

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE
FISIOLOGÍA BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Efecto de la hormona ouabaina sobre las uniones comunicantes,
en células mamarias cancerosas y no cancerosas”**

T E S I S

Que presenta

BIOL. MAURICIO SERRANO RUBÍ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
FISIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR

Directores de tesis:

Dra. María del Refugio García Villegas

Dr. Marcelino Cerejido Mattioli

Ciudad de México

SEPTIEMBRE, 2016

Agradecimientos:

A mis padres y hermanos, por su apoyo moral y económico durante todo el trayecto de la maestría.

A mis directores de tesis.

A mis asesores y sinodales:

Dr. Arturo Ponce Balderas

Dr. Fanis Missirlis.

A mis compañeros de laboratorio:

Dra. Lorena Hinojosa Baca

Dra. Aida M. Castillo Alvarez

A mis compañeros y amigos, que aunque ya no están conmigo, nunca me dejaron estar completamente solo, mismos a quienes no me atrevo a llamar mis mascotas...

INDICE

INDICE	3
RESUMEN.....	5
ABSTRACT	5
INTRODUCCION	6
La ouabaína.....	6
Historia de la ouabaína	6
La ouabaína.....	7
La molécula de ouabaína y sus análogos.....	8
La ouabaína como hormona.....	10
La química fisiológica de la Ouabaína.....	10
La hormona ouabaína.....	13
La comunicación intercelular.....	15
Ouabaína y comunicación intercelular.....	16
El cáncer.....	17
Los hallmarks del cáncer.....	18
El cáncer y la comunicación intercelular.....	20
El cáncer de mama.....	23
Las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF10-A.....	25
OBJETIVOS.....	27
OBJETIVO GENERAL	27
Objetivos Particulares.....	27
HIPÓTESIS:	29
MATERIALES Y METODOS	29
Cultivo celular	29
Depleción y tratamiento:.....	30
Microinyección	31
Procesamiento de las imágenes	31
Sensibilidad a la ouabaína	32
RESULTADOS.....	33
De la prueba de sensibilidad a la ouabaína	33
De los ensayos de transferencia de colorante.....	34

DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES.....	43
PERSPECTIVAS DE TRABAJO.....	44
BIBLIOGRAFIA	46

RESUMEN

La presente tesis trata del efecto de la ouabaína sobre de comunicación celular en el cáncer de mama. Se sometieron dos líneas celulares de epitelio mamario, canceroso (MDA-MB-23) y no canceroso (MCF-10A), a tratamiento con ouabaína en una concentración de 50 nM; se observó que la ouabaína en esa concentración es capaz de inducir la comunicación celular medida por uniones de hendidura en las células mamarias no cancerosa, mientras que en las cancerosas no. Se hicieron también ensayos de sensibilidad a la ouabaína en las dos líneas celulares y se encontró que las células cancerosas son insensibles, mientras que en las no cancerosas la ouabaína si causa los efectos ya conocidos en el laboratorio.

ABSTRACT

This thesis is about the effect of ouabain in cellular communication of mammary cancer. Two cell lines of normal and cancerous mammary epithelium where treated with oubain 50nM; we observe that oubain in this concentration can induce cellular communication via gap junctions in normal cells, meanwhile the same treatment has no effect in cancer cells. Also we measure the ouabain sensibility of both cell lines and we found that cancer cells are insensitive and normal cells have the common response previously known in our labs.

INTRODUCCION

La ouabaína

Historia de la ouabaína

Debo dar una idea del trasfondo histórico de qué me ha llevado a estudiar el efecto de la ouabaína sobre la comunicación intercelular. La manera habitual es pretender que se trata de un único hilo narrativo que atravesó miles de años en forma lineal, e imperturbable, sin interaccionar con nada, y eso en sí conlleva una falsedad totalmente inaceptable. Para justificar que no adoptaré ese formato, mencionaré que la historia de mi tema arrancó hace miles de años en tiempos en que no se habían desarrollado los conceptos de molécula, ni de hormona, ni de contactos celulares. Tampoco se sabía de fisiología cardíaca, ni de hemodinámica, de hipertensión arterial, ni se tenía una noción de "fármaco cardiotónico". Por eso partiré de conceptos aparentemente independientes y arbitrarios. (1) Desde hace miles de años se sabía que el extracto de algunos vegetales tenía tóxicos y venenos con los que se podían embadurnar puntas de flechas, lanzas, dardos para atontar o matar animales de caza o guerreros enemigos. (2) pero no se tenía el concepto de "especie" vegetal ni animal. (3) Los vegetales que tenían dicho poder no pertenecían de una única especie. (4) no había dispositivos para medir la presión arterial ni se sabía de dicha variable. (5) Ni siquiera había nacido William Harvey (1578-1657), descubridor de la circulación de la sangre. (6) El estudio detallado de los componentes de células y tejidos animales o vegetales requiere el uso de instrumentos que permitan ampliar muchas veces la imagen de las estructuras que los constituyen. (7) Pero el microscopio recién fue inventado por un fabricante de anteojos de origen holandés, llamado Zaccharias Janssen, alrededor del año 1590, y pasó mucho tiempo hasta que se pudo adaptar al estudio de tejidos biológicos. (8) El microscopio fue inventado por un fabricante de anteojos también de origen holandés. Pero pasaron muchos años antes de que se lo pudiera aplicar al estudio

de tejidos orgánicos. (9) Recién en 1655, el inglés Robert Hooke creó el primer microscopio compuesto, en el cual se utilizaban dos sistemas de lentes, las lentes oculares (u ocular) para visualizar y las lentes objetivas. Publicó "Micrographia", el primer libro en el que se describían las observaciones de varios organismos realizadas a través de su microscopio. (10) En su libro, Robert Hooke llamó "células" a los numerosos compartimientos divididos por paredes, que no por eso correspondían a lo que hoy llamamos "membrana celular", pues la visualización de estas requirió microscopios electrónicos, fijaciones especiales (glutaraldehído), y aparatos capaces de cortar tajadas muy delgadas (ultramicroscopios). (11) El análisis químico de los componentes del miocardio recién se comenzó en el siglo XX. (12) El conocimiento de que la fisiología de todo el corazón depende de fenómenos eléctricos que se fueron desarrollado a partir del Siglo XX, pues el descubridor del electrocardiograma, Willem Einthoven, vivió entre 1860 y 1927).

Todos esos desarrollos, conceptos, aparatos, sustancias químicas, patologías, farmacodinamia, etc. recién se empezaron a amalgamar en la primera mitad del siglo XX.

Por eso, para referirme a los grandes pasos y etapas que constituyen el campo de mi tesis, seguiré entonces rutas independientes, y sólo señalaré sus cruces cuando sean pertinentes.

La ouabáina

Del somalí *waabaayo* que significa "veneno de flecha", se conociera como sustancia química, dicha sustancia y sus análogos químicos fueron utilizados por tribus primitivas como los Hadza (Figura 1) y Sam del sureste de África, los Penan de Borneo, hasta algunas de la Amazonia como los Shuar y los Ureu-wau-wau, para envenenar sus flechas, dardos y lanzas con macerados de diversas

plantas entre las que figuraban los géneros *Acokanthera* , *Nerium*, *Asclepias*, *Strophanthus*, *Apocynaceae* y *Digitalis* (Figura 1)

La molécula de ouabaína y sus análogos.

Entre los vegetales de los cuales provienen predominaban el género digitálico, de los cuales se fueron aislando metabolitos secundarios como los glucósidos como la ouabaína, digitonina, digitoxina, digitogenina, bufotenina, etc. Cuando se llegó a caracterizar su efecto sobre el corazón, se los agrupó bajo el nombre de **digitálicos cardíacos**.

Muchas plantas y el cuerpo de muchos insectos son tan ricas en estos digitálicos. Se debe a que los usan como una defensa para repeler la depredación (Roca-Jácome, 2004)



Figura 1. Izquierda: Tribu Hadza en ritual de cacería. Derecha: Digitalis y Strophanthus

Aunque el uso de los glucósidos cardíacos se remonta a los egipcios y romanos, que los usaron como venenos de flechas, el primero en registrar

formalmente los beneficios de estas plantas fue William Withering, médico inglés del siglo XVIII que observó que los pacientes con edema maligno (*dropsy* en inglés), mejoraban notablemente cuando eran tratados con una infusión de “foxglove” cuyo nombre científico es *Digitalis purpurea* (Larre et al. 2014). No obstante, el éxito de Whithering en el tratamiento del edema maligno, nunca advirtió que lo que parecía una enfermedad generalizada, el edema, no era más que el síntoma detrás de la verdadera patología que hoy se conoce como insuficiencia cardíaca congestiva. En esta enfermedad el corazón no puede bombear la sangre en suficiente cantidad debido a una falla en la válvula tricúspide permite que parte de la sangre, regrese al circuito venoso durante la sístole ventricular, aumente su presión en los capilares, provocando que el espacio intersticial se llene de líquido. Concomitantemente los tejidos, afectados por la falta de la sangre que la insuficiencia impidió que le llegara, pasa a resentir la falta de oxigenación y de nutrientes, envían señales que llegan en forma refleja al corazón, y es como si este intentara compensarlo aumentando su función, esfuerzo a la larga acaba hipertrofiándolo (para una revisión actual, ver Roca-Jácome, 2004). El éxito del uso de las infusiones de estas plantas en el tratamiento del edema maligno, llevó a la Societè de Pharmacie de París a crear un premio para quien encontrase el principio activo del foxglove, originando una carrera intelectual y de trabajo bioquímico que llevó a aislar varios de ellos a los que se les denominó en conjunto **digitálicos**, entre los que figura la ouabaína.

Desde entonces y por mucho tiempo la ouabaína fue considerada un metabolito producido exclusivamente por las plantas, como si se tratara de clorofila o algún principio activo antibiótico.

La ouabaína como hormona.

No fue sino hasta finales del siglo XX y principios del presente cuando se constató que es una hormona. Uno de los grupos pioneros en el tema fue el de Hamlyn en 1991, quienes usando espectrometría de masa demostraron que se produce en el organismo una sustancia idéntica a la ouabaína de los vegetales. A pesar de estos experimentos, algunos escépticos argumentaron que la ouabaína bien podría provenir de la dieta, ya que los vegetales la poseen en buena cantidad. Posteriormente esto se confirmó con resonancia magnética nuclear de protones (Kawamura et al., 1999), y espectrometría de ionización (Komiyama et al., 2001). □ Incluso se pudo demostrar que la ouabaína es sintetizada en el hipotálamo y las glándulas suprarrenales, y se secreta en concentraciones bajas, similares a las de la una hormona (Hamlyn et al., 1991).

La química fisiológica de la Ouabaína

Químicamente la ouabaína tiene una constitución similar del resto de los digitálicos: 1) consta de un núcleo esteroideo ciclopentano-perhidro-fenantreno (colesterol) 2) un grupo glicona formada por una o varias azúcares (para el caso particular de la ouabaína una manosa) y 3) Un grupo funcional en el carbono 17 del esteroide (la ouabaína tiene una lactona). La ouabaína es un cardenólido caracterizado por tener la configuración estereoquímica siguiente: los carbonos C5 y C14 tienen cada uno un grupo hidroxil β -orientados, el C3 un azúcar L-ramnosa y una lactona b-orientada en el C19, esto se ilustra en la figura 2 (Hamlyn et al., 1991).

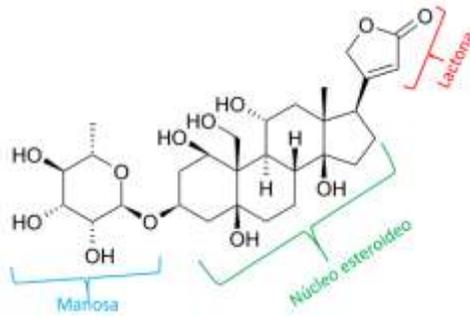


Figura 2. Estructura química de la ouabaína.

Así como muchos fármacos, la ouabaína llega a un receptor, por el que tiene una alta afinidad. Este receptor es la Na^+, K^+ ATPasa descubierta por Jens Skou en 1957 en extractos de cangrejos, y le llamó así porque justamente su capacidad de hidrolizar ATP depende de las concentraciones de sodio y potasio que se encuentran al interior y exterior de una membrana biológica (llamase membrana celular, mitocondrial, de Golgi, etc.) gracias a la hidrólisis de ATP (Skou, 1957).

Estructuralmente la Na^+, K^+ -ATPasa consta de tres subunidades, la alfa, beta (Figura 3) y gamma, de estas la α y la β se expresan ubicuamente en los tejidos, mientras que la subunidad γ se expresa de manera tejido específica (Therien, Goldshleger, Karlish, & Blostein, 1997); en los mamíferos se han descrito cuatro isoformas de la α y tres de la β .

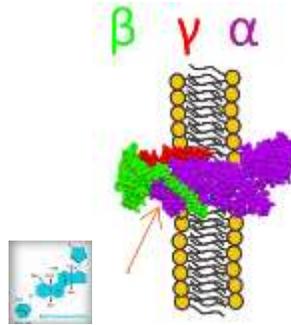


Figura 3. Estructura de la Na⁺K⁺ATPasa, Indicado sitio de unión a la ouabaína

La ouabaína se une a la subunidad α de la Na⁺,K⁺-ATPasa, esta es una molécula de aproximadamente 112 KDA y atraviesa 10 veces la membrana celular dando lugar a sitios transmembranales, intercelulares y extracelulares, precisamente la porción extracelular es la que posee el sitio de unión a la ouabaína en los segmentos α M1 α M6. La isoforma 1 de la subunidad α de la Na⁺,K⁺-ATPasa es la que presenta la mayor afinidad por la ouabaína ($K_m < 10^{-8}$), en la figura 4 se ilustra la orientación sugerida por Magpusao y colaboradores en 2015. En ese mismo trabajo se hicieron modificaciones a las tres partes de la ouabaína ya mencionadas y se observó cómo se modificaban tanto la orientación como en el efecto que causa sobre la Na⁺,K⁺-ATPasa, de tal manera que pudo determinarse que la estructura más importante para que la ouabaína lleve a cabo su función es el núcleo esteroideo, seguido del anillo lactona y por último el azúcar (Magpusao et al., 2015a)

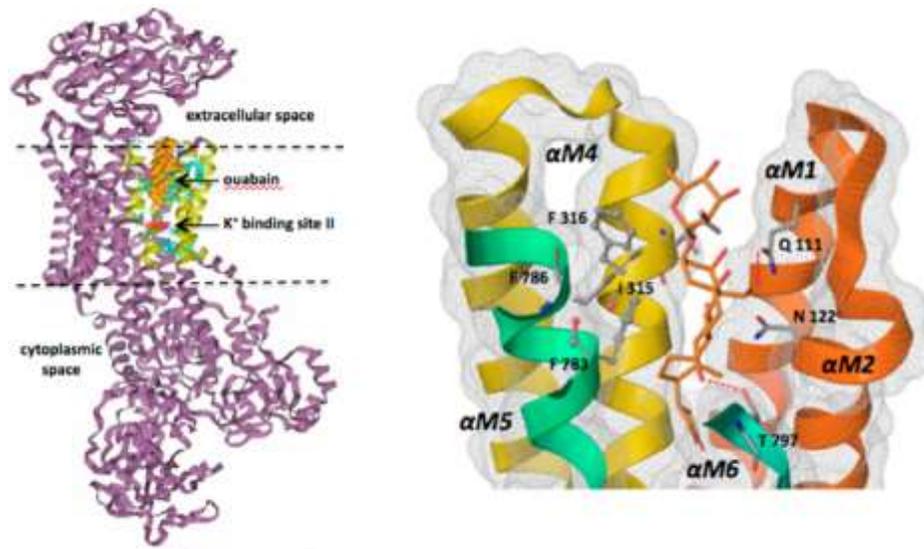


Figura 4. Sitio de anclaje de ouabaína y orientación espacial

La hormona ouabaína

Una vez confirmado y aceptado que la ouabaína puede producirse endógenamente, y que tiene un receptor, por supuesto la siguiente pregunta fue: Si la ouabaína es una hormona ¿Cuál es entonces su función fisiológica? Así pues, para orientar la búsqueda de la función fisiológica de la ouabaína en 1999 Contreras y colaboradores tomando en cuenta los trabajos de demostraron que cuando se aplica ouabaína en altas concentraciones (1 μM), esta bloquea las funciones de la Na^+, K^+ -ATPasa, por lo tanto incrementan los niveles intracelulares de Na^+ y Ca^{++} , y disminuye el de K^+ , también propicia que las moléculas de membrana asociadas con el contacto y la adhesión célula-célula y célula-sustrato sean endocitadas, causando que se despeguen. No obstante también se pudo constatar que a pesar de que las células se despegaban, no presentaban signos de apoptosis, por lo que en adelante a estas concentraciones (superiores a los 400

nM) se les denominó tóxicas (Contreras et al., 1999). Esta observación llevó a sospechar que quizás, a concentraciones fisiológicas (10 - 70 nM), la ouabaína puede unirse a la Na⁺,K⁺-ATPasa, pero sin inhibir la bomba ni causar un desbalance iónico pero aun así modular los contactos celulares.

Con dicha idea *in mente* Larre et al., mostraron que a concentraciones hormonales (10 nM) la ouabaína modula contactos celulares y evaluaron en principio los efectos de esta sobre la unión oclusora. Realizaron ensayos de resistencia transepitelial (TER por sus siglas en inglés), y resultó evidente la ouabaína a concentraciones fisiológicas (10, 50 y 100 nM) incrementa el grado de hermeticidad de la unión estrecha (TJ) de manera concentración dependiente, pero si la concentración se eleva por encima de 500 nM la TJ se abre y la TER cae, lo cual concordaba con los resultados de Contreras en 1999 (Larre et al., 2010) .

Este mismo grupo de trabajo realizó estudios para probar los el efecto de la ouabaína que tiene sobre la diferenciación celular dependiente de contactos celulares, para ello midieron la velocidad de la ciliogénesis en cultivos de células MDCK; cuando estas células en cultivo llegan a confluencia, comienzan a desarrollar un cilio en su dominio apical y, paulatinamente, todas las células llegan a tener un cilio. Si este mismo proceso se hace en presencia de 10 nM ouabaína, la ciliogénesis es mucho más rápida en este estudio en las primeras 24 horas, la velocidad de la ciliogénesis aumenta un cerca del 400% . En resumen: la ouabaína modula también los contactos célula-célula que se establecen cuando las células llegan a confluencia (Isabel Larre et al., 2011).

En trabajos más recientes se demostró también que la ouabaína es capaz de aumentar la comunicación celular mediada por uniones de hendidura (GAP junctions), estos experimentos fueron realizados por el grupo de trabajo de Ponce A., y colaboradores. No obstante, antes de explicar estos experimentos, que son los antecedentes ligados más directamente a esta tesis de maestría, por fines

didácticos a continuación se describirán algunas generalidades de las uniones comunicantes.

La comunicación intercelular

La comunicación intercelular es uno de los elementos más importantes en la fisiología de las células, tiene varias funciones tanto a nivel celular como tisular entre las que se encuentran el mantenimiento del homeostasis órgano-tisular, la respuesta sincronizada frente a las condiciones ambientales, la diferenciación celular, así como la cooperación metabólica. Para llevar a cabo todos estos procesos hace falta que los citoplasmas de las células vecinas de un órgano puedan transmitirse de manera directa iones y moléculas pequeñas, de hasta aproximadamente 1 kDa en tamaño, que hacen las veces de señal. Para este efecto, cuando las células se contactan pueden establecer unas estructuras llamadas en inglés *gap junctions* y en castellano *uniones comunicantes* (figura 5). Estructuralmente las uniones comunicantes constan de un hexámero de proteínas llamadas conexinas, que al unirse integran un hemiconexón, a su vez se unen a un hemiconexón ubicado en una célula vecina y completan la estructura conocida como conexón; una vez ensamblada esta estructura posee un poro que puede estar abierto o cerrado, cuando están abiertos es precisamente que permiten el paso de las sustancias, mismas puede llevar cargas eléctricas o ser neutras (Meşe, Richard, & White, 2007). Estos conexones generalmente no se encuentran aislados, sino que se agrupan en conjuntos de tamaño considerable que aparecen en las imágenes de réplicas de criofractura como círculos o hexágonos. (Shivers & McVicar, 1995)

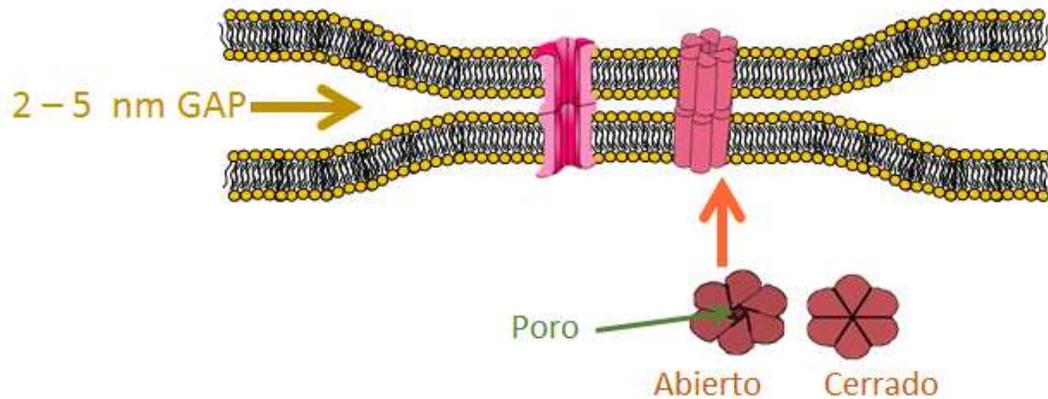


Figura 5. Esquema de la unión comunicante: Muestra dos membranas celulares unidas por un Conexones

Ouabaína y comunicación intercelular

En 2014 Ponce y colaboradores demostraron con ensayos de transferencia de colorante, que la ouabaína, a concentraciones hormonales (10 nM) es capaz de incrementar la comunicación. Estos experimentos consistieron en inyectar una célula MDCK de una monocapa confluyente, dos moléculas, una fluorescente (Dextran de 20 kDa marcado con FITC que tiñe al citoplasma de verde) que debido a su tamaño no puede pasar a través de las uniones comunicantes y es retenida en la célula inyectada. La segunda molécula que se inyecta simultáneamente es neurobotina (0.3 kDa), una molécula no autofluorescente que sí es capaz de pasar a través de las gap junctions. Al final del experimento la monocapa es fijada y tratada con Streptavidina TRITC, sustancia de muy alta afinidad por la biotina, y el

procedimiento revela si la neurobiotina pudo pasar a células vecinas través de uniones comunicantes y muestra las células unidas a la inyectada directa o indirectamente (Ponce et al., 2014).

El cáncer.

Hanahan y Weinberg, han hecho recientemente una revisión exhaustiva y lograron determinar que si bien existen muchos tipos de cáncer hay características que todos ellos poseen (las llama en inglés “Hallmarks”). Los tumores no son solo una masa aislada de células con una tasa de proliferación acelerada, sino que son tejidos complejos compuestos por distintos tipos celulares que participan en interacciones homo y heterotípicas. Un tumor canceroso tiene células troncales cancerosas, pericitos junto con sus respectivas células endoteliales, fibroblastos asociados, células inflamatorias y células cancerosas primarias e invasivas, así como también están rodeadas de células normales del paciente. De forma sintética esta revisión habla de 6 Hallmarks ya definidos que tienen que ver con las capacidades biológicas particulares del cáncer, hay además 2 hallmarks emergentes pues fueron registrados más recientemente, y 3 condiciones de los tumores cancerosos que permiten habilitar a otras células no cancerosas para hacer que “trabajen para ellos” (Hanahan & Weinberg, 2011).

Los hallmarks del cáncer

1. **Inducción de angiogénesis:** los tumores cancerosos tienen la habilidad de reclutar células de tal manera que surgen capilares que les permiten obtener los nutrientes necesarios.
2. **Inflamación:** Uno de los tipos celulares más comunes en un tumor canceroso son las células inflamatorias que lo penetran, pero que se observan preponderantemente a su alrededor.
3. **Reprogramación de la energía metabólica:** Conforme avanza un tumor, requiere que la energía le sea suministrada más y más rápido, para ello las células cancerosas reprograman su metabolismo y el de las células vecinas para que metabolicen por la vía glicolítica en lugar de la oxidativa. La primera resulta carísima metabólicamente hablando, porque en lugar de obtener 36 moléculas de ATP por glucosa procesada, sólo obtiene 2.
4. **Reclutamiento de células normales:** Las células cancerosas son capaces de reclutar a otras normales para cubrir sus necesidades fisiológicas, incluso pueden de transformarlas en alguna de tipo canceroso.
5. **Activación de la invasión y metástasis:** Los cánceres pueden invadir otros tejidos aledaños, o a considerable distancia, para ello es imprescindible la comunicación, tanto para preparar las células que han de partir del tumor primario con rumbo a otros tejidos, como cuando hace metástasis y ocurre un fenómeno conocido como HOMING en el que la célula cancerosa no viaja hacia cualquier parte, sino que reconoce un microambiente donde puede instalarse y causar un tumor en otro lugar del organismo. Uno de los requerimientos es, por supuesto, que las células que reciben a las metastásicas estén listas para comunicarse con ellas y, por ejemplo, vascularizar la metástasis.

6. **Inestabilidad genómica:** Los cánceres tienen la habilidad de evadir las señales que en condiciones normales llevarían a una célula a la muerte por apoptosis, es por ello que tienden a acumular material deletéreo que aunado a la constante replicación del ADN tornan inestable al genoma, causándole un sin número de mutaciones. Muchas de estas moléculas que se van acumulando son de tamaño pequeño como las especies reactivas del oxígeno u otros radicales libres, y pueden pasar a través de las uniones comunicantes.

El artículo de Hanahan & Weinberg menciona además otras 5 características de los cánceres que, si bien no tienen que ver con la comunicación, o al menos no obviamente, son importantes para la comprensión de estas patologías:

- **Señal de proliferación celular sostenida:** Las células cancerosas se reproducen constantemente, esto es por que mantienen señales de proliferación celular como las ciclinas, o la MAP cinasa.
- **Evaden supresores de crecimiento:** Las células adultas en condiciones normales, poseen vías que regulan la reproducción y el crecimiento de manera negativa como lo son las proteínas asociadas a retinoblastoma o bien P53. Así pues, un defecto en la síntesis o mal funcionamiento de estas proteínas puede derivar en un cáncer.
- **Resisten a la muerte celular:** Como bien es sabido, las células tienen un ciclo que pueden culminar en la muerte celular programada activada por la vía de las caspasas. Un grupo de proteínas de la familia BCL-2 que son inhibidores de la apoptosis inhiben a un par de moléculas proapoptóticas Bax y Bak, e interaccionan físicamente por un motivo denominado BH3, luego una familia de proteínas con un solo motivo BH3 interfieren uniéndose a BCL-2 suprimiendo el efecto y con ello la apoptosis.

- **Habilitan su inmortalidad replicativa:** Esto indica que al reproducirse, las células cancerosas confieren la inmortalidad a las células hijas que de ella se deriven.
- **Evaden la respuesta inmune del organismo:** En condiciones normales el sistema inmune logra detectar células anormales y reacciona en su contra, impidiendo el desarrollo de tumores. Cuando por alguna razón estas células no son detectadas, se dice que evadieron la respuesta inmune propiciando así un ambiente adecuado para el desarrollo de un tumor canceroso.

El cáncer y la comunicación intercelular

En los últimos años el estudio del cáncer se ha tornado en uno de los temas de mayor importancia médica, acorde con la incidencia y gravedad de este grupo de enfermedades. Sin embargo, la mayor parte de esta investigación se ha enfocado sobre el tratamiento mediante diversos fármacos o bien sobre los estudios genéticos y epigenéticos de los cambios que tienen lugar al presentarse esta enfermedad, dejando de lado, aunque no del todo, la comprensión fisiológica de la misma al menos en lo que a comunicación se refiere.

Como bien ya se mencionó, la comunicación mediada por GAP permite el paso de moléculas de tamaño menor a 1 kD, en el cáncer es crítico este fenómeno fisiológico debido a que pueden atravesar moléculas como el AMPc, Ca⁺⁺, y algunos aminoácidos. La apoptosis celular, la familia de receptores y ligandos VEGF y las vías de señalización de AKT, EGF, P53 e inhibición de metaloproteasas de matriz, son las vías y biomoléculas más importantes afectadas, por el paso de estas pequeñas moléculas a través de las uniones comunicantes (Asadi-Khiavi, Hamzeiy, Khani, Nakhband, & Barar, 2011). Se sabe por ejemplo, que el EGF y las vías de señalización que desencadena tienen un papel vital en la carcinogénesis de los carcinomas derivados de epitelio mamario y de pulmón (Cameron et al., 2003).

Un trabajo clave fundamental que dio pie a la idea central de la presente tesis fue el realizado en 1967 por el grupo de Loewenstein W. y Kanno Y., en el que se explora mediante el paso de señales puramente eléctricas por qué las células de hígado normal y canceroso presentan comportamientos distintos en lo que a comunicación se refiere. Si obtenían células de hígado normal podían observar que el pulso inyectado en una de las células se podía registrar en algunas vecinas, aunque más atenuado. De acuerdo con la Teoría de Cable el pulso registrado en las células vecinas era mucho mayor al que se esperaría si este mismo pulso tuviera que atravesar la membrana plasmática de todas esas células, dado que suman en serie la resistencia de sus membranas. Este hecho llevo a pensar que una estructura estaba facilitando el paso de corriente entre una célula y otra, justamente esa estructura es la unión comunicante. Lo destacable fue que cuando se hizo este mismo experimento con células de tumores hepáticos, la señal eléctrica no pasaba a las vecinas, o sólo lo hacía dificultosamente, por lo que desde luego esto indicaba que las células cancerosas de hígado poseen menos uniones comunicantes. Loewenstein y Kanno llegaron a sugerir que el cáncer es una estructura anormal porque las células no se pueden sincronizarse para formar estructuras complejas como lo son un lobulillo, una nefrona, o un islote y en cambio forman tumores.

Esta misma observación fue confirmada por los trabajos de Lee y colaboradores en 1992 donde describen cómo en las células de cáncer de mama epiteliales expresan reguladas a la baja las conexinas 26x y 43x en comparación con células de epitelio mamario normal. Dicho trabajo sugiere que este fallo en el establecimiento de uniones comunicantes se da a nivel transcripcional, se apoyan en las evidencias encontradas a partir de sus experimentos que son: (a) Comprobaron mediante un análisis de restricción encimática que las secuencias que codifican para dichas conexinas que se encuentran inalteradas en las células cancerosas, (b) los mRNA de esta proteínas se encuentran débilmente expresados en células de tumores primarios pero no en las metastásicas, (c) ambos mRNA en células normales son estables en presencia de actinomicina D lo que indica que los transcritos no son degradados rápidamente, por lo tanto su ausencia en células

cancerosas no se debe a degradación del mismo (Lee, Tomasetto, Paul, Keyomarsi, & Sager, 1992). Así mismo se hicieron ensayos de transferencia de colorante con amarillo Lucifer, en los que resultó que las células de epitelio normal (línea celular 81N) había transferencia de colorante de una célula inyectada a sus vecinas, mientras que las células cancerosas (línea celular 21 MT-2), experimentos análogos a los propuestos en la presente tesis.

Ya en la era de la proteómica se han hecho estudios acerca de cómo influyen las proteínas de la unión comunicante (conexinas) en el cáncer, de tal modo que hoy en día se han relacionado conexinas como la 43X, 32X y 26X con el cáncer en ocasiones incluso de manera aparentemente contradictoria. Por un lado las investigaciones del grupo de Yano en 2001 nos dice que al transfectar células de cáncer de hígado (HepG2) con conexina 26 éstas disminuyen su capacidad invasiva debido al aumento de la actividad de la metaloproteasa (Yano & Yamasaki, 2001); del otro lado de la moneda está el trabajo más reciente de Stoletov y colaboradores en el 2013 en donde resulta que las conexinas 43 y 26 propician la invasión metastásica en cáncer de mama y melanoma (Stoletov et al., 2013). En condiciones fisiológicas normales estas conexinas tienen roles importantes en la migración celular no patológica durante el desarrollo embrional, y en la neurogénesis en particular en la migración de la cresta neural (Gstein, 2007) y las neuronas precursoras del cortex (Elias et al., 2007). Este último resultado también es inconsistente con evidencia encontrada en nuestros laboratorios donde se encontró que las conexinas 43 y 32 son intermediarios en la respuesta de las células MDCK a incrementar su comunicación mediada por GAP, propiciada por el tratamiento con ouabaína 10 nM, si se toma en cuenta la hipótesis de Loewenstein y Kano al respecto de que quizá una de las causas del cáncer es la falta de comunicación entre las células. No obstante, es notable que las conexinas y la comunicación celular juegan un papel muy importante en el cáncer ya sea porque forman parte de problema o como una propuesta de solución.

El cáncer de mama

En particular el cáncer de mama tiene un alto impacto en la población femenina de México y de todo el mundo. Las cifras oficiales del INEGI muestran que el cáncer de mama es el más frecuente en las mujeres ya que a nivel mundial representa el 16% de los cánceres femeninos y está aún por encima del cáncer de cervix. Actualmente el cáncer de mama causa 480 mil fallecimientos anuales en el mundo, mientras que las cifras para México alcanzan los 3,500. Este padecimiento se presenta con más frecuencia en países desarrollados, pero tiene mayor impacto en la población de países de bajos y medios ingresos como México, debido al aumento en la esperanza de vida, la urbanización y los cambios en el modo de vida.

En los pacientes de cáncer de mama no siempre es el tumor primario la causa principal de la muerte, sino alguna metástasis de este hacia otros órganos distantes. Actualmente no existe forma precisa de predecir las metástasis de este cáncer o cualquiera de sus subtipos de manera individual, es decir personalizada para cada paciente; por ello se ha acudido a tratamientos coadyuvantes agresivos como la radioterapia o quimioterapia, los cuales tienen efectos tóxicos en los pacientes que se les administra. El cáncer de mama es considerado una enfermedad heterogénea en el sentido de que aproximadamente 10-15% de los casos tienen un agresivo desarrollo de metástasis dentro de los primeros 3 años, no obstante tampoco es inusual que se desarrolle 10 años después de la detección (Weigelt, Peterse, & van 't Veer, 2005); La tabla 1 ilustra los principales subtipos de cáncer de mama y su frecuencia. La naturaleza heterogénea del cáncer de mama hace difícil no solo la detección del subtipo de cáncer, sino también los factores de riesgo a los que se enfrentan las mujeres enfermas, por lo cual se vuelve imperativo además del establecimiento de marcadores confiables para poder predecir el comportamiento del mismo, tratamientos que no comprometan la salud de los pacientes.

Tipo histopatológico de carcinoma invasivo mamario	Frecuencia	Tasa de supervivencia
Carcinoma ductal	50–80%	35–50%
Carcinoma lobular	5–15%	35–50%
Mixto ductal/lobular	4–5%	35–50%
Carcinoma tubular sibriforme	1–6%	90–100%
Carcinoma mucinoso	<5% 80–100%	90–100%
Carcinoma medular	1–7%	50–90%
Carcinoma papilar	<1–2%	desconocido
Carcinoma micropapilar	<3%	desconocido
Carcinoma metaplástico	<5%	desconocido
Carcinoma adenocístico	0.1%	desconocido
Carcinoma apócrino	0.3–4%	desconocido
Carcinoma neuro endócrino	2–5%	desconocido
Carcinoma secretorio	0.01–0.15%	desconocido

Carcinoma rico en lípidos	<1–6%	desconocido
Carcinoma celular-acínico	7 casos	desconocido
Carcinoma rico en glicógeno	1–3%	desconocido
Carcinoma sebáceo	4 casos	desconocido

Tabla 1: Tipos de carcinoma mamario (Chavez, Garimella, & Lipkowitz, 2010).

Clínicamente el cáncer de mama puede dividirse en distintos subtipos que tienen implicaciones tanto en el pronóstico del desarrollo de la enfermedad como terapéuticas. Existen marcadores moleculares que se expresan rutinariamente en los tumores cancerosos de mama, tal es el caso del receptor a estrógenos y receptor a progesterona, otro marcador es la expresión amplificada del receptor a HER 2. De este modo, estas expresiones características se han vuelto tanto blancos de estudio como de terapia para tratar los tumores, de tal manera que la ausencia de alguno de estos marcadores en un cáncer es considerada atípica y lo vuelve más difícil de tratar (Chavez, Garimella, & Lipkowitz, 2010).

Las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF10-A

En nuestro laboratorio se cuenta varias líneas de epitelio de mamario de las cuales describiré a continuación las dos que se han seleccionado para los propósitos del presente estudio, pues la comprensión de las características de sus fenotipos es fundamental para entender el porqué de mi investigación.

MCF-10A: Estas son células epiteliales mamarias inmortalizadas, pero no transformadas, ampliamente usadas en la investigación en torno al cáncer; poseen propiedades adherentes y provienen de una fibrosis quística de mama en una mujer

de 36 años, y fueron inmortalizadas. Este tipo de células expresan normalmente la Na^+, K^+ -ATPasa y el tipo de subunidad es alfa 1 que, como ya se dijo, es la que presenta mayor afinidad por la ouabaína.

MDA-MD-231: Son células epiteliales con propiedades adherentes menguadas, provienen de un cáncer de mama de una mujer de 51 años. Esta línea entra dentro de la clasificación de los tumores cancerosos triple negativos, lo que significa que no expresan los tres marcadores típicos (receptores a estrógenos y progesterona, ni amplificación de HER2), lo que los vuelve especialmente difíciles de tratar pues no responden a terapias hormonales ni a las dirigidas a HER2; expresan EGF así como TGF- γ Magp. Tienen comportamiento de cáncer metastásico expresan pocas proteínas de unión y no establecen comunicación mediada por GAP con las células vecinas (Leithe, Sirnes, Omori, & Rivedal, 2006). Un reciente trabajo describe que las células MDA-MB-231 pueden unir ouabaína a su Na^+, K^+ -ATPasa, además ya se había descrito con anterioridad en 2013 que esta línea celular expresa precisamente la subunidad $\alpha 1$. Cuando estas células son tratadas con ouabaína 500 nM su capacidad invasiva se disminuye, esto fue confirmado con ensayos de migración por el método de “wound healing” (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000) (Magpusao et al., 2015a) (Clifford & Kaplan, 2013). No obstante si recordamos, la concentración 500 nM ya se encuentra dentro de las que se consideran tóxicas (superior a los 400 nM), y, como describen Clifford y Kaplan en sus trabajos, las células tumorígenas son más resistentes a los efectos de los glicósidos cardíacos (entre los que figura la ouabaína) que las células normales (Clifford & Kaplan, 2013).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la ouabaína sobre la comunicación mediada por uniones de hendidura en células de epitelio mamario canceroso y no canceroso.

Objetivos Particulares

- Determinar la sensibilidad a la ouabaína de las líneas celulares MCF-10A y MDA-MB-231
- Evaluar el efecto de la ouabaína a concentraciones hormonales sobre la comunicación entre células NO cancerosas.
- Evaluar el efecto de la ouabaína a concentraciones hormonales sobre la comunicación entre células cancerosas

HIPÓTESIS:

En las células cancerosas, como ya se mencionó, la comunicación mediada por GAP está disminuida, al menos en los tipos de cáncer de mama e hígado. Dado que la ouabaína puede estimular las uniones comunicantes, se espera que al tratar las células MCF-10A y MDA-MB-231 con ouabaína en concentraciones hormonales, puedan establecer uniones comunicantes entre ellas.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo celular

MCF-10A (ATCC CRL-1031) : Fue sembrada a confluencia con medio MEMM (Lonza cat. CC-3150) y suero de caballo (GIBCO 26050-070) al 10%, complementado con el kit de la misma marca, con las especificaciones de protocolo que incluyen hidrocortizona, EGF humano e insulina humana. Este proceso se realiza en cajas Petri plásticas desechables, a 36.5°C en una atmósfera de 95% de O₂ y 5% de CO₂ (FormaScientific CO₂ incubator, Steri-Cult 200) y suplementado con suplementado con penicilina/estreptomicina 10 000 U/mm/ml (Gibco 600-5145). Luego las células se resiembran lavándolas 2 veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS-Gibco 21300-058), se incuban 20 minutos en esta solución, se elimina el PBS y se adicionan 3 ml de Tripsina–EDTA y se incuban 10 minutos. Se homogeneiza la suspensión con 15 ml de MEMM al 10% con

suplementos y se colocan sobre cubreobjetos en multicámaras de 24 pozos con 1 ml de medio suplementado, para su manipulación en el microinyector.

MDA-MB-231 (ATCC CRM-HTB-26): Se siembran a confluencia en medio RPMI (Lonza 12-702F) con suero fetal bovino (GIBCO 12483-020) al 10%. En ambos casos la siembra se lleva a cabo en cajas Petri plásticas desechables, a 36.5°C en una atmósfera de 95% de O₂ y 5% de CO₂ (FormaScientific CO₂ incubator, Steri-Cult 200) y suplementado con suplementado con penicilina/estreptomicina 10 000 U/mm/ml (Gibco 600-5145). Las células se resiembran, se lavan dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS-Gibco 21300-058) sin Ca⁺⁺, y se incuban en un tercer lavado por 20 min y pasándolas a Tripsina-TV por 3 min. Se resuspenden en medio RPMI suplementado al 10 % y se siembran en multicámaras sobre cubreobjetos para su manipulación en el microinyector.

Depleción y tratamiento:

Para observar el efecto de la ouabaína a concentraciones fisiológicas, se depletan de suero los cultivos, ya que se asume que el suero fetal puede contener ouabaína. Para este efecto se retira el medio de cultivo con 10% de suero fetal y se le sustituye por el medio óptimo para cada línea celular con sólo 1% de suero fetal, se incuba por 24 horas antes de cada experimento. En el caso de las células MCF-10A se les priva de los complementos en su totalidad durante ese mismo periodo de tiempo.

Se aplica un tratamiento de ouabaína 50 nM (solvente medio de cultivo) una hora antes de las inyecciones. La ouabaína es una molécula fotosensible, por lo que se recomienda cubrir los recipientes con aluminio para optimizar los resultados.

Microinyección

Se utilizan electrodos con una resistencia de 5-10 mΩ llenos de una mezcla de diclorofluoresceína (Sigma 200-968-6) 5% y Streptavidina-Rodamina 5% (Rockland 800-656-7625). Se inyecta con un micromanipulador inyector semiautomático (Eppendorf Injectman NI2) con el flujo de salida durante 6 minutos a temperatura ambiente, el procedimiento completo se realiza a la luz de un microscopio de epifluorescencia (Zeiss) y se toman fotos inmediatamente con el programa Axiovision 4.8. Este procedimiento se aplica a ambas líneas celulares.

Procesamiento de las imágenes

Debido a que las células MCF10-A adquieren formas irregulares al llegar a confluencia, las imágenes tomadas son procesadas para poder realizar la estadística cuantitativa en lo que a comunicación se refiere. **Primero**, las imágenes tomadas con el programa Axiovision 4.8 son guardadas con el formato .tif que permite el acceso a metadatos de las imágenes, se toman tres imágenes una para cada tipo de fluorescencia (verde/roja) y una más en contraste de fases. **Segundo**, estas imágenes son procesadas con el programa ImageJ (cualquier versión) para dar optimizar el brillo y contraste de las mismas y se les otorga color con MERGE a las imágenes .tif y se exporta en formato JPEG así mismo debe transformarse a este formato la imagen en contraste de fases. Tercero, las imágenes en JPEG son sobrepuestas con el programa GIMP 2 (software libre) para el conteo de células comunicadas como se muestra en la Figura 6.

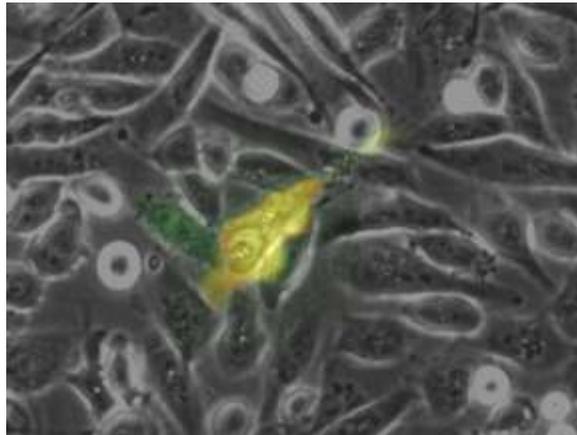


Figura 6. Técnica in sillico de triple merge (Contraste de Fases, Fluorescencia verde y fluorescencia roja). Se muestra una Inyección de células MDA-MB-231 inyectada con diclorofluoresceina y Streptavidina rodamina, La célula inyectada se ve en color amarillo, las células comunicadas en verde, la imagen en contraste de fases detalla el borde celular lo que facilita el conteo de células comunicadas.

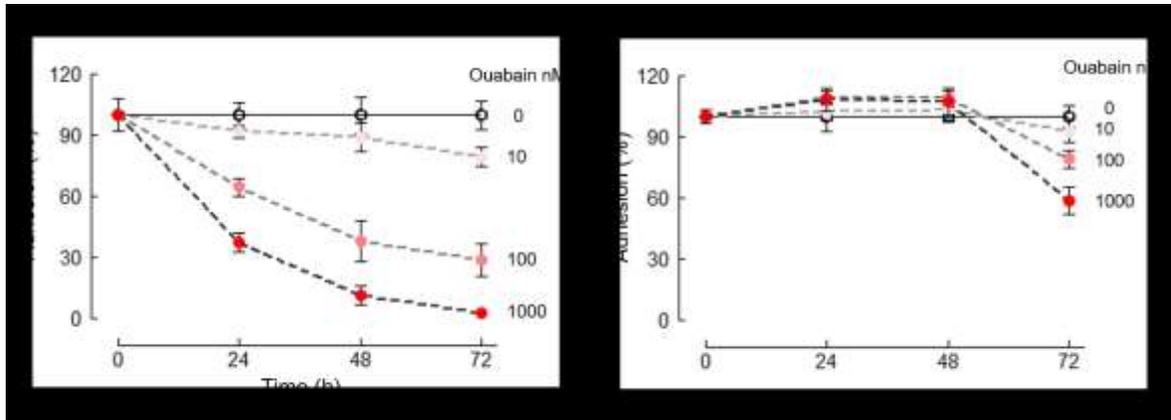
Sensibilidad a la ouabaína

Este procedimiento aplica igual para ambas líneas celulares. Se sembraron las células MDA-MB-231 y MCF-10A como se mencionó con anterioridad y se hizo la depleción, se aplicaron tratamientos con ouabaína en concentraciones de 10nM, 100nM y 1µM por 24, 48 y 72 horas, cumplido cada uno de estos tiempos se analizó el porcentaje de las células despegadas de la caja Petri tomando como referencia el total del contenido proteico que fue analizado con el Kit BCA Protein Assay de Thermo scientific (Pierce, IL) Cat. 23225.

RESULTADOS

De la prueba de sensibilidad a la ouabaína

A mi llegada al laboratorio del Dr. Cereijido, la Dra. Lorena Hinojosa, ya se encontraba realizando experimentos preliminares acerca de la sensibilidad a la ouabaína de varias líneas de epitelio mamario. De ellas se seleccionaron las líneas celulares MCF-10A y MDA-MB-231 por tener comportamientos distintos ante el estímulo con ouabaína en diferentes tiempos y concentraciones. Dichos experimentos consisten en someter estas células a un tratamiento con ouabaína a concentraciones que van desde las basales hormonales (10 nM) hasta las tóxicas y se midió el porcentaje de proteína total de las células que quedaban aun en la caja, en relación a la cantidad inicial, luego del tratamiento en tiempos 24, 48 y 72 hrs. Las células MCF-10A respondieron a la ouabaína de modo similar al que lo hacen las células MDCK silvestres, en concentraciones bajas (10 nM), es decir no se despegaron sino hasta las 72 horas después de haberse depletado, el 80% de estas quedaba aun en la caja, este porcentaje puede considerarse dentro de la “normalidad”, pues depletar implica quitar el suero del medio, mismo que contiene elementos indispensables para el crecimiento de los cultivos, entre ellos enzimas, hormonas y a la misma ouabaína; a concentraciones altas (1 μ M) las células se despegaron en un 84% luego de 48 horas de exposición y para las 72 horas se despegaron en su totalidad. Por otro lado las células MDA-MD-231 pudieron crecer sin problemas a todas las concentraciones durante las primeras 48 horas. Finalmente, a las 72 hrs a la concentración 100 nM se despegó el 25%, y a 1 μ M el 40% (Gráfica 1).



Gráfica 1. Prueba de sensibilidad a la Ouabaína. La línea MCF10-A (izquierda) tiene sensibilidad normal a la ouabaína; la línea celular MDA-MB-231 (derecha) es resistente al tratamiento de ouabaína incluso en concentraciones tóxicas.

De los ensayos de transferencia de colorante

MCF-10A: En la Figura 7 se muestran imágenes típicas de los experimentos de microinyección en condiciones control y con tratamiento de ouabaína 50 nM, donde se puede observar la fluorescencia adquirida de una monocapa confluyente de células como resultado de la inyección de diclorofluoresceína 5% (verde) y streptavidina-rodamina 5% (rojo). La célula inyectada presenta color amarillo-anaranjado debido al traslape de ambas fluorescencias; la streptavidina-rodamina al tener un peso molecular de 60kD no pasa a través de las uniones comunicantes, mientras que la diclorofluoresceína pesa 0.4kD puede fluir por ellas y pasar de un citoplasma celular a otro, por esta razón las células que se comunican a la inyectada, solo se presentan fluorescencia verde. Como se esperaba, tomando el como base los resultados de prueba de la sensibilidad de esta línea celular, la

comunicación si incrementó cuando se trata con ouabaína 50 nM, mientras que en condiciones control la comunicación no cambió. El procedimiento estadístico demuestra que las diferencias observadas son significativas con la prueba T de student para muestras independientes con $P = 0.9738$ (Gráfica 2)

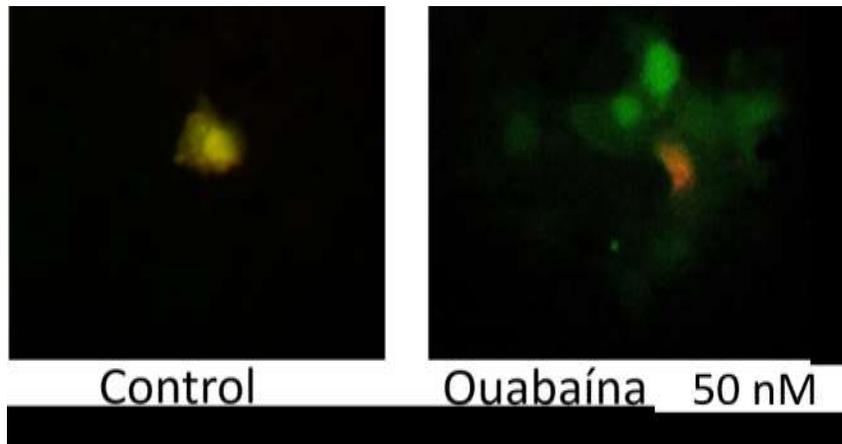
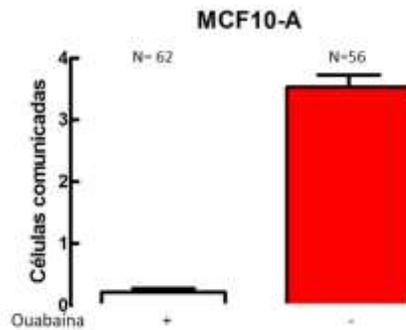


Figura 7. La ouabaína 50 nm incrementa la comunicación en células no cancerosas de epitelio mamario (MCF-10A)



Gráfica 2. Prueba estadística para el experimento de comunicación con células MCF-10A.

MDA-MB-231: La figura 8 muestra una imágenes típicas de la fluouescencia adquirida por una monocapa de células cancerosas como resultado de la inyección de dicloroflouresceína 5% (verde) y streptavidina-rodamina 5% (rojo) por las células

cancerosas triple negativo MDA-MB-231. Como se esperaba, dado que tiene resistencia a la ouabaína, un tratamiento con esta a 50 nM no incrementa la comunicación. La gráfica 3 muestra que no existe una diferencia significativa en la comunicación intercelular mediada por GAP en esta línea celular, el procedimiento realizado fue una T de Student para muestras independientes, y se obtuvo un valor p de 0.0001

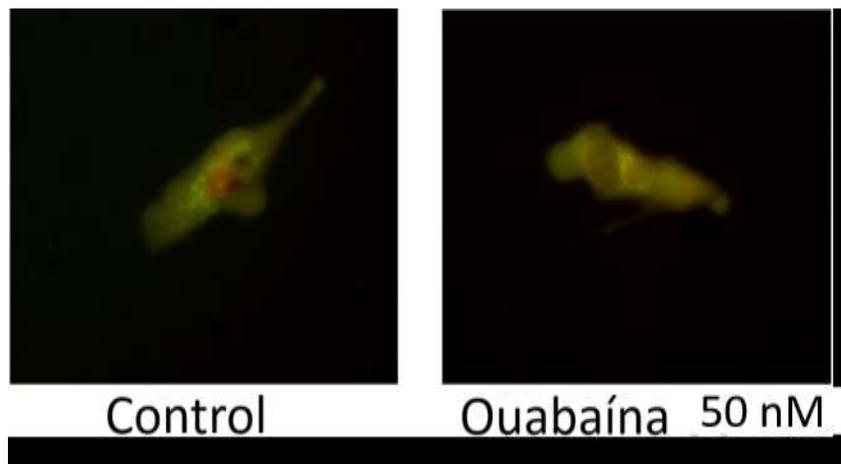
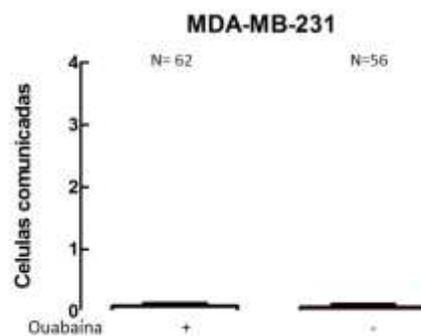


Figura 8. La ouabaína 50 nM no incrementa la comunicación en células cancerosas de epitelio mamario triple negativo (MDA-MB-231.)



Gráfica 3. Prueba estadística para el experimento de comunicación con células MDA-MB-231.

DISCUSIÓN

Como se observó previamente en los resultados las pruebas de “sensibilidad a la ouabaína” demostraron que las líneas de epitelio mamario canceroso (MDA-MB-231) y no canceroso (MCF10-A) tienen respuestas distintas a los tratamientos con ouabaína en diferentes concentraciones y tiempos. He entrecomillado en esta ocasión la frase <sensibilidad a la ouabaína> dado que estos no son experimentos que muestren el grado de afinidad del receptor de la ouabaína (la subunidad α de la Na^+,K^+ -ATPasa) como lo sería un ensayo de unión de desplazamiento o competencia, o bien un ensayo por saturación que permite determinar la constante de afinidad de la unión ligando receptor (Kuo & Lauffenburger, 1993); no obstante con base en la experiencia se ha adquirido en nuestros laboratorios a los largos de estos años, en el estudio de la función fisiológica de la ouabaína, ahora sabemos que estos experimentos de despegue celular en concentraciones tóxicas de ouabaína (mayores a 400 nM), nos pueden dar una idea clara acerca de lo sensibles que son esta las células en cuestión (cualesquiera) hacia la ouabaína (Contreras et al., 1995) (Cereijido et al., 2004) (Isabel Larre et al., 2006).

Es de esperarse que los distintos tipos celulares que conforman a un organismo tengan diferente sensibilidad a la ouabaína pues como bien podemos asegurar ahora, **la ouabaína modula contactos celulares**, y por tanto aquellos tejidos en los que sea imprescindible la constante regulación de estas proteínas son los más sensibles a esta hormona; tal es el caso de los tejidos que componen al riñón, en los cuales hay gran un control y selectividad al paso de iones (Abaza et al., 1974) o bien en la barrera hematoencefálica donde se requiere una regulación estricta al paso de sustancias entre el torrente sanguíneo y la masa encefálica, una falla en esta barrera puede causar enfermedades graves como ictus, epilepsia y esclerosis múltiple (Abar R., 2010).

En cuanto al epitelio mamario como pudimos observar en el presente estudio que la línea celular MCF-10A (recordemos que esta es una línea celular de epitelio mamario no canceroso) mostró sensibilidad a la ouabaína, primero en los ensayos de despegado de células en distintas concentraciones y luego al observar que si hubo un efecto de incremento en la comunicación celular, no obstante, este efecto se logró observar al agregar 50 nM de ouabaína, mientras que en las células MDCK este mismo efecto se observa en concentración de 10 nM (Ponce et al., 2014). Aquí cabe señalar que, desde luego, para realizar esta investigación se comenzó por evaluar el efecto de la ouabaína en concentración de 10 nM pues ya se tenía el antecedente al respecto, sin embargo no se observó efecto alguno en ninguna de las dos líneas celulares (MCF-10A y MDA-MB-231, resultados no mostrados), por lo cual se decidió incrementar la concentración 50 nM que es una concentración que aún se encuentra en el rango fisiológico y en células MDCK es la concentración a la cual se satura el efecto del incremento de resistencia transepitelial como consecuencia del tratamiento con ouabaína. Una posible explicación al por qué las células de epitelio mamario tienen menos sensibilidad a la ouabaína si se les compara con MDCK, se encuentra unos renglones antes dentro de este mismo párrafo, como el epitelio mamario no requiere de tan estricta regulación de los contactos celulares pues la función fisiológica de la glándula mamaria no es establecer una barrera o filtro, (aunque si exista la selectividad epitelial normal), entonces puede permitirse ser menos sensible. No obstante, se desconoce el mecanismo por el cual las células mamarias adquieren una menor sensibilidad.

En un organismo completo los distintos tipos celulares de la glándula mamaria expresan otros receptores de hormonas esteroideas como los de estrógenos y progesterona, moléculas que tienen una estructura química celular muy similar a la ouabaína ya que poseen un centro esteroideo. Se ha demostrado, por ejemplo que la ouabaína y otros glucósidos pueden desplazar a la hidroxiprogesterona de su receptor; estos receptores se expresan constitucionalmente en los tejidos de epitelio mamario y su función está relacionada

con la lactancia, el ciclo menstrual y la diferenciación celular (Chow et al., 1979). También se ha reportado que la ouabaína puede competir con el estradiol por su receptor y este puede expresarse en los ductos mamarios (Milgrom et al., 1973). Pero la idea de que exista una competencia de estos receptores por la ouabaína se puede desechar ya que se ha demostrado que las líneas MCF-10A y MDA-MB.231 no expresan estos receptores a pesar de ser de epitelio mamario, esto muy probablemente debido a que ambas líneas provienen de células tumorigénicas aunque las MCF10-A son no cancerosas mientras que la línea MDA-MB-231 si lo es (Subik et al., 2010).

Los resultados de la prueba de sensibilidad a la ouabaína de las células cancerosas elegidas para el presente estudio, mostraron que estas no tienen una respuesta a la hormona en cuestión cuando se les trata con concentraciones que resultarían tóxicas para las células no cancerosas (1 μ M en 24 y 48 horas), éstas no se despegan, por lo tanto puede sugerirse que son menos sensibles al tratamiento con ouabaína que las no cancerosas; incluso, su comportamiento puede compararse al de las células MDCK-R (R de resistentes a la ouabaína) éstas son células que poseen una mutación en el sitio de unión de la ouabaína en la subunidad α de la Na^+, K^+ -ATPasa, mismas que fueron tratadas con concentraciones tóxicas y letales, se observó que no hay respuesta como efecto del tratamiento con ouabaína (Soderberg et al. 1983). A partir de entonces se han realizado investigaciones con esta línea celular como un control negativo para dilucidar cuál es el papel fisiológico de la ouabaína, por ejemplo, en nuestro laboratorio se hizo una investigación acerca de como las células MDCK-R son capaces de rescatar a las MDCK silvestres cuando se les trata con ouabaína en concentraciones tóxicas (Bolívar et al., 1987). Así pues, las células MDA-MB-231, son equiparables a las MDCK-R, sin embargo, estas últimas poseen una mutación puntual que, hasta donde se sabe, las células cancerosas mamarias no la tienen. Entonces faltaría encontrar la razón del por qué las células de cáncer mamario triple

negativo no se despegan de la caja de cultivo al tratarlas con ouabaína en concentraciones tóxicas.

La forma más inmediata de abordar la problemática acerca de cómo las células MDA-MB-231 adquieren “resistencia” a la ouabaína o, mejor dicho, para no confundir al lector, pierden sensibilidad a la ouabaína, es desde luego ver cuál es la isoforma de la subunidad α de la Na^+, K^+ -ATPasa que expresan estas células, ya que las cuatro isoformas tienen distinta afinidad por la ouabaína, siendo la subunidad alfa 1 la más afín (Betts et al., 1997); luego entonces, se pensaría que quizá estas células cancerosas pudieran estar expresando otra una isoforma de la subunidad α que no es la 1, sin embargo esta hipótesis se viene abajo con los trabajos de Clifford y Kaplan en el 2013 pues demuestran que tanto las isoformas $\alpha 1$ como $\beta 1$ están presentes en las células MDA-MB-231 y también en las MCF-10A (Clifford et al., 2013), luego entonces el problema de la baja sensibilidad de las células cancerosas triple negativo, no se puede explicar mediante la expresión de una isoforma distinta a la 1; tampoco puede explicarse por la presencia de receptores a progesterona o estrógenos porque como se señala en el trabajo “The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines.”, estas no los expresan (Subik et al., 2010)

Lamentablemente no existen trabajos que nos ayuden a comprender de una manera directa cómo las células cancerosas pierden sensibilidad a la ouabaína, por ejemplo, alguno donde se secuencie la subunidad para verificar si hay mutaciones, ni tampoco se realizaron dichos experimentos para la presente tesis. Ya en un estudio del laboratorio en el año 1995 muestra un caso similar donde demostró que las células MA-104 tienen una alta resistencia a la ouabaína pero no se debe a falta de afinidad del receptor de estas células por la ouabaína, sin embargo, tampoco logran comprender del todo porque esta línea celular posee resistencia al efecto de

despegue de las células, aun cuando se les trata con concentraciones tóxicas en ese tiempo se justifica un tanto la resistencia a los efectos de la ouabaína diciendo que esta varía entre cada especie (Contreras et al., 1995), no obstante ahora nos encontramos ante una línea celular donde se pierden los efectos de la ouabaína y a la vez es de humano. Pese a esto, existe una manera un tanto indirecta de poder abordar el problema, pero se abordará más adelante cuando se explique el efecto de la ouabaína en las uniones comunicantes.

Es evidente en nuestros resultados de los ensayos de comunicación mediada por GAP junction que los tratamientos con ouabaína a 50 nM, permiten un incremento en la comunicación en las células no cancerosas de epitelio mamario (MCF-10A), no hay mucho que discutir al respecto, este era un resultado esperado ya que los resultados coinciden con los expuestos por Ponce y colaboradores en el 2014. No obstante, mientras en este trabajo antecedente la célula inyectada pudo establecer comunicación con 7.5 vecinas, en nuestros resultados en promedio, las células inyectadas establecen comunicación con 4.5 de las vecinas, esto probablemente debido a que son un poco menos sensibles a la ouabaína que las MDCK, como ya se había mencionado, pero no hay de momento rastro alguno que pueda explicar la causa de este fenómeno.

Como bien se ha mencionado ya en varias ocasiones en esta tesis, las células MDA-MB-231 son cancerosas y poseen un gran invasividad metastásica, para llegar a este punto los cánceres deben pasar por un proceso llamado transición epitelio mesénquima durante el cual se desencadenan una serie de vías de señalización que como resultado final permiten que la célula pueda reprogramarse para poder vencer varias barreras que la limitan a permanecer en el tejido original; este proceso es molecularmente similar al que lleva a cabo cuando se implanta un embrión (Kalluri & Weinberg, 2009). Durante la transición epitelio mesénquima las células cancerosas pierden muchos de los contactos celulares que los mantienen

unido al epitelio, entre estos contactos se encuentra la cadherina (Lombaerts et al., 2006). En un trabajo realizado por Prowse y colaboradores en 1997, se realizaron cocultivos de dos tipos celulares muy distintos, uno que eran células de epitelio derivado del hígado de rata (BRL) y otro que eran células de carcinoma mamario también de rata (BICR), de estos dos se encontró que las células BRL expresan constitutivamente E-cadherina y P-cadherina, mientras que las células BICR no las expresan, no obstante ambas expresan conexina 43 y ductina, dos proteínas de la unión comunicante. Los resultados mostraron que cuando se cocultiva estas dos líneas celulares no son capaces de establecer comunicación entre sí a pesar de que ambas poseen la conexina 43. Posteriormente se transfectaron estas líneas celulares con cadherina humana, sorprendentemente en esta ocasión sí pudieron establecer comunicación mediante uniones de hendidura. La conclusión de este trabajo evidentemente fue que para que se pueda establecer comunicación mediada por GAP junction debe haber antes un reconocimiento de las cadherinas (Prowse et al., 1997). Por lo tanto, dado que las células de epitelio mamario canceroso metastásico pierden gran parte de sus moléculas de adhesión entre ellas la cadherina, no existe una señal inicial para el posterior ensamble de las uniones comunicantes.

Hasta ahora respecto a la ouabaína se ha demostrado que modula las uniones: Estrecha (Larre, et al., 2010), Los contactos que intervienen en la ciliogénesis (Larre et al., 2011) y las uniones comunicantes (Ponce et al., 2014), cuando se utilizan concentraciones hormonales estas van desde 10 nM, esta es la concentración de un ser humano adulto sano en estado de reposo. Estas concentraciones pueden variar mediante el ejercicio o con algún padecimiento incluyendo el embarazo (Jacobs et al, 2012). En algunas condiciones de patología como es el caso de las enfermedades cardíacas o la preclamsia (Larre et al., 2014). Respecto las uniones comunicantes, se ha demostrado que tienen un papel importante en varios procesos como la diferenciación celular, el crecimiento, la coordinación metabólica y la homeostasis (para revisión actualizada consúltese

Mathias et al., 2010). Como ya se mencionó en la sección introductoria las células cancerosas en general sufren procesos de desdiferenciación celular y una reprogramación generalizada pues se activan genes que normalmente solo se encuentran expresándose en el desarrollo embrionario (Hanahan & Weinberg, 2011). Visto entonces desde una perspectiva moderna, los resultados obtenidos en el presente estudio refuerzan de la sugerencia de Loewenstein y Kano de que las células cancerosas se originan por la pérdida de la comunicación celular, es natural pensar que así sea puesto que la comunicación influye en la diferenciación y las células cancerosas pierden dicha comunicación.

CONCLUSIONES

- Las células mamarias no cancerosas en condiciones control no establecen comunicación.
- La ouabaína 50 nM promueve la comunicación en células mamarias no cancerosas.
- La hormona ouabaína es necesaria para que se establezcan las uniones comunicantes.
- Las células cancerosas poseen poca sensibilidad a la ouabaína y se comportan de manera similar a las células MDCK resistentes.
- Las células cancerosas poseen poca sensibilidad a la ouabaína

PERSPECTIVAS DE TRABAJO

La visión a futuro de esta investigación es prometedora. Sin duda este trabajo resolvió algunas dudas respecto la comunicación en el cáncer de mama y el efecto de la ouabaína en líneas de epitelio mamario; pero también nos ha arrojado muchas dudas como, por ejemplo: Si la ouabaína es capaz de promover la formación de uniones comunicantes y en teoría las células cancerosas poseen el receptor a la ouabaína en su isoforma $\alpha 1$ que es la más sensible, entonces, ¿Por qué el tratamiento con ouabaína en concentraciones fisiológicas no incrementa la comunicación en este tipo celular?

Esta pregunta puede abordarse de distintas formas, para empezar, no existe información de si la subunidad alfa en estas células se encuentra integra o ha sufrido algún tipo de mutación ya que no se ha secuenciado y el sitio de unión del anticuerpo no es el mismo que el sitio de unión a la ouabaína (Thermo Scientific MA3-929), entonces el siguiente paso lógico sería comprobar que efectivamente la ouabaína se esté uniendo al receptor haciendo ensayos de ouabaína tritiada (Contreras et al., 1995). También puede secuenciarse el gen en esta línea celular y por medio de un análisis in silico compáralo con la subunidad alfa de las células control.

Desde luego también habría que probar la propuesta hecha en la discusión acerca de si el hecho de que las células cancerosas pierdan las uniones comunicantes entre ellas la cadherina, influye en que no se establezcan uniones comunicantes aun en presencia de ouabaína. Para resolver esto una propuesta

sería transfectar cultivos de esta línea celular con E-cadherina, luego aplicar un tratamiento con ouabaína y observar lo que ocurre.

Otra forma de saber más acerca del efecto de la ouabaína en el las células de cáncer mamario es incrementando la concentración de ouabaína de tal manera que supera a las concentraciones fisiológicas y se acerque a las terapéuticas como por ejemplo 400 nM, una concentración que fue utilizada en un ensayo de migración celular sobre MDA-MB-231 y de la cual obtuvieron resultados positivos (Magpusao et al., 2015b).

BIBLIOGRAFIA

- Abar R. (2010). Alteraciones en la barrera hematoencefálica afectan al cerebro. Retrieved from <http://www.elblogdemercksalud.es/barrera-hematoencefalica-enfermedades-neurologicas/>
- Abaza, N. A., Leighton, J., & Schultz, S. G. (1974). Effects of Ouabain on the Function and Structure of a Cell Line (MDCK) Derived from Canine Kidney. I. Light Microscopic Observations of Monolayer Growth on JSTOR. Retrieved from http://www.jstor.org/stable/4291799?seq=1#page_scan_tab_contents
- Asadi-Khiavi, M., Hamzeiy, H., Khani, S., Nakhband, A., & Barar, J. (2011). Gap junctions: the claymore for cancerous cells. *BioImpacts : BI*, 1(2), 113–9. <http://doi.org/10.5681/bi.2011.015>
- Betts, D. H., MacPhee, D. J., Kidder, G. M., & Watson, A. J. (1997). Ouabain sensitivity and expression of Na/K-ATPase alpha- and beta-subunit isoform genes during bovine early development. *Molecular Reproduction and Development*, 46(2), 114–26. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199702\)46:2<114::AID-MRD2>3.0.CO;2-T](http://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199702)46:2<114::AID-MRD2>3.0.CO;2-T)
- Bolívar, J. J., Lázaro, A., Fernández, S., Stefani, E., Peña-Cruz, V., Lechene, C., & Cereijido, M. (1987). Rescue of a wild-type MDCK cell by a ouabain-resistant mutant. *The American Journal of Physiology*, 253(1 Pt 1), C151-61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3300360>
- Cameron, S. J., Malik, S., Akaike, M., Lerner-Marmarosh, N., Yan, C., Lee, J.-D., ... Yang, J. (2003). Regulation of epidermal growth factor-induced connexin 43 gap junction communication by big mitogen-activated protein kinase1/ERK5 but not ERK1/2 kinase activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(20), 18682–8. <http://doi.org/10.1074/jbc.M213283200>
- Cereijido, M., Contreras, R. G., & Shoshani, L. (2004). Cell adhesion, polarity, and epithelia in the dawn of metazoans. *Physiological Reviews*, 84(4), 1229–62. <http://doi.org/10.1152/physrev.00001.2004>
- Chavez, K. J., Garimella, S. V., & Lipkowitz, S. (2010). Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Disease*, 32(1–2), 35–48. <http://doi.org/10.3233/BD-2010-0307>
- Chow, E., Kim, R. S., Labella, F. S., & Queen, G. (1979). Ouabain receptor binding of hydroxyprogesterone derivatives. *British Journal of Pharmacology*, 67(3), 345–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/497535>
- Clifford, R. J., & Kaplan, J. H. (2013). Human breast tumor cells are more resistant to cardiac glycoside toxicity than non-tumorigenic breast cells. *PloS One*, 8(12), e84306. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0084306>

- Clifford, R. J., Kaplan, J. H., Schatzmann, H., Kaplan, J., Kaplan, J., Dvela, M., ... Cidlowski, J. (2013). Human Breast Tumor Cells Are More Resistant to Cardiac Glycoside Toxicity Than Non-Tumorigenic Breast Cells. *PLoS ONE*, 8(12), e84306. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0084306>
- Contreras, R. G., Lázaro, A., Mújica, A., González-Mariscal, L., Valdés, J., García-Villegas, M. R., & Cerejido, M. (1995). Ouabain resistance of the epithelial cell line (Ma104) is not due to lack of affinity of its pumps for the drug. *The Journal of Membrane Biology*, 145(3), 295–300. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7563030>
- Contreras, R. G., Shoshani, L., Flores-Maldonado, C., Lázaro, A., & Cerejido, M. (1999). Relationship between Na(+),K(+)-ATPase and cell attachment. *Journal of Cell Science*, 112 (Pt 2, 4223–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10564641>
- Elias, L. A. B., Wang, D. D., & Kriegstein, A. R. (2007). Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature*, 448(7156), 901–7. <http://doi.org/10.1038/nature06063>
- Hamlyn, J. M., Blaustein, M. P., Bova, S., DuCharme, D. W., Harris, D. W., Mandel, F., ... Ludens, J. H. (1991). Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(14), 6259–63. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=52062&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>
- Jacobs, B. E., Liu, Y., Pulina, M. V., Golovina, V. A., & Hamlyn, J. M. (2012). Normal pregnancy: mechanisms underlying the paradox of a ouabain-resistant state with elevated endogenous ouabain, suppressed arterial sodium calcium exchange, and low blood pressure. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 302(6), H1317-29. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00532.2011>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–8. <http://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Kuo, S. C., & Lauffenburger, D. A. (1993). Relationship between receptor/ligand binding affinity and adhesion strength. *Biophysical Journal*, 65(5), 2191–200. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81277-3](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81277-3)
- Larre, I., Castillo, A., Flores-Maldonado, C., Contreras, R. G., Galvan, I., Muñoz-Estrada, J., & Cerejido, M. (2011). Ouabain modulates ciliogenesis in

- epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(51), 20591–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.1102617108>
- Larre, I., Ponce, A., Fiorentino, R., Shoshani, L., Contreras, R. G., & Cereijido, M. (2006). Contacts and cooperation between cells depend on the hormone ouabain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(29), 10911–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.0604496103>
- Larre, I., Ponce, A., Franco, M., & Cereijido, M. (2014). The emergence of the concept of tight junctions and physiological regulation by ouabain. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 36C, 149–156. <http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.09.010>
- Lee, S. W., Tomasetto, C., Paul, D., Keyomarsi, K., & Sager, R. (1992). Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines. *The Journal of Cell Biology*, 118(5), 1213–21. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2289599&tool=pmc&rendertype=abstract>
- Leithe, E., Sirnes, S., Omori, Y., & Rivedal, E. (2006). Downregulation of gap junctions in cancer cells. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 12(3–4), 225–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17425504>
- Lombaerts, M., van Wezel, T., Philippo, K., Dierssen, J. W. F., Zimmerman, R. M. E., Oosting, J., ... Cleton-Jansen, A.-M. (2006). E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *British Journal of Cancer*, 94(5), 661–71. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602996>
- Magpusao, A. N., Omolloh, G., Johnson, J., Gascón, J., Peczuh, M. W., & Fenteany, G. (2015a). Cardiac glycoside activities link Na(+)/K(+) ATPase ion-transport to breast cancer cell migration via correlative SAR. *ACS Chemical Biology*, 10(2), 561–9. <http://doi.org/10.1021/cb500665r>
- Magpusao, A. N., Omolloh, G., Johnson, J., Gascón, J., Peczuh, M. W., & Fenteany, G. (2015b). Cardiac glycoside activities link Na(+)/K(+) ATPase ion-transport to breast cancer cell migration via correlative SAR. *ACS Chemical Biology*, 10(2), 561–9. <http://doi.org/10.1021/cb500665r>
- Mathias, R. T., White, T. W., & Gong, X. (2010). Lens gap junctions in growth, differentiation, and homeostasis. *Physiological Reviews*, 90(1), 179–206. <http://doi.org/10.1152/physrev.00034.2009>
- Meşe, G., Richard, G., & White, T. W. (2007). Gap junctions: basic structure and function. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127(December 2006), 2516–2524. <http://doi.org/10.1038/sj.jid.5700770>

- Milgrom, E., Atger, M., & Baulieu, E. E. (1973). Studies on estrogen entry into uterine cells and on estradiol-receptor complex attachment to the nucleus--is the entry of estrogen into uterine cells a protein-mediated process? *Biochimica et Biophysica Acta*, 320(2), 267–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4356294>
- Ponce, A., Larre, I., Castillo, A., García-Villegas, R., Romero, A., Flores-Maldonado, C., ... Cereijido, M. (2014). Ouabain increases gap junctional communication in epithelial cells. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 34, 2081–90. <http://doi.org/10.1159/000366403>
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1461096&tool=pmc&rendertype=abstract>
- Prowse, D. M., Cadwallader, G. P., & Pitts, J. D. (1997). E-cadherin expression can alter the specificity of gap junction formation. *Cell Biology International*, 21(12), 833–43. <http://doi.org/10.1006/cbir.1997.0202>
- SKOU, J. C. (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochimica et Biophysica Acta*, 23(2), 394–401. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13412736>
- Soderberg, K., Rossi, B., Lazdunski, M., & Louvard, D. (1983). Characterization of ouabain-resistant mutants of a canine kidney cell line, MDCK. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(20), 12300–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6313650>
- Stoletov, K., Strnadel, J., Zardoujian, E., Momiyama, M., Park, F. D., Kelber, J. A., ... Klemke, R. L. (2013). Role of connexins in metastatic breast cancer and melanoma brain colonization. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 4), 904–13. <http://doi.org/10.1242/jcs.112748>
- Subik, K., Lee, J.-F., Baxter, L., Strzepek, T., Costello, D., Crowley, P., ... Tang, P. (2010). The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 4, 35–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20697531>
- Therien, A. G., Goldshleger, R., Karlsh, S. J., & Blostein, R. (1997). Tissue-specific distribution and modulatory role of the gamma subunit of the Na,K-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 32628–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9405479>
- Weigelt, B., Peterse, J. L., & van 't Veer, L. J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature Reviews. Cancer*, 5(8), 591–602.

<http://doi.org/10.1038/nrc1670>

Yano, T., & Yamasaki, H. (2001). Regulation of cellular invasion and matrix metalloproteinase activity in HepG2 cell by connexin 26 transfection. *Molecular Carcinogenesis*, 31(2), 101–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11429787>