



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE FISILOGIA, BIOFISICA Y
NEUROCIENCIAS**

**Efecto de la hormona ouabaína sobre la comunicación
intercelular mediada por gap junctions (CIGJ) en mezclas
de células MDCK silvestres y resistentes a ouabaína en
proporción 50:50.**

Que presenta

EDUARDO ALEJANDRO OGAZON DEL TORO

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE FISIOLÓGÍA
CELULAR Y MOLECULAR**

Directores:

DR. ARTURO PONCE BALDERAS Y

DR. MARCELINO CEREJIDO MATTIOLI

México, D.F. Septiembre, 2015

ÍNDICE

Resumen.....	3
Antecedentes	
Historia de la ouabaína.....	5
Estructura química.....	5
Na ⁺ , K ⁺ -ATPasa.....	6
Ouabaína como inhibidor de la Na ⁺ , K ⁺ -ATPasa	7
Ouabaína endógena.....	7
Na ⁺ , K ⁺ -ATPasa como receptor de la hormona ouabaína.....	8
Ouabaína y contactos celulares.....	9
Unión estrecha.....	10
Unión comunicante.....	12
Trabajos previos. Efecto en la unión estrecha.....	14
Efecto en la ciliogenesis.....	15
Efecto en la unión comunicante.....	16
Hipótesis.....	18
Objetivos.....	19
Materiales y Métodos.....	18
Resultados.....	19
Discusión de Resultados.....	24
Conclusiones.....	27
Referencias.....	28

Resumen

Ouabaína es una sustancia que ha sido de interés científico por muchos años por sus propiedades. El primer acercamiento científico se dio a fines del siglo XVIII cuando se usó para tratar padecimientos como el edema maligno, consecuencia de la insuficiencia cardíaca. Muchos años después se elucidó su estructura y se descubrió que actúa como un inhibidor de la Na^+ , K^+ -ATPasa, incrementando la contractilidad del músculo cardíaco, generando así sus efectos benéficos.

A fines de la década de los 80's se identificaron formas endógenas de ouabaína una en diferentes organismos animales incluido el ser humano, la cual además se incrementa en diversos procesos fisiológicos y patológicos. Tras reconocerse la existencia de ouabaína endógena, se propuso que es una hormona.

Entonces la pregunta obvia a abordar surgió; Si la ouabaína es una hormona, ¿Cuáles serían sus efectos en el organismo?

Se ha demostrado previamente en nuestro laboratorio que ouabaína tiene efectos en diferentes contactos celulares. Como parte de esta línea de investigación, en la presente tesis se estudia el efecto sobre la comunicación intercelular mediada por gap junctions (CIGJ). En primer lugar se determinó que la Na^+ , K^+ -ATPasa es el receptor que media el efecto de ouabaína sobre la unión comunicante mediante ensayos con células MDCK resistentes.

En segundo lugar se analizó el efecto de ouabaína 10 nM sobre la CIGJ en mezclas de células MDCK silvestres y MDCK resistentes en proporción 50:50. Se determinó que ouabaína 10 nM incrementa la CIGJ en estas mezclas. El incremento observado de la CIGJ se analizó a continuación con el fin de saber si las células resistentes son capaces de establecer CIGJ o el aumento observado es producto de comunicación solo entre células silvestres. Los resultados mostraron que tanto células silvestres como resistentes establecen CIGJ. Se observó que en algunos casos, células resistentes sin contacto directo con células silvestres también establecían comunicación, por lo que deben recibir algún mensaje químico de una célula silvestre que las "induce" a comunicarse.

Summary

Ouabain is a substance that has been of interest for scientists for long time because of many of its properties. The first scientific approach occurred by the end of eighteenth century when it was used as a treatment of edema, a consequence of cardiac insufficiency. Many years later it was defined as an inhibitor of Na^+ , K^+ -ATPase, which is a protein of great importance for the cell, since it generates de charge gradient by introducing potassium and expulsing sodium.

By the 1980's an endogenous form of ouabain was identified in animal and human plasma. Its concentration increases on different physiological and pathological conditions. After this finding ouabain was proposed a hormone.

So, if ouabain is a hormone, the obvious question arises: Which are its physiological effects?

It has been determined previously in our lab that ouabain modulates different cell to cell contacts. So, as part of the research on this aspect, this thesis studies the effect of ouabain on gap junction intercellular communication (GJIC).

First, Na^+ , K^+ -ATPase was demonstrated to be the receptor of hormone ouabain for the effects. In second place, the effect of ouabain on mixed cultures of wild MDCK and resistant MDCK cells in a 50/50 proportion was studied. Results show that ouabain increases GJIC in this cultures.

Finally it was studied if the effect of hormone ouabain on GJIC on this mixed cultures obeyed to the establishment of GJIC between only wild cells or if also resistant cells established GJIC using resistant cells transfected with RFP so that they can be easily identified. Results show that MDCK resistant cells establish GJIC as well as wild type cells, but also that resistant cells that are not in direct contact with wild type cells can establish GJIC. Since this cells can't respond to ouabain, this means that this cells most have received some kind of message from a wild type cell.

ANTECEDENTES

Historia de la Ouabaína

La ouabaína es una sustancia que ha sido conocida por el hombre desde tiempos remotos. Fue usada desde la antigüedad como veneno para la caza por distintas tribu de África y como tratamiento en la medicina tradicional de diversos pueblos. Sin embargo, su entendimiento científico comienza a fines del siglo XVIII. Fue aislada originalmente a partir de extractos de *Digitalis purpurea*, una planta comúnmente conocida en Inglaterra como “foxglove”. Fue William Withering, un médico inglés quién comenzó su uso medicinal para tratar pacientes que padecían de edema maligno. Más tarde se descubriría que dicho padecimiento es solo un síntoma derivado de la insuficiencia cardíaca ya que el corazón se debilita, provocando el reflujo de la sangre y acumulación de líquido en los tejidos (Larre et al., 2014). Posteriormente se pudo comprobar que la acción de la ouabaína era precisamente actuar como cardiotónico, intensificando la fuerza del latido cardíaco, aunque este hallazgo fue puramente empírico dado que el conocimiento de su efecto a nivel celular y molecular siguió ignorado por muchos años.

Estructura química.

Además de la planta foxglove, otras plantas como *Acocantera ouabaio* y *Strophantus kombe* contienen ouabaína.

Por su estructura se le denomina cardenolide, ya que tiene un núcleo esteroide que deriva del ciclopentanoperhidrofenantreno, base de los esteroides unido a una lactona en un extremo y glicosilada en el otro. Su estructura es similar a la de otros esteroides cardíacos y de manera interesante también guarda similitud con algunas hormonas esteroideas.

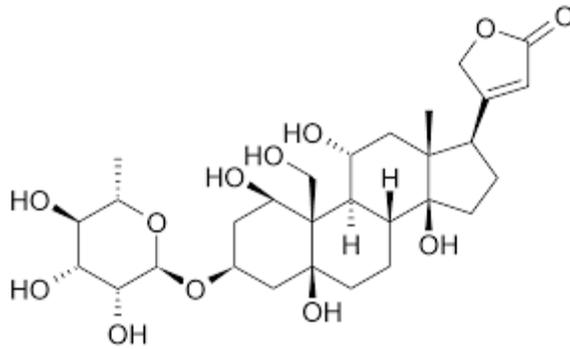


Figura 1: Estructura química de la ouabaína

Na⁺, K⁺-ATPasa. CARACTERISTICAS

La Na⁺, K⁺-ATPasa es un componente fundamental de la célula ya que se encarga de mantener una concentración de sodio baja y alta potasio en el interior de la célula generando así el gradiente electroquímico que mantiene el potencial de membrana, el cual es fundamental para diversos procesos desde la absorción de nutrientes hasta la generación de potenciales de acción en células excitables.

Las ATPasas son proteínas de transporte activo, es decir transportan iones en contra del gradiente de concentración, a costa de energía que obtiene de la hidrólisis de ATP. Existen diversas familias de bombas que han sido clasificadas de acuerdo a su homología y su mecanismo de transporte.

Las V-ATPasas son ATPasas vacuolares y se trata principalmente de ATPasas de protones mientras que las F-ATPasas aunque también son bombas de protones, actúan a la inversa como ATP sintasas. La ATP sintasa mitocondrial es un miembro de esta familia.

La Na⁺, K⁺ -ATPasa se clasifica en la familia de las P-ATPasas. Su característica principal es que tras la hidrólisis del ATP, la propia ATPasa debe fosforilarse. Por lo general, introducen un tipo de ion al mismo tiempo que expulsan otro (Pedersen et al., 2002).

Es una proteína de membrana que consta de una subunidad α , una β y en algunos tejidos una subunidad γ que principalmente tiene funciones regulatorias. La subunidad alfa está for-

mada por 10 segmentos transmembranales y contiene los sitios de unión a ATP y a los iones. Dicha subunidad tiene la actividad catalítica. Una característica de este tipo de bombas es que tras hidrolizar el ATP un segmento de la bomba une al fosfato liberado. La subunidad β actúa como una molécula de adhesión entre bombas de células vecinas y consta de un solo paso transmembranal con un largo segmento extracelular altamente glicosilado (Shoshani 2010).

La bomba introduce 2 iones K^+ , al mismo tiempo que expulsa al medio extracelular 3 iones Na^+ a costa de la hidrólisis de una molécula de ATP. De esta forma contribuye a mantener un voltaje de membrana negativo.

Inhibidor de la Na^+ , K^+ -ATPasa.

Fue casi 2 siglos después de los descubrimientos de Whiting de las propiedades medicinales de la ouabaína que se realizaron los primeros estudios farmacológicos que lograron obtener información sobre las acciones en el nivel celular y molecular. El grupo de Schatzman descubrió que la ouabaína se une a la Na^+ , K^+ -ATPasa actuando como un inhibidor específico. La exposición de células a la ouabaína provoca la inversión del gradiente iónico acumulándose sodio al interior de la célula y perdiendo potasio (Schatzman, 1953). Esto permitió esclarecer el efecto cardiotónico de ouabaína. Al acumularse sodio al interior de la célula se activa un intercambiador Na^+/Ca^{++} que restablece el gradiente normal. Esto provoca un flujo masivo de calcio, que tiene como resultado un incremento en la contractilidad de la célula.

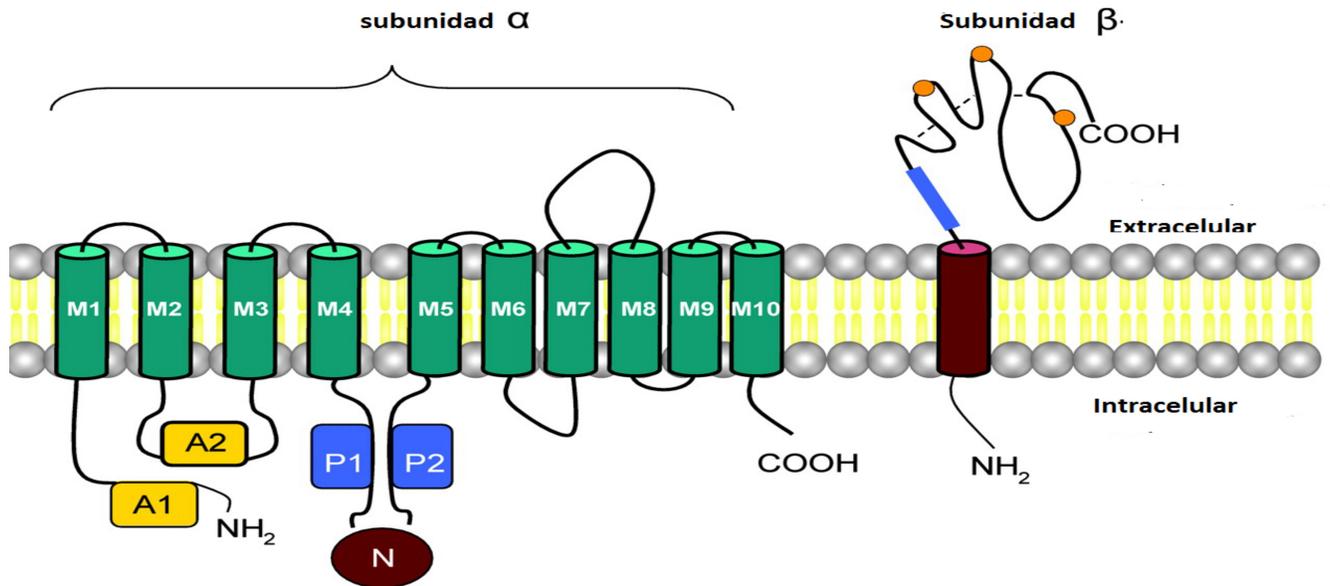


Figura 2. Esquema de la estructura molecular de la Na⁺, K⁺-ATPasa

Ouabaína endógena.

Tras caracterizarse a la ouabaína como un inhibidor de la bomba, se realizaron diversos estudios farmacológicos que cambiaron la forma en que se veía a esta sustancia más allá de ser una sustancia tóxica.

La constante de disociación obtenida, es un valor bastante pequeño lo que indica que la bomba tiene una afinidad muy alta por ouabaína. Esto hizo pensar a algunos investigadores que no podía ser mera casualidad y que tan alta afinidad solo podría explicarse con la existencia de un compuesto endógeno similar a ouabaína, (Muhler-Ehsen et al., 2001).

Diversos grupos encontraron ouabaína en la sangre y además, su estructura era idéntica a la de ouabaína vegetal. Esta forma de ouabaína endógena puede encontrarse en una variedad de especies animales tan diversas como *Bufo bufo* (Lichtstein et al., 1986), *Ovis aries* (Tamura et al., 1987), *Rattus rattus* (Ferrandi et al., 1993) y *Homo sapiens* (Bauer et al., 2006) entre otros. En un principio se pensó que esta ouabaína proviene de la ingesta de vegetales. Esto resultó parcialmente cierto ya que una parte de la ouabaína circulante proviene de la dieta, pero el grupo de Hamlyn logró demostrar que haciendo a un lado la ouabaína proveniente de la ingesta, sigue existiendo en la circulación ouabaína que es de origen endógeno (Hamlyn et al., 1993).

Además otros estudios, usando precursores marcados han mostrado que la ouabaína se secreta en el hipotálamo (Laredo et al., 1993) y en la glándula suprarrenal (Tymiak et al., 1993). Su concentración en plasma es 1-10 nM (Gottlieb *et al.*, 1992) y se ha encontrado también que el nivel de ouabaína en el plasma sanguíneo se incrementa en condiciones fisiológicas tales como tras realizar ejercicio intenso (Bauer et al., 2005), alta ingesta de sal en la dieta (Weidemann et al., 2004) así como en condiciones patológicas como hipertensión, eclampsia, (De Angelis & Hauptert, 1998) falla renal, insuficiencia cardíaca y el infarto del miocardio. (Gottlieb et al., 1992; Manunta et al., 2009)

Es importante tener en cuenta que a las concentraciones fisiológicas ouabaína no inhibe la bomba y no hay cambios en el contenido iónico de la célula

Na⁺-K⁺-ATPasa como receptor de la hormona ouabaína.

La Na⁺, K⁺-ATPasa es un componente fundamental de la célula, que por mucho tiempo se consideró solamente respecto a su función de transporte. Sin embargo, el estudio de los efectos de ouabaína a concentraciones hormonales vino a cambiar esta perspectiva (Larre et al., 2012). A la concentración hormonal, la función de bombeo no se ve afectada, como lo muestran ensayos que miden el contenido intracelulares de K⁺ y Na⁺ tras la exposición a concentraciones hormonales de ouabaína y muestran que los niveles iónicos no se ven alterados (Contreras et al., 2004). Por mucho tiempo se ha propuesto que la Na⁺, K⁺-ATPasa más allá de su función de bomba, funciona como el receptor a la hormona ouabaína con base en diferentes evidencias. El grupo de Soderberg desarrollo células MDCK con una mutación en la bomba en la región de unión a ouabaína, lo que genera bombas con baja afinidad por ouabaína. Usando ouabaína radioactiva este grupo demostró que estas células prácticamente no unen ouabaína (Soderberg et al., 1983). Estas células no muestran ninguno de los efectos en respuesta a ouabaína (los cuales se abordan a detalle más adelante), lo que llevó a proponer que la Na⁺, K⁺-ATPasa es el receptor de la hormona ouabaína. Más recientemente se obtuvo la estructura cristalina de la bomba unida a ouabaína, en el que se pudo observar que la unión de ouabaína genera cambios conformacionales en la bomba (Laursen, 2013). Además, evidencia muestra que el segmento intracelular de la bomba se asocia a moléculas de señalización como ERK 1/2 y c-Src (Xie et al. 1999). Tras unir ouabaína el cambió conformacional en la bomba produce cambios en Src, haciendo que expongan su sitio activo de cinasa. Una

vez que Src se activa, fosforila a su vez a ERK, que continua la señalización (Tian et al., 2006)

Por otra parte, se ha observado que ouabaína produce un incremento del calcio intracelular en células vasculares y la contractilidad de las células y podría fungir como segundo mensajero. Además, se produce la translocación al núcleo de NF-KB que produce la activación de distintos genes

Interesantemente, se descubrió además que en miocitos, ouabaína es capaz de transactivar al receptor a EGF a través de c-Src, lo que incrementa la señalización, principalmente mediante la vía de MAPK.

Ouabaína y contactos celulares.

Uno de los primeros indicios de la función como hormona surgió de un trabajo precisamente de nuestro grupo. En el estudio se observó que células MDCK tratadas con concentraciones tóxicas de ouabaína (1 μ M) se desprendían de la caja de cultivo, sin embargo seguían viables, por lo que este desprendimiento no era consecuencia de apoptosis. Al analizar moléculas de adhesión como cadherinas se observó que son rápidamente interiorizadas en vesículas. Esto permitió sugerir que ouabaína actúa sobre contactos celulares (Contreras et al., 2004).

Por mucho tiempo, los contactos celulares fueron considerados componentes “estáticos” cuya principal función es mantener a las células unidas y mantenerlas así en su lugar en los tejidos, de manera similar como harían los tornillos en un puente manteniendo las piezas unidas. Sin embargo en años recientes se ha demostrado que las funciones de estas proteínas van más allá de solamente la adhesión y el contacto. Participan activamente en distintos procesos desde la morfogénesis de órganos, la diferenciación, la migración, proliferación, entre otros (González-Mariscal et al., 2007). Muchas proteínas de las diferentes uniones celulares se encuentran además asociadas a proteínas de señalización y muchas de las proteínas de andamiaje pueden tener funciones de señalización por si mismas. Como un ejemplo de esto, en el trabajo antes mencionado se mostró que tras la exposición a ouabaína, β -catenina migra al núcleo, donde puede alterar la expresión génica (Contreras et al., 2004).

La ouabaína produce estos efectos en la adhesión a través de la activación de ERK 1/2 y c-Src, lo que ocasiona la inhibición de Rho. Esto tiene como consecuencia cambios en el citoesqueleto y fosforilación de las moléculas de adhesión que son en consecuencia interiorizadas (Contreras et al., 2004).

Con base en lo observado, en nuestro grupo de investigación se han dedicado a evaluar el efecto de ouabaína a concentración hormonal sobre diversos contactos celulares.

Antes de describir dichos efectos, me dedicare en las siguientes secciones a describir brevemente estos contactos así como sus funciones para un mejor entendimiento de los efectos que ouabaína tiene sobre dichas uniones.

Unión estrecha.

La unión estrecha es un complejo multiproteico que se encuentra en la cara basolateral cerca del borde apical. Esta estructura es exclusiva de los epitelios. Forma un “cinturón” que sella estrechamente la zona de contacto entre 2 células. Por esto, se puede considerar que la unión estrecha tiene 2 funciones principales: De **compuerta** pues regula el paso de sustancias por la vía paracelular y de **cerca**, al impedir la difusión de proteínas de la cara basolateral a la apical y viceversa, por lo que la unión estrecha además de dar a los epitelios su impermeabilidad, mantiene la polaridad (Dragsten et al., 1981).

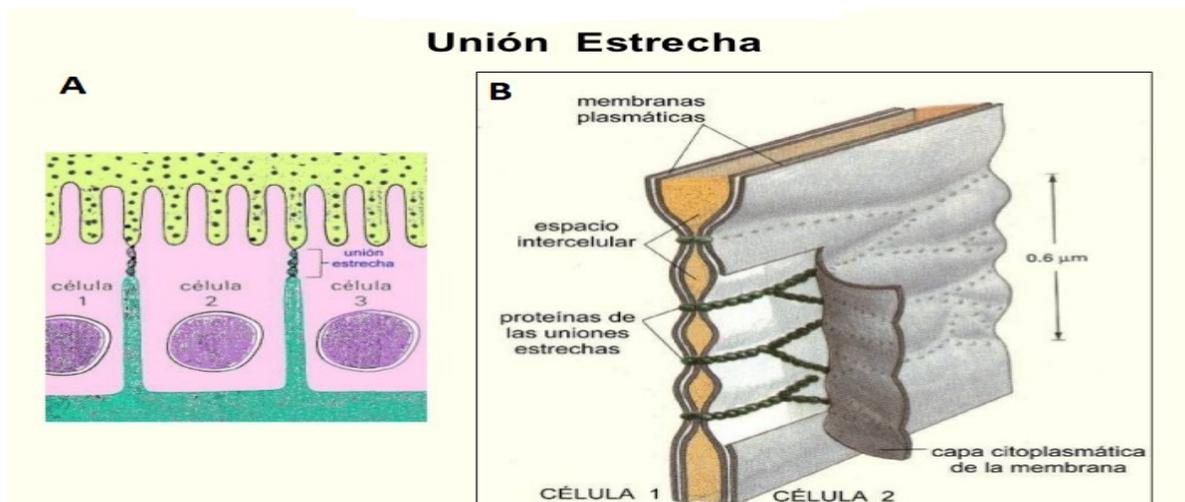


Figura 4. A) Esquema que muestra la localización de la unión estrecha. B) esquema de la estructura de la unión estrecha.

A nivel molecular la unión estrecha está formada por 2 tipos de proteínas: Proteínas transmembranales como claudinas, ocludinas y JAM, y proteínas periféricas como ZO-1,-2 y -3 que unen a las proteínas transmembranales con el citoesqueleto dándole estabilidad a la unión (González-Mariscal et al., 2003; Cereijido et al., 2007; Cereijido et al., 2008).

Las claudinas son una familia de proteínas transmembranales de 4 pasos con 2 asas extracelulares. Estas asas median la unión con las claudinas de la célula adyacente. Se han identificado 24 isoformas en mamíferos. En algunas claudinas estas asas tienen aminoácidos cargados, lo que les permite regular la permeabilidad de la unión a iones según su carga (Furuse et al., 2002). Por ello, la permeabilidad de la unión estrecha depende del patrón de expresión de claudinas (Van Itallie et al., 2003).

Las ocludinas son proteínas de estructura similar a las claudinas, con la diferencia de que la porción intracelular de las ocludinas es considerablemente más larga. Se conocen 2 isoformas de esta familia. Las ocludinas confieren muy baja permeabilidad a iones por lo que no contribuyen a las propiedades de permeabilidad de la unión estrecha.

Las proteínas JAM son proteínas de adhesión de la familia de las inmunoglobulinas, tienen un solo paso transmembranal y se conocen 4 isoformas en mamíferos. Tienen de forma similar a las claudinas 2 asas extracelulares. Las proteínas JAM son las primeras en localizarse en la membrana cuando se está formando la unión estrecha por lo que se les considera como una señal que indica el lugar correcto de la membrana donde la unión se debe formar (Martin-Padura et al., 1998; Nasdala et al., 2002).

Las proteínas de la familia ZO, son proteínas de andamiaje, ya que contienen dominios PDZ de unión a actina y unen a las proteínas membranales con el citoesqueleto, dándole estabilidad y permitiendo que mantengan su localización en la membrana.

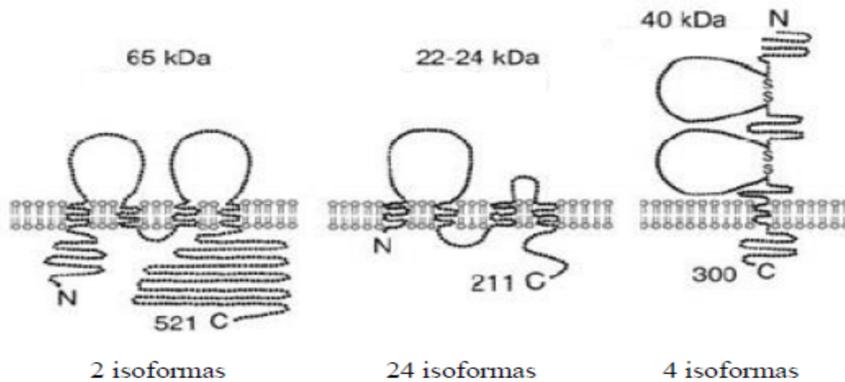


Figura 5. Estructura molecular de ocludina, Claudina y JAM respectivamente.

Se cuenta con varias formas de estudiar la unión estrecha. Por microscopia de inmunofluorescencia se observa con un patrón conocido como malla de gallinero. Uno de los métodos más utilizados consiste en medir la resistencia trans-epitelial (RET). Se mide la resistencia al paso de iones de una cara (apical) a otra (basolateral) de una monocapa epitelial. Este parámetro nos permite evaluar la integridad de la unión así como su grado de permeabilidad. A mayor RET, menor es la permeabilidad de la unión y viceversa.

Unión comunicante

Las uniones comunicantes son canales que se encuentran en la membrana basolateral de 2 células adyacentes, formando un poro acuoso entre ambas células estableciendo así un acople eléctrico y metabólico (Loewenstein & kanno, 1964). A través de la unión comunicante pueden pasar diversas sustancias con masa molecular menor a 1 KDa como son diversos iones (K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Cl^-), segundos mensajeros pequeños como IP_3 y AMPc, metabolitos pequeños (glucosa, algunos aminoácidos y otros monosacáridos (Goldberg et al., 2004) e incluso moléculas como pequeños RNAs y péptidos cortos (Valiunas et al., 2005). Por ello, las uniones comunicantes constituyen una vía para la cooperación metabólica, pero además para la transmisión de diversos mensajes químicos y señales eléctricas.

Las uniones comunicantes están formadas por 2 hemicanales, aportado uno por cada célula. Cada hemicanal o conexón a su vez está formado por un hexámero de proteínas denominadas como conexinas. Las conexinas son proteínas con 4 segmentos

transmembranales y 2 asas extracelulares, sus segmentos amino y carboxilo son intracelulares (Krutovskikh & Yamasaki, 2000).

Se conocen 23 formas de conexinas codificadas por diferentes genes y se nombran por lo general de acuerdo a su peso molecular. La expresión de estas isoformas varía de tejido a tejido (Evans & Martin, 2002).

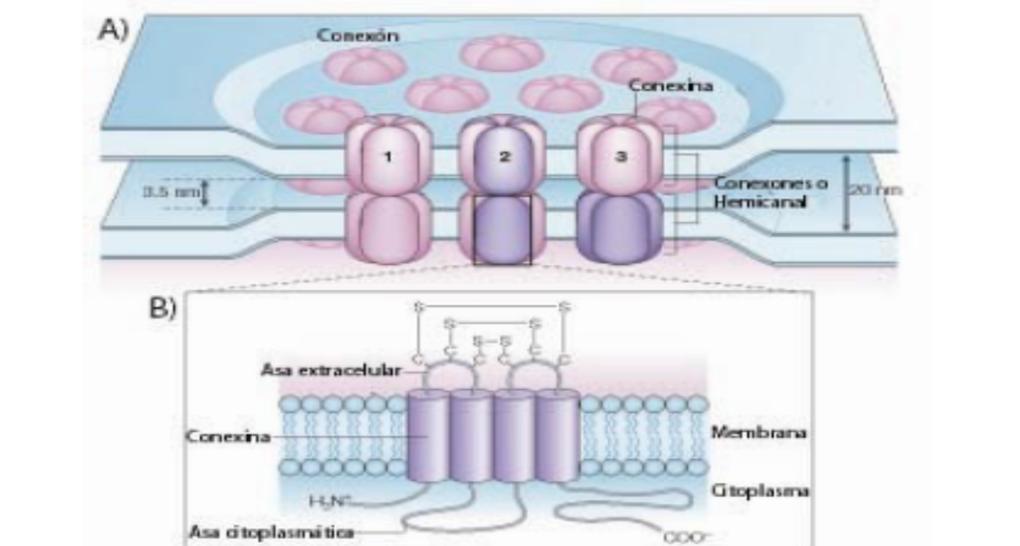


Figura 6. A) Esquema de la unión comunicante, formada por 2 hemicanales o conexones. B) Estructura molecular de las conexinas

Los conexones pueden estar formados por el mismo tipo de conexinas (homoméricos) o por 2 o más formas de conexinas (heteroméricos). Además, un conexón de cierto tipo de conexinas puede formar uniones comunicantes con otro conexón compuesto de otro tipo de conexinas (heterotípicos) (Herve et al., 2007). Si bien las uniones comunicantes no son selectivas, la composición de conexinas puede determinar la permeabilidad de la unión a substratos según su carga y tamaño. La apertura de estos canales está sumamente regulada por efecto de la concentración de calcio, cambios de pH y fosforilaciones u otras modificaciones postraduccionales. Las conexinas tienen una vida media corta de apenas

unas cuantas horas y sufren un recambio constante. Cambios postransduccionales, principalmente fosforilaciones modulan el ensamble y degradación de las conexinas (Lampe & Lau, 2005).

Se cuenta con diversos métodos que permiten evaluar el grado de comunicación que se establece por medio de uniones comunicantes. El primer método que se desarrolló consiste en inyectar un pulso de corriente a una célula mediante un microelectrodo y medir la cantidad de corriente en las células adyacentes (Loewenstein 1960).

Con el desarrollo de la microscopia de fluorescencia, surgió un método conocido como ensayo de transferencia de colorante. Consiste en inyectar un colorante de masa menor a 1000 Da en una célula. Si existe comunicación, el colorante difundirá a células vecinas que tomaran coloración, si no la hay solo la célula inyectada fluoresce. Debido a que es un método relativamente sencillo y económico, es el método más usado en la actualidad para evaluar la comunicación (El-Fouly, 1987). Se realiza también en la variante de herida, que consiste en realizar una pequeña herida sobre la monocapa, para dañar células y permitir así el flujo de colorante.

PAPEL FISIOLÓGICO DE LA UNIÓN COMUNICANTE

Las uniones comunicantes tienen papeles relevantes en la célula ya que permiten el intercambio de sustancias. Uno de los papeles más estudiados es la sinapsis eléctrica. Este tipo de sinapsis se da mayormente en invertebrados pero también se presenta en mamíferos aunque en menor proporción que la sinapsis química. En la sinapsis eléctrica una neurona pre-sináptica se conecta con una neurona post-sináptica a través de la unión comunicante. Una vez que el potencial de acción alcanza el extremo de la membrana pre-sináptica, provoca un flujo de iones de la célula pre-sináptica a la post-sináptica que permite una rápida conducción del potencial de acción lo cual se conoce como acople eléctrico (Bennet, 1997).

Otro ejemplo muy estudiado es el corazón. La unión comunicante conecta cardiomiocitos, de manera que cuando se da el potencial de acción, hay un flujo de iones a través de la unión, lo que permite que la conducción del potencial sea rápida y sincronizada, permitiendo así una contracción casi simultánea del corazón que se genere el latido cardíaco. De lo contrario el corazón fibrilaria ya que su contracción no sería uniforme. (Kanno & Saffitz, 2001)

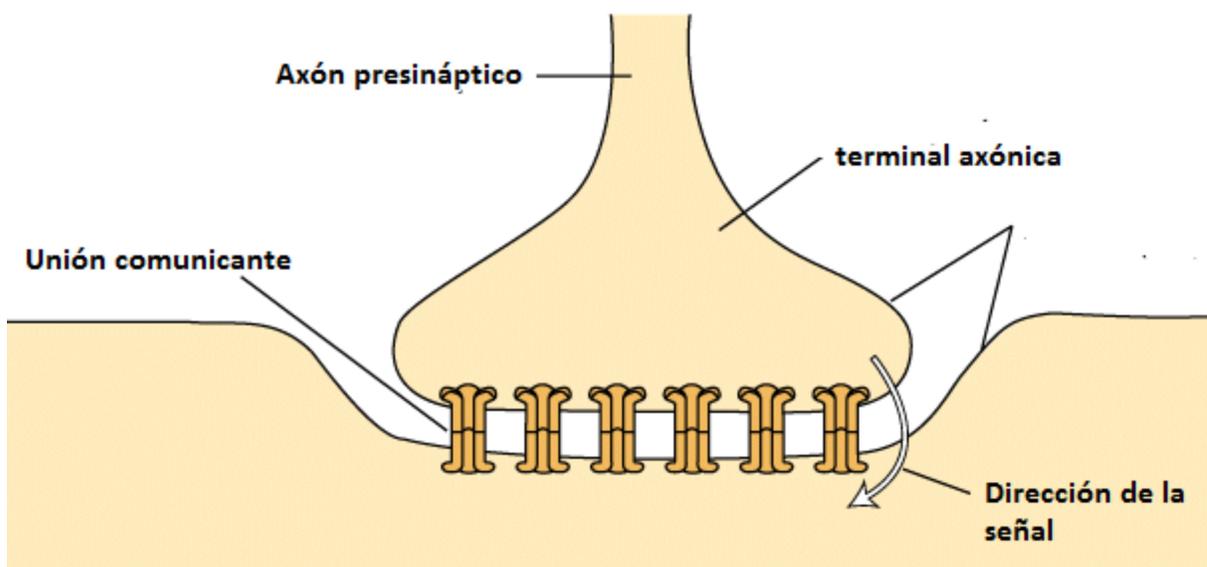


Figura 7. Esquema de la unión comunicante y su participación en la sinapsis eléctrica.

TRABAJOS PREVIOS EN EL LABORATORIO

EFFECTO DE LA HORMONA OUABAINA EN LA UNION ESTRECHA.

Utilizando como parámetro la resistencia transepitelial, se evaluó el efecto de ouabaína 10 nM sobre la unión estrecha. Tras 24 horas de exposición a ouabaína, se produce un aumento de la TER, debido a cambios en la expresión de claudinas. A partir del día 1 aumenta la expresión de la claudina 1, una claudina que incrementa la TER. En el día 2 se produjo un incremento en la expresión de claudina 4, otra claudina que aumenta la TER. Interesantemente también aumenta la expresión de claudina 2, una claudina que disminuye la TER, sin embargo, la mayor parte de esta claudina se mantienen en el citoplasma, por lo que no llega a formar parte de la unión oclusora. Otro porcentaje de esta Claudina se localiza en el cilio. Estos efectos de la hormona ouabaína son muy específicos ya que no todas las claudinas cambian simultáneamente ni en la misma magnitud, además de que la expresión de ocludina no se altera.

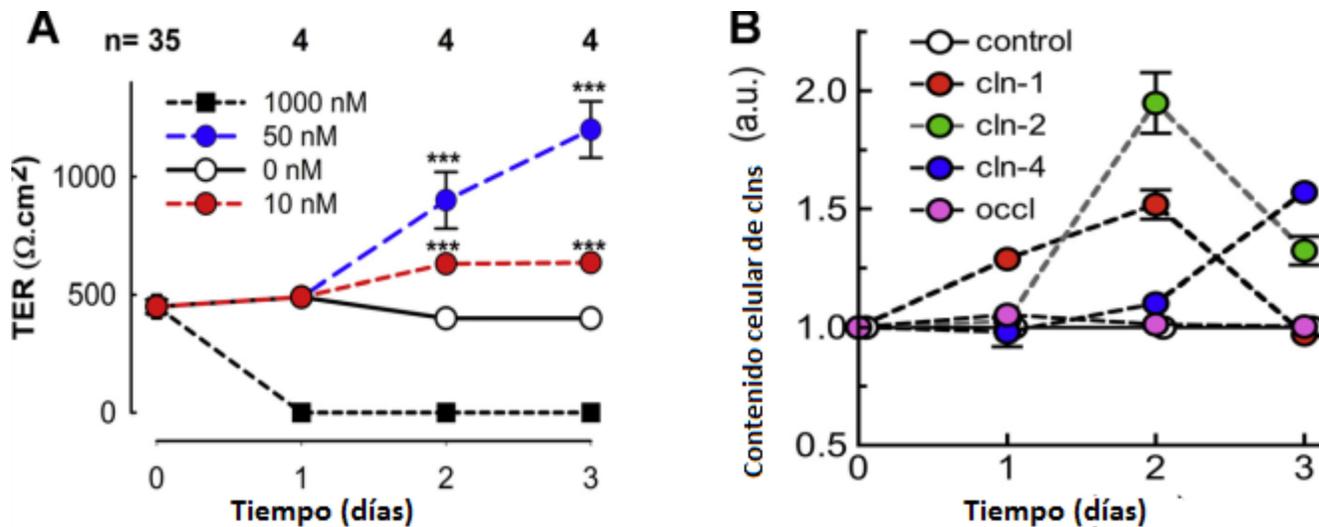


Figura 8. A) Grafica de resistencia transepitelial a lo largo del tiempo. Ouabaína incrementa la TER de forma dependiente de la concentración. B) Grafica que muestra los niveles de expresión de claudinas y ocludina tras tratamiento con ouabaína 10 nM. Claudina 1 y 2 incrementan su expresión desde 24 horas, claudina a partir del segundo día mientras que los niveles de ocludina no cambian. Adviértase la gran especificidad de la modulación, dado que las claudinas no cambian su expresión homocómeamente y las ocludinas se mantienen

EFFECTO DE LA HORMONA OUABAÍNA EN LA CILIOGÉNESIS.

En un estudio posterior se propuso estudiar el efecto de ouabaína sobre la polaridad celular. Para ello, se analizó el cilio, una estructura que es exclusiva de las células epiteliales y se forma solo en la cara apical una vez que la célula ha establecido su polaridad y comienza a madurar, por lo que se le puede considerar como un parámetro de polaridad. Está formado principalmente por la proteína α -tubulina. En el estudio de los efectos hormonales de ouabaína se tomó en cuenta el cilio, ya que se forma cuando la célula ha completado su diferenciación y depende de que los contactos celulares se hayan formado correctamente. Por ello, se usó para determinar si la ouabaína es capaz de modular el establecimiento de la polaridad epitelial.

Mediante microscopia de fluorescencia se contaron las células que formaron procilios a periodos de tiempo constante y por microscopia electrónica se midió la longitud de los cilios. Se compararon estas medidas entre condiciones control y células tratadas con ouabaína 10 nM.

En los resultados obtenidos se mostró que en las células tratadas con ouabaína, la cantidad de células que han formado procilios es mayor que en el control y además, sus cilios tienen mayor longitud que los de las células control. De este estudio se concluye que la hormona ouabaína es capaz de modular la polaridad en células MDCK

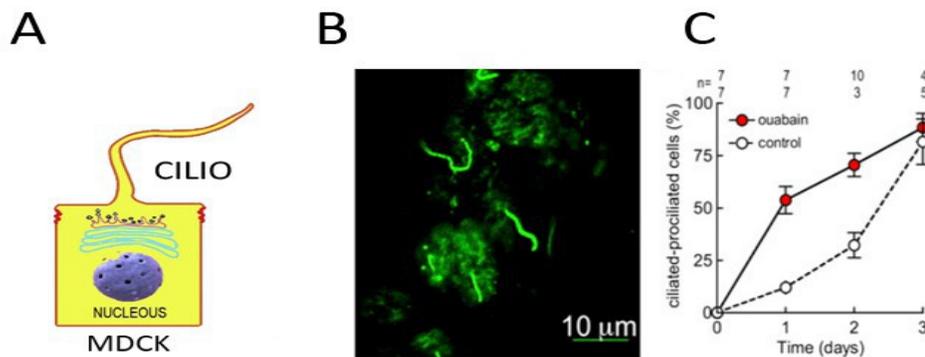


Figura 9. A) Esquema del cilio. B) Imágenes de inmunofluorescencia de cilios y procilios. C) Grafica que compara el número de células que presentan cilio en condiciones control (círculos blancos) y tras ser tratadas con ouabaína (círculos rojos) a lo largo de 3 días

EFFECTO DE LA HORMONA OUABAÍNA EN LA UNION COMUNICANTE

En un trabajo previo del laboratorio se estudió el efecto de ouabaína 10 nM sobre la unión comunicante en monocapas confluentes de células MDCK mediante ensayos de transferencia de colorante

En condiciones control, es decir, sin ser expuestas a ouabaína, la marca fluorescente se observa solo en la célula inyectada, (figura A). En cambio, tras una hora de exposición, la neurobiotina difundió a células vecinas, dándoles fluorescencia roja, por lo que ouabaína 10 nM incrementa la comunicación en células MDCK a un valor promedio de 10 células comunicadas por célula inyectada.

En cuanto al curso temporal la gráfica muestra (figura B) que el efecto se da desde tiempos tan tempranos como 15 minutos con su máximo a una hora y posteriormente decrece. Este resultado sugiere que el efecto de ouabaína sobre las conexinas es a nivel de modificaciones postraduccionales, sin efecto a nivel traduccional.

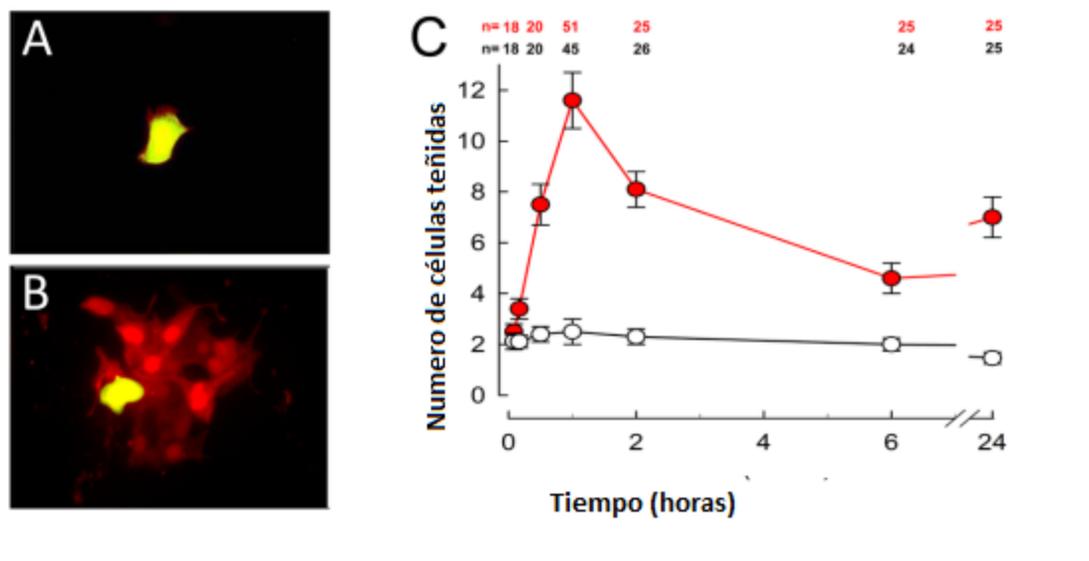


Figura 10. A) Imagen confocal de células MDCK control, no presentan comunicación. B) Imagen confocal de células MDCK tratadas con ouabaína 10 nM por 1 hr. La célula inyectada (amarilla) comunica con varias de sus vecinas. C) Gráfica temporal del efecto de ouabaína. El efecto máximo se presenta a una hora.

Con el fin de obtener más información, se evaluó el efecto de ouabaína en la comunicación tras exponer las células a cicloheximida, un agente que inhibe la síntesis de proteínas.

En la gráfica de la figura D se muestra que aun en presencia de cicloheximida, ouabaína incrementa la comunicación, lo que indica que efectivamente el efecto de ouabaína no requiere la síntesis de nuevas conexinas, probablemente solo modula su apertura, o bien provoca un aumento en el tráfico de conexinas hacia la membrana.

En el mismo trabajo, se evaluó también el efecto de ouabaína 10 nM en la comunicación en células MDCK-R. Como se aprecia en la imagen, no hay un aumento significativo en la comunicación, lo cual prueba por una parte que la Na^+ , K^+ -ATPasa es el receptor de

ouabaína, y por otra permite establecer a las, células MDCK-R como un modelo de resistencia a ouabaína, lo cual como se mostrara más adelante es útil para otros estudios.

A tiempos tardíos como 24 horas, ouabaína provoca incremento en la expresión de conexina 32, aunque parte de esta conexina se queda en el citoplasma, mientras que los niveles de conexina 43 y 26 no se ven alterados. De estos estudios podemos dividir el efecto de ouabaína en 2 partes, un efecto temprano (15 min a 1 hora) en que se modula la apertura de las uniones y un efecto tardío (24 horas) en que se promueve la expresión de nuevas conexinas.

En este último estudio se exploraron detalles importantes de cómo se da este fenómeno. Se descartó la existencia de algún factor soluble producido en respuesta a ouabaína y el efecto observado es mediado por la vía de señalización de c-Src y ERK antes descrita.

MÉTODOS

Cultivo celular

Las células MDCK (ATCC) fueron cultivadas en medio DMEM completo (10% suero fetal bovina, 1 % estreptomycin-penicilina). Las células MDCK-R se cultivaron en DMEM con 10% de suero y 140 µl de G418.

Se sembraron en cubreobjetos estériles 48 horas antes del ensayo a confluencia (150,000 células/ml) en cajas de 24 pozos. 24 horas antes del ensayo de transferencia de colorante se les retiro el medio, realizando 2 lavados con DMEM solo. Se dejaron incubar en DMEM con 1% de SBF y antibióticos, ya que se sabe que el suero contiene ouabaína. 1 hora antes del ensayo se colocó en cada pozo ouabaína disuelta en DMEM

Microinyección

Para los ensayos de microinyección de células individuales en monocapa madura se utilizan micropipetas de vidrio, que se producen a partir de capilares de borosilicato, los cuales se estiran por calor hasta lograr una resistencia eléctrica de entre 5 y 10 mOhms. Dichas pipetas se llenan con 2% de neurobiotina y 1% de dextrán FITC en solución salina de alto potasio que contiene 20 mM KCl, 5 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, and 5 mM HEPES, pH 7.4). Tras

llenarse, se colocan las pipetas en un soporte montado en un micromanipulador (PCS-750; Burleigh Instruments) para la inyección celular. Monocapas cultivadas en cubreobjetos se colocan en una cámara con fondo de vidrio llena con PBS con calcio 1.8 mM a temperatura ambiente. Posteriormente la cámara se monta en la platina de un microscopio invertido equipado con epifluorescencia (Diaphot 300; Nikon) para monitorear la inyección. Se eligen células al azar para inyectar y se inyectan con un pulso neumático usando un equipo para microinyección. (IM300; Narishige). Se verifica que la inyección sea efectiva mediante la difusión de FITC- dextrán en la célula inyectada. 15 minutos después de la inyección se fijan las células con paraformaldehído al 4%, se enjuagan con PBS y se incuban durante la noche a 4°C en TRITC-streptavidina (Zymed, número de catálogo 43-4314) a una dilución 1:200. Por último, las muestras se enjuagan 2 veces y se montan con VECTASHIELD(H-1000; Vector Laboratories, Burlingame CA, USA).

HIPOTESIS

Si la bomba Na^+ , K^+ -ATPasa es el receptor que media la acción de la hormona ouabaína sobre las uniones comunicantes, entonces deberá observarse que en ensayos de transferencia de colorantes con células MDCK-R el efecto estimulante de ouabaína 10 nM no ocurre.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la acción de la ouabaína en dosis hormonal, sobre la comunicación intercelular mediada por gap junctions en células epiteliales MDCK.

Objetivos particulares.

1. Evaluar, mediante ensayos de inyección de colorantes, si la ouabaína, en una concentración de 10 nM (hormonal) efectivamente induce la (CIGJ) en células MDCK silvestres y en células MDCK resistentes.
2. Determinar mediante ensayos de inyección de colorantes si ouabaína induce incremento en CIGJ en monocapas confluentes producidas con mezclas de células MDCK silvestres y MDCK resistentes en proporción 50:50.
3. Si en Mezclas se observa incremento en la CIGJ, determinar si se establece CIGJ entre células MDCK-W y MDCK-R y a su vez si una célula MDCK-R que ha establecido CIGJ puede inducir a otra célula MDCK-R adyacente a establecer CIGJ.

RESULTADOS.

Las células MDCK resistentes a ouabaína no establecen comunicación en respuesta a ouabaína.

Previamente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la Na^+ , K^+ -ATPasa es el receptor que media algunos de los efectos hormonales de ouabaína, como es el caso de su efecto sobre la unión estrecha y sobre la cilio genesis. Sin embargo a mi llegada al laboratorio no se tenía suficiente evidencia sobre si la Na^+ , K^+ -ATPasa es el receptor que media los efectos hormonales de ouabaína sobre la unión comunicante.

Por ello se planteó como uno de los objetivos de la presente tesis evaluar la comunicación intercelular en células MDCK-R en condiciones control y tras ser expuestas a ouabaína 10 nM. Si bien esto ya ha sido evaluado previamente, la cantidad de datos que se tienen se considera insuficiente para realizar una estadística robusta que permita dar contundencia a los resultados.

Si bien previamente ya se ha descrito en nuestro grupo el efecto de ouabaína 10 nM sobre la comunicación en células MDCK-W, en este estudio se incluyeron como control positivo que nos permitiera verificar que la ouabaína usada estaba funcionando correctamente. El resultado obtenido en estas células (figura 10) es consistente con lo publicado anteriormente, al haber un aumento significativo de la comunicación en las células tratadas con ouabaína.

Los datos obtenidos para células MDCK-R en este trabajo son consistentes con los obtenidos previamente. Como se observa en la figura, en condiciones control, estas células no muestran comunicación y de la misma forma tras ser tratadas con ouabaína no establecen comunicación, por lo que no existe diferencia significativa.

De estos ensayos podemos concluir que efectivamente la Na^+ , K^+ -ATPasa es el receptor que media los efectos hormonales de ouabaína sobre la unión comunicante.

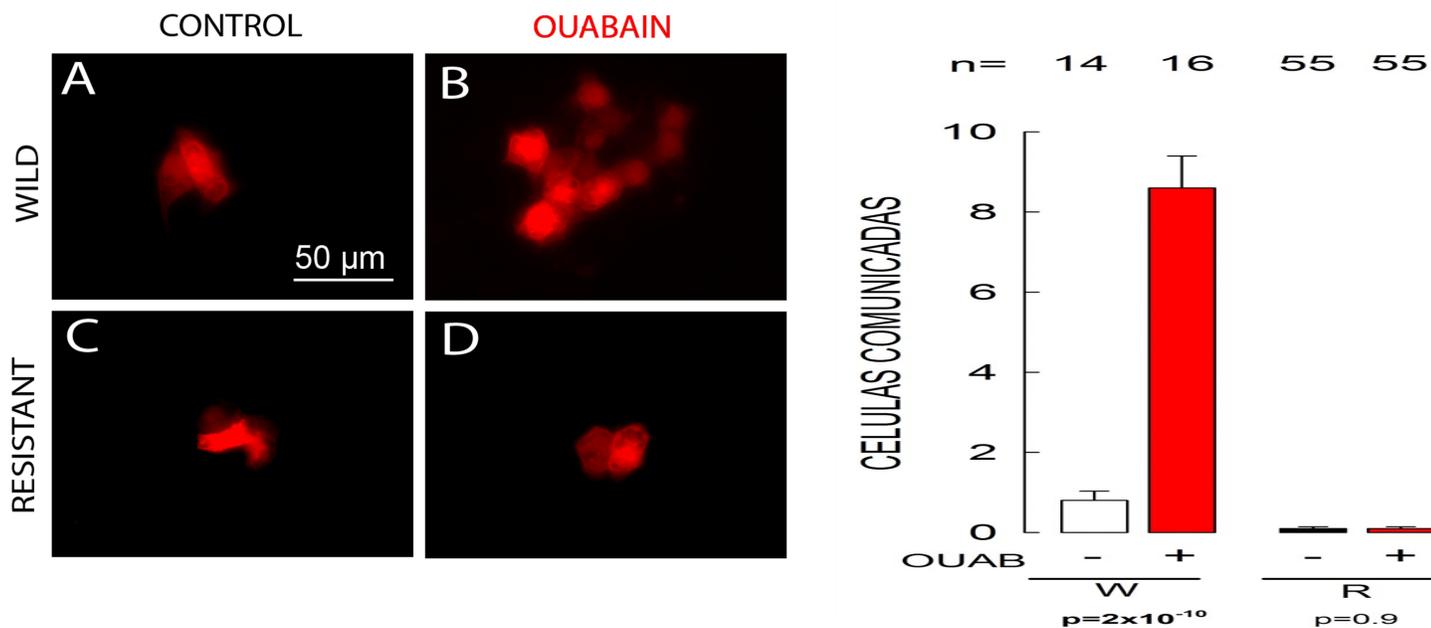


Figura 11. Imágenes de fluorescencia de células MDCK-W en condiciones control (A) y tratadas con ouabaína 10 nM 1 hora (B), células MDCK/R en condiciones control (C) y tratadas con ouabaína 10 nM por una hora (D). (E). Análisis estadístico que compara el número de células MDCK-W comunicadas (primer par de barras) en condiciones control (*Barra blanca*) y tras 1 hora de tratamiento con ouabaína 10 nM (*Barra roja*). El valor de p obtenido muestra que el resultado es significativo. En el segundo par de barras se compara la cantidad de células MDCK-R teñidas tras la inyección de colorante en condiciones control (*Barra color negro*) y tras una hora de tratamiento con ouabaína 10 nM (*Barra roja*), en cuyo caso no hay diferencia significativa. Los números que se muestran sobre cada barra indican el número total de datos obtenidos en 3 ensayos independientes. B) Análisis de la frecuencia de eventos de comunicación. La barra azul muestra el número de veces en que se observó comunicación solo entre células MDCK-W (W-W), la barra naranja muestra el número de veces que se observó comunicación entre células MDCK-W y MDCK-R (W-R) y la barra roja muestra el número de veces que se observó comunicación de una célula MDCK-R a al menos otra célula MDCK-R que no tiene contacto directo con células MDCK-W.

La hormona ouabaína induce un incremento en la comunicación en mezclas de células MDCK-W/ MDCK-R en proporción 50:50.

Como parte del segundo objetivo se planteó analizar si en mezclas de células MDCK-W/MDCK-R en proporción 50:50 en monocapas confluentes se recupera la capacidad de establecer CIGJ en respuesta a ouabaína 10 nM. Como se observa en la figura, en condiciones control, las células prácticamente no tienen comunicación, en cambio tras la exposición a ouabaína 10 nM, se da un incremento significativo de la CIGJ hasta un promedio de 8 células.

El valor de p nos muestra que el efecto es altamente significativos ($p= 4 \times 10^{-19}$) por lo que prácticamente puede tomarse como una certeza. Estos resultados nos indican que el establecimiento de contactos entre células MDCK-W y MDCK-R permite reestablecer la comunicación en respuesta a ouabaína.

Control

Ouabaína 10 nM, 1 hr

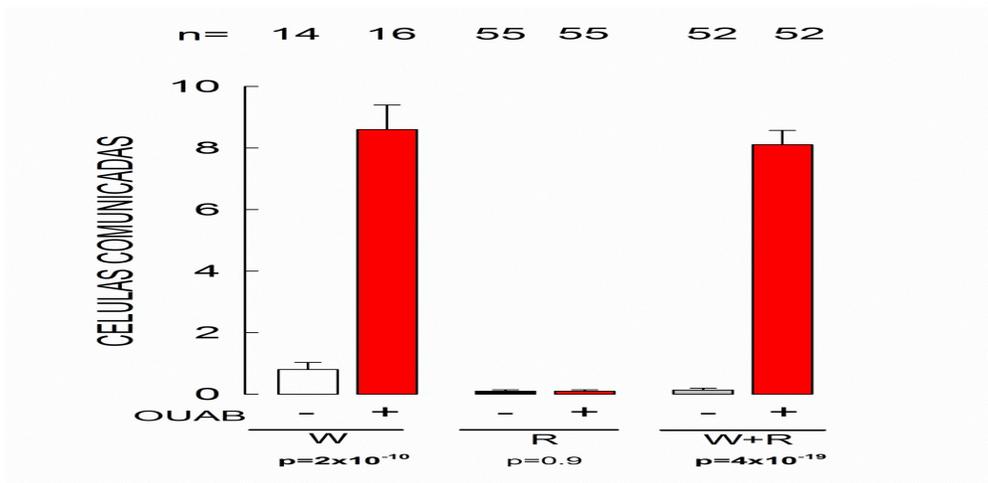
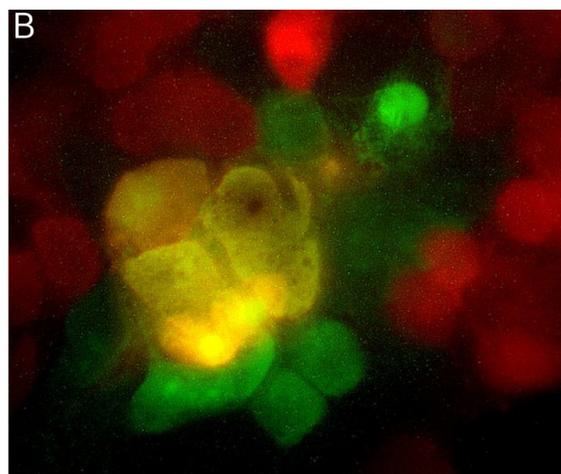
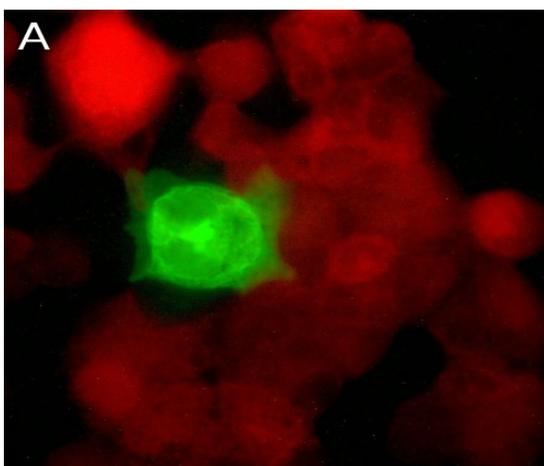


Figura 12. Imágenes representativas de fluorescencia de ensayos de transferencia de colorante en monocapas mezcladas MDCK-R/MDCK-W 50:50, A) en condiciones control y B) tras una hora de tratamiento con ouabaína 10 nM. C) Análisis estadístico que compara la cantidad de células comunicadas MDCK-W sin y con ouabaína (*primer par de barras*), células MDCK-R sin y con ouabaína (*segundo par de barras*) y en monocapas mezcladas (*tercer par de barras*). El valor de *p* arroja que los resultados son altamente significativos.

Las células MDCK silvestres inducen a células resistentes a comunicarse en respuesta a ouabaína 10 nM. A su vez las células resistentes inducidas pueden inducir a otras células resistentes a comunicarse.

Dada la importancia del resultado anterior se planteó como tercer objetivo para el trabajo analizar si en el incremento observado de la CIGJ en mezclas, la comunicación se establece solo entre células MDCK-W o si células MDCK-R también participan en el establecimiento de CIGJ. Además en caso de que las células MDCK-R participen en la comunicación, se planteó analizar si una célula MDCK-R que puede establecer comunicación podría a su vez inducir a otra célula MDCK-R a establecer comunicación. En la siguiente imagen se esquematizan las 3 posibilidades planteadas.

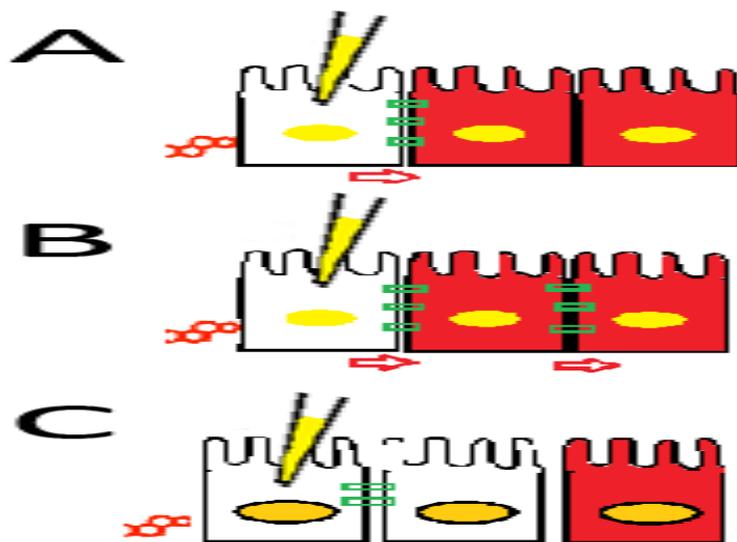
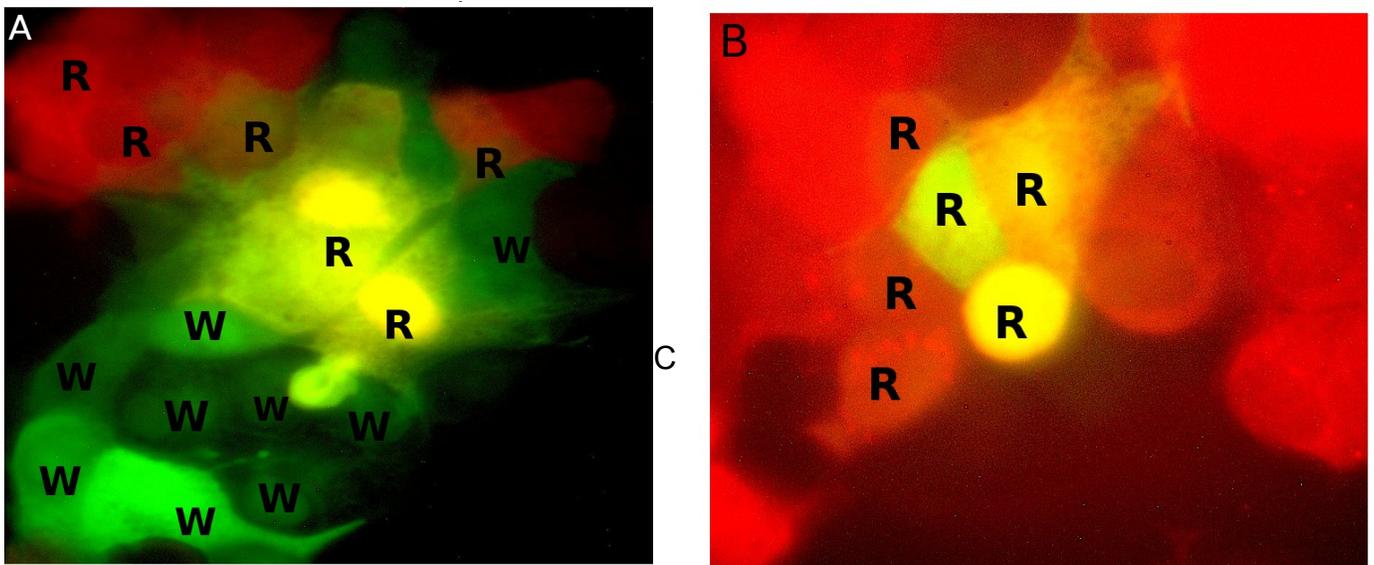


Figura 13. Esquema de una monocapa mezclada vista lateralmente en que se muestran los posibles patrones de comunicación planteados. La unión comunicante se establece como rectángulos verdes. A) Una célula MDCK-W adyacente a una célula MDCK-R responde a ouabaína y establece comunicación con ella. B) Una célula MDCK-W adyacente a una célula

MDCK-R responde a ouabaína estableciendo comunicación con su vecina resistente, pero además, dicha célula MDCK-R es capaz de establecer comunicación con otra célula MDCK-R, por lo que decimos que la “indujo” a establecer comunicación en respuesta a ouabaína. C) Solo las células MDCK-W son capaces de responder a ouabaína, cuando hay células MDCK-R adyacentes, no son capaces de establecer CIGJ.

En los ensayos de transferencia de colorante se observó que las células MDCK-R también establecen comunicación como se observa en las imágenes de la figura, ya que se observan células teñidas en amarillo, lo que nos indica que células MDCK-R que fluorescen en rojo, adquirieron el colorante de alguna de sus vecinas. Esto nos indica que las células MDCK-W son capaces de establecer comunicación con células MDCK-R con las que tienen contacto. Pero además de esta observación, se logró observar en algunas ocasiones que células MDCK-R que están rodeadas por otras células MDCK-R y por lo tanto no tienen contacto directo con células MDCK-W, también adquieren el colorante, tomando un color amarillo. Por lo tanto las células MDCK-R deben de haber recibido algún tipo de mensaje de las células MDCK-W con que tienen contacto que les permiten indicar a otras células resistentes adyacentes que deben establecer en comunicación.



Frecuencia de eventos de comunicación

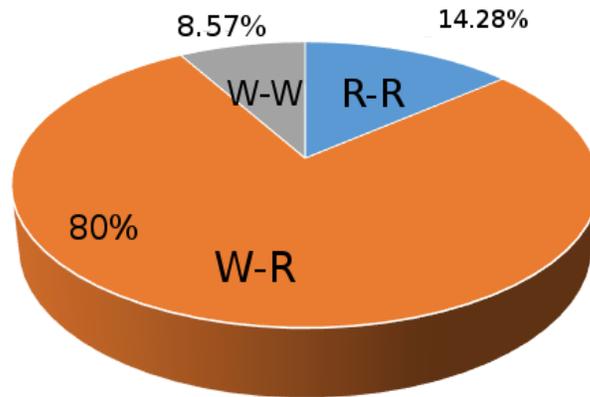


Figura 14. A) y B) Ejemplos de imágenes de fluorescencia de ensayos de transferencia de colorante en que se observa comunicación de células MDCK-W (teñidas en verde, se señalan con “W”) con células MDCK-R (se observan en amarillo debido a la sobreposición de rojo y verde, se señalan como “R”). Se señala con una punta de flecha una célula MDCK-R sin contacto directo con células MDCK-W por lo que se sugiere que un célula MDCK.R que estableció comunicación previamente indujo a dicha célula a establecer comunicación. La célula que fue inyectada se señala con una flecha. C) Análisis de la frecuencia con que ocurrieron los distintos eventos de comunicación. W-W casos en que solo se observó comunicación entre células MDCK-W, W-R casos en que se observó comunicación entre células MDCK-W y MDCK-R, R-R casos en que además de comunicación entre células MDCK-W y MDCK-R se observa que una célula MDCK-R que establece comunicación “induce” a otra célula MDCK-R adyacente a establecer comunicación. Es importante mencionar que todas las inyecciones fueron realizadas en zonas de contacto entre células MDCK-W y MDCK-R.

DISCUSIÓN

El estudio de la “nueva” hormona ouabaína, denominada así ya que hace solo algunos años se le propuso como hormona, apenas ha comenzado a revelar cuáles pueden ser sus funciones fisiológicas. La presente tesis se suma a este objetivo con base en el interés de nuestro grupo de averiguar cuáles son los efectos de ouabaína sobre la unión comunicante.

La primera parte de los resultados concerniente a las células MDCK-R se suma a la creciente cantidad de estudios que permiten identificar a la Na^+ , K^+ -ATPasa como el receptor de la hormona ouabaína para desencadenar diversos efectos. Se demuestra que las células MDCK-R son insensibles a ouabaína y no presentan cambios en la CIGJ tras ser tratadas con ouabaína 10 nM, así como tampoco responden con ningún cambio en la unión oclusora y la ciliogénesis. Por lo tanto la Na^+ , K^+ -ATPasa es el receptor para la hormona ouabaína que media los efectos observados sobre la unión comunicante.

En cuanto a las observaciones hechas con mezclas, los resultados obtenidos nos indican que la hormona ouabaína es capaz de modular a la unión comunicante en mezclas de células MDCK silvestres y resistentes a ouabaína. De este resultado se puede inferir que la presencia de células MDCK-W permite reestablecer la respuesta a ouabaína y por lo tanto los contactos entre células normales y resistentes deben ser necesarios para que se dé la respuesta a la hormona.

Sin embargo en un primer momento tras observar este resultado, surge la duda de si el aumento en la comunicación observado es producto de la comunicación establecida solo entre células silvestres, que son sensibles a los efectos de ouabaína. Lo que podría dejar fuera del cuadro a las células resistentes. Por ello se procedió a analizar si células resistentes también participan en el establecimiento de CIGJ como lo hacen las células silvestres.

Los resultados nos muestran que las células MDCK-R si establecen comunicación con células MDCK-W, lo que confirma la idea de que los contactos entre células silvestres y resistentes es necesario para recuperar la capacidad de establecer CIGJ en respuesta a ouabaína.

Interesantemente se observó que no solo las células resistentes que tienen contacto directo con células silvestres pueden establecer CIGJ como sería de esperarse, sino que además

las células MDCK-R adyacentes solo a otras células resistentes, aun sin tener contacto directo con células silvestres pueden establecer CIGJ. Esta observación tiene varias implicaciones, en primer lugar que como parte de la respuesta a ouabaína las células silvestres activan alguna cadena de señales que indica a las células resistentes que deben establecer CIGJ en respuesta a ouabaína. Esto implica además que debe suceder una secuencia de varios eventos en respuesta al estímulo con ouabaína: 1) Las células MDCK-W son sensibles a ouabaína, por lo que cuando ouabaína se une al receptor, desencadenan un proceso de señalización que tiene como resultado final el incremento en la CIGJ, probablemente generando la apertura de canales presentes en la membrana. 2) Una vez que células MDCK silvestres y resistentes establecen CIGJ entre sí, la célula resistente debe recibir algún tipo de mensaje químico generado en la célula silvestre. 3) Una vez que las células MDCK-R han recibido esta señal pueden transmitírsela a otra célula resistente adyacente que no tiene contacto directo con células silvestres. El alcance de dicho proceso puede ser limitado por la concentración del agente químico, que difundirá a través de varias células reduciendo su concentración.

Aunque al momento, los experimentos realizados no nos dan información directa sobre el mecanismo que provoca el incremento en la CIGJ, con base en diferentes observaciones de estudios previos y trabajos de diversos autores puede proponerse una posible explicación. Diversos estudios han demostrado que algunas moléculas de señalización como c-Src se asocian a la Na⁺, K⁺-ATPasa y que la unión de ouabaína provoca cambios conformacionales que exponen el sitio activo de la cinasa. Esta cinasa puede activar a su vez a otras cinasas como ERK 1/2. Si bien en el caso de las mezclas, desconocemos el papel de Src y ERK, debe de considerarse esta posibilidad para futuros ensayos.

Estudios previos de nuestro laboratorio sobre el efecto de ouabaína 10 nM sobre la CIGJ en células MDCK-W han sugerido que el incremento de la CIGJ en estas células no es producido por incrementos en la síntesis de conexinas, con base en 2 observaciones; el efecto se comienza a observar desde tiempos tan tempranos como 15 minutos, alcanzando su pico máximo en una hora. Estos tiempos son insuficientes para un proceso que implique la síntesis de proteínas. Por otra parte el tratamiento con Actinomicina D y Cicloheximida, agentes que inhiben los procesos de transcripción y traducción. Sin embargo no podemos descartar

aún que alguna pueda provocar incremento en la expresión de conexinas, ya que no se han hecho este tipo de estudios en tiempos mayores como 24 horas.

Por esto se considera que el aumento observado en la CIGJ puede ser explicado al menos en parte por procesos que más bien desencadenan la apertura de conexinas que ya se encuentran en la membrana. Las conexinas son proteínas muy reguladas de diversas formas, principalmente modificaciones postraduccionales como fosforilaciones. Al menos en el caso de conexina 42 existen varios sitios de regulación por fosforilación que pueden generar la apertura de los canales. Algunos de estos sitios son específicos para algunas cinasas como Src y Erk 1/2. La información mencionada anteriormente sobre la asociación a la Na⁺, K⁺-ATPasa hace candidatas a estas proteínas de señalización como posibles participantes del proceso además de que es sabido que las células MDCK expresan conexina 42.

Además de la apertura de los canales, debemos considerar un posible aumento en la residencia en la membrana de las conexinas. Si bien los resultados previos de nuestro laboratorio permiten descartar incrementos en la expresión de conexinas, la evidencia de dichos estudios no nos da información sobre la permanencia en la membrana de las conexinas. Si bien las células MDCK-R no tendrían este aumento, el aumento de la cantidad de canales en una célula MDCK-W puede aumentar la probabilidad de que los pocos canales que se encuentren abiertos en células MDCK-R (los cuales no son suficientes para permitir el paso de colorante en un ensayo de transferencia) podrían encontrarse con otros canales de la célula MDCK-W.

Diversos segundos mensajeros son AMPc, IP3 e incluso algunos RNA's pequeños como miRNA's pueden pasar a través de las uniones comunicantes. Por ello y con otras ideas en mente puede proponerse que la señal antes mencionada probablemente se transmita a través de la misma unión comunicante. Interesantemente, existen numerosos reportes que demuestran que uno de estos mensajeros, el AMPc además es capaz de modular la unión comunicante. En dichos trabajos se observa que el AMPc incrementa la CIGJ en numerosas líneas celulares, si bien la información no es del todo consistente ya que en algunos reportes se ha visto que AMPc disminuye la CIGJ o simplemente no tiene efecto, la mayoría de los datos indican un aumento. Una vez abierta la unión en células MDCK-W pueden pasar a través de ella la molécula mensajera a la célula resistente adyacente provocando la apertura de

nuevas conexinas y nuevamente el paso de la molécula mensajera a otra célula adyacente. Es importante destacar que en varios de estos estudios se ha demostrado que el AMPc incrementa la CIGJ aumentando la permanencia de conexinas en la membrana y el tráfico de conexinas. Además, AMPc puede activar a algunas cinasas como ERK.

De los resultados obtenidos se decidió analizar la frecuencia con que se dan los patrones de comunicación. Resulta interesante que la comunicación entre células silvestres y resistentes es el que se da con mayor frecuencia, por lo que podemos pensar que sucede con cierta facilidad en los tiempos analizados. El evento de comunicación R-R si bien es poco común basta para poder afirmar que sucede. En este aspecto es importante considerar 2 aspectos. El primero es que en las mezclas de células silvestres y resistentes el acomodo de las células no permite observar muchas zonas en que se encuentren células resistentes en contacto solo con otras células resistentes y en segundo lugar si tenemos en cuenta la gran cantidad de eventos que tienen suceder para que el mensaje llegue hasta una célula resistente sin contacto con células silvestres, el tiempo de incubación de una hora puede ser algo reducido para poder observar el fenómeno con mayor frecuencia.

Los resultados de este trabajo tienen una gran importancia ya que hemos demostrado que puede restituirse la capacidad de establecer comunicación en respuesta a un estímulo (en este caso la hormona ouabaína) a células que han perdido dicha capacidad. Un ejemplo de células que pierden la capacidad de establecer comunicación, con consecuencias importantes sobre el fenotipo celular es el cáncer. Distintos tipos de células cancerosas pierden su capacidad de comunicarse así como su sensibilidad a diversas sustancias y hormonas que inducen comunicación (Loewenstein et al., 1964). Se ha relacionado la pérdida de comunicación con el desarrollo del cáncer y su agresividad, así como el restablecimiento de la comunicación con la reversión hacia un fenotipo menos agresivo.

Existen otras enfermedades que conllevan alteraciones en la comunicación, como algunas enfermedades cardiovasculares y algunos padecimientos de origen neurológico. Por esto un fenómeno como el descrito podría ser importante para restituir la comunicación y con ello la respuesta fisiológica normal. En un sentido más amplio puede ser a su vez un fenómeno que restituya la respuesta a hormonas, con efectos más allá de la comunicación.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

En el presente estudio se demostró que la Na^+ , K^+ -ATPasa es el receptor que media los efectos sobre la CIGJ en células MDCK, lo que se une a diversos estudios que han demostrado que la Na^+ , K^+ -ATPasa es el receptor de la hormona para diversos efectos. Por otra parte se pudo constatar que la hormona ouabaína incrementa la CIGJ en mezclas de células MDCK silvestres y resistentes. Y de forma importante, que las células resistentes son capaces de establecer CIGJ con células silvestres en respuesta a ouabaína e incluso células resistentes que no tienen contacto directo con células silvestres pueden establecer CIGJ por lo que existe un fenómeno de inducción de la comunicación.

El fenómeno descrito en este trabajo puede ser importante para enfermedades en que las células pierden la comunicación, adoptando características anormales.

Es por esto que será importante determinar la naturaleza del mecanismo por el que la ouabaína induce incremento en la CIGJ en mezclas en futuros trabajos. Se debe tener en cuenta para futuros trabajos el papel de proteínas de señalización como c-Src y Erk 1/2, (que ya han sido descritos en células MDCK silvestres y por lo que se espera que participen en estos procesos) mediante ensayos con inhibidores específicos de estas proteínas. Además sería importante evaluar el papel de moléculas que pueden difundir a través de la unión comunicante y que a su vez pueden modular la unión comunicante como es el caso del AMPc.

BIBLIOGRAFÍA

Aperia, A. (2007). New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drugtarget. *J Intern Med* 261, 44-52.

Bauer, N., Muller-Ehmsen, J., Kramer, U., Hambarchian, N., Zobel, C., Schwinger, R.H., Neu,

Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition New York: Garland Science

Cereijido, M., Contreras, R.G., Shoshani, L., and Larre, I. (2012). The Na⁺-K⁺-ATPase as self-adhesion molecule and hormone receptor. *Am J Physiol Cell Physiol* 302, C473-481.

Dragsten, P.R., Blumenthal, R., and Handler, J.S. (1981). Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? *Nature* 294, 718-722.

Evans WH1, Martin PE. (2002) Gap junctions: structure and function (Review). *Mol Membr Biol*. Apr-Jun;19(2):121-36.

Gottlieb, S.S., Rogowski, A.C., Weinberg, M., Krichten, C.M., Hamilton, B.P., and Hamlyn, J.M. (1992). Elevated concentrations of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure. *Circulation* 86, 420-425.

Ferrandi M, et al., (1993). Characteristics of a ouabain-like factor from Milan hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*;22 Suppl 2:S75-8.

Flores-Benitez, D., Rincon-Heredia, R., Padilla-Benavides, T., *et al.* (2010). Ouabain

modulates from partners to functions. *Prog Biophys Mol Biol* 94, 29-65

Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., and Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156, 1099-1111.

Gonzalez-Mariscal, L., Namorado, M.C., Martin, D., Luna, J., Alarcon, L., Islas, S., Valencia, L., Muriel, P., Ponce, L., and Reyes, J.L. (2000). Tight junction proteins ZO-1, ZO-2, and occludin along isolated renal tubules. *Kidney Int* 57, 2386-2402

Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., and Jaramillo, B.E. (2003). Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 81, 1-44.

Gonzalez-Mariscal, L., Lechuga, S., and Garay, E. (2007). Role of tight junctions in cell proliferation and cancer. *Prog Histochem Cytochem* 42, 1-57.

Gorman A.L F. Marmor A. (1974) LONG-TERM EFFECT OF QUABAIN AND SODIUM PUMP INHIBITION ON A NEURONAL MEMBRANE *J. Physiol.* , 242, pp. 49-60

H., Kirch, U., Grunbaum, E.G., and Schoner, W. (2005). Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs: effects of beta-blockade and angiotensin converting enzyme inhibition. *Hypertension* 45, 1024-1028.

Hamlyn, JM. 1991 Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*;88:6259-6263.

Herve, J.C., Bourmeyster, N., Sarrouilhe, D., and Duffy, H.S. (2007). Gap junctional complexes: isomer isolated from bovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8189-8193.

The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. (2004) Lampe PD, Lau AF. *Int J Biochem Cell Biol.* 36(7):1171-86.

Laredo, J., Hamilton, B.P., and Hamlyn, J.M. (1994). Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells. *Endocrinology* 135, 794-797.

Larre I, Contreras RG, Cereijido M. 2011 Ouabain modulates cell contacts as well as functions that depend on cell adhesion. *Methods Mol Biol.*;763:155-68.

Larre I, et al., (2006). Contacts and cooperation between cells depend on the hormone ouabain. *Proc Natl Acad Sci U S A*;103:10911-10916.

Larre, I. et al., 2004 The emergence of the concept of tight junctions and physiological regulation by ouabain. *Semin Cell Dev Biol.* 36:149-56

Larre, I., Castillo, A., Flores-Maldonado, C., Contreras, R.G., Galvan, I., Munoz-Estrada, J., and Cereijido, M. (2011). Ouabain modulates ciliogenesis in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 20591-20596

Lichtstein D, et al., 1986. Identification of a ouabain-like compound in toad skin and plasma as a bufodienolide derivative. *Life Sci.* Apr 7;38(14):1261-70.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, 2000. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman;

Manunta P, et al., 2006 Salt intake and depletion increase circulating levels of endogenous ouabain in normal men. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*;290:R553-559.

Müller-Ehmsen J, Juvvadi P, Thompson CB, Tuyman L, Croyle M, Lingrel JB, Schwinger RH, McDonough AA, Farley RA. (2001) Ouabain and substrate affinities of human Na(+)-K(+)-ATPase alpha(1)beta(1), alpha(2)beta(1), and alpha(3)beta(1) when expressed separately in yeast cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 281(4):C1355-64.

N., Nakanishi, K., Haber, E., *et al.* (1993). Physicochemical characterization of a ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8189-8193.

Ponce A, Larr, I, Castillo A, García-Villegas R, Romero A, Flores Maldonado C, Martínez-Rendón J, Contreras RG, Cereijido M. (2014) Ouabain increases Gap junctional communication in epithelial cells. *Cell Physiol Biochem* 2014;34:2081-2090.

Soderberg, K., Rossi, B., Lazdunski, M., and Louvard, D. (1983). Characterization of ouabain resistant mutants of a canine kidney cell line, MDCK. *J Biol Chem* 258, 12300-12307.

Tian, J., Cai, T., Yuan, Z., Wang, H., Liu, L., Haas, M., Maksimova, E., Huang, X.Y., and Xie, Z (2006). Binding of Src to Na⁺/K⁺-ATPase forms a functional signaling complex. *Mol Biol Cell* 17, 317-326.

Van Itallie, C.M., Fanning, A.S., and Anderson, J.M. (2003). Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACYT por el apoyo otorgado para mis estudios de maestría,

A mis padres (Graciela Clara Del Toro Monjaraz y Eduardo Ogazón Bernal) y mi hermano
(Erick Gabriel Ogazón Del Toro) por su apoyo,

A los directores de la tesis (Dr. Marcelino Cereijido Mattioli y Dr. Arturo Ponce Balderas).

A los asesores (Dra. Martha Romano Pardo y Dra. Refugio Garcia-Villegas)

Agradezco también a la Dra. Lorena Hinojosa, la Dra. Aída Castillo, Eduardo Méndez, Lidia Jimenez Peña y Mauricio Serrano Rubí, ya que gracias al trabajo y apoyo de todos ellos fue posible la realización de este trabajo.