

## Participación de la señalización purinérgica en la citotoxicidad del talio

## DM. Salvatierra Fréchou, PJ. Schwarzbaum, SV. Verstraeten.

dsalvatierra@gb.ffyb.uba.ar

INTRODUCCIÓN: El talio (TI) posee dos estados de oxidación [TI(I) y TI(III)] y es un contaminante emergente sumamente tóxico, cuyos mecanismos de citotoxicidad no están completamente esclarecidos. En células de feocromocitoma de rata (línea PC12-Adh) previamente demostramos que el TI promueve autofagia, cese replicativo y quiescencia.

OBJETIVO: Investigar la participación de la señalización purinérgica en los mecanismos de citotoxicidad del TI(I) y TI(III) en células PC12-Adh. **RESULTADOS:** 



Fig. 1. (A) Medición en tiempo real de la liberación de ATP al medio extracelular (ATPe) en células PC12-Adh incubadas en ausencia (control, C), o presencia de TI(I) o TI(III) (100 µM). (B) Velocidad de liberación de ATPe en células preincubadas con un inhibidor de canales de panexina-1 (carbenoxolona, CBX) o de la exocitosis (brefeldina A, BRF) y expuestas a Tl(I) o Tl(III) (100 mM). (C) Variación en el volumen celular medido por microscopia de fluorescencia utilizando la sonda calceína-AM. (D) Medición de la fluidez de la membrana plasmática en su hemicapa externa (PA-DPH), interna (TMA-DPH) y en el entorno próximo a las proteínas integrales (Pireno). Los resultados están expresados como la media ± SEM (n≥5). \* P<0.05 respecto del control, o \* respecto del TI(III) sin inhibidor (ANOVA de dos vías).



El TI(III) inhibió en forma irreversible la actividad ectoATPasa



Fig. 2. (A) Se incubaron células PC12-Adh en ausencia (control, C), o presencia de Tl(I) o Tl(III) (100 µM) y se registró la liberación de 32Pi a partir de la hidrólisis de [y32Pi]ATPe (0-1 µM). A partir de los datos obtenidos se calculó la constante catalítica aparente (Kcat app). (B) Se incubaron las células con 0,1 µM de [γ32Pi]ATPe y TI(III) (100 μM) durante 60 min, se añadió el quelante de cationes DTPA (0,5 μM) y se registró la cinética de liberación de 32Pi por otros 60 min. (C) Se evaluó la velocidad catalítica en células control tratadas con los inhibidores específicos de ectonucleotidasas (POM), de ectofosfatasas alcalinas (levamisol, LEV) y de ectoATPasas en general (suramina, SUR). Los resultados están expresados como la media ± SEM (n≥5). \* P<0.05 respecto del control, o \* respecto del TI(I) (ANOVA de dos vías).







Fig. 4. Células PC12-Adh se preincubaron en ausencia o presencia de PPADS (inhibidor de receptores P2) y se las incubó durante 3 h en ausencia (control, C) o presencia TI(I) o TI(III) (100 µM). Se analizó por Western Blot (A) la fosforilación de JNK (p-JNK), o (B) la fosforilación de p38 (p-p38), y los resultados se normalizaron por el contenido de b-tubulina en las muestras. Los resultados están expresados como la media ± SEM (n≥3). \* . P<0.05 respecto del control, o \* respecto del TI(I) o TI(III) sin pretratar (ANOVA de dos vías).

La señalización purinérgica participa de los efectos citotóxicos del TI



Fig. 3. Las células PC12-Adh fueron preincubadas con (A) enzima apirasa (Apy) que remueve el ATPe, sin o con la adición de 8-PSTP para descartar un efecto residual de la adenosina formada; (B) inhibidor de ectonucleotidasas (POM), ectofosfatasa alcalina (LEV) o ectoATPasas en general (SUR); y (C) inhibidores inespecíficos de los receptores purinérgicos P2 (SUR y PPADS) y específicos para P2X7 (A740003 y A438079). Las células fueron incubadas por 48 h en ausencia (control, C), TI(I) o presencia de TI(III) (100  $\mu$ M), y se determinó la viabilidad por reducción del MTT. Los resultados están expresados como la media ± SEM (n≥3). \* P<0.05 respecto del control, o \* del TI(I) o TI(III) sin inhibidor (ANOVA de dos vías).

CONCLUSIONES: La señalización purinérgica participa de los mecanismos de citotoxicidad del TI en células PC12-Adh ya que:

- el TI(III) indujo la liberación de ATPe a través de canales de panexina-1 y exocitosis,
- el TI(III) produjo un rápido incremento de volumen y la rigidificación global de la membrana plasmática, pero aumentando la fluidez del entorno inmediato a proteínas,
  - el TI(III) inhibió en modo irreversible la actividad ectoATPasa en el rango bajo de concentraciones de ATPe, donde la mayor actividad catalítica estaría dada por las ecto-fosfatasas alcalinas,
  - la disminución de viabilidad celular por TI(I) y TI(III) fue prevenida parcialmente por la presencia de ATPe,
  - la actividad de las ectoATPasas participó en la toxicidad del TI(III) pero no del TI(I),
  - los receptores P2 participaron de la toxicidad de ambos cationes, pero P2X7 únicamente en la del TI(III),
  - ambos cationes actuaron a través de receptores P2 activando las SAPK JNK y p38.
- TI(I) TI(III) E-NTPD ADP E-FAL TI(III) ATP