de G) con el voltaje se modifica sensiblemente por cambios en el gradiente de pH: a menor gradiente de pH es necesaria una mayor despolarización de la membrana para obtener valores significativos de conductancia a los H^+ . También esta propiedad coincide con la reportada para el canal Hv1 para este tipo celular [43].

Por otro lado, demostramos que las corrientes de H^+ , son inhibidas por Zn^{2+} (considerado como el “*gold standard*” para la identificación del canal) y que concentraciones equivalentes a 250 μM logran abolir las corrientes en nuestro modelo celular, confirmando la identidad del canal. Respecto al Cl-GBI (5-chloro-2-guanidinobenzimidazol) que se postula como un bloqueante selectivo del canal y que no había sido reportado su efecto en las células T Jurkat, nuestros resultados indican que el mismo efectivamente inhibe las corrientes de H^+ posicionándolo entonces como una herramienta relevante para evidenciar la función del canal en la regulación del pH_i . Con el mismo propósito, la evaluación electrofisiológica de los efectos de la difenhidramina en células T Jurkat confirma que esta droga inhibe al canal al igual que lo reportado recientemente en células BV12. Teniendo en cuenta que la difenhidramina (DPH) es un conocido antagonista de los receptores de histamina evaluamos también si el efecto sobre el canal Hv1 se encuentra relacionado con este hecho. Los resultados mostraron

que la histamina no modifica las corrientes ni en su magnitud ni en su cinética, tampoco la combinación de histamina y DPH en iguales cantidades afectó la inhibición producida por DPH sola. Por lo tanto, sin ser categóricos, estos resultados sugieren poco probable la relación entre actividad histaminérgica y la inhibición de corrientes de protones. Recientemente Kim y col. [110] demostraron que la inhibición por DPH no modifica el potencial de reversión de la corriente, excluyendo la posibilidad de que el efecto sea producto de la modificación del pH_i por las características básicas de la DPH. Ambas observaciones sugieren un efecto directo de la droga sobre el canal.

Si bien es escaso el conocimiento actual sobre las funciones fisiológicas del canal Hv1 , es lógico pensar que la actividad de transporte de H^+ tendrá un efecto sobre el pH_i . Se ha reportado que determinados estímulos (como PMA y ácido araquidónico), que han puesto en evidencia la función del canal Hv1 , lo activan generando un eflujo de H^+ . Sin embargo, esto no implica que en condiciones de reposo celular exista un eflujo a través del canal. Es decir, no resulta obvio que el mismo sea determinante del pH_i en condiciones basales. En este sentido existen pocas publicaciones que sugieren que, en células tumorales, el canal esté activo en condiciones de reposo. En particular, Wang y col. han reportado la acidificación de células metastásicas de neoplasias de mama (MDA-MB-231) y colorrectales (SW620) posterior a la transfección con ARN de interferencia contra el mensajero del canal Hv1 [247]–[249], así como la acidificación de células provenientes de gliomas (SHG-44) ante el agregado de zinc [250]. En todos los casos citados, en las líneas celulares de menor agresividad, que mostraban una menor expresión del canal, no se observó acidificación intracelular ante la inhibición (líneas MCF-7 de mama, SW480 colorrectales y U-251 de glioblastoma). Por otro lado Ribeiro-Silva y col. han descrito que las células T98G, provenientes de glioblastomas multiformes, se acidifican significativamente ante el agregado de ZnCl_2 al medio de cultivo, pero sólo en ausencia de sodio extracelular [251]. Estos datos muestran que existe una variabilidad del impacto de la actividad del canal Hv1 en el pH_i basal según la línea celular en estudio. Además, en las mencionadas publicaciones no se informa el tiempo de inhibición del canal necesario para generar los efectos acidificantes, ni tampoco el curso temporal de los cambios.

En este trabajo, demostramos que las células T Jurkat provenientes de una leucemia humana se acidifican rápidamente cuando son tratadas en condiciones basales con Zn^{2+} o Cl-GBI los cuales producen la inhibición farmacológica del canal Hv1 . El

análisis del curso temporal del pH_i pone en evidencia que la disminución en el pH_i basal inducida por los inhibidores se manifiesta en tiempos comparables con los observados para la inhibición de la corriente iónica, lo cual apoya la hipótesis que el canal Hv1 está involucrado en la regulación del pH_i . Además los datos indican que el canal también participa en la capacidad de respuesta de la célula luego de una carga ácida ya que la velocidad de recuperación del pH_i disminuye en presencia de los inhibidores del canal. La evaluación de estas propiedades en ausencia de sodio extracelular nos permitió, en un primer análisis, evaluar el rol del canal Hv1 en la regulación del pH_i evitando la actividad de otros transportadores dependientes de Na^+ que podrían haber enmascarado o compensado la inhibición del canal. Posteriormente observamos los mismos resultados en presencia de sodio extracelular, ratificando así que efectivamente la actividad del canal es determinante del pH_i aun cuando otros transportadores de H^+ se encuentran activos y participan también en el establecimiento de dicho parámetro celular. De hecho se puede ver que la caída en el pH_i basal ante el bloqueo del canal Hv1 en presencia de Na^+ es menor que en ausencia del mismo, también la velocidad de recuperación post agregado del ácido propiónico es mayor en los controles en presencia de sodio. Ambos hechos sugieren que los transportadores que mueven equivalentes ácidos junto con el Na^+ (probablemente del tipo NHE) tienen un peso importante en determinar el pH_i pero no alcanzan a suplir una deficiencia en la actividad del canal Hv1.

Los resultados de los ensayos de medición del pH_i luego de períodos prolongados de incubación con los inhibidores del canal complementan lo recientemente mencionado y muestran que los tres inhibidores del canal Hv1 lograron producir acidificación intracelular a las 2 hs de tratamiento, la cual se mantiene a tiempos mayores y se profundiza hacia las 48 hs. Estos ensayos nos permitieron poner a prueba la existencia de respuestas compensatorias del pH_i tanto en la actividad de las estructuras reguladoras del pH_i , como en el metabolismo glucolítico que genera el incremento en la producción de especies ácidas en las células tumorales. Para el caso del Zn^{2+} se observó una acidificación más pronunciada que la inducida por los otros inhibidores a tiempos más prolongados, la cual podría deberse a alteraciones en otros procesos celulares reportadas para este catión [294]. Es interesante señalar también que en estos ensayos, las condiciones de cultivo permiten que la incubación con las drogas se realice en condiciones más cercanas a las fisiológicas que aquellas utilizadas en las

mediciones instantáneas. Particularmente en cultivo se usa un sistema buffer $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ el cual permite la actividad de sistemas de regulación del pH_i del tipo NBC/CA cuya actividad podría estar limitada en las condiciones de los ensayos a tiempos cortos. Además el medio de incubación posee una complejidad de sustratos para la función celular que no están presentes en las otras condiciones.

También observamos que la inhibición del intercambiador NHE con EIPA, logró producir acidificación intracelular, incluso más marcada que la inducida por la inhibición del canal Hv1. En concordancia con los resultados obtenidos a tiempos cortos, estos indican que en el caso de las células T Jurkat las dos estructuras reguladoras estudiadas son críticas para la homeostasis ácido-base a tiempos prolongados, no resultan redundantes y al menos durante 48 hs sus efectos sobre el pH_i no son compensados por otros mecanismos.

Por otro lado, el efecto del inhibidor selectivo Cl-GBI produjo una leve disminución de los niveles de especies reactivas del oxígeno que si bien no resultó estadísticamente significativa muestra una tendencia a ser menor que en condiciones basales control. Dado que una de las funciones más descritas del canal es el acoplamiento funcional a la NADPH oxidasa, este resultado podría ser indicativo de que en las células T Jurkat existe una pobre producción basal de ROS que se inhibe cuando el Hv1 disminuye su actividad debido al bloqueo farmacológico. Este dato concuerda con la idea de que en las células T, al no ser fagocíticas, la relevancia de dicho mecanismo no está claramente establecida. Sin embargo, el comportamiento observado ante el tratamiento con Zn^{2+} , muestra un aumento en la producción de ROS en forma dependiente de la concentración. Esto último puede ser interpretado por el efecto de ciertos metales de transición, en los cuales se incluye el Zn^{2+} , que en altas concentraciones catalizan la producción de ROS mediante las llamadas reacciones fenton [295].

En los mismos trabajos citados más arriba que reportan una asociación entre la función del canal Hv1 y el pH_i en células tumorales, se muestra también que la proliferación celular se ve alterada. En el primero de ellos Wang y col. en 2012 reportaron que la transfección con siRNA para el canal Hv1 en células MDA-MB-231 de cáncer de mama altamente metastásico, redujo la viabilidad celular en cultivos 2D así como el crecimiento de tumores en xenografts murinos [248]. Luego, los mismos

autores obtuvieron resultados similares tratando con Zn^{2+} células SHG-44, provenientes de gliomas altamente metastásicos [250]. Posteriormente, Ribeiro-Silva y col. demostraron que el tratamiento con Zn^{2+} de células de glioblastoma T98G lograba incrementar el porcentaje de células que incorporaban yoduro de propidio, siendo esta la primer evidencia que relaciona la inhibición del canal con la muerte celular [251]. Si bien Wang y col. mencionan la inducción de apoptosis en las células SHG-44, el ensayo realizado de MTT (que evalúa la actividad metabólica por la actividad de oxidoreductasas dependientes de NAD(P)H) no permite discernir entre una merma en el crecimiento celular (por ej. arresto en el ciclo celular) de los diversos procesos de muerte celular.

Nuestro trabajo presenta la primera evidencia de que la inhibición del canal Hv1 y la acidificación que esto produce, puede asociarse a la inducción de apoptosis en células tumorales. Los resultados muestran que la acidificación por inhibición del canal se produce en forma inmediata y se mantiene en el tiempo que dura el proceso de apoptosis y posterior necrosis. Con los tres inhibidores observamos que a las 2 hs ya existe un porcentaje importante de células en proceso de apoptosis que en general deviene en necrosis a las 48 hs. Por lo tanto es posible especular en que la acidificación producida por la inhibición del canal es un evento temprano que inicia el proceso. En este sentido los resultados obtenidos en esta tesis con el antagonista de los receptores H1, difenhidramina, fortalecen esta idea estableciendo un vínculo entre las observaciones de inducción de apoptosis en células T Jurkat por parte de difenhidramina (Jangi y col.) con aquellas donde esta droga inhibe el canal Hv1 en células BV12 (Song y col.). Nuestros resultados muestran que en las células T Jurkat el mencionado antihistamínico produce la inhibición del canal, una consecuente acidificación intracelular y la inducción de apoptosis, todos efectos observados a las mismas concentraciones utilizadas por Jangi y col. A pesar de que estas observaciones fueron reproducidas con diversos antihistamínicos, los mismos autores plantearon evidencias que contradicen la idea de que el efecto sea debido a la interacción con el receptor H1 ya que estos efectos permanecieron inalterados por la presencia de histamina, el tratamiento con α -fluorometilhistidina o la abolición de la expresión del receptor H1. Si bien esto no significa una prueba irrefutable de que el canal Hv1 sea la estructura blanco que explique la apoptosis inducida por difenhidramina, nuestra hipótesis de que la

acidificación generada por la inhibición del canal Hv1 podría ser un evento temprano pro-apoptótico brinda una explicación para las observaciones de Jangi y col.

De acuerdo con esta idea vimos que la inhibición del intercambiador NHE1 genera acidificación intracelular y también altera la proliferación celular en las células T Jurkat. En este caso generando un alto grado de muerte, que en las condiciones evaluadas sugiere un mecanismo necrótico en vez de apoptótico.

Como se describió en la sección 1.3.4 de la introducción, existe una serie de evidencias que demuestran cómo diversas estructuras que desencadenan y ejecutan la apoptosis funcionan más eficientemente en condiciones ácidas (caspasas, nucleasas, etc.). Sin embargo, las observaciones que describen el descenso del pH_i luego de un estímulo pro-apoptótico no necesariamente explican los eventos que ocurren cuando la acidificación en sí es el estímulo apoptótico. Este planteo deriva en el interrogante de ¿qué estructura celular es la responsable de integrar un bajo pH_i como una señal de noxa? Dada la amplia variedad de estructuras afectadas por un cambio en tal parámetro, se puede esperar que la respuesta implique una complejidad considerable. Por otro lado, el hecho que la inhibición del canal Hv1 y del intercambiador NHE1 derivan en la muerte celular por vías distintas (apoptosis y necrosis, respectivamente), nos hace preguntarnos si esto se debe a las diferencias en la magnitud y cinética de acidificación observadas o debido a mecanismos de integración de señales específicos para cada estructura involucrada.

Si bien la hipótesis de trabajo tiene en cuenta el efecto Warburg que se desarrolla en las células tumorales, donde, un alto metabolismo glucolítico genera una gran cantidad de especies ácidas que necesitan ser extruidas para evitar la muerte celular; los ensayos realizados con los inhibidores del canal Hv1 en células PBMC normales mostraron que la inhibición del canal produce muerte de los linfocitos T (CD3+). El tratamiento con los inhibidores produjo un claro efecto necrótico en la población de células CD3+ a concentración similares a las que producen apoptosis en las células tumorales T Jurkat. Sin embargo en el resto de las poblaciones (células CD3-, mayoritariamente linfocitos B) no se observaron cambios. Este resultado muestra en primer lugar que en las células PBMC el efecto inductor de muerte celular es selectivo ya que afecta solo a los linfocitos T y en segundo lugar de la comparación de este efecto con el observado en las células T tumorales surge que las vías por las cuales se

produce la muerte celular son diferentes. Tanto la expresión como la función y regulación del canal podrían considerarse para el planteo de nuevas hipótesis que permitan explicar estas diferencias. Tal como se mencionó en la introducción, se ha reportado que el canal Hv1 se expresa en todas las células del sistema inmune pero que el nivel de expresión es variable entre las mismas. En particular su expresión es menor en linfocitos T normales que en linfocitos B y que en células tumorales Jurkat, en función de este dato esperábamos que la menor expresión del canal reportada para los linfocitos T normales resultase en un menor efecto de muerte. Sin embargo, el resultado fue el contrario, la población CD3⁺ normal luego de 17 hs de incubación con los diferentes inhibidores del canal, presenta un alto porcentaje de muerte celular por necrosis. A raíz de estos resultados pensamos que el canal podría tener una relevancia notable en la homeostasis ácido-base de células T normales pese a su baja expresión, dando su bloqueo una disminución en el pH_i suficiente para ser una señal de daño. Tanto la acidificación como la susceptibilidad a la misma, resultarían particularidades de las células CD3⁺ frente a las células B, las cuales pese a contar con una mayor dotación de canales Hv1 no sufren muerte alguna; esto implicaría que la función del canal es prescindible para la regulación del pH_i de las mismas. En estas células ya ha sido descripta en detalle la función del canal en la activación por BCR, mientras que en los linfocitos T la función del canal no cuenta con estudio alguno.

Otro aspecto poco explorado en este tipo celular, y analizado en este trabajo se relaciona con los efectos que produce la acidificación intracelular sobre la concentración de Ca²⁺ citosólica; especialmente teniendo en cuenta que su variación es importante en la señalización de los procesos de proliferación y muerte celular. Los ensayos realizados muestran que tanto en los linfocitos T normales (CD3⁺) como en las células T tumorales Jurkat, la inhibición del canal Hv1 por CI-GBI produce un aumento del calcio intracelular, aproximadamente 5 veces mayor en las células T Jurkat que en los linfocitos normales CD3⁺. Además, en ambos tipos celulares el incremento en la [Ca²⁺]_i se produce en forma independiente de la presencia de calcio extracelular, sugiriendo que el calcio podría ser liberado desde los depósitos intracelulares. Esta posibilidad se corroboró en las células T Jurkat, en las cuales no se produjo el mencionado aumento cuando previamente se vació el retículo endoplásmico con un estímulo con CPA. La respuesta al CPA nos brindó también una estimación del contenido de calcio del RE en ambos tipos celulares, observando que la respuesta de las

células T Jurkat fue 7 veces mayor respecto de los linfocitos CD3⁺ sugiriendo que en la células Jurkat los depósitos de calcio reticulares constituyen una fuente de calcio más potente que en los linfocitos CD3⁺, lo cual puede explicar la diferencia observada ante el tratamiento con Cl-GBI.

En base a estos resultados podríamos especular que la acidificación generada por el bloqueo del Hv1 induce un aumento en la liberación basal de Ca²⁺ por el retículo o alternativamente una inhibición de la bomba Ca²⁺-ATPasa (SERCA); ambos mecanismos tendrían como consecuencia el aumento del calcio citosólico. Respecto al posible aumento en la liberación basal de calcio, tanto para el receptor de inositol trifosfato (RIP3) como para los receptores de rianodina (RyR), dos estructuras fundamentales en la liberación de calcio del retículo, se ha reportado que modifican la afinidad por el ligando en función del pH citoplasmático [296], [297]. En ambos casos se ha descrito que la afinidad por el ligando aumenta a pHs más alcalinos, lo cual hace improbable la hipótesis de que el aumento observado en respuesta a la acidificación que produce el Cl-GBI sea a través de este mecanismo. Por otro lado Lytton y col. han descrito en sistemas de expresión heteróloga, que la actividad de las tres principales isoformas de las Ca²⁺-ATPasas del retículo (SERCA) es dependiente del pH [282]. Las isoformas 1 y 2 presentan un rango de actividad máxima a pHs entre 6,5 y 7,0, por lo que su actividad decaerá a valores ligeramente alcalinos por encima de 7,0 o a valores ácidos por debajo de 6,5. Sin embargo, la isoforma 3 exhibe un corrimiento de la relación actividad-pH hacia valores más alcalinos, mostrando una actividad máxima a un valor de pH cercano a 7,3, decae a valores menores de 7,3 alcanzando una actividad de aproximadamente 40% de la máxima actividad a valores ácidos (6,5). Esta propiedad sugiere que la isoforma 3 sea el blanco responsable de los efectos observados. En células del sistema inmune y en modelos celulares de leucemias linfoblásticas agudas de células T (células MOLT-4 y Jurkat [298]) la expresión de la SERCA3 es predominante. De esta manera la acidificación inducida por el bloqueo del canal Hv1 podría restringir la actividad de la SERCA3, disminuyendo la recaptación de Ca²⁺ citosólico y derivando en un aumento de la [Ca²⁺]_i. Este planteo concuerda con datos bibliográficos que muestran células T Jurkat cultivadas en medios suplementados con biotina producen una menor expresión de la SERCA3 generando un aumento significativo de los niveles de calcio intracelular respecto a las células control [299]. No obstante, según Lytton y col. sería necesario alcanzar valores de pH marcadamente ácidos para lograr disminuir

considerablemente la actividad de la SERCA3 valores que según nuestras mediciones no se alcanzan en la escala de tiempo en la que se monitorean los niveles de calcio. De cualquier manera hay que tener en cuenta que las mediciones del pH evalúan el valor de la célula en general, lo cual no implica que la vecindad del canal Hv1 no presente valores más ácidos que la media ante el bloqueo; de existir una proximidad intracelular entre la membrana plasmática (canal Hv1) y el RE (SERCA3) la hipótesis mantiene el sentido original.

Más allá de los orígenes del incremento observado en la $[Ca^{2+}]_i$ ante el bloqueo del canal Hv1, resulta natural preguntarse acerca de las consecuencias de tal aumento en la biología de la célula. A pesar de que es difícil poder obtener una respuesta sin más información que la aquí presentada, es lícito pensar que tal aumento pueda jugar un rol en la inducción de la apoptosis. Si bien aumentos en el calcio intracelular forman parte de la señalización de estímulos proliferativos estos son de naturaleza transitorios, mientras que aumentos permanentes son asociados al inicio de la apoptosis [278]. Por ende, para responder estos interrogantes, sería necesario continuar con otros ensayos que nos permitan conocer cuál es la evolución de los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ en una escala de tiempo mayor a la presentada.

Sección 6

Conclusiones

El presente trabajo de tesis doctoral constituye un aporte que permite vincular el conocimiento electrofisiológico del canal de protones Hv1, con funciones celulares de células T tanto tumorales como normales. Los resultados presentados muestran que el rol del canal excede su bien descripta asistencia al complejo NADPH oxidasa durante la producción de especies reactivas del oxígeno, mostrando que en las células T Jurkat es un actor indispensable de su homeostasis ácido-base.

Se puso en evidencia que los bloqueantes del canal producen la acidificación intracelular en una escala de tiempo equivalente a la manifestación electrofisiológica de su inhibición. Si bien en las mencionadas células es evidente una notoria actividad de otros transportadores de protones, los mismos no son capaces de suplir una merma en la actividad del canal Hv1, siendo así tanto a tiempos cortos como durante períodos prolongados de inhibición. Esto muestra que los mecanismos que regulan el pH intracelular de las células T Jurkat no son plenamente redundantes.

En correlación al efecto acidificante se pudo comprobar la inducción de apoptosis por parte de los tres inhibidores del canal Hv1 ensayados, lo cual resultó evidente tanto por la exposición temprana de fosfatidilserina en la membrana externa de las células como en la pérdida de ADN. Estas pruebas constituyen las primeras evidencias que relacionan la inhibición del canal Hv1 con la muerte celular por apoptosis. En contraposición a lo esperado según la hipótesis inicial, la inducción de muerte también se produjo en células T provenientes de sangre periférica. En estas células no se considera a-priori un metabolismo glucolítico que genere una sobreproducción de especies ácidas que impliquen una amenaza para la supervivencia celular, por lo que el fenómeno de necrosis observado representa un punto que requerirá mayor estudio. Este hecho adquiere particular interés a futuro dado que el efecto fue selectivo de los linfocitos T, sin que las células B se vieran afectadas, esto podría ser de importancia más allá de la patología tumoral.

Otro hecho manifestado en este trabajo de tesis es la interrelación de la homeostasis ácido-base de células T con la dinámica del calcio intracelular. Aquí el bloqueo del canal mostró ser suficiente para incrementar los niveles de dicho ión a partir de su liberación de los depósitos reticulares. Esto nos incita a seguir indagando en las consecuencias de dicho aumento y sobre la relación espacial entre el canal Hv1 y el retículo endoplásmico.

Finalmente, podemos concluir en que la inhibición de los canales Hv1 constituye un potencial mecanismo pro-apoptótico en células leucémicas que podría sumarse a la estrategia farmacológica ya planteada en el campo de la oncología experimental para otras estructuras celulares extrusoras de H⁺.

Sección 7

Bibliografía

Bibliografía

- [1] M. Fogel and J. W. Hastings, "Bioluminescence : Mechanism and Mode of Control of Scintillon Activity," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 69, no. 3, pp. 690–693, 1972.
- [2] R. C. Thomas and R. W. Meech, "Hydrogen ion currents and intracellular pH in depolarized voltage-clamped snail neurones," *Nature*, vol. 299, no. 5886, p. 826–8., 1982.
- [3] T. E. DeCoursey, "Hydrogen ion currents in rat alveolar epithelial cells," *Biophys J*, vol. 60, pp. 1243–1253, 1991.
- [4] R. M. Krause, A. Baroffio, M. Hamann, A. Kaelin, C. M. Universitaire, D. Pdiatrie, and C. Universitaire, "A voltage-dependent proton current in cultured human skeletal muscle myotubes," *J. Physiol.*, vol. 470, pp. 313–333, 1993.
- [5] T. E. DeCoursey and V. V Cherny, "Potential, pH, and arachidonate gate hydrogen ion currents in human neutrophils.," *Biophys. J.*, vol. 65, no. 4, pp. 1590–8, 1993.
- [6] R. M. Krause, L. Berrnheim, and C. Bader, "Human skeletal muscle has a voltage-gated proton current," *Neuromuscul. Disord.*, vol. 3, no. 5, pp. 407–411, 1994.
- [7] N. Demaurex, S. Grinstein, M. Jaconi, W. Schlegel, D. P. Lew, and K. Krause, "Proton currents in human granulocytes: regulation by membrane potential and intracellular pH," *J. Physiol.*, vol. 466, pp. 329–344, 1993.
- [8] T. DeCoursey and V. Cherny, "Voltage-activated Hydrogen Ion Currents," *J. Membr. Biol.*, vol. 141, pp. 203–223, 1994.
- [9] T. E. DeCoursey, "Voltage-Gated proton channels and other proton transfer pathways (vol 83, pg 475, 2003)," *Physiol. Rev.*, vol. 84, no. 4, p. 1479, 2004.
- [10] A. Ratanayotha, T. Kawai, S. Higashijima, and Y. Okamura, "Molecular and functional characterization of the voltage-gated proton channel in zebrafish neutrophils," vol. 5, 2017.
- [11] I. S. Ramsey, M. M. Moran, J. A. Chong, and D. E. Clapham, "A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain.," *Nature*, vol. 440, no. 7088, pp. 1213–6, 2006.
- [12] M. Sasaki, M. Takagi, and Y. Okamura, "A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel.," *Science*, vol. 312, no. 5773, pp. 589–592, 2006.
- [13] T. E. DeCoursey, "Voltage-gated proton channels: what's next?," *J. Physiol.*, vol. 586, no. 22, pp. 5305–5324, Nov. 2008.
- [14] T. E. DeCoursey, "Four varieties of voltage-gated proton channels," *Front. Biosci.*, vol. 3, pp. 477–482, 1998.
- [15] T. E. DeCoursey and C. Eder, "Voltage-gated proton channels in microglia," *Prog. Neurobiol.*, vol. 64, pp. 277–305, 2001.

- [16] M. Capasso, M. K. Bhamrah, T. Henley, R. S. Boyd, C. Langlais, K. Cain, D. Dinsdale, K. Pulford, M. Khan, B. Musset, V. V Cherny, D. Morgan, R. D. Gascoyne, E. Vigorito, T. E. DeCoursey, I. C. M. MacLennan, and M. J. S. Dyer, "HVCN1 modulates BCR signal strength via regulation of BCR-dependent generation of reactive oxygen species.," *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 3, pp. 265–72, 2010.
- [17] T. E. DeCoursey, "Voltage-Gated Proton Channels Find Their Dream Job Managing the Respiratory Burst in Phagocytes," *Physiology*, vol. 25, no. 1, pp. 27–40, 2010.
- [18] A. El Chemaly, Y. Okochi, M. Sasaki, S. Arnaudeau, Y. Okamura, and N. Demaurex, "VSOP/Hv1 proton channels sustain calcium entry, neutrophil migration, and superoxide production by limiting cell depolarization and acidification.," *J. Exp. Med.*, vol. 207, no. 1, pp. 129–39, 2010.
- [19] D. Morgan, M. Capasso, B. Musset, V. V. Cherny, E. Rios, M. J. S. Dyer, and T. E. DeCoursey, "Voltage-gated proton channels maintain pH in human neutrophils during phagocytosis," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 42, pp. 18022–18027, 2009.
- [20] Y. Okochi, M. Sasaki, H. Iwasaki, and Y. Okamura, "Voltage-gated proton channel is expressed on phagosomes," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 382, no. 2, pp. 274–279, 2009.
- [21] I. S. Ramsey, E. Ruchti, J. S. Kaczmarek, and D. E. Clapham, "Hv1 proton channels are required for high-level NADPH oxidase-dependent superoxide production during the phagocyte respiratory burst.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 18, pp. 7642–7647, 2009.
- [22] B. Musset, V. V Cherny, D. Morgan, Y. Okamura, I. S. Ramsey, D. E. Clapham, and T. E. DeCoursey, "Detailed comparison of expressed and native voltage-gated proton channel currents.," *J. Physiol.*, vol. 586, no. 10, pp. 2477–86, 2008.
- [23] B. Musset, S. M. E. Smith, S. Rajan, D. Morgan, V. V Cherny, and T. E. DeCoursey, "Aspartate 112 is the selectivity filter of the human voltage-gated proton channel," *Nature*, vol. 480, no. 7376, pp. 273–277, 2011.
- [24] B. Musset, S. M. E. Smith, S. Rajan, V. V Cherny, S. Sujai, D. Morgan, and T. E. DeCoursey, "Zinc inhibition of monomeric and dimeric proton channels suggests cooperative gating.," *J. Physiol.*, vol. 588, no. Pt 9, pp. 1435–1449, 2010.
- [25] T. E. DeCoursey, D. Morgan, B. Musset, and V. V. Cherny, "Insights into the structure and function of H_v1 from a meta-analysis of mutation studies," *J. Gen. Physiol.*, vol. 148, no. 2, pp. 97–118, 2016.
- [26] B. Musset, M. Capasso, V. V. Cherny, D. Morgan, M. Bhamrah, M. J. S. Dyer, and T. E. DeCoursey, "Identification of Thr29 as a critical phosphorylation site that activates the human proton channel Hvcn1 in leukocytes," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 8, pp. 5117–5121, 2010.
- [27] H. P. Koch, T. Kurokawa, Y. Okochi, M. Sasaki, Y. Okamura, and H. P. Larsson, "Multimeric nature of voltage-gated proton channels.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.*

- S. A.*, vol. 105, no. 26, pp. 9111–9116, 2008.
- [28] F. Tombola, M. H. Ulbrich, and E. Y. Isacoff, “The Voltage-Gated Proton Channel Hv1 Has Two Pores, Each Controlled by One Voltage Sensor,” *Neuron*, vol. 58, no. 4, pp. 546–556, 2008.
- [29] S.-Y. Lee, J. A. Letts, and R. MacKinnon, “Dimeric subunit stoichiometry of the human voltage-dependent proton channel Hv1,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 22, pp. 7692–7695, 2008.
- [30] G. L. Petheo, A. Orient, M. Baráth, I. Kovács, B. Réthi, Á. Lányi, A. Rajki, É. Rajnavölgyi, and M. Geiszt, “Molecular and functional characterization of Hv1 proton channel in human granulocytes,” *PLoS One*, vol. 5, no. 11, 2010.
- [31] Y. Fujiwara, T. Kurokawa, K. Takeshita, M. Kobayashi, Y. Okochi, A. Nakagawa, and Y. Okamura, “The cytoplasmic coiled-coil mediates cooperative gating temperature sensitivity in the voltage-gated H⁺channel Hv1,” *Nat. Commun.*, vol. 3, no. May, 2012.
- [32] B. Musset, S. M. E. Smith, S. Rajan, V. V. Cherny, D. Morgan, and T. E. DeCoursey, “Oligomerization of the voltage-gated proton channel,” *Channels (Austin)*, vol. 4, no. 4, pp. 260–265, 2010.
- [33] T. E. DeCoursey, “Voltage-gated proton channels: molecular biology, physiology, and pathophysiology of the H(V) family,” *Physiol. Rev.*, vol. 93, no. 2, pp. 599–652, 2013.
- [34] S. Y. Lee, J. A. Letts, and R. MacKinnon, “Functional Reconstitution of Purified Human Hv1 H⁺Channels,” *J. Mol. Biol.*, vol. 387, no. 5, pp. 1055–1060, 2009.
- [35] V. V. Cherny, R. Murphy, V. Sokolov, R. A. Levis, and T. E. Decoursey, “Properties of Single Voltage-gated Proton Channels in Human Eosinophils Estimated by Noise Analysis and by Direct Measurement The Journal of General Physiology,” vol. 121, no. June, 2003.
- [36] L. Byerly and Y. Suen, “Characterization of proton currents in neurones of the snail, *Lymnaea stagnalis*,” *J. Physiol.*, vol. 413, no. 1, pp. 75–89, Jun. 1989.
- [37] T. E. Decoursey and V. V. Cherny, “Temperature Dependence of Voltage-gated H⁺ Currents in Human Neutrophils, Rat Alveolar Epithelial Cells, and Mammalian Phagocytes,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 112, no. October, pp. 503–522, 1998.
- [38] M. Kuno, H. Ando, H. Morihata, H. Sakai, H. Mori, M. Sawada, and S. Oiki, “Temperature dependence of proton permeation through a voltage-gated proton channel,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 134, no. 3, pp. 191–205, 2009.
- [39] T. E. DeCoursey and V. V. Cherny, “Na⁺-H⁺ antiport detected through hydrogen ion currents in rat alveolar epithelial cells and human neutrophils,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 103, no. May, pp. 755–785, 1994.
- [40] T. E. DeCoursey, V. V. Cherny, D. Morgan, B. Z. Katz, and M. C. Dinauer, “The gp91phox Component of NADPH Oxidase Is Not the Voltage-gated Proton Channel in Phagocytes, but It Helps,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 39, pp.

- 36063–36066, 2001.
- [41] D. V Gordienko, M. Tare, S. Parveen, C. J. Fenech, C. Robinson, and T. B. Bolton, “Voltage-activated proton current in eosinophils from human blood.,” *J. Physiol.*, vol. 496, no. 2, pp. 299–316, 1996.
- [42] A. Kapus, R. Romanek, A. Y. Qu, O. D. Rotstein, and S. Grinstein, “A pH-sensitive and voltage-dependent proton conductance in the plasma membrane of macrophages.,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 102, no. 4, pp. 729–760, 1993.
- [43] T. Schilling, A. Gratopp, T. E. DeCoursey, and C. Eder, “Voltage-activated proton currents in human lymphocytes.,” *J. Physiol.*, vol. 545, no. Pt 1, pp. 93–105, 2002.
- [44] T. E. DeCoursey and V. V. Cherny, “Voltage-activated proton currents in membrane patches of rat alveolar epithelial cells.,” *J. Physiol.*, vol. 489, no. 2, pp. 299–307, Dec. 1995.
- [45] T. E. DeCoursey, V. V. Cherny, A. G. DeCoursey, W. Xu, and L. L. Thomas, “Interactions between NADPH oxidase-related proton and electron currents in human eosinophils,” *J. Physiol.*, vol. 535, no. 3, pp. 767–781, 2001.
- [46] T. E. DeCoursey and V. V. Cherny, “Voltage-activated Proton Currents in Human THP-1 Monocytes,” *J. Membr. Biol.*, vol. 152, no. 2, pp. 131–140, Jul. 1996.
- [47] J. L. Bankers-Fulbright, H. Kita, G. J. Gleich, and S. M. O’Grady, “Regulation of human eosinophil NADPH oxidase activity: a central role for PKCdelta,” *J. Cell Physiol*, vol. 189, no. 0021–9541 (Print), pp. 306–315, 2001.
- [48] T. E. DeCoursey and V. V. Cherny, “Voltage-activated hydrogen ion currents,” *J. Membr. Biol.*, vol. 141, no. 3, pp. 203–223, 2003.
- [49] V. De-la-Rosa, E. Suárez-Delgado, G. E. Rangel-Yescas, and L. D. Islas, “Currents through Hv1 channels deplete protons in their vicinity,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 147, no. 2, pp. 127–136, 2016.
- [50] V. V. Cherny, V. S. Markin, and T. E. DeCoursey, “The voltage-activated hydrogen ion conductance in rat alveolar epithelial cells is determined by the pH gradient,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 105, no. 6, pp. 861–896, 1995.
- [51] T. E. DeCoursey and V. V. Cherny, “Deuterium isotope effects on permeation and gating of proton channels in rat alveolar epithelium.,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 109, no. 4, pp. 415–34, 1997.
- [52] R. C. THOMAS, “Proton Channels in Snail Neurones Does Calcium Entry Mimic the Effects of Proton Influx?,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 574, no. 1, pp. 287–293, Dec. 1989.
- [53] T. Seredenina, N. Demaurex, and K. Krause, “Voltage-Gated Proton Channels as Novel Drug Targets: From NADPH Oxidase Regulation to Sperm Biology.,” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–63, 2014.
- [54] V. Y. F. Wang, W. Huang, M. Asagiri, N. Spann, A. Hoffmann, C. Glass, and G.

- Ghosh, “The Transcriptional Specificity of NF- κ B Dimers Is Coded within the κ B DNA Response Elements,” *Cell Rep.*, vol. 2, no. 4, pp. 824–839, 2012.
- [55] “Repositorio genómico de la University of California Santa Cruz (UCSC).” [Online]. Available: [http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?position = chr12:111086491-111127617&hgid = 339452261&knownGene = pack&hgFind.matches =uc010syd.1](http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?position=chr12:111086491-111127617&hgid=339452261&knownGene=pack&hgFind.matches=uc010syd.1).
- [56] E. Hondares, M. A. Brown, B. Musset, D. Morgan, V. V Cherny, C. Taubert, M. K. Bhamrah, D. Coe, F. Marelli-Berg, J. G. Gribben, M. J. S. Dyer, T. E. DeCoursey, and M. Capasso, “Enhanced activation of an amino-terminally truncated isoform of the voltage-gated proton channel HVCN1 enriched in malignant B cells.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 50, pp. 18078–83, 2014.
- [57] N. Demaurex, G. P. Downey, T. K. Waddell, and S. Grinstein, “Intracellular pH regulation during spreading of human neutrophils,” *J. Cell Biol.*, vol. 133, no. 6, pp. 1391–1402, 1996.
- [58] B. Musset, D. Morgan, V. V Cherny, D. W. MacGlashan, L. L. Thomas, E. Ríos, and T. E. DeCoursey, “A pH-stabilizing role of voltage-gated proton channels in IgE-mediated activation of human basophils.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 31, pp. 11020–5, 2008.
- [59] A. Nanda, A. Gukovskaya, J. Tseng, and S. Grinstein, “Activation of vacuolar-type proton pumps by protein kinase C: Role in neutrophil pH regulation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 32, pp. 22740–22746, 1992.
- [60] M. Kuno, J. Kawawaki, and F. Nakamura, “A highly temperature-sensitive proton current in mouse bone marrow-derived mast cells,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 109, no. 6, pp. 731–740, 1997.
- [61] L. J. Wu, G. Wu, M. R. Akhavan Sharif, A. Baker, Y. Jia, F. H. Fahey, H. R. Luo, E. P. Feener, and D. E. Clapham, “The voltage-gated proton channel Hv1 enhances brain damage from ischemic stroke,” *Nat Neurosci*, vol. 15, no. 4, pp. 565–573, 2012.
- [62] R. Murphy, V. V Cherny, D. Morgan, and T. E. DeCoursey, “Voltage-gated proton channels help regulate pHi in rat alveolar epithelium.,” *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 288, no. 2, pp. L398-408, 2005.
- [63] T. Nordström, O. D. Rotstein, R. Romanek, S. Asotra, J. N. M. Heersche, M. F. Manolson, G. F. Brisseau, and S. Grinstein, “Regulation of cytoplasmic pH in osteoclasts: Contribution of proton pumps and a proton-selective conductance,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 5, pp. 2203–2212, 1995.
- [64] T. Nordström, L. D. Shrode, O. D. Rotstein, R. Romanek, T. Goto, J. N. M. Heersche, M. F. Manolson, G. F. Brisseau, and S. Grinstein, “Chronic Extracellular Acidosis Induces Plasmalemmal Vacuolar Type H + ATPase Activity in Osteoclasts,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 10, pp. 6354–6360, Mar. 1997.
- [65] Y. M. Cheng, T. Kelly, and J. Church, “Potential contribution of a voltage-

- activated proton conductance to acid extrusion from rat hippocampal neurons,” *Neuroscience*, vol. 151, no. 4, pp. 1084–1098, 2008.
- [66] a. Diarra, C. Sheldon, C. L. Brett, K. G. Baimbridge, and J. Church, “Anoxia-evoked intracellular pH and Ca²⁺ concentration changes in cultured postnatal rat hippocampal neurons,” *Neuroscience*, vol. 93, no. 3, pp. 1003–1016, 1999.
- [67] H. Morihata, F. Nakamura, T. Tsutada, and M. Kuno, “Potentiation of a voltage-gated proton current in acidosis-induced swelling of rat microglia,” *J. Neurosci.*, vol. 20, no. 19, pp. 7220–7227, 2000.
- [68] C. Sheldon and J. Church, “Intracellular pH response to anoxia in acutely dissociated adult rat hippocampal CA1 neurons,” *J. Neurophysiol.*, vol. 87, pp. 2209–2224, 2002.
- [69] P. V. Lishko, I. L. Botchkina, A. Fedorenko, and Y. Kirichok, “Acid Extrusion from Human Spermatozoa Is Mediated by Flagellar Voltage-Gated Proton Channel,” *Cell*, vol. 140, no. 3, pp. 327–337, 2010.
- [70] C. a Mawson and M. I. Fischer, “Zinc and carbonic anhydrase in human semen,” *Biochem. J.*, vol. 55, no. 4, pp. 696–700, 1953.
- [71] M. Saaranen, U. Suistomaa, M. Kantola, S. Saarikoski, and T. Vanha-perttula, “Lead, magnesium, selenium and zinc in human seminal fluid: Comparison with semen parameters and fertility,” *Hum. Reprod.*, vol. 2, no. 6, pp. 475–479, 1987.
- [72] S. A. Gunn and T. C. Gould, “Role of Zinc in Fertility and Fecundity in the Rat,” *Am. J. Physiol. Content*, vol. 193, no. 3, pp. 505–508, Jun. 1958.
- [73] D. F. Babcock and D. R. Pfeiffer, “Independent elevation of cytosolic [Ca²⁺] and pH of mammalian sperm by voltage-dependent and pH-sensitive mechanisms,” *J. Biol. Chem.*, vol. 262, no. 31, pp. 15041–15047, 1987.
- [74] A. E. Platts, D. J. Dix, H. E. Chemes, K. E. Thompson, R. Goodrich, J. C. Rockett, V. Y. Rawe, S. Quintana, M. P. Diamond, L. F. Strader, and S. A. Krawetz, “Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 16, no. 7, pp. 763–773, 2007.
- [75] A. El Chemaly, R. Guinamard, M. Demion, N. Fares, V. Jebara, J. F. Faivre, and P. Bois, “A voltage-activated proton current in human cardiac fibroblasts,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 340, no. 2, pp. 512–516, 2006.
- [76] B. Bánfi, J. Schrenzel, O. Nüsse, D. P. Lew, E. Ligeti, K. H. Krause, and N. Demarex, “A novel H(+) conductance in eosinophils: unique characteristics and absence in chronic granulomatous disease,” *J. Exp. Med.*, vol. 190, no. 2, pp. 183–94, 1999.
- [77] J. K. Femling, V. V. Cherny, D. Morgan, B. Rada, A. P. Davis, G. Czirják, P. Enyedi, S. K. England, J. G. Moreland, E. Ligeti, W. M. Nauseef, and T. E. DeCoursey, “The Antibacterial Activity of Human Neutrophils and Eosinophils Requires Proton Channels but Not BK Channels,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 127, no. 6, pp. 659–672, 2006.
- [78] H. Fischer, “Function of proton channels in lung epithelia,” *Wiley Interdiscip.*

- Rev. Membr. Transp. Signal.*, vol. 1, no. 3, pp. 247–258, 2012.
- [79] D. Iovannisci, B. Illek, and H. Fischer, “Function of the HVCN1 proton channel in airway epithelia and a naturally occurring mutation, M91T.,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 136, no. 1, pp. 35–46, 2010.
- [80] R. A. Clark, K. G. Leidal, D. W. Pearson, and W. M. Nauseef, “NADPH Oxidase of Human Neutrophils,” vol. 262, no. 9, pp. 4065–4074, 1987.
- [81] T. E. DeCoursey and E. Ligeti, “Regulation and termination of NADPH oxidase activity,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 62, no. 19–20, pp. 2173–2193, 2005.
- [82] K. Bedard and K.-H. Krause, “The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology,” *Physiol. Rev.*, vol. 87, no. 1, pp. 245–313, 2007.
- [83] T. E. DeCoursey, D. Morgan, and V. V Cherny, “The voltage dependence of NADPH oxidase reveals why phagocytes need proton channels.,” *Nature*, vol. 422, no. 6931, pp. 531–4, 2003.
- [84] L. M. Henderson, J. B. Chappell, and O. T. Jones, “The superoxide-generating NADPH oxidase of human neutrophils is electrogenic and associated with an H⁺ channel.,” *Biochem. J.*, vol. 246, no. 2, pp. 325–9, 1987.
- [85] J. Schrenzel, L. Serrander, B. Bánfi, O. Nüße, R. Fouyouzi, D. P. Lew, N. Demarex, and K. H. Krause, “Electron currents generated by the human phagocyte NADPH oxidase,” *Nature*, vol. 392, no. 6677, pp. 734–737, 1998.
- [86] T. G. Gabig, B. A. Lefker, P. J. Ossanna, and S. J. Weiss, “Proton stoichiometry associated with human neutrophil respiratory- burst reactions,” *J. Biol. Chem.*, vol. 259, no. 21, pp. 13166–13171, 1984.
- [87] L. V. Chernomordik, S. I. Sukharev, S. V. Popov, V. F. Pastushenko, A. V. Sokirko, I. G. Abidor, and Y. A. Chizmadzhev, “The electrical breakdown of cell and lipid membranes: the similarity of phenomenologies,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 902, no. 3, pp. 360–373, Sep. 1987.
- [88] S. Daou, A. El Chemaly, P. Christofilopoulos, L. Bernard, P. Hoffmeyer, and N. Demarex, “The potential role of cobalt ions released from metal prosthesis on the inhibition of Hv1 proton channels and the decrease in *Staphylococcus epidermidis* killing by human neutrophils,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 7, pp. 1769–1777, 2011.
- [89] B. Musset, R. A. Clark, T. E. DeCoursey, G. L. Petheo, M. Geiszt, Y. Chen, J. E. Cornell, C. A. Eddy, R. G. Brzyski, and A. El Jamali, “NOX5 in human spermatozoa: Expression, function, and regulation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 12, pp. 9376–9388, 2012.
- [90] T. E. DeCoursey, V. V. Cherny, W. Zhou, and L. L. Thomas, “Simultaneous activation of NADPH oxidase-related proton and electron currents in human neutrophils,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, no. 12, pp. 6885–6889, 2000.
- [91] V. V Cherny, L. M. Henderson, W. Xu, L. L. Thomas, and T. E. DeCoursey, “Activation of NADPH oxidase-related proton and electron currents in human

- eosinophils by arachidonic acid,” *J. Physiol.*, vol. 535, no. Pt 3, pp. 783–794, 2001.
- [92] B. Musset, V. V. Cherny, and T. E. DeCoursey, “Strong glucose dependence of electron current in human monocytes,” *AJP Cell Physiol.*, vol. 302, no. 1, pp. C286–C295, 2012.
- [93] D. Morgan, V. V. Cherny, A. Finnegan, J. Bollinger, M. H. Gelb, and T. E. DeCoursey, “Sustained activation of proton channels and NADPH oxidase in human eosinophils and murine granulocytes requires PKC but not cPLA2 alpha activity,” *J. Physiol.*, vol. 579, no. Pt 2, pp. 327–344, 2007.
- [94] H. Mori, H. Sakai, H. Morihata, J. Kawawaki, H. Amano, T. Yamano, and M. Kuno, “Regulatory Mechanisms and Physiological Relevance of a Voltage-Gated H⁺,” vol. 18, no. 11, pp. 2069–2076, 2003.
- [95] P. Lacy, D. A. Latif, M. Steward, S. Musat-Marcu, S. F. P. Man, and R. Moqbel, “Divergence of Mechanisms Regulating Respiratory Burst in Blood and Sputum Eosinophils and Neutrophils from Atopic Subjects,” *J. Immunol.*, vol. 170, no. 5, pp. 2670–2679, 2003.
- [96] M. de Boer and D. Roos, “Metabolic comparison between basophils and other leukocytes from human blood,” *J. Immunol.*, vol. 136, no. 9, pp. 3447–54, May 1986.
- [97] T. E. Cherny, V. V., Thomas, L. L., & DeCoursey, “Voltage-gated proton currents in human basophils,” *Biol. Membr.*, vol. 18, no. 6, pp. 458–465, 2001.
- [98] J. Schrenzel, D. P. Lew, and K. H. Krause, “Proton currents in human eosinophils,” *Am. J. Physiol. Physiol.*, vol. 271, no. 6, pp. C1861–C1871, Dec. 1996.
- [99] K. Káldi, K. Szászi, G. Koncz, K. Suszták, and E. Ligeti, “Arachidonic acid activatable electrogenic H⁺ transport in the absence of cytochrome b₅₅₈ in human T lymphocytes,” *FEBS Lett.*, vol. 381, no. 1–2, pp. 156–160, 1996.
- [100] M. Sasaki, A. Tojo, Y. Okochi, N. Miyawaki, D. Kamimura, A. Yamaguchi, M. Murakami, and Y. Okamura, “Autoimmune disorder phenotypes in Hvcn1-deficient mice,” *Biochem. J.*, vol. 450, pp. 295–301, 2013.
- [101] A. R. Taylor, C. Brownlee, and G. L. Wheeler, “Proton channels in algae: Reasons to be excited,” *Trends Plant Sci.*, vol. 17, no. 11, pp. 675–684, 2012.
- [102] D. Morgan, B. Musset, V. V. Cherny, S. M. E. Smith, W. Hastings, and T. E. DeCoursey, “Bioluminescence of Scintillons Isolated from *Noctiluca Miliaris* is Inhibited by Divalent Metal Cations, Suggesting Proton Channel Involvement,” *Biophys. J.*, vol. 102, no. 3, p. 575a, 2012.
- [103] V. V. Cherny and T. E. DeCoursey, “pH-dependent inhibition of voltage-gated H⁽⁺⁾ currents in rat alveolar epithelial cells by Zn⁽²⁺⁾ and other divalent cations,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 114, no. 6, pp. 819–838, 1999.
- [104] K. Takeshita, S. Sakata, E. Yamashita, Y. Fujiwara, A. Kawanabe, T. Kurokawa,

- Y. Okochi, M. Matsuda, H. Narita, Y. Okamura, and A. Nakagawa, "X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel.," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 21, no. 4, pp. 352–7, 2014.
- [105] A. R. A. Alabi, M. I. Bahamonde, H. J. Jung, J. Il Kim, and K. J. Swartz, "Portability of paddle motif function and pharmacology in voltage sensors," *Nature*, vol. 450, no. 7168, pp. 370–375, 2007.
- [106] L. O. U. Byerly, R. Meech, and W. J. Moody, "Rapidly Activating Hydrogen Ion Currents in Perfused Neurones of the Snail, LYMNAEA STAGNALIS," *J. Physiol.*, vol. 351, pp. 199–216, 1984.
- [107] C. Eder, H. G. Fischer, U. Hadding, and U. Heinemann, "Properties of voltage-gated currents of microglia developed using macrophage colony-stimulating factor," *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 430, no. 4, pp. 526–533, 1995.
- [108] J. H. Song, W. Marszalec, L. Kai, J. Z. Yeh, and T. Narahashi, "Antidepressants inhibit proton currents and tumor necrosis factor- α production in BV2 microglial cells," *Brain Res.*, vol. 1435, pp. 15–23, 2012.
- [109] H. Shin and J. H. Song, "Antipsychotics, chlorpromazine and haloperidol inhibit voltage-gated proton currents in BV2 microglial cells," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 738, pp. 256–262, 2014.
- [110] J. Kim and J.-H. Song, "Inhibitory effects of antihistamines, diphenhydramine and chlorpheniramine, on proton currents in BV2 microglial cells," *Eur. J. Pharmacol.*, 2017.
- [111] T. E. Decoursey, "The voltage-gated proton channel: A riddle, wrapped in a mystery, inside an enigma," *Biochemistry*, vol. 54, no. 21, pp. 3250–3268, 2015.
- [112] L. Hong, M. M. Pathak, I. H. Kim, D. Ta, and F. Tombola, "Voltage-Sensing Domain of Voltage-Gated Proton Channel Hv1 Shares Mechanism of Block with Pore Domains," *Neuron*, vol. 77, no. 2, pp. 274–287, 2013.
- [113] L. Hong, I. H. Kim, and F. Tombola, "Molecular determinants of Hv1 proton channel inhibition by guanidine derivatives.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 27, pp. 9971–6, 2014.
- [114] S. T. Whitten, B. Garcia-Moreno E., and V. J. Hilser, "Local conformational fluctuations can modulate the coupling between proton binding and global structural transitions in proteins," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 12, pp. 4282–4287, 2005.
- [115] W. Boron, "Regulation of intracellular pH," *Adv. Physiol. Educ.*, vol. 28, pp. 160–179, 2004.
- [116] N. Sperelakis, *Cell Physiology Source Book*. San Diego: Academic Press, 1997.
- [117] J. R. Casey, S. Grinstein, and J. Orłowski, "Sensors and regulators of intracellular pH.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, no. 1, pp. 50–61, 2010.
- [118] S. K. Parks, J. Chiche, and J. Pouyssegur, "Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 13, no. 9, pp. 611–

- 623, 2013.
- [119] P. S. Aronson, "KINETIC PROPERTIES OF THE PLASMA MEMBRANE Na⁺-H⁺ EXCHANGER," *J. Gen. Physiol.*, vol. 3, pp. 36–38, 1985.
- [120] S. Paris and J. Pouyssegur, "Growth factors activate the Na⁺/H⁺ antiporter in quiescent fibroblasts by increasing its affinity for intracellular H⁺," *J. Biol. Chem.*, vol. 259, no. 17, pp. 10989–10994, 1984.
- [121] F. Cuello, A. K. Snabaitis, M. S. Cohen, J. Taunton, and M. Avkiran, "Evidence for Direct Regulation of Myocardial Na⁺/H⁺ Exchanger Isoform 1 Phosphorylation and Activity by 90-kDa Ribosomal S6 Kinase (RSK): Effects of the Novel and Specific RSK Inhibitor fmk on Responses to 1-Adrenergic Stimulation," *Mol. Pharmacol.*, vol. 71, no. 3, pp. 799–806, 2006.
- [122] W. Yan, K. Nehrke, J. Choi, and D. L. Barber, "The Nck-interacting Kinase (NIK) Phosphorylates the Na⁺-H⁺ Exchanger NHE1 and Regulates NHE1 Activation by Platelet-derived Growth Factor," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 33, pp. 31349–31356, 2001.
- [123] O. Aharonovitz, H. C. Zaun, T. Balla, J. D. York, J. Orłowski, and S. Grinstein, "Intracellular pH regulation by Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate," *J. Cell Biol.*, vol. 150, no. 1, pp. 213–24, 2000.
- [124] T. Pang, S. Wakabayashi, and M. Shigekawa, "Expression of calcineurin B homologous protein 2 protects serum deprivation-induced cell death by serum-independent activation of Na⁺/H⁺ exchanger," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 46, pp. 43771–43777, 2002.
- [125] S. P. Denker, D. C. Huang, J. Orłowski, H. Furthmayr, and D. L. Barber, "Direct binding of the Na-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H⁺ translocation," *Mol. Cell*, vol. 6, no. 6, pp. 1425–1436, 2000.
- [126] M. E. Meima, J. R. Mackley, and D. L. Barber, "Beyond ion translocation: Structural functions of the sodium-hydrogen exchanger isoform-1," *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, vol. 16, no. 4, pp. 365–372, 2007.
- [127] S. P. Denker and D. L. Barber, "Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1," *J. Cell Biol.*, vol. 159, no. 6, pp. 1087–1096, 2002.
- [128] C. Stock and A. Schwab, "Role of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 in cell migration," *Acta Physiol.*, vol. 187, no. 1–2, pp. 149–157, 2006.
- [129] H. Hayashi, O. Aharonovitz, R. T. Alexander, N. Touret, W. Furuya, J. Orłowski, and S. Grinstein, "Na² / H² exchange and pH regulation in the control of neutrophil chemokinesis and chemotaxis," vol. 8, pp. 526–534, 2008.
- [130] H. Patel and D. L. Barber, "A developmentally regulated Na-H exchanger in *Dictyostelium discoideum* is necessary for cell polarity during chemotaxis," *J. Cell Biol.*, vol. 169, no. 2, pp. 321–329, 2005.

- [131] L. K. Putney and D. L. Barber, "Na-H Exchange-dependent Increase in Intracellular pH Times G2/M Entry and Transition," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 45, pp. 44645–44649, 2003.
- [132] A. Kapus, S. Grinstein, S. Wasan, R. Kandasamy, and J. Orłowski, "Functional characterization of three isoforms of the Na⁺/H⁺ exchanger stably expressed in Chinese hamster ovary cells. ATP dependence, osmotic sensitivity, and role in cell proliferation," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 38, pp. 23544–23552, 1994.
- [133] A. P. Halestrap and D. Meredith, "The SLC16 gene family - From monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond," *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 447, no. 5, pp. 619–628, 2004.
- [134] J. I. Vandenberg, J. C. Metcalfe, and A. A. Grace, "Mechanisms of pHi recovery after global ischemia in the perfused heart," *Circ Res*, vol. 72, no. 5, pp. 993–1003, 1993.
- [135] S. Pastorekova, S. Parkkila, J. Pastorek, and C. T. Supuran, "Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects," *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 19, no. 3, pp. 199–229, Jan. 2004.
- [136] C. T. Supuran, "Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, no. 2, pp. 168–181, Feb. 2008.
- [137] D. Sterling and J. R. Casey, "Transport activity of AE3 chloride/bicarbonate anion-exchange proteins and their regulation by intracellular pH," *Biochem. J.*, vol. 344 Pt 1, pp. 221–229, 1999.
- [138] D. S. Goldfarb, "A Guide to the Translocation Channel of the Nuclear Pore Complex," in *Nuclear Transport*, Kehlenbach and R., Eds. Austin: Landes Bioscience, 2009.
- [139] M. Forgac, "Vacuolar ATPases: Rotary proton pumps in physiology and pathophysiology," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 11, pp. 917–929, 2007.
- [140] F. B. Schapiro and S. Grinstein, "Determinants of the pH of the Golgi complex," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 28, pp. 21025–21032, 2000.
- [141] O. A. Weisz, "Organelle acidification and disease," *Traffic*, vol. 4, no. 2, pp. 57–64, 2003.
- [142] A. Jankowski, J. H. Kim, R. F. Collins, R. Daneman, P. Walton, and S. Grinstein, "In Situ Measurements of the pH of Mammalian Peroxisomes Using the Fluorescent Protein pHluorin," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 52, pp. 48748–48763, 2001.
- [143] M. F. Cano Abad, G. Di Benedetto, P. J. Magalhães, L. Filippin, and T. Pozzan, "Mitochondrial pH Monitored by a New Engineered Green Fluorescent Protein Mutant," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 12, pp. 11521–11529, 2004.
- [144] G. P. Brierley, K. Baysal, and D. W. Jung, "Cation transport systems in mitochondria: Na⁺ and K⁺ uniports and exchangers," *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 26, no. 5, pp. 519–26, 1994.

- [145] M. CROMPTON and I. HEID, "The Cycling of Calcium, Sodium, and Protons Across the Inner Membrane of Cardiac Mitochondria," *Eur. J. Biochem.*, vol. 91, no. 2, pp. 599–608, 1978.
- [146] T. E. Gunter, K. K. Gunter, S. S. Sheu, and C. E. Gavin, "Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance," *Am. J. Physiol. Physiol.*, vol. 267, no. 2, pp. C313–C339, Aug. 1994.
- [147] J. G. McCormack, A. P. Halestrap, and R. M. Denton, "Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism," *Physiol. Rev.*, vol. 70, no. 2, pp. 391–425, Apr. 1990.
- [148] S. Matsuyama, J. Llopis, Q. L. Deveraux, R. Y. Tsien, and J. C. Reed, "Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis," *Nat. Cell Biol.*, vol. 2, no. 6, pp. 318–325, 2000.
- [149] C. J. Deutsch, A. Holian, S. K. Holian, R. P. Daniele, and D. F. Wilson, "Transmembrane electrical and pH gradients across human erythrocytes and human peripheral lymphocytes," *J. Cell. Physiol.*, vol. 99, no. 1, pp. 79–93, Apr. 1979.
- [150] C. Deutsch, "Regulation of intracellular pH by human peripheral blood lymphocytes as measured by ¹⁹F NMR," vol. 79, no. December, pp. 7944–7948, 1982.
- [151] D. F. Gerson and H. Kiefer, "High intracellular pH accompanies mitotic activity in murine lymphocytes," *J. Cell. Physiol.*, vol. 112, no. 1, pp. 1–4, Jul. 1982.
- [152] D. F. Gerson and H. Kiefer, "Intracellular pH and the cell cycle of mitogen-stimulated murine lymphocytes," *J. Cell. Physiol.*, vol. 114, no. 1, pp. 132–136, Jan. 1983.
- [153] S. Grinstein, "Activation of Na⁺/H⁺ exchange in lymphocytes by osmotically induced volume changes and by cytoplasmic acidification," *J. Gen. Physiol.*, vol. 82, no. 5, pp. 619–638, Nov. 1983.
- [154] S. Grinstein, "Cytoplasmic pH regulation in thymic lymphocytes by an amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ antiport," *J. Gen. Physiol.*, vol. 83, no. 3, pp. 341–369, Mar. 1984.
- [155] O. Warburg, "The Metabolism of Carcinoma Cells," *Cancer*, vol. 9, no. 1, 1925.
- [156] O. et al. Warburg, "Ueber den stoffwechsel der tumoren.," *Biochem. Zeitschrift*, vol. 152, pp. 319–344, 1924.
- [157] H. G. Crabtree, "Observations on the carbohydrate metabolism of tumours," *Biochem. J.*, vol. 23, p. 536, 1929.
- [158] M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, and C. B. Thompson, "Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation," *Science (80-.)*, vol. 324, no. 5930, pp. 1029–1033, May 2009.
- [159] J. W. Locasale and L. C. Cantley, "Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth," *Cell Metab.*, vol. 14, no. 4, pp. 443–451, 2011.

- [160] A. A. Shestov, X. Liu, Z. Ser, A. A. Cluntun, Y. P. Hung, L. Huang, D. Kim, A. Le, G. Yellen, J. G. Albeck, and J. W. Locasale, “Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step,” *Elife*, vol. 3, no. July2014, pp. 1–18, 2014.
- [161] T. Pfeiffer, S. Schuster, and S. Bonhoeffer, “Cooperation and Competition in the Evolution of ATP-Producing Pathways,” *Science (80-.)*, vol. 292, no. 5516, pp. 504–507, 2001.
- [162] N. Slavov, B. A. Budnik, D. Schwab, E. M. Airoidi, and A. van Oudenaarden, “Constant Growth Rate Can Be Supported by Decreasing Energy Flux and Increasing Aerobic Glycolysis,” *Cell Rep.*, vol. 7, no. 3, pp. 705–714, 2014.
- [163] S. Y. Lunt and M. G. Vander Heiden, “Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 27, no. 1, pp. 441–464, 2011.
- [164] C. Sebastián and R. Mostoslavsky, “Untangling the fiber yarn: Butyrate feeds warburg to suppress colorectal cancer,” *Cancer Discov.*, vol. 4, no. 12, pp. 1368–1370, 2014.
- [165] E. A. Mazzi, N. Boukli, N. Rivera, and K. F. A. Soliman, “Pericellular pH homeostasis is a primary function of the warburg effect: Inversion of metabolic systems to control lactate steady state in tumor cells,” *Cancer Sci.*, vol. 103, no. 3, pp. 422–432, 2012.
- [166] P. S. Ward and C. B. Thompson, “Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate,” *Cancer Cell*, vol. 21, no. 3, pp. 297–308, 2012.
- [167] M. Shanmugam, S. K. McBrayer, and S. T. Rosen, “Targeting the Warburg effect in hematological malignancies: from PET to therapy,” *Curr. Opin. Oncol.*, vol. 21, no. 6, pp. 531–6, 2009.
- [168] H. Ying, A. C. Kimmelman, C. A. Lyssiotis, S. Hua, G. C. Chu, E. Fletcher-Sananikone, J. W. Locasale, J. Son, H. Zhang, J. L. Coloff, H. Yan, W. Wang, S. Chen, A. Viale, H. Zheng, J. H. Paik, C. Lim, A. R. Guimaraes, E. S. Martin, J. Chang, A. F. Hezel, S. R. Perry, J. Hu, B. Gan, Y. Xiao, J. M. Asara, R. Weissleder, Y. A. Wang, L. Chin, L. C. Cantley, and R. A. Depinho, “Oncogenic kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism,” *Cell*, vol. 149, no. 3, pp. 656–670, 2012.
- [169] A. H. Shain, I. Yeh, I. Kovalyshyn, A. Sriharan, E. Talevich, A. Gagnon, R. Dummer, J. North, L. Pincus, B. Ruben, W. Rickaby, C. D’Arrigo, A. Robson, and B. C. Bastian, “The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 373, no. 20, pp. 1926–1936, 2015.
- [170] D. Molenaar, R. Van Berlo, D. De Ridder, and B. Teusink, “Shifts in growth strategies reflect tradeoffs in cellular economics,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 5, no. 323, pp. 1–10, 2009.
- [171] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: The next generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.

- [172] C. H. Chang, J. Qiu, D. O'Sullivan, M. D. Buck, T. Noguchi, J. D. Curtis, Q. Chen, M. Gindin, M. M. Gubin, G. J. W. Van Der Windt, E. Tonc, R. D. Schreiber, E. J. Pearce, and E. L. Pearce, "Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression," *Cell*, vol. 162, no. 6, pp. 1229–1241, 2015.
- [173] P. C. Ho, J. D. Bihuniak, A. N. MacIntyre, M. Staron, X. Liu, R. Amezquita, Y. C. Tsui, G. Cui, G. Micevic, J. C. Perales, S. H. Kleinstein, E. D. Abel, K. L. Insogna, S. Feske, J. W. Locasale, M. W. Bosenberg, J. C. Rathmell, and S. M. Kaech, "Phosphoenolpyruvate Is a Metabolic Checkpoint of Anti-tumor T Cell Responses," *Cell*, vol. 162, no. 6, pp. 1217–1228, 2015.
- [174] K. M. Kennedy, P. M. Scarbrough, A. Ribeiro, R. Richardson, H. Yuan, P. Sonveaux, C. D. Landon, J.-T. Chi, S. Pizzo, T. Schroeder, and M. W. Dewhirst, "Catabolism of Exogenous Lactate Reveals It as a Legitimate Metabolic Substrate in Breast Cancer," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, p. e75154, Sep. 2013.
- [175] S. Dhup, R. Kumar Dadhich, P. Ettore Porporato, and P. Sonveaux, "Multiple Biological Activities of Lactic Acid in Cancer: Influences on Tumor Growth, Angiogenesis and Metastasis," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 18, no. 10, pp. 1319–1330, Apr. 2012.
- [176] P. Sonveaux, T. Copetti, C. J. De Saedeleer, F. Végran, J. Verrax, K. M. Kennedy, E. J. Moon, S. Dhup, P. Danhier, F. Frérart, B. Gallez, A. Ribeiro, C. Michiels, M. W. Dewhirst, and O. Feron, "Targeting the Lactate Transporter MCT1 in Endothelial Cells Inhibits Lactate-Induced HIF-1 Activation and Tumor Angiogenesis," *PLoS One*, vol. 7, no. 3, p. e33418, Mar. 2012.
- [177] P. Sonveaux, F. Végran, T. Schroeder, M. C. Wergin, J. Verrax, Z. N. Rabbani, C. J. De Saedeleer, K. M. Kennedy, C. Diepart, B. F. Jordan, M. J. Kelley, B. Gallez, M. L. Wahl, O. Feron, and M. W. Dewhirst, "Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice," *J. Clin. Invest.*, Nov. 2008.
- [178] R. J. Gillies, N. Raghunand, G. S. Karczmar, and Z. M. Bhujwalla, "MRI of the tumor microenvironment," *J. Magn. Reson. Imaging*, vol. 16, no. 4, pp. 430–450, 2002.
- [179] A. I. Hashim, X. Zhang, J. W. Wojtkowiak, G. V. Martinez, and R. J. Gillies, "Imaging pH and metastasis," *NMR Biomed.*, vol. 24, no. 6, pp. 582–591, 2011.
- [180] V. Estrella, T. Chen, M. Lloyd, J. Wojtkowiak, H. H. Cornell, A. Ibrahim-Hashim, K. Bailey, Y. Balagurunathan, J. M. Rothberg, B. F. Sloane, J. Johnson, R. A. Gatenby, and R. J. Gillies, "Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion," *Cancer Res.*, vol. 73, no. 5, pp. 1524–1535, 2013.
- [181] R. A. Gatenby and E. T. Gawlinski, "A Reaction-Diffusion Model of Cancer Invasion," *Cancer Res.*, vol. 56, no. 31, pp. 5745–5753, 1996.
- [182] R. Martínez-Zaguilán, E. a Seftor, R. E. Seftor, Y. W. Chu, R. J. Gillies, and M. J. Hendrix, "Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 14, no. 2, pp. 176–186, 1996.

- [183] E. K. Rofstad, B. Mathiesen, K. Kindem, and K. Galappathi, “Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 13, pp. 6699–6707, 2006.
- [184] C. M. Holman, C. C. Kan, M. R. Gehring, and H. E. Van Wart, “Role of His-224 in the anomalous pH dependence of human stromelysin-1,” *Biochemistry*, vol. 38, no. 2, pp. 677–681, 1999.
- [185] O. R. Colegio, N. Q. Chu, A. L. Szabo, T. Chu, A. M. Rhebergen, V. Jairam, N. Cyrus, C. E. Brokowski, S. C. Eisenbarth, G. M. Phillips, G. W. Cline, A. J. Phillips, and R. Medzhitov, “Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid,” *Nature*, vol. 513, no. 7519, pp. 559–563, 2014.
- [186] A. Calcinotto, P. Filipazzi, M. Grioni, M. Iero, A. De Milito, A. Ricupito, A. Cova, R. Canese, E. Jachetti, M. Rossetti, V. Huber, G. Parmiani, L. Generoso, M. Santinami, M. Borghi, S. Fais, M. Bellone, and L. Rivoltini, “Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor-infiltrating T lymphocytes,” *Cancer Res.*, vol. 72, no. 11, pp. 2746–2756, 2012.
- [187] Z. Omran, P. Scaife, S. Stewart, and C. Rauch, “Physical and biological characteristics of multi drug resistance (MDR): An integral approach considering pH and drug resistance in cancer,” *Semin. Cancer Biol.*, pp. 1–7, 2017.
- [188] S. Faes, A. P. Duval, A. Planche, E. Uldry, T. Santoro, C. Pythoud, J. C. Stehle, J. Horlbeck, I. Letovanec, N. Riggi, N. Demartines, and O. Dormond, “Acidic tumor microenvironment abrogates the efficacy of mTORC1 inhibitors,” *Mol. Cancer*, vol. 15, no. 1, pp. 1–11, 2016.
- [189] S. Faes, A. Planche, E. Uldry, T. Santoro, C. Pythoud, J.-C. Stehle, J. Horlbeck, I. Letovanec, N. Riggi, D. Datta, N. Demartines, and O. Dormond, “Targeting carbonic anhydrase IX improves the anti-cancer efficacy of mTOR inhibitors,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 24, 2016.
- [190] M. Bohloli, A. Atashi, M. Soleimani, S. Kaviani, and A. Anbarlou, “Investigating Effects of Acidic pH on Proliferation, Invasion and Drug-Induced Apoptosis in Lymphoblastic Leukemia,” *Cancer Microenviron.*, vol. 9, no. 2–3, pp. 119–126, 2016.
- [191] S. K. Parks and J. Pouyssegur, “Targeting pH regulating proteins for cancer therapy – Progress and Limitations,” *Semin. Cancer Biol.*, 2017.
- [192] S. K. Parks, J. Chiche, and J. Pouyssegur, “Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, no. 9, pp. 611–23, 2013.
- [193] J. D. Johnson, D. Epel, and M. Paul, “Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilisation,” *Nature*, vol. 262, no. 5570, pp. 661–664, Aug. 1976.
- [194] G. L’Allemain, S. Paris, and J. Pouyssegur, “Growth factor action and intracellular pH regulation in fibroblasts,” *J Biol Chem*, vol. 259, no. 9, pp. 5809–5815, 1984.

- [195] A. D. Balgi, G. H. Diering, E. Donohue, K. K. Y. Lam, B. D. Fonseca, C. Zimmerman, M. Numata, and M. Roberge, “Regulation of mTORC1 signaling by pH,” *PLoS One*, vol. 6, no. 6, 2011.
- [196] J. Pouysstgur, C. Sardet, A. Franchi, G. L ’allemain, and S. Paris, “A specific mutation abolishing Na⁺/H⁺ antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic pH (H⁺-suicide selection/cytoplasmic pH/Na⁺ influx/growth control/somatic cell genetics),” *Cell Biol.*, vol. 81, no. August, pp. 4833–4837, 1984.
- [197] R. Le Floch, J. Chiche, I. Marchiq, T. Naiken, K. Ilc, C. M. Murray, S. E. Critchlow, D. Roux, M.-P. Simon, and J. Pouyssegur, “CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 40, pp. 16663–16668, Oct. 2011.
- [198] K. E. Wellen and C. B. Thompson, “A two-way street: Reciprocal regulation of metabolism and signalling,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 4, pp. 270–276, 2012.
- [199] C. Lu and C. B. Thompson, “Metabolic regulation of epigenetics,” *Cell Metab.*, vol. 16, no. 1, pp. 9–17, 2012.
- [200] C. Sebastián and R. Mostoslavsky, “The role of mammalian sirtuins in cancer metabolism,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 43, pp. 33–42, 2015.
- [201] K. E. Wellen and C. B. Thompson, “A two-way street: Reciprocal regulation of metabolism and signalling,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 4, pp. 270–276, 2012.
- [202] C. Lu and C. B. Thompson, “Metabolic regulation of epigenetics,” *Cell Metab.*, vol. 16, no. 1, pp. 9–17, 2012.
- [203] J. Luo and I. F. Tannock, “Inhibition of the regulation of intracellular pH: Potential of 5-(N, N-hexamethylene) amiloride in tumour-selective therapy,” *Br. J. Cancer*, vol. 70, no. 4, pp. 617–624, 1994.
- [204] I. N. Rich, D. Worthington-White, O. a Garden, and P. Musk, “Apoptosis of leukemic cells accompanies reduction in intracellular pH after targeted inhibition of the Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger.,” *Blood*, vol. 95, no. 4, pp. 1427–1434, 2000.
- [205] A. P. Kumar, A. L. Quake, M. K. X. Chang, T. Zhou, K. S. Y. Lim, R. Singh, R. E. Hewitt, M. Salto-Tellez, S. Pervaiz, and M.-V. Clement, “Repression of NHE1 Expression by PPAR Activation Is a Potential New Approach for Specific Inhibition of the Growth of Tumor Cells In vitro and In vivo,” *Cancer Res.*, vol. 69, no. 22, pp. 8636–8644, 2009.
- [206] A. R. Beltrán, M. A. Ramírez, L. R. Carraro-Lacroix, Y. Hiraki, N. A. Rebouças, and G. Malnic, “NHE1, NHE2, and NHE4 contribute to regulation of cell pH in T84 colon cancer cells,” *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 455, no. 5, pp. 799–810, 2008.
- [207] S. J. Reshkin, A. Bellizzi, R. A. Cardone, M. Tommasino, V. Casavola, and A. Paradiso, “Paclitaxel Induces Apoptosis via Protein Kinase A- and p38 Mitogen-

- activated Protein-dependent Inhibition of the Na⁺ / H⁺ Exchanger (NHE) NHE Isoform 1 in Human Breast Cancer Cells 1,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 9, no. June, pp. 2366–2373, 2003.
- [208] R. M. Mentzer, C. Bartels, R. Bolli, S. Boyce, G. D. Buckberg, B. Chaitman, A. Haverich, J. Knight, P. Menasché, M. L. Myers, J. Nicolau, M. Simoons, L. Thulin, and R. D. Weisel, “Sodium-Hydrogen Exchange Inhibition by Cariporide to Reduce the Risk of Ischemic Cardiac Events in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting: Results of the EXPEDITION Study,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 85, no. 4, pp. 1261–1270, Apr. 2008.
- [209] D. Neri and C. T. Supuran, “Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 10, no. 10, pp. 767–777, 2011.
- [210] R. M. Mentzer, C. Bartels, R. Bolli, S. Boyce, G. D. Buckberg, B. Chaitman, A. Haverich, J. Knight, P. Menasché, M. L. Myers, J. Nicolau, M. Simoons, L. Thulin, and R. D. Weisel, “Sodium-Hydrogen Exchange Inhibition by Cariporide to Reduce the Risk of Ischemic Cardiac Events in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting: Results of the EXPEDITION Study,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 85, no. 4, pp. 1261–1270, Apr. 2008.
- [211] C. C. Wykoff, N. J. P. Beasley, P. H. Watson, K. J. Turner, J. Pastorek, A. Sibtain, G. D. Wilson, H. Turley, K. L. Talks, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, and A. L. Harris, “Hypoxia-inducible Expression of Tumor-associated Carbonic Anhydrases Hypoxia-inducible Expression of Tumor-associated Carbonic Anhydrases 1,” *Cancer Res.*, no. 13, pp. 7075–7083, 2000.
- [212] D. Neri and C. T. Supuran, “Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 10, no. 10, pp. 767–777, 2011.
- [213] E. Švastová, A. Hulíková, M. Rafajová, M. Zat’ovičová, A. Gibadulinová, A. Casini, A. Cecchi, A. Scozzafava, C. T. Supuran, J. Pastorek, and S. Pastoreková, “Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH,” *FEBS Lett.*, vol. 577, no. 3, pp. 439–445, Nov. 2004.
- [214] P. Swietach, A. Hulikova, R. D. Vaughan-Jones, and A. L. Harris, “New insights into the physiological role of carbonic anhydrase IX in tumour pH regulation,” *Oncogene*, vol. 29, no. 50, pp. 6509–6521, Dec. 2010.
- [215] J. Chiche, K. Ilc, J. Laferriere, E. Trottier, F. Dayan, N. M. Mazure, M. C. Brahim-Horn, and J. Pouyssegur, “Hypoxia-Inducible Carbonic Anhydrase IX and XII Promote Tumor Cell Growth by Counteracting Acidosis through the Regulation of the Intracellular pH,” *Cancer Res.*, vol. 69, no. 1, pp. 358–368, Jan. 2009.
- [216] J. Chiche, K. Ilc, J. Laferriere, E. Trottier, F. Dayan, N. M. Mazure, M. C. Brahim-Horn, and J. Pouyssegur, “Hypoxia-Inducible Carbonic Anhydrase IX and XII Promote Tumor Cell Growth by Counteracting Acidosis through the Regulation of the Intracellular pH,” *Cancer Res.*, vol. 69, no. 1, pp. 358–368, Jan. 2009.
- [217] N. Robertson, C. Potter, and A. L. Harris, “Role of Carbonic Anhydrase IX in Human Tumor Cell Growth, Survival, and Invasion,” *Cancer Res.*, vol. 64, no.

- 17, pp. 6160–6165, Sep. 2004.
- [218] S. K. Parks, J. Chiche, and J. Pouyssegur, “pH control mechanisms of tumor survival and growth,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 226, no. 2, pp. 299–308, Feb. 2011.
- [219] Y. Lou, P. C. McDonald, A. Oloumi, S. Chia, C. Ostlund, A. Ahmadi, A. Kyle, U. auf dem Keller, S. Leung, D. Huntsman, B. Clarke, B. W. Sutherland, D. Waterhouse, M. Bally, C. Roskelley, C. M. Overall, A. Minchinton, F. Pacchiano, F. Carta, A. Scozzafava, N. Touisni, J.-Y. Winum, C. T. Supuran, and S. Dedhar, “Targeting Tumor Hypoxia: Suppression of Breast Tumor Growth and Metastasis by Novel Carbonic Anhydrase IX Inhibitors,” *Cancer Res.*, vol. 71, no. 9, pp. 3364–3376, May 2011.
- [220] Y. Lou, P. C. McDonald, A. Oloumi, S. Chia, C. Ostlund, A. Ahmadi, A. Kyle, U. auf dem Keller, S. Leung, D. Huntsman, B. Clarke, B. W. Sutherland, D. Waterhouse, M. Bally, C. Roskelley, C. M. Overall, A. Minchinton, F. Pacchiano, F. Carta, A. Scozzafava, N. Touisni, J.-Y. Winum, C. T. Supuran, and S. Dedhar, “Targeting Tumor Hypoxia: Suppression of Breast Tumor Growth and Metastasis by Novel Carbonic Anhydrase IX Inhibitors,” *Cancer Res.*, vol. 71, no. 9, pp. 3364–3376, May 2011.
- [221] J. Doyen, S. K. Parks, S. Marcié, J. Pouyssegur, and J. Chiche, “Knock-down of hypoxia-induced carbonic anhydrases IX and XII radiosensitizes tumor cells by increasing intracellular acidosis,” *Front. Oncol.*, vol. 2, 2013.
- [222] L. Dubois, S. Peeters, N. G. Lieuwes, N. Geusens, A. Thiry, S. Wigfield, F. Carta, A. McIntyre, A. Scozzafava, J.-M. Dogné, C. T. Supuran, A. L. Harris, B. Masereel, and P. Lambin, “Specific inhibition of carbonic anhydrase IX activity enhances the in vivo therapeutic effect of tumor irradiation,” *Radiother. Oncol.*, vol. 99, no. 3, pp. 424–431, Jun. 2011.
- [223] A. McIntyre, S. Patiar, S. Wigfield, J. -l. Li, I. Ledaki, H. Turley, R. Leek, C. Snell, K. Gatter, W. S. Sly, R. D. Vaughan-Jones, P. Swietach, and A. L. Harris, “Carbonic Anhydrase IX Promotes Tumor Growth and Necrosis In Vivo and Inhibition Enhances Anti-VEGF Therapy,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 11, pp. 3100–3111, Jun. 2012.
- [224] S. Granja, D. Tavares-valente, O. Queirós, and F. Baltazar, “Value of pH regulators in the diagnosis, prognosis and treatment of cancer,” *Semin. Cancer Biol.*, pp. 1–18, 2017.
- [225] D. Sterling, R. A. F. Reithmeier, and J. R. Casey, “A Transport Metabolon. Functional interaction of Carbonic Anhydrase II and Chloride/Bicarbonate Exchangers,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 51, pp. 47886–47894, Dec. 2001.
- [226] E. Boedtkjer, J. M. A. Moreira, M. Mele, P. Vahl, V. T. Wielenga, P. M. Christiansen, V. E. D. Jensen, S. F. Pedersen, and C. Aalkjaer, “Contribution of Na^+ , HCO_3^- -cotransport to cellular pH control in human breast cancer: A role for the breast cancer susceptibility locus NBCn1 (SLC4A7),” *Int. J. Cancer*, vol. 132, no. 6, pp. 1288–1299, Mar. 2013.
- [227] G. Lauritzen, M. B. F. Jensen, E. Boedtkjer, R. Dybboe, C. Aalkjaer, J. Nylandsted, and S. F. Pedersen, “NBCn1 and NHE1 expression and activity in

- Δ NerbB2 receptor-expressing MCF-7 breast cancer cells: Contributions to pH_i regulation and chemotherapy resistance,” *Exp. Cell Res.*, vol. 316, no. 15, pp. 2538–2553, Sep. 2010.
- [228] P. Sonveaux, F. Végran, T. Schroeder, M. C. Wergin, J. Verrax, Z. N. Rabbani, C. J. De Saedeleer, K. M. Kennedy, C. Diepart, B. F. Jordan, M. J. Kelley, B. Gallez, M. L. Wahl, O. Feron, and M. W. Dewhirst, “Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice,” *J. Clin. Invest.*, Nov. 2008.
- [229] K.-S. DIMMER, B. FRIEDRICH, F. LANG, J. W. DEITMER, and S. BRÖER, “The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells,” *Biochem. J.*, vol. 350, no. 1, pp. 219–227, Aug. 2000.
- [230] J. E. M. Fox, D. Meredith, and A. P. Halestrap, “Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle,” *J. Physiol.*, vol. 529, no. 2, pp. 285–293, Dec. 2000.
- [231] V. Miranda-Gonçalves, M. Honavar, C. Pinheiro, O. Martinho, M. M. Pires, C. Pinheiro, M. Cordeiro, G. Bebiano, P. Costa, I. Palmeirim, R. M. Reis, and F. Baltazar, “Monocarboxylate transporters (MCTs) in gliomas: expression and exploitation as therapeutic targets,” *Neuro. Oncol.*, vol. 15, no. 2, pp. 172–188, Feb. 2013.
- [232] R. Le Floch, J. Chiche, I. Marchiq, T. Naiken, K. Ilc, C. M. Murray, S. E. Critchlow, D. Roux, M.-P. Simon, and J. Pouyssegur, “CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 40, pp. 16663–16668, Oct. 2011.
- [233] J. Fang, Q. J. Quinones, T. L. Holman, M. J. Morowitz, Q. Wang, H. Zhao, F. Sivo, J. M. Maris, and M. L. Wahl, “The H⁺-Linked Monocarboxylate Transporter (MCT1/SLC16A1): A Potential Therapeutic Target for High-Risk Neuroblastoma,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 70, no. 6, pp. 2108–2115, Aug. 2006.
- [234] M. L. Wahl, J. A. Owen, R. Burd, R. A. Herlands, S. S. Nogami, U. Rodeck, D. Berd, D. B. Leeper, and C. S. Owen, “Regulation of intracellular pH in human melanoma: potential therapeutic implications,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 1, no. 8, pp. 617–28, Jun. 2002.
- [235] J. Chiche, Y. Le Fur, C. Vilmen, F. Frassinetti, L. Daniel, A. P. Halestrap, P. J. Cozzone, J. Pouyssegur, and N. W. Lutz, “In vivo pH in metabolic-defective Ras-transformed fibroblast tumors: Key role of the monocarboxylate transporter, MCT4, for inducing an alkaline intracellular pH,” *Int. J. Cancer*, vol. 130, no. 7, pp. 1511–1520, Apr. 2012.
- [236] J. Chiche, Y. Le Fur, C. Vilmen, F. Frassinetti, L. Daniel, A. P. Halestrap, P. J. Cozzone, J. Pouyssegur, and N. W. Lutz, “In vivo pH in metabolic-defective Ras-transformed fibroblast tumors: Key role of the monocarboxylate transporter, MCT4, for inducing an alkaline intracellular pH,” *Int. J. Cancer*, vol. 130, no. 7, pp. 1511–1520, Apr. 2012.

- [237] H. M. Becker and J. W. Deitmer, “Nonenzymatic Proton Handling by Carbonic Anhydrase II during H⁺-Lactate Cotransport via Monocarboxylate Transporter 1,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 31, pp. 21655–21667, Aug. 2008.
- [238] H. M. Becker, M. Klier, C. Schuler, R. McKenna, and J. W. Deitmer, “Intramolecular proton shuttle supports not only catalytic but also noncatalytic function of carbonic anhydrase II,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 7, pp. 3071–3076, Feb. 2011.
- [239] S. M. Gallagher, J. J. Castorino, and N. J. Philp, “Interaction of monocarboxylate transporter 4 with β 1 -integrin and its role in cell migration,” *Am. J. Physiol. Physiol.*, vol. 296, no. 3, pp. C414–C421, Mar. 2009.
- [240] S. M. Gallagher, J. J. Castorino, D. Wang, and N. J. Philp, “Monocarboxylate Transporter 4 Regulates Maturation and Trafficking of CD147 to the Plasma Membrane in the Metastatic Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231,” *Cancer Res.*, vol. 67, no. 9, pp. 4182–4189, Apr. 2007.
- [241] S. Fais, “Proton pump inhibitor-induced tumour cell death by inhibition of a detoxification mechanism: Symposium,” *J. Intern. Med.*, vol. 267, no. 5, pp. 515–525, 2010.
- [242] R. Martínez-Zaguilán, R. M. Lynch, G. M. Martínez, and R. J. Gillies, “Vacuolar-type H(+)-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells,” *Am. J. Physiol. Physiol.*, vol. 265, no. 4, pp. C1015–C1029, Oct. 1993.
- [243] R. Martínez-Zaguilán, N. Raghunand, R. M. Lynch, W. Bellamy, G. M. Martínez, B. Rojas, D. Smith, W. S. Dalton, and R. J. Gillies, “pH and drug resistance. I. functional expression of plasmalemmal V-type H⁺-ATPase in drug-resistant human breast carcinoma cell lines,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 57, no. 9, pp. 1037–1046, May 1999.
- [244] J. Xu, R. Xie, X. Liu, G. Wen, H. Jin, Z. Yu, Y. Jiang, Z. Zhao, Y. Yang, B. Ji, H. Dong, and B. Tuo, “Expression and functional role of vacuolar H⁺-ATPase in human hepatocellular carcinoma,” *Carcinogenesis*, vol. 33, no. 12, pp. 2432–2440, Dec. 2012.
- [245] J. P. Mattsson, K. Väänänen, B. Wallmark, and P. Lorentzon, “Omeprazole and bafilomycin, two proton pump inhibitors: Differentiation of their effects on gastric, kidney and bone H⁺-translocating ATPases,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1065, no. 2, pp. 261–268, Jun. 1991.
- [246] E. P. Spugnini, P. Sonveaux, C. Stock, M. Perez-Sayans, A. De Milito, S. Avnet, A. G. Garcia, S. Harguindey, and S. Fais, “Proton channels and exchangers in cancer,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1848, no. 10, pp. 2715–2726, 2015.
- [247] Y. Wang, S. J. Li, J. Pan, Y. Che, J. Yin, and Q. Zhao, “Specific expression of the human voltage-gated proton channel Hv1 in highly metastatic breast cancer cells, promotes tumor progression and metastasis,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 412, no. 2, pp. 353–359, 2011.

- [248] Y. Wang, S. J. Li, X. Wu, Y. Che, and Q. Li, "Clinicopathological and biological significance of human voltage-gated proton channel Hv1 protein overexpression in breast cancer," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 17, pp. 13877–13888, 2012.
- [249] Y. Wang, X. Wu, Q. Li, S. Zhang, and S. J. Li, "Human Voltage-Gated Proton Channel Hv1: A New Potential Biomarker for Diagnosis and Prognosis of Colorectal Cancer," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, 2013.
- [250] Y. Wang, S. Zhang, and S. J. Li, "Zn²⁺ induces apoptosis in human highly metastatic SHG-44 glioma cells, through inhibiting activity of the voltage-gated proton channel Hv1," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 438, no. 2, pp. 312–317, 2013.
- [251] L. Ribeiro-Silva, F. O. Queiroz, A. M. B. da Silva, A. E. Hirata, and M. Arcisio-Miranda, "Voltage-gated proton channels in human glioblastoma multiforme cells," *ACS Chem. Neurosci.*, p. acschemneuro.6b00083, 2016.
- [252] S. Matsuyama and J. C. Reed, "Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation.," *Cell Death Differ.*, vol. 7, no. 12, pp. 1155–1165, 2000.
- [253] D. Lagadic-Gossmann, L. Huc, and V. Lecureur, "Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles.," *Cell Death Differ.*, vol. 11, no. 9, pp. 953–961, 2004.
- [254] I. Szabo, A. Lepple-Wienhues, K. N. Kaba, M. Zoratti, E. Gulbins, and F. Lang, "Tyrosine kinase-dependent activation of a chloride channel in CD95-induced apoptosis in T lymphocytes," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 95, no. 11, pp. 6169–6174, May 1998.
- [255] P. X. PETIT, M.-C. GENDRON, N. SCHRANTZ, D. MÉTIVIER, G. KROEMER, Z. MACIOROWSKA, F. SUREAU, and S. KOESTER, "Oxidation of pyridine nucleotides during Fas- and ceramide-induced apoptosis in Jurkat cells: correlation with changes in mitochondria, glutathione depletion, intracellular acidification and caspase 3 activation," *Biochem. J.*, vol. 353, no. 2, pp. 357–367, Jan. 2001.
- [256] R. a Gottlieb, J. Nordberg, E. Skowronski, and B. M. Babior, "Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. January, pp. 654–658, 1996.
- [257] D. Liu, G. Martino, M. Thangaraju, M. Sharma, F. Halwani, S. H. Shen, Y. C. Patel, and C. B. Srikant, "Caspase-8-mediated intracellular acidification precedes mitochondrial dysfunction in somatostatin-induced apoptosis," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 13, pp. 9244–9250, 2000.
- [258] L. K. Putney, S. P. Denker, and D. L. Barber, "The Changing Face of the Na⁺/H⁺ Exchanger NHE1: Structure, Regulation, and Cellular Actions," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 42, no. 1, pp. 527–552, Apr. 2002.
- [259] F. Lang, J. Madlung, J. Bock, U. Lükewille, S. Kaltenbach, K. S. Lang, C. Belka, C. A. Wagner, H. J. Lang, E. Gulbins, and A. Lepple-Wienhues, "Inhibition of Jurkat-T-lymphocyte Na⁺/H⁺-exchanger by CD95(Fas/Apo-1)-receptor stimulation," *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.*, vol. 440, no. 6, pp. 902–907,

- 2000.
- [260] M. Thangaraju, K. Sharma, B. Leber, D. W. Andrews, S.-H. Shen, and C. B. Srikant, "Regulation of Acidification and Apoptosis by SHP-1 and Bcl-2," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 41, pp. 29549–29557, Oct. 1999.
- [261] M. Thangaraju, K. Sharma, D. Liu, S. H. Shen, and C. B. Srikant, "Interdependent regulation of intracellular acidification and SHP-1 in apoptosis," *Cancer Res.*, vol. 59, no. 7, pp. 1649–1654, 1999.
- [262] M. A. Belaud-Rotureau, N. Leducq, F. M. P. De Gannes, P. Diolez, L. Lacoste, F. Lacombe, P. Bernard, and F. Belloc, "Early transitory rise in intracellular pH leads to Bax conformation change during ceramide-induced apoptosis," *Apoptosis*, vol. 5, no. 6, pp. 551–560, 2000.
- [263] M. Karmazyn, M. (Metin) Avkiran, and L. Fliegel, *The Sodium-Hydrogen Exchanger : From Molecule to its Role in Disease*. 2003.
- [264] K. L. Wu, S. Khan, S. Lakhe-Reddy, L. Wang, G. Jarad, R. T. Miller, M. Konieczkowski, A. M. Brown, J. R. Sedor, and J. R. Schelling, "Renal tubular epithelial cell apoptosis is associated with caspase cleavage of the NHE1 Na⁺/H⁺ exchanger.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 284, no. 4, pp. F829–F839, 2003.
- [265] I. J. Furlong, R. Ascaso, A. Lopez Rivas, and M. K. Collins, "Intracellular acidification induces apoptosis by stimulating ICE-like protease activity.," *J. Cell Sci.*, vol. 110, no. 5, pp. 653–661, 1997.
- [266] M. Thangaraju, K. Sharma, B. Leber, D. W. Andrews, S.-H. Shen, and C. B. Srikant, "Regulation of Acidification and Apoptosis by SHP-1 and Bcl-2," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 41, pp. 29549–29557, Oct. 1999.
- [267] J. L. Hirpara, M.-V. Clément, and S. Pervaiz, "Intracellular acidification triggered by mitochondrial-derived hydrogen peroxide is an effector mechanism for drug-induced apoptosis in tumor cells.," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 15, pp. 10269–10269, Apr. 2014.
- [268] R. Marches, E. S. Vitetta, and J. W. Uhr, "A role for intracellular pH in membrane IgM-mediated cell death of human B lymphomas.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 6, pp. 3434–9, 2001.
- [269] E. B. Affar, R. G. Shah, A.-K. Dallaire, V. Castonguay, and G. M. Shah, "Role of poly(ADP-ribose) polymerase in rapid intracellular acidification induced by alkylating DNA damage.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, no. 1, pp. 245–250, 2002.
- [270] S. Roy, C. I. Bayly, Y. Gareau, V. M. Houtzager, S. Kargman, S. L. Keen, K. Rowland, I. M. Seiden, N. a Thornberry, and D. W. Nicholson, "Maintenance of caspase-3 proenzyme dormancy by an intrinsic 'safety catch' regulatory tripeptide.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 11, pp. 6132–6137, 2001.
- [271] M. S. Segal and E. Beem, "Effect of pH, ionic charge, and osmolality on cytochrome c-mediated caspase-3 activity.," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 281, pp. C1196–C1204, 2001.

- [272] M. A. Barry and A. Eastman, "Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis," *Archives of Biochemistry & Biophysics*, vol. 300, no. 1. pp. 440–450, 1993.
- [273] M. A. Barry and A. Eastman, "Endonuclease activation during apoptosis: The role of cytosolic Ca²⁺ and pH," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 186, no. 2, pp. 782–789, Jul. 1992.
- [274] S. Altairac, S. Zeggai, P. Perani, Y. Courtois, and a Torriglia, "Apoptosis induced by Na⁺/H⁺ antiport inhibition activates the LEI/L-DNase II pathway.," *Cell Death Differ.*, vol. 10, no. 5, pp. 548–557, 2003.
- [275] M. K. Collins, I. J. Furlong, P. Malde, R. Ascaso, J. Oliver, and A. Lopez Rivas, "An apoptotic endonuclease activated either by decreasing pH or by increasing calcium.," *J. Cell Sci.*, vol. 109 (Pt 9, pp. 2393–9, Sep. 1996.
- [276] B. Antonsson, "Inhibition of Bax Channel-Forming Activity by Bcl-2," *Science (80-.)*, vol. 277, no. 5324, pp. 370–372, Jul. 1997.
- [277] C. Cui, R. Merritt, L. Fu, and Z. Pan, "Targeting calcium signaling in cancer therapy," *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 7, no. 1, pp. 3–17, 2017.
- [278] T. A. Stewart, K. T. D. S. Yapa, and G. R. Monteith, "Altered calcium signaling in cancer cells," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1848, no. 10 Pt B, pp. 2502–2511, 2015.
- [279] M. S. Kim, D. M. Shin, and M. S. Kim, "Acidification induces OGR1/Ca²⁺/calpain signaling in gingival fibroblasts," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 496, no. 2, pp. 693–699, 2018.
- [280] N. R. Scrimgeour, D. P. Wilson, and G. Y. Rychkov, "Glu¹⁰⁶ in the Orai1 pore contributes to fast Ca²⁺-dependent inactivation and pH dependence of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) current," *Biochem. J.*, vol. 441, no. 2, pp. 743–753, 2012.
- [281] K. a Christensen, J. T. Myers, and J. a Swanson, "pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages.," *J. Cell Sci.*, vol. 115, no. Pt 3, pp. 599–607, 2002.
- [282] J. Lytton, M. Westlin, S. E. Burk, G. E. Shull, and D. H. MacLennan, "Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 20, pp. 14483–14489, 1992.
- [283] J. N. Lai, O. Y. H. Wang, V. H. C. Lin, C. F. Liao, D. C. Tarng, and E. J. Chien, "The non-genomic rapid acidification in peripheral T cells by progesterone depends on intracellular calcium increase and not on Na⁺/H⁺-exchange inhibition," *Steroids*, vol. 77, no. 10, pp. 1017–1024, 2012.
- [284] S. Chow and D. Hedley, "Flow Cytometric Measurement of Intracellular pH," *Curr. Protoc. Cytom.*, p. 9.3.1-9.3.10, 1997.
- [285] Invitrogen, "Fura and Indo Ratiometric Calcium Indicators." 2011.

- [286] P. Franck, "Measurement of intracellular pH in cultured cells by flow cytometry with BCECF-AM," *J. Biotechnol.*, vol. 46, no. 3, pp. 187–195, 1996.
- [287] D. A. Eisner, N. A. Kenning, S. C. O. Neill, G. Pocock, C. D. Richards, and M. Valdeolmillos, "A novel method for absolute calibration of intracellular pH indicators," *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 413, pp. 553–558, 1989.
- [288] P. Terho, "Flowing Software." .
- [289] B. Verhoven, "Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes," *J. Exp. Med.*, vol. 182, no. 5, pp. 1597–1601, 1995.
- [290] J. V. Watson, S. H. Chambers, and P. J. Smith, "A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak," *Cytometry*, vol. 8, no. 1, pp. 1–8, Jan. 1987.
- [291] D. S. Wishart, Y. D. Feunang, A. C. Guo, E. J. Lo, A. Marcu, J. R. Grant, T. Sajed, D. Johnson, C. Li, Z. Sayeeda, N. Assempour, I. Iynkkaran, Y. Liu, A. Maciejewski, N. Gale, A. Wilson, L. Chin, R. Cummings, D. Le, A. Pon, C. Knox, and M. Wilson, "DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. D1, pp. D1074–D1082, Jan. 2018.
- [292] J. Ollig, V. Kloubert, I. Weßels, H. Haase, and L. Rink, "Parameters Influencing Zinc in Experimental Systems in Vivo and in Vitro," *Metals (Basel)*, vol. 6, no. 3, p. 71, 2016.
- [293] S. M. Jangi, A. Asumendi, J. Arlucea, N. Nieto, G. Perez-Yarza, M. C. Morales, M. de la Fuente-Pinedo, and M. D. Boyano, "Apoptosis of human T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by diphenhydramine, an H1 histamine receptor antagonist," *Oncol Res*, vol. 14, no. 7–8, pp. 363–372, 2004.
- [294] M. Murakami and T. Hirano, "Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling," *Cancer Sci.*, vol. 99, no. 8, pp. 1515–1522, 2008.
- [295] M. Jiménez Del Río and C. Vélez-Pardo, "Transition metal-induced apoptosis in lymphocytes via hydroxyl radical generation, mitochondria dysfunction, and caspase-3 activation: An in vitro model for neurodegeneration," *Arch. Med. Res.*, vol. 35, no. 3, pp. 185–193, 2004.
- [296] P. De Smet, J. B. Parys, S. Vanlingen, G. Bultynck, G. Callewaert, A. Galione, H. De Smedt, and L. Missiaen, "The relative order of IP3 sensitivity of types 1 and 3 IP3 receptors is pH dependent," *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 438, no. 2, pp. 154–158, 1999.
- [297] L. Xu, G. Mann, and G. Meissner, "Regulation of Cardiac Ca²⁺ Release Channel (Ryanodine Receptor) by Ca²⁺, H⁺, Mg²⁺, and Adenine Nucleotides Under Normal and Simulated Ischemic Conditions," *Circ. Res.*, vol. 79, no. 6, pp. 1100–1109, Dec. 1996.
- [298] C. Wu, X. Jin, G. Tsueng, C. Afrasiabi, and A. I. Su, "BioGPS: Building your own mash-up of gene annotations and expression profiles," *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. D1, pp. D313–D316, 2016.

- [299] J. B. Griffin, R. Rodriguez-Melendez, L. Dode, F. Wuytack, and J. Zempleni, "Biotin supplementation decreases the expression of the SERCA3 gene (ATP2A3) in Jurkat cells, thus, triggering unfolded protein response," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 17, no. 4, pp. 272–281, Apr. 2006.