



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y**

**“La ouabaína acelera la migración colectiva
activando a la metaloproteasa 2, de
manera dependiente de cSrc y ERK1/2”**

T E S I S

Que presenta

M en C. Odette Monserrat Verdejo Torres

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

en la Especialidad de

Fisiología Celular y Molecular

Director de Tesis: Dr. Rubén Gerardo Contreras Patiño

Este trabajo se realizó en el laboratorio 3 del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN), de septiembre 2013 a junio 2019, bajo la dirección del Dr. Rubén Gerardo Contreras Patiño, con apoyo del CONACyT (420904 y P221513) y SEP-Cinvestav 143.

Agradecimientos

A mi hermana Nataly, por enseñarme cada día que la vida es lo más preciado que tenemos, por su amistad y amor incondicional.

A mis padres, Sara y Arturo, por todo su amor, comprensión, dedicación y apoyo absoluto que siempre me han dado para que cumpla cada una de mis metas profesionales y personales.

A mi compañero de vida, David, por su apoyo en mi crecimiento profesional.

A mis amigos y maestros, Dra. Catalina Flores Maldonado, Biol. Raúl Bonilla Moreno y Dra. Vicky García Hernández, por su apoyo, confianza y sus invaluable consejos que me han brindado desde el primer día.

Al Dr. Rubén Gerardo Contreras Patiño, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

A la Dra. Teresita Padilla-Benavides, Dra. Ma. Eugenia Mendoza Garrido, .Dr. José Eduardo Pérez Salazar y Dr. Antonio Roberto de Jesús Lara Lemus.

Al Sr. Eduardo Estrada por su apoyo técnico.

ÍNDICE

Resumen.....	01
Abstract.....	02
Introducción.....	03
La Ouabaína.....	03
La Na ⁺ ,K ⁺ -ATPasa.....	05
Na ⁺ ,K ⁺ -ATPasa, ouabaína y adhesión celular.....	09
La Migración Celular Colectiva.....	12
Las metaloproteasas en la migración celular.....	15
Planteamiento del problema.....	18
Hipótesis.....	18
Objetivo General.....	18
Objetivos Particulares.....	18
Métodos.....	19
Cultivo de células MDCK.....	19
Ensayo de Migración Celular.....	19
Actividad de MMPs: Zimograma en Gelatina.....	20
Expresión de Proteínas: Western blot.....	21
Transfección celular.....	21
Análisis Estadístico.....	22
Resultados.....	23
La ouabaína acelera la reparación de heridas.....	23
La ouabaína acelera la reparación de heridas a través de cSrc y ERK1/2.....	24
El aumento de la migración inducido por la ouabaína requiere la activación de FAK.....	25
La migración inducida por ouabaína depende de las MMPs.....	27
La migración inducida por ouabaína promueve la secreción de la MMP-2.....	28
La secreción y activación de la MMP-2, inducida por la ouabaína, requiere de la activación de cSrc y ERK1/2.....	30
Discusión.....	32
Conclusión.....	35
Perspectivas.....	36
Bibliografía.....	37

Resumen

Los estudios realizados en la línea celular epitelial del riñón de perro Madin-Darby (MDCK) mostraron que la ouabaína, el inhibidor específico de la subunidad α de la Na^+, K^+ -ATPasa, regula la adhesión celular y algunos procesos biológicos relacionados con la adhesión celular, tales como la migración. En esta Tesis Doctoral, demostramos que la ouabaína (10 nM) acelera la migración celular colectiva y repara las heridas en las monocapas de células MDCK cultivadas. La aceleración de la migración celular inducida por la ouabaína depende de la activación de la cascada de señalización cSrc-ERK1/2, ya que la migración celular es bloqueada mediante los inhibidores específicos de dichas cinasas: PP2 y PD98059, respectivamente. La activación de la cascada de señalización cSrc-ERK1/2 indujo la expresión y la activación de la metaloproteinasa-2 de matriz extracelular (MMP-2). La inhibición de la actividad de MMP usando el inhibidor genérico GM6001 o el potente inhibidor iMMP-2 impidió el efecto acelerador de la ouabaína. Del mismo modo, la inhibición de la cinasa de adhesión focal (FAK) mediante la transfección del péptido dominante negativo FRNK, bloqueó el efecto de la ouabaína. Estos resultados sugieren que la unión de la ouabaína a la Na^+, K^+ -ATPasa acelera la migración colectiva de las células MDCK, a través de la activación de la cascada de señalización cSrc-ERK1/2-FAK y promueve la expresión, secreción y la actividad de MMP-2.

Abstract

Studies made in the Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cell line showed that ouabain, the specific inhibitor of the α subunit of the Na^+, K^+ -ATPase regulates cell adhesion and cell-adhesion-related biological processes, such as migration. In this doctoral thesis, we demonstrated that 10 nM ouabain accelerates collective cell migration and heals wounds in cultured MDCK cell monolayers. Ouabain-dependent acceleration of cell migration depends on activation of the cSrc-ERK1/2 signaling cascades, as it was prevented by the specific kinase inhibitors PP2 and PD98059, respectively. Activation of the cSrc-ERK1/2 signaling pathway increased expression and activation of the extracellular matrix metalloproteinase-2 (MMP-2). Inhibition of MMP activity using the generic inhibitor GM6001 or the specific iMMP-2 inhibitor, prevented the accelerative effect of ouabain. Likewise, inhibition of the Focal Adhesion Kinase (FAK) using the dominant negative peptide FRNK impaired the effect of ouabain. These results suggest that ouabain binding to the Na^+, K^+ -ATPase accelerates collective migration of MDCK cells through activation of the cSrc-ERK1/2-FAK signaling cascade and promoting secretion and MMP-2 activity.

Introducción

➤ La Ouabaína

La ouabaína pertenece a la familia de los esteroides cardiotónicos, que son sustancias que ejercen un efecto inotrópico positivo sobre el miocardio. Estructuralmente, la ouabaína es una molécula que incluye un núcleo esteroideo, una lactona y un glucósido, que es una rhamnosa (Fig. 1). La ouabaína y otros esteroides cardiotónicos, también se conoce como digitálicos porque algunos de ellos suele purificarse de plantas como las del género *Digitalis* (Fig. 1) (Bagrov, Shapiro y Fedorova 2009). La ouabaína se extrajo inicialmente de los tallos del árbol africano *Acokanthera ouabaio* y es utilizado para la elaboración de las puntas de flechas envenenadas por comunidades somalíes (Loubatieres y Arnaud 1948). De hecho, la palabra somalí “ouabaio” significa veneno de flecha. Además de ser utilizados en armas, los extractos de plantas que contienen a los esteroides cardiotónicos se usan desde hace siglos para tratar exitosamente la insuficiencia cardiaca congestiva (Withering 1785). La dosis terapéutica de los esteroides cardiotónicos es muy estrecha, oscila entre 2-20 ng/ml, lo cual no impide que uno de ellos, la digoxina, continúe siendo una alternativa terapéutica en la arritmia cardiaca (Prassas y Diamandis 2008; Altamirano et al. 2006).

Los esteroides cardiotónicos no solo son de origen vegetal, se ha demostrado la síntesis de estas sustancias en insectos, anfibios y mamíferos, incluyendo el humano (Hamlyn *et al.* 1991). También, se ha demostrado que la ouabaína se encuentra en el plasma, corteza suprarrenal, hipófisis e hipocampo de mamíferos (Doris 1996; Doris *et al.* 1996; Schoner 2002). Por ejemplo, estímulos con hormona adrenocorticotropa (ACTH) y angiotensina II, de las células de la corteza suprarrenal cultivadas en medio definido, promueven la secreción de ouabaína al medio (Laredo *et al.* 1994). Por otra parte, pacientes con feocromocitoma, tumor de la glándula suprarrenal, presentan altas concentraciones de ouabaína plasmática (Nishimura, Masuda y Takahashi 1999). Estos hechos demuestran que las glándulas adrenales producen ouabaína y la liberan al plasma (Doris *et al.* 1996).



Figura 1. Estructura de la ouabaína.

Los efectos fisiológicos conocidos de la ouabaina incluyen la proliferación e hipertrofia en cardiomiocitos (Kometiani 1998; Xie 1999); protección de células epiteliales de la muerte celular inducida por suero, mediante la inducción de ondas de Ca^{2+} citosólico y la translocación de factor de transcripción NF κ B al núcleo (Aizman *et al.* 2001); el aumento de la viabilidad de ciertas líneas celulares (Dvela *et al.* 2012); y el aumento de la síntesis de glucógeno en células musculares (Kotova *et al.* 2006). El alto consumo de sal, promueve un aumento de la ouabaína en plasma, promoviendo un incremento en la presión arterial (Dvela *et al.* 2012; Fedorova *et al.* 2010) y natriuresis (Nesher *et al.* 2009). Durante el ejercicio, la ouabaína endógena aumenta rápida y transitoriamente, sugiriendo que participa en la regulación de ese fenómeno fisiológico (Antolovic *et al.* 2000; Bauer *et al.* 2005). La ouabaína, también promueve el rescate de las células epiteliales de apoptosis en ratones desnutridos durante el desarrollo del riñón (Li *et al.* 2010), mostrando así que es importante en el desarrollo.

Los efectos fisiológicos mencionados anteriormente, resultan de la interacción de la ouabaína con su receptor, la Na^+,K^+ -ATPasa.

➤ **La Na⁺,K⁺-ATPasa**

La Na⁺,K⁺-ATPasa, o bomba de sodio, es un transportador transmembranal de las células eucariotas superiores (Skou 1957) (Fig. 2), que mantiene el gradiente electroquímico transmembranal. Esta bomba, junto con las diferencias de permeabilidad iónica de la membrana, producen las diferencias en las concentraciones de Na⁺ y K⁺ que existe entre el interior y exterior celular, generando una energía potencial electroquímica necesaria para el transporte de diversas sustancias a través de la membrana plasmática, el control del volumen celular y el mantenimiento de la actividad eléctrica de las células excitables (Blanco y Mercer 1998). La Na⁺,K⁺-ATPasa pertenece a la familia de las P-ATPasas, que se caracteriza porque sus miembros presentan DKTGTLT residuos conservados que se fosforilan transitoriamente durante el ciclo catalítico (Pedersen y Carafoli 1987; Kaplan 2002).

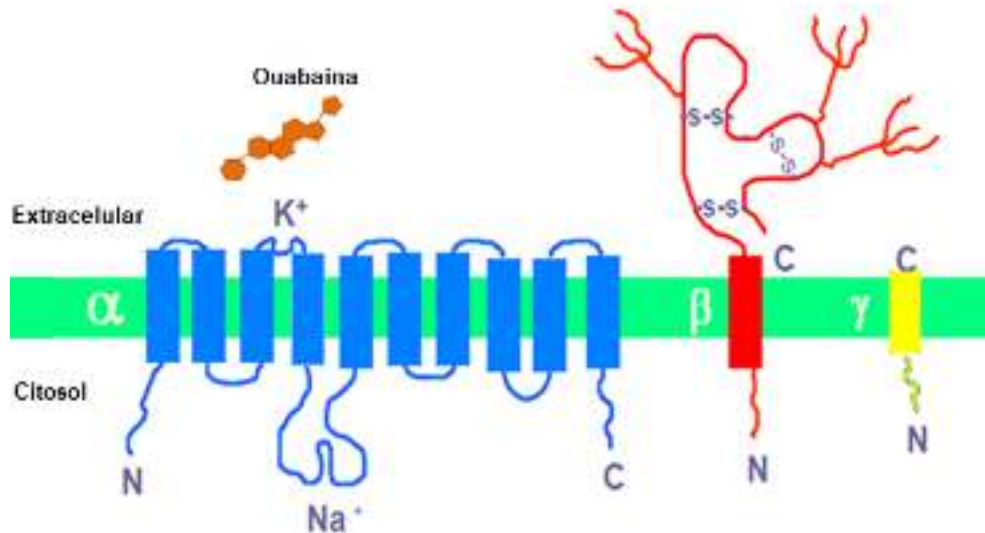


Figura 2. Esquema de la Na⁺,K⁺-ATPasa. En azul se representa a la subunidad α , en rojo la subunidad β y en amarillo la subunidad γ . La ouabaina en naranja.

La Na⁺,K⁺-ATPasa es un trímero proteínico constituido por las subunidades α , β y γ (Fig. 2). La α es la subunidad catalítica que está compuesta por aproximadamente 1000 residuos de aminoácidos, tiene una masa molecular de

aproximadamente 110 KDa, tiene 10 dominios transmembranales (representada en azul, Figura 2), tanto el extremo amino como el carboxilo son intracelulares, el primero incluye residuos de aspartato, se han identificado cuatro isoformas distintas que tienen una expresión tejido-específica (Kaplan 2002). Esta subunidad tiene los sitios de interacción con el Na⁺, K⁺, Mg⁺ y ATP involucrados en el transporte vectorial (Kaplan 2002; Cereijido, Contreras y Shoshani 2004; Blanco y Mercer 1998). La subunidad β es necesaria para el plegamiento correcto de la unidad completa, así como de la translocación a la membrana, mantenimiento y función en la membrana plasmática (Blanco y Mercer 1998). La subunidad β es también una molécula de adhesión en células epiteliales (Shoshani *et al.* 2005) y esta propiedad permite que las bombas se expresen específicamente en el dominio lateral, gracias a que el dominio extracelular de una β se adhiere directamente al de la célula vecina y se expresa de forma tejido-específica, estudios recientes sugieren que la ouabaína modula la expresión de la subunidad β_1 en la membrana, promoviendo la adhesión celular (Padilla-Benavides *et al.* 2010; Cereijido *et al.* 2012; Vilchis-Nestor *et al.* 2019). La subunidad γ tiene una expresión tejido-específica y regula la actividad de la bomba (Béguin *et al.* 2001).

➤ **Interacción de la subunidad α con la ouabaína**

La subunidad α , además de tener la función catalítica, es el receptor a esteroides cardiotónicos, principalmente la ouabaína (Rossi *et al.* 1982; Blanco y Mercer 1998). Esta sustancia accede a su sitio de unión en la subunidad α desde el lado extracelular y se inserta en el dominio transmembranal de la proteína (Fig. 3) (Ogawa *et al.* 2009). Los esteroides cardiotónicos, en general, se unen a la subunidad α con una selectividad y afinidad que dependen tanto de la isoforma α involucrada, como del tipo de esteroide estudiado (Fedorova *et al.* 2010, Blanco y Mercer 1998).

Mientras que las altas concentraciones de ouabaína inhiben el bombeo de iones (Schatzmann 1953), concentraciones no saturantes revelaron que la subunidad α se asocia con proteínas transductoras y activa varias vías de señalización intracelular. Entre estas, se activa la cinasa oncogénica cSrc, que

transactiva al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), promoviendo la activación de las cinasas reguladas extracelulares 1/2 (ERK1/2), que induce la proliferación celular, la hipertrofia y la comunicación celular (Liu *et al.* 2000; Wang *et al.* 2004), mientras que la asociación de la subunidad α al receptor de inositol trifosfato (IP3R) induce cambios cíclicos en la concentración del Ca^{2+} citosólico, la translocación de NF κ B al núcleo y la sobrevivencia celular (Aizman *et al.* 2001; Zhang, Wang y Chen 2006; Yuan *et al.* 2005).

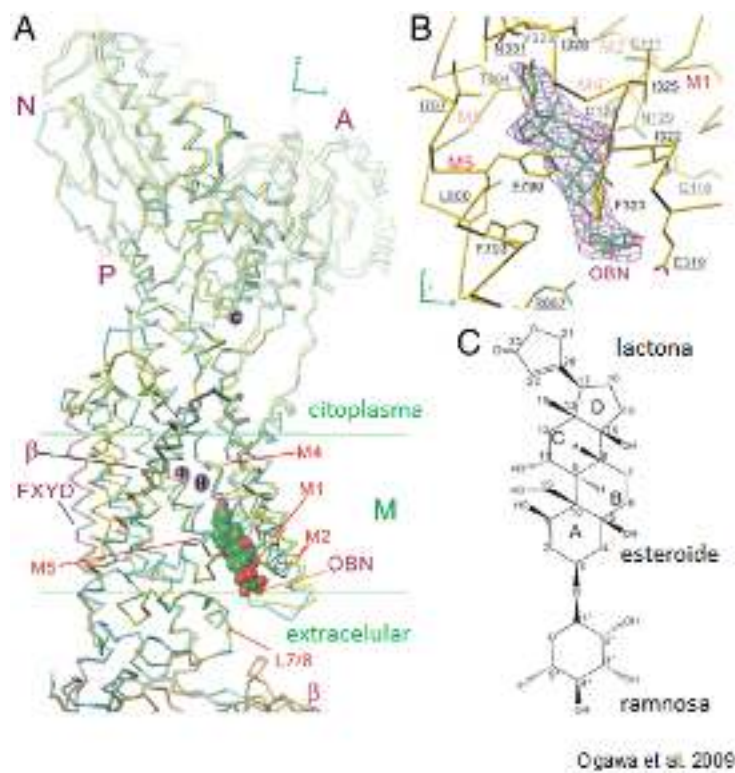


Figura 3. Cristal de la Na^+,K^+ -ATPasa unida a la ouabaína. (A) estructura de alambre de la Na^+,K^+ -ATPasa. N es el dominio de unión a nucleótidos, P es el de fosforilación, β señala los dominios transmembranal y extracelular de la subunidad β , M membrana plasmática, M1-5 dominios transmembranales de la subunidad α , FDXY es la subunidad, OBN ouabaína. (B) acercamiento del sitio de unión de la ouabaína con la hormona representada con la estructura de alambre y la nube de electrones (malla violeta). (C) estructura de líneas de la ouabaína con sus distintos componentes. (Ogawa *et al.* 2009).

La activación de estas rutas en ocasiones es independiente de la actividad de la bomba (Akimova *et al.* 2006; Contreras *et al.* 2004; Oweis *et al.* 2006). De hecho, las funciones de bombeo y señalización se pueden disecar. Una mutación que reduce el tamaño de las cadenas laterales de los aminoácidos que componen el sitio de la Na^+, K^+ -ATPasa que une a cSrc, impide que la ouabaína active a ERK1/2 sin alterar la actividad de transporte (Ye *et al.* 2013). Al activar rutas de señalización, la Na^+, K^+ -ATPasa modifica el estado diferenciado, la proliferación celular, así como el transporte de sustancias transmembranal y transepitelial (Tian *et al.* 2006; Contreras *et al.* 2006). La incubación de células epiteliales con ouabaína, induce la endocitosis de la Na^+, K^+ -ATPasa (Contreras *et al.* 2004; Larre *et al.* 2006; Liu *et al.* 2004) y del transportador Na^+/H^+ (Oweis *et al.* 2006), disminuyendo así el transporte transepitelial de Na^+ (Cai *et al.* 2008).

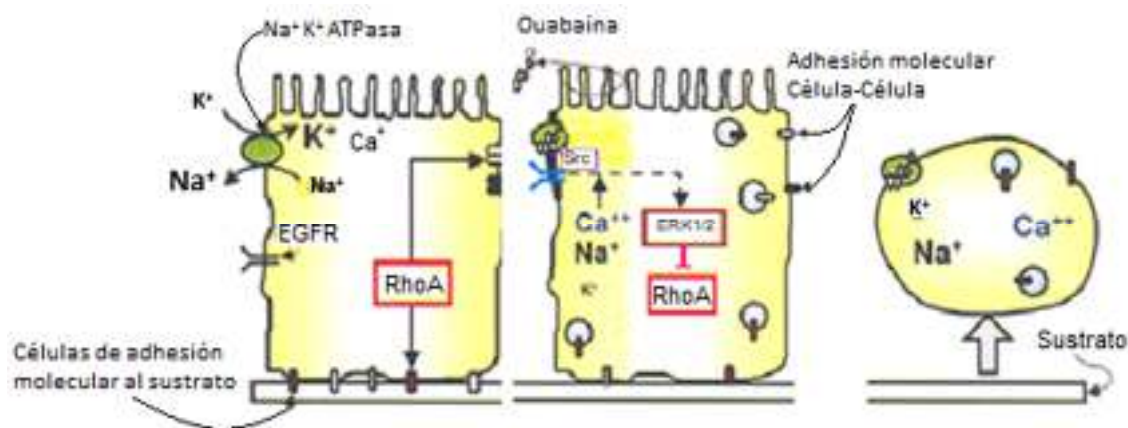


Figura 4. Bloqueo de la bomba de sodio por concentraciones saturantes de ouabaína.

La exposición de las células epiteliales a concentraciones saturantes de ouabaína, promueven la inhibición catalítica de la bomba, y una cascada de señalización que involucra la activación de Src y ERK1/2, que promueve la inhibición de la proteína RhoA, generando la endocitosis de las proteínas de unión célula-célula y célula-sustrato, lo que lleva al despegue y muerte celular.

En las células de riñón de perro Madin-Darby (MDCK), la ouabaína a una concentración de 10 nM, fortalece las uniones estrechas (Larre *et al.* 2010). Sin embargo, una concentración saturante de ouabaína, ≥ 300 nM, induce endocitosis y degradación de la adhesión célula-célula y célula-sustrato, y como consecuencia, el despegue y la muerte de las células epiteliales a través de la activación de la vía

de señalización EGFR-cSrc-ERK1/2 (Orlov *et al.* 1999; Contreras *et al.* 1999; Rincon-Heredia *et al.* 2014) (Fig. 4).

➤ **Na⁺,K⁺-ATPasa, ouabaína y adhesión celular**

Adicionalmente, el mecanismo mediante el cual la Na⁺,K⁺-ATPasa participa en la adhesión celular y el mantenimiento de la integridad epitelial, depende también de la subunidad β. Esta subunidad es necesaria para la formación de uniones estrechas (Rajasekaran *et al.* 2001), uniones adherentes (Vagin *et al.* 2006) y es una molécula de adhesión en células gliales y epiteliales (Gloor *et al.* 1990; Shoshani *et al.* 2005). El dominio extracelular de la subunidad β interactúa con un dominio idéntico en la membrana plasmática de las células vecinas, lo que contribuye a mantener el Na⁺,K⁺-ATPasa en la membrana lateral (Padilla-Benavides *et al.* 2010; Contreras *et al.* 1995; Cereijido *et al.* 2012; Shoshani *et al.* 2005). Las interacciones homotípicas mediadas por la subunidad β dependen del estado de glicosilación de la proteína y de una región extracelular ácida de 10 residuos (Tokhtaeva *et al.* 2012).

La expresión de la subunidad γ y de la bomba de sodio, correlaciona con la regulación negativa de la E-cadherina, lo que disminuye la adhesión celular y promueve metástasis. Evidencias experimentales han mostrado que la subunidad γ y esta sobreexpresada en células cancerígenas (Tokhtaeva *et al.* 2016).

Experimentos en modelos *in vitro* de células epiteliales cultivadas, han mostrado que la interacción de la subunidad α con la ouabaína, a concentraciones cercanas a los niveles fisiológicos (10 nM), induce la expresión de moléculas de adhesión. Por ejemplo, la ouabaína favorece la síntesis de claudinas, proteínas transmembranales que componen las uniones estrechas y modulan el grado de sellado de la unión (Larre y Cereijido 2010) (Fig. 5). También induce la translocación de la β-catenina al núcleo en las células MDCK (Contreras *et al.* 2004), esta proteína citoplásmica, además de participar en la adhesión celular (Fig. 5), es un componente crucial de la ruta de señalización de WNT, que promueve la supervivencia celular (Conacci-Sorrell *et al.* 2002). Además, concentraciones nM de ouabaína, inducen

también la expresión de las conexinas 32 y 43 en la membrana plasmática de células epiteliales y, en consecuencia, aumenta la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes (Larre *et al.* 2006; Cerejido *et al.* 2012; Ponce *et al.* 2016) (Fig. 5).

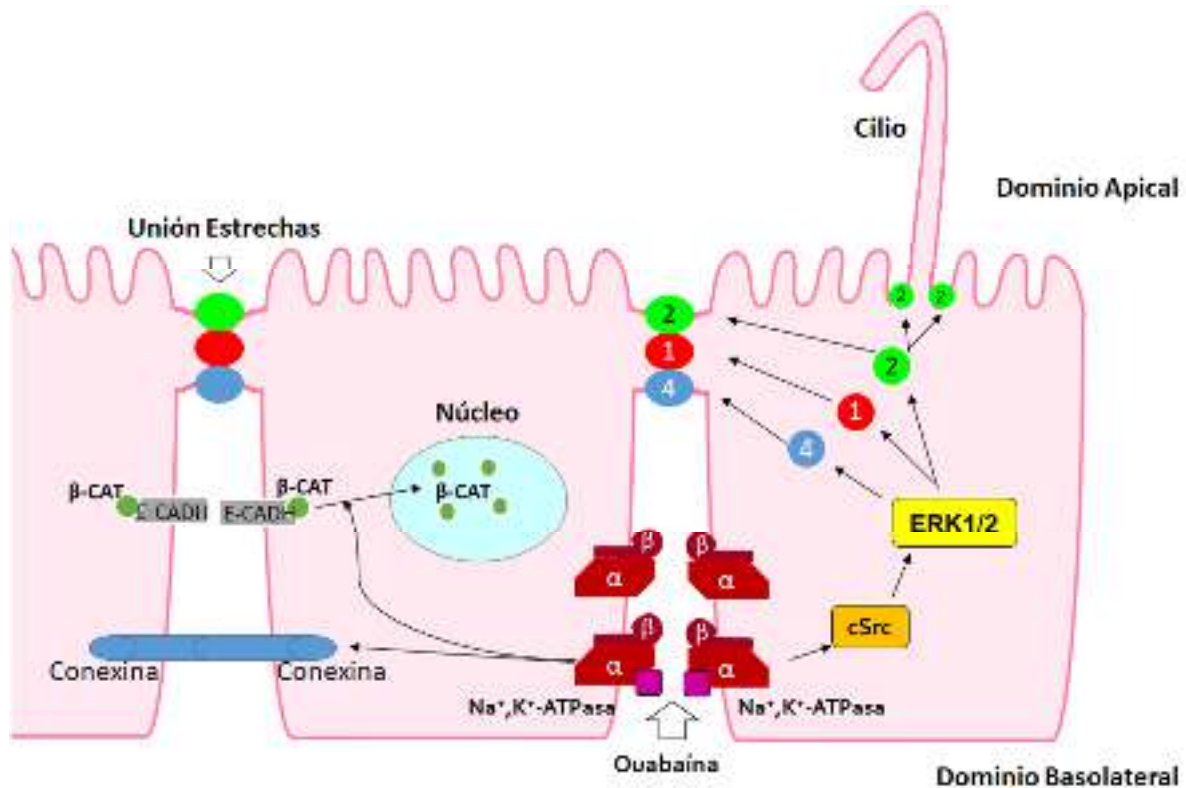


Figura 5. La ouabaína regula las uniones célula-célula. Cuando la bomba de ouabaína, se activan las rutas de señalización como cSrc-ERK1/2 y β-catenina (β-CAT), que a su vez, modulan distintos elementos de la adhesión celular como uniones estrechas (claudinas 1, 2 y 4, círculos rojo, verde y morado, respectivamente), uniones adherentes (E-CADH1) y uniones comunicantes (conexinas). La ouabaína es representada como anillos rojos y la bomba como silueta morada y verde.

Actualmente, la ouabaína es considerada una hormona esteroidea de la corteza suprarrenal y el hipotálamo (Schoner 2002), y la información previamente descrita, sugiere que puede regular la adhesión celular (Contreras *et al.* 2006; Cerejido *et al.* 2012), por lo tanto, es posible que también module los procesos biológicos tales como la proliferación, diferenciación, comunicación, polaridad y migración celular. Es aceptado que las uniones estrechas, comunicantes y al

substrato se modifican con la ouabaína (Larre *et al.* 2006; Larre y Cerejido 2010; Cerejido *et al.* 2012; Contreras *et al.* 2006; Rincon-Heredia *et al.* 2013). También se sabe que la ouabaína regula el proceso de polaridad en la línea celular de riñón de perro MDCK, pues acelera expansiones celulares filiformes, es decir, el desarrollo del cilio mayor e induce un incremento en su longitud, esta estructura es considerada una característica importante de la polaridad (Larre *et al.* 2011) (Fig. 5). Por otro lado, la ouabaína y la marinobufagenina, otro esteroide cardiotónico, también regulan la interacción de las células con el sustrato, ya que aumentan la producción de colágena en fibroblastos y favorecen la cicatrización en la piel del ratón (El-Okdi *et al.* 2008). En células MDCK, la ouabaína a 10 nM acelera la migración celular (Cuellar 2007) (Fig. 6).

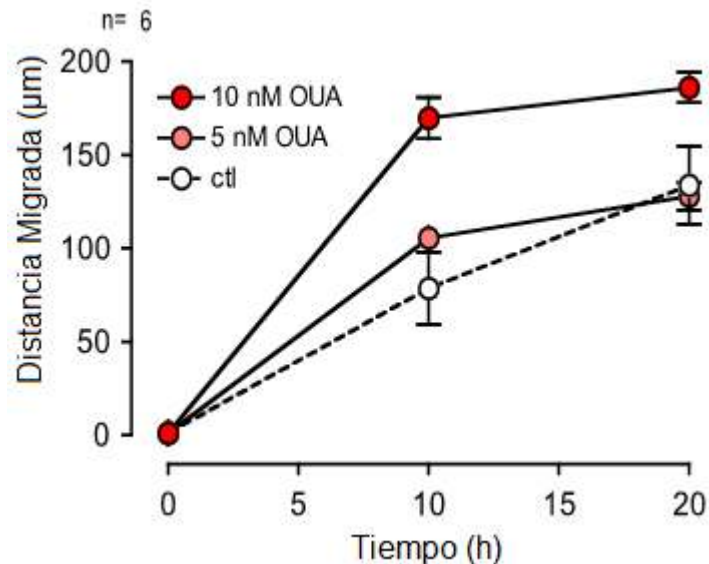


Figura 6. La migración de las células MDCK aumenta con la ouabaína. Usando el modelo de reparación de herida en células MDCK cultivadas, se hicieron heridas a monocapas confluentes, se incubaron 1 h con 4 µg/ml de mitomicina, para inhibir la proliferación celular, y se registró el tamaño de la herida al tiempo 0. Posteriormente, se incubaron 5 h con ouabaína y se fotografiaron de nuevo para calcular la distancia migrada. Control (círculos blancos) o con 5 (círculos rosas) o 10 nM (Círculos rojos) de ouabaína en el medio. n= a seis experimentos independientes. (Cuellar 2007).

➤ La Migración Celular Colectiva

La migración celular colectiva es la movilización coordinada de grupos de células bajo la guía de una o varias células líderes (Scarpa y Mayor 2016; Ridley *et al.* 2003). Juega un papel fundamental durante el desarrollo normal y la metástasis (Vedula *et al.* 2013) (Fig. 7).

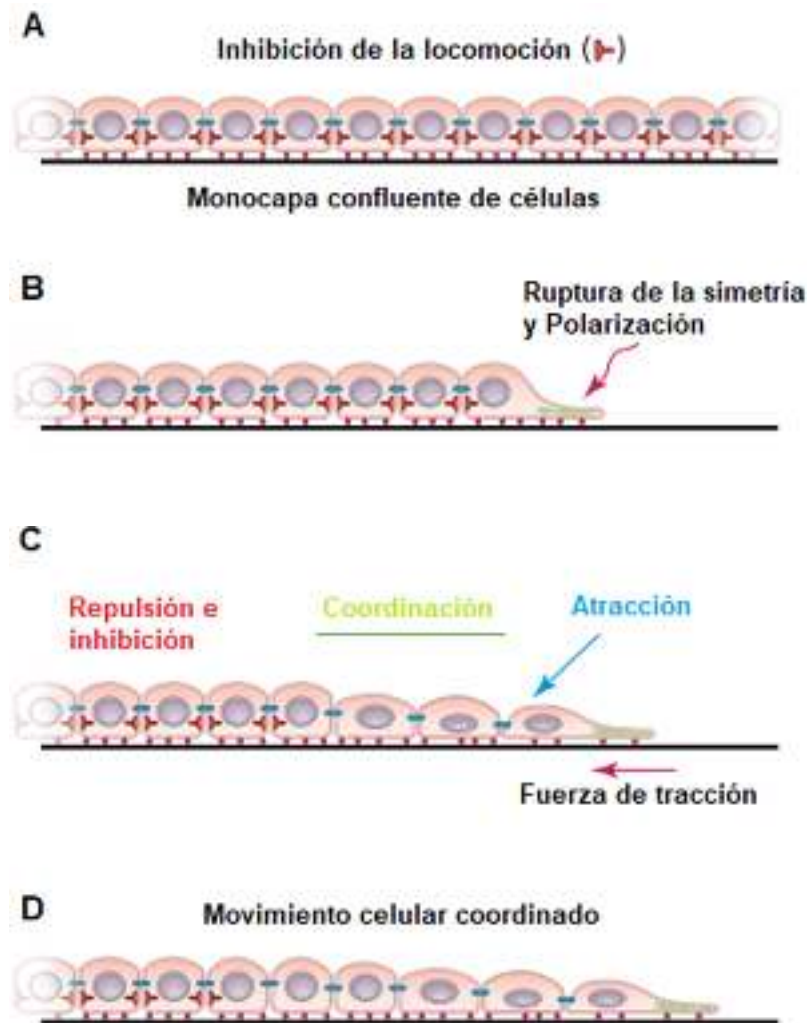


Figura 7. Migración celular colectiva. A. La locomoción de las células en una monocapa altamente densa están sujetas a la inhibición por contacto, todas las células son inhibidas simétricamente, lo que resulta en poca migración. B. La disponibilidad de un espacio libre para migrar, rompe la simetría y polariza las células posteriores al borde de migración. Esto supera las señales inhibitorias y promueve la motilidad celular. C. Las células en movimiento que se encuentran en el frente de migración, ejercen fuerzas atractoras sobre sus vecinas, que, a su vez, coordinan su movimiento. D. Promoviendo un movimiento celular coordinado (Vedula *et al.* 2013).

En general, la migración celular es un proceso en el que una célula responde a un estímulo formando y/o ampliando protuberancias localizadas específicamente en la porción de la membrana que se orienta hacia el frente migratorio (Vedula *et al.* 2013). Estas protuberancias membranales pueden ser lamelipodios, que son grandes y laminares, y/o filopodios, de forma digitiforme (Vedula *et al.* 2013). Su formación y función es impulsada por la polimerización de actina y se estabilizan adhiriéndose a la matriz extracelular (MEC) o células adyacentes, a través de receptores transmembranales que inducen la formación de complejos de adhesión asociados al citoesqueleto (Vedula *et al.* 2013). En medios constituidos por mallas tridimensionales de colagena, las células también pueden avanzar por movimiento ameboideo, con protrusiones esféricas o “ámpulas”, por su nombre en inglés “blebs” (Charras *et al.* 2008). Sobre superficies duras, las células, individualmente o en grupos, avanzan formando adhesiones en el frente de migración y desmontándolas en la parte trasera de las células (Lauffenburger y Horwitz 1996).

La migración celular requiere la formación cíclica y el ensamble y desensamble de las adhesiones focales, que son complejos de proteínas integrales y asociadas a la membrana, como las integrinas, que unen la célula a la matriz extracelular (ECM) y la cinasa de adhesión focal (FAK), también fundamental en este proceso (Burrige y Chrzanowska-Wodnicka 1996).

Una de las primeras proteínas de señalización reclutadas en la adhesión focal es FAK, una tirosina quinasa no receptora que une talina y paxillin, a través de su focalización en su dominio C-terminal, FAK es una proteína que desencadena la respuesta celular a la MEC, actuando como un integrador de la señalización (Mousson *et al.* 2018). En general, la fosforilación de FAK en el residuo de Y397 crea un sitio de unión para el dominio SH2 de cSrc, Dentro de este complejo, cSrc fosforila a FAK en los residuos Y576 y Y577, creando una conformación abierta de FAK que funciona como un andamiaje y promueve el reclutamiento de más proteínas al complejo, como vinculina, paxilina, talina entre otras (Mousson *et al.* 2018). El reclutamiento de proteínas en las adhesiones focales, es importante para poder generar un cambio más dinámico de la polimerización de actina, a través del

cual se genera la fuerza de tracción necesaria para mover a la célula y al conjunto celular que forma la monocapa en dirección a la migración (Vedula *et al.* 2013) (Fig. 8).

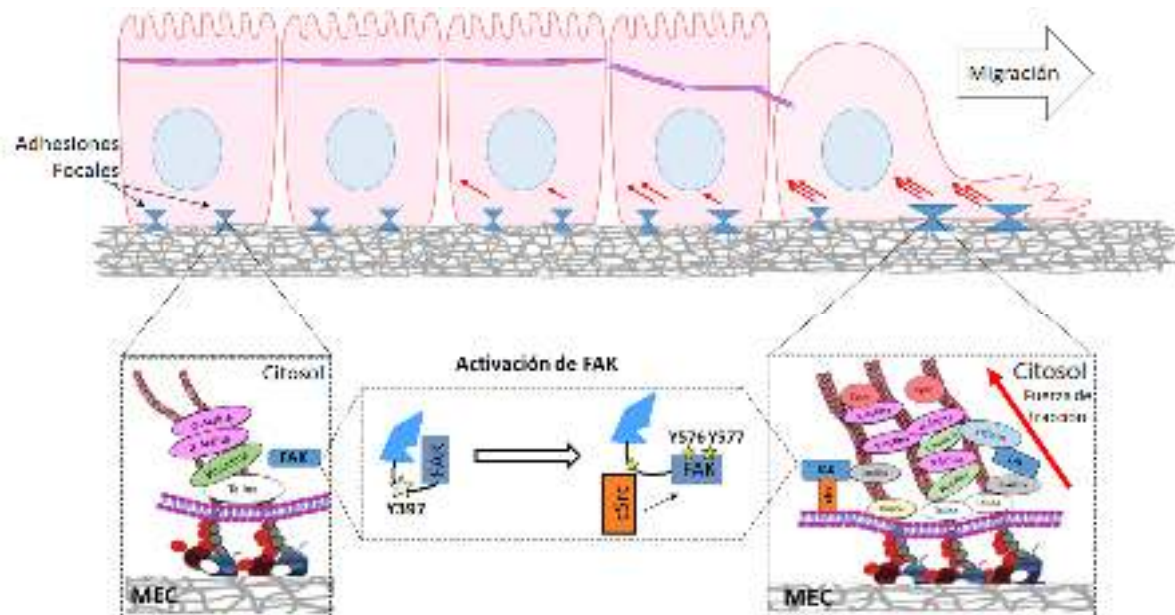


Figura 8. Participación de las adhesiones focales en la migración celular colectiva. Para generar fuerza para el movimiento celular y las elongaciones de la membrana durante la migración, es necesario la interacción del citoesqueleto con la matriz extracelular (MEC). Las adhesiones focales están encargadas de dichos procesos, y son un conjunto dinámico de proteínas que transmiten señales del exterior al interior celular y viceversa, debido a que este macrocomplejo de proteínas conecta el citoesqueleto con la MEC. El cambio conformacional constante de las Integrinas, en las células en movimiento, genera el reclutamiento, fosforilación y activación de las cinasas FAK y cSrc (Mousson *et al.* 2018).

Una parte esencial de la migración celular es la MEC, que está compuesta por una gran cantidad de fibras proteicas, proteoglicanos y proteínas asociadas a la matriz (Mouw y Weaver 2014). Las modificaciones postraduccionales y la composición bioquímica y biomecánica de la MEC están reguladas dinámicamente, a través de receptores transmembranales especializados que incluyen a las integrinas, que una vez activados, reconocen motivos específicos dentro de la MEC, induciendo cambios conformacionales en el complejo proteico de las adhesiones

focales y posteriormente, activan la señalización para influir en la migración celular colectiva (Kai *et al.* 2019).

Adicionalmente, las células regulan la composición de la ECM al secretar metaloproteinasas de matriz dependientes de Zn^{2+} (MMPs) en respuesta a factores de crecimiento, hormonas y citoquinas (Page-McCaw *et al.* 2007; Duarte *et al.* 2015; Ra y Parks 2007).

➤ Las metaloproteasas en la migración celular

Las MMPs regulan la migración celular, la remodelación de tejidos, la cicatrización de heridas, la angiogénesis y desempeñan un papel en la artritis, el cáncer y la ulceración de tejidos (Vargová *et al.* 2012). Estas proteasas son dependientes de Zn^{2+} y Ca^{2+} y pueden ser solubles (MMPs) o de membrana (MT-MMPs). Según el sustrato que degraden, reciben los nombres de gelatinasas, collagenasas, matrilasas, entre otras (Fig. 9).

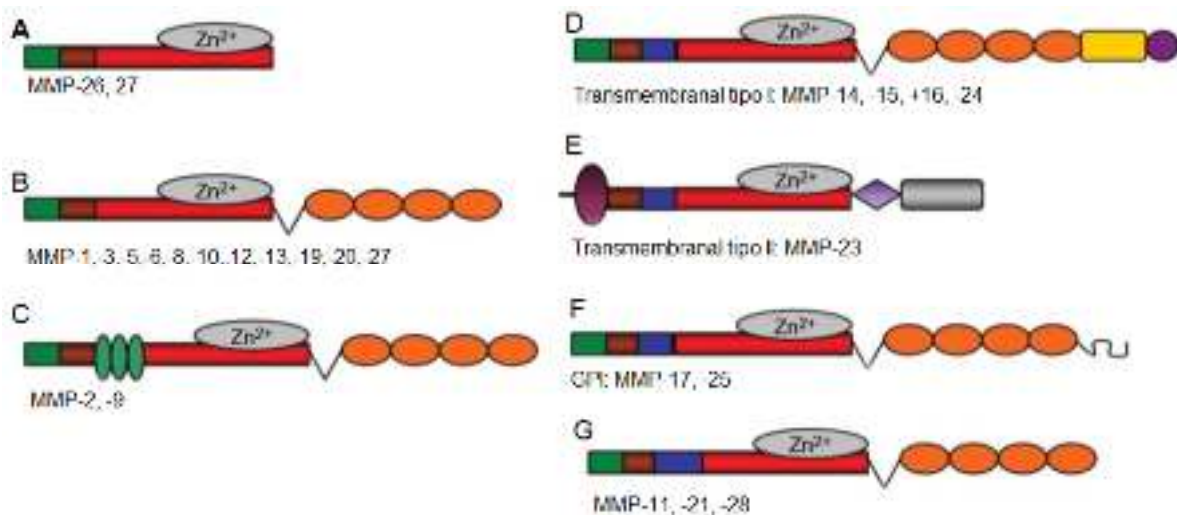


Figura 9. Estructura de la familia de metaloproteasas. En verde se representa la secuencia señalizadora; en marrón el propéptido; el rectángulo naranja es el sitio catalítico de unión al Zn^{2+} ; y los círculos naranjas representan el dominio de hemopexinas.

Las MMPs se sintetizan como zimógenos inactivos en estado latente (pro-MMPs), debido a que el prodominio enmascara el sitio activo al prevenir la hidratación del ión Zn^{2+} , una vez secretadas las MMPs, se hidrata el sitio activo del

predominio y se activan (Sternlicht y Werb 2001). La activación de las MMPs se da en respuesta a estímulos como son los factores de crecimiento, las hormonas, las citosinas y sus inhibidores específicos (TIPMs) (Visse y Nagase 2003; Sternlicht y Werb 2001) (Fig. 10). Rara vez la actividad aumenta por síntesis de nuevas MMPs (Borkakoti 2004).

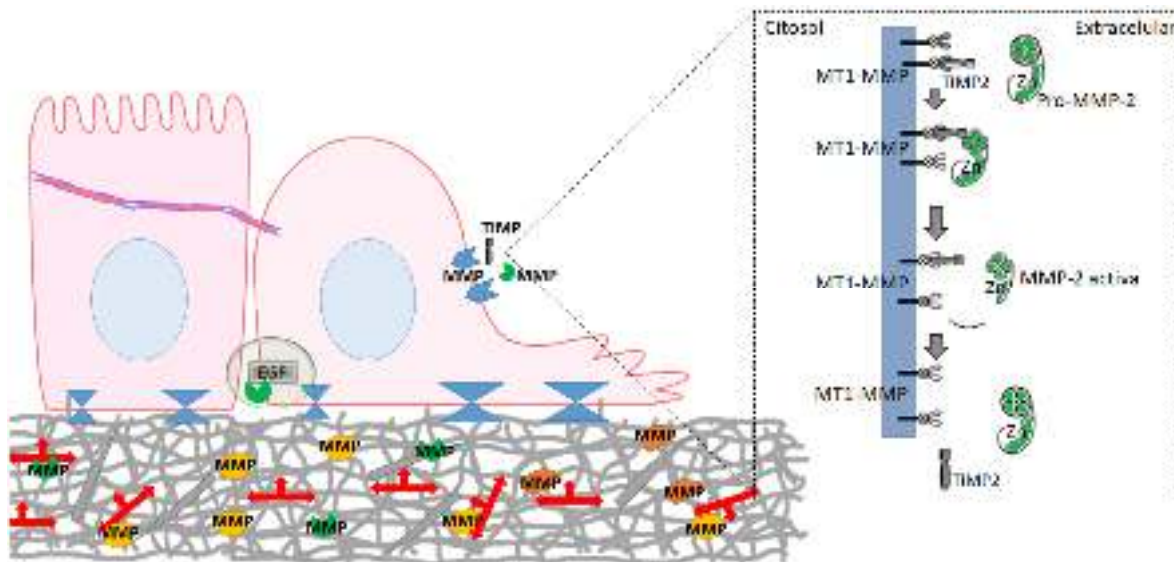


Figura 10. Mecanismo de activación de la pro-MMP-2 mediada por MT1-MMPy TIMP-2.

En gris se representa a la colágena y en flechas rojas a la laminina, blancos de degradación de las MMPs activas (círculos verdes, amarillos y naranjas). El cuadro de la derecha, representa la activación de la MMP-2: MT1-MMP se dimeriza y TIMP2 sirve de andamio para unir a la MMP-2 y poder así activar a la MMP-2.

La MMP-2 es una gelatinasa involucrada en la migración de las células epiteliales, fibroblastos y del sistema inmune (Giannelli *et al.* 1997), promoviendo los cambios estructurales en la MEC, necesarios para la remodelación de tejidos y la invasión celular. Por ejemplo la MMP-2 corta a la laminina-5, dejando descubierto un sitio pro-migratorio que promueve la motilidad en células de epiteliales de mama (Giannelli *et al.* 1997). La MMP-2 (gelatinasa A) y la MMP-9 (gelatinasa B) degradan fácilmente el colágeno y la gelatina, la estructura de estas enzimas tienen tres repetidos de dominios fibronectina insertados en el dominio catalítico en el cual se encuentra el Zn, que se une a la gelatina, a las colágenas y las lamininas (Fig. 9C) (Visse y Nagase 2003). La pro-MMP-2 es activada en la superficie celular y es

mediada por la MT-MMPs, entre ellas se encuentra la MT1-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP y MT6-MMP (Fig. 9B). La activación de la pro-MMP-2 mediada por la MT1-MMP requiere de la asociación de TIMP-2 a ésta, inhibiendo su actividad (Visse y Nagase 2003). La MT1-MMP puede formar dímeros o multímeros en la superficie celular a través de la interacción de los dominios hemopexina e unir a TIMP-2. Posteriormente la pro-MMP-2 se une al dominio C-terminal de TIMP-2 a través de su dominio de hemopexina, permitiendo que la MT1-MMP vecina hidrolice a la MMP-2, liberándose de la membrana en su forma activa (Visse y Nagase 2003) (Fig. 10). La MMP-2 activa, han sido implicada en el control de del procesamiento de factores de crecimiento que se encuentran en la membrana plasmática, promoviendo la transactivación de los receptores a factores de crecimiento, promoviendo procesos como la migración celular, el desarrollo muscular, la fertilización y diferenciación celular (Roelle *et al.* 2003).

Planteamiento del problema

¿Cuál es el mecanismo mediante el cual la ouabaína promueve la migración colectiva de las células MDCK?

Hipótesis

La ouabaína estimula la migración de células epiteliales a través de la Na^+, K^+ -ATPasa-cSrc-ERK1/2, promoviendo la activación de FAK y aumentando la secreción y activación de la MMP-2.

Objetivo General

Investigar el mecanismo por el que la ouabaína promueve la migración colectiva de las células MDCK.

Objetivos Particulares

1. Evaluar si cSrc y ERK1/2 participan en la migración colectiva de las células MDCK inducida por ouabaína.
2. Investigar si FAK participa en la migración colectiva de las células MDCK inducida por ouabaína.
3. Examinar la participación de las MMPS en la migración colectiva de las células MDCK inducida por ouabaína.
4. Identificar cual gelatinasa participa en la migración colectiva de las células MDCK inducida por ouabaína.
5. Analizar si la secreción y activación de la MMP-2 participa en la migración colectiva de las células MDCK inducida por ouabaína.
6. Averiguar si cSrc y ERK1/2 participan en la secreción y activación de la MMP-2 inducida por ouabaína.

Métodos

- **Cultivo de células MDCK**

Las células MDCK se sembraron en placas de Petri (Corning Costar) a 70% de densidad y se incubaron 24 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Life Technologies) suplementado con penicilina (10.000 unidades/ml), estreptomina (10 mg/ml, in vitro) y 10 % de suero bovino fetal (FBS) suplementado con hierro (Life Technologies). En preparación para los experimentos, las células se privaron de suero, incubándolas durante 20 h en DMEM complementado con penicilina (10.000 U/ml) y estreptomina (10 mg/ml).

- **Ensayo de Migración Celular**

Las monocapas confluentes de MDCK, depletadas de suero, se incubaron durante 1 h con 4 mg/ml de mitomicina C para inhibir la proliferación celular, y en presencia o ausencia de cada uno de los siguientes inhibidores: GM6001 (N - [(2R) 2- (hidroxamidocarbonilmetil) -4-metilpentanoil] l-triptófano metilamida), inhibidor genérico de MMPs (Sigma-Aldrich); PP2 (4-amino-5- (4-clorofenil) -7 (dimetiletil) pirazolo [3,4-d] pirimidina), inhibidor de cSrc (Merck); PD98059 (2'-amino-3'-metoxiflavona), inhibidor de la quinasa MEK1/2 que afecta la activación de ERK1/2 (Merck); y iMMP-2 ((2R) - [(4-bifenililsulfonil) amino] N-hidroxi-3-fenilpropionamida), inhibidor específico de MMP-2 (Merck). La mitomicina C bloquea la proliferación, es un anticarcinógeno usado contra el glaucoma que entrecruza guaninas contiguas frenando así la replicación y la proliferación (Mao *et al.* 199). PP2 inhibe a cSrc, al unirse a un área de la molécula que no se superpone con el dominio de unión a ATP (Hanke *et al.* 1996). PD98059 es un inhibidor potente y selectivo de las MAP cinasas (MAPKK), MEK1 y MEK2 (Alessi *et al.* 1995). Se une a la forma inactiva de MAPKK y evita la activación por parte de activadores ascendentes como cRaf. El GM6001 inhibe a las MMPs porque su estado aniónico del grupo ácido hidroxámico forma un complejo bidentado con el sitio activo de Zn²⁺ (Santiskulvong *et al.* 2003).

Se usó una punta de pipeta de 1 ml esterilizada para generar heridas a través de la monocapa de las células MDCK, y los residuos se lavaron con PBS. Después, las monocapas se incubaron, con 10 nM de ouabina durante 5 h. La parte inferior de la placa se marcó como referencia y el mismo campo de las monocapas se fotografió inmediatamente después de practicar la herida (tiempo = 0 h) y 5 h después de la incubación con ouabina (t = 5 h), se analizaron 18 imágenes por placa. La distancia entre los bordes de la herida se midió en el momento 0 y a las 5 h, y la distancia migrada reportada en las figuras, corresponde a la diferencia entre estos dos. Las distancias entre los bordes de cada imagen se calcularon a partir del área libre de células dividida por la altura de la imagen, utilizando el software ImageJ y la herramienta de coherencia de cicatrización de heridas MRI (Schneider *et al.* 2012).

- **Actividad de MMPs: Zimograma en Gelatina**

Se colectaron los medios de cultivo de células MDCK usadas en el ensayo de migración celular a las 5 h, descritas anteriormente. Las muestras de proteínas se precipitaron con ácido sulfosalicílico al 3% y la actividad proteolítica de las MMPs se analizó en geles de gelatina-sustrato como se describió anteriormente (Charvat *et al.* 1998; Heussen y Dowdle 1980). Brevemente, 30 µg de proteína no desnaturalizadas, se mezclaron con solución amortiguadora de muestra no desnaturalizante (SDS al 2.5%, sacarosa al 1% y rojo de fenol al 4%) y se separaron en geles de poli(acrilamida) al 8 % co-polimerizados con gelatina (1 mg/ml). La electroforesis se realizó a 72 V durante 2 h. Los geles se enjuagaron dos veces en Triton X-100 al 2.5 % para eliminar el SDS y luego se incubaron en el buffer de ensayo (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 y 5 mM CaCl₂) a 37 ° C durante 48 h. Los geles se fijaron y se tiñeron con Azul de Coomassie Brillante, G-250, al 0.25% en ácido acético al 10% y metanol al 30% (Cortes-Reynosa *et al.* 2008). Los geles se pasaron a imágenes por medio de un escáner.

- **Expresión de Proteínas: Western blot**

Las células MDCK con heridas, incubadas 5 h en diferentes condiciones indicadas en las figuras, se lavaron dos veces con PBS frío, suplementado con 1.8 mM Ca²⁺ y posteriormente se incubaron durante la noche a -20 °C con solución amortiguadora de lisis (Tris 20 mM pH 7.0, 2 mM EGTA, 5 mM EDTA, 30 mM NaF, 40 mM β-glicerofosfato, 1 mM Na₃VO₄, 3 mM benzamidina, 0,5% Nonidet P-40, Sigma-Aldrich) complementado con inhibidor de proteasa completo (Roche Applied Science). Los extractos celulares se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Los extractos se descongelaron y pasaron 10 veces a través de una aguja de calibre 21. El contenido total de proteínas se cuantificó utilizando el ensayo BCA siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific). Las muestras se diluyeron en buffer de muestra Laemmli, se resolvieron mediante SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, BioRad). Las membranas se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-MMP-2 (Santa Cruz Biotechnologies) durante 2 h a 37 °C seguido de un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo IgG (H + L) acoplado a HRP (Thermo Fisher Scientific). Las bandas se revelaron con el reactivo de detección de transferencia Western Prime de ECL (General Electric Company). Los análisis densitométricos se realizaron utilizando el software ImageJ.

- **Transfección celular**

Las células MDCK sembradas al 80 % de confluencia, fueron transfectadas usando Lipofectamina 2000, según las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific). Las células se transfectaron con 2.5 µg/ml de vector de expresión pFLAG-CMVtm-2, que contiene el dominio no-cinasa relacionado con FAK humana (FRNK, por sus siglas en inglés), que consiste en el dominio FAT C-terminal de FAK, un fragmento que actúa como un regulador dominante negativo de la actividad de cinasa de FAK (Heidkamp *et al.* 2002; Koshman *et al.* 2010). Después de 5 h en la mezcla de transfección, las monocapas se lavaron y se incubaron en DMEM complementado con FBS al 10% durante 20 h. Antes de comenzar los ensayos de

migración, las monocapas se cultivaron durante 20 horas adicionales en medio sin suero.

- **Análisis Estadístico**

La significancia estadística se calculó utilizando pruebas t no pareadas o análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de pruebas de comparación múltiple de Bonferroni, utilizando Prism 5 (software GraphPad). Los asteriscos representan: * $p > 0.05$; ** $p < 0,01$; y *** $p < 0.001$. Para la distancia migrada, los datos experimentales se normalizaron multiplicándolos por un factor que consiste en el promedio total de todas las mediciones de control, dividido por el promedio de los controles correspondientes.

Resultados

1. La ouabaína acelera la reparación de heridas

La Na⁺,K⁺-ATPasa, como receptor de la ouabaína, desencadena vías de señalización que promueven cambios en la adhesión célula-célula y célula-sustrato (Contreras *et al.* 1999, 2004; Rincon-Heredia *et al.* 2014). En este trabajo, investigamos el efecto de una concentración fisiológica de ouabaína en la migración de células MDCK, utilizando un ensayo clásico de cicatrización de heridas.

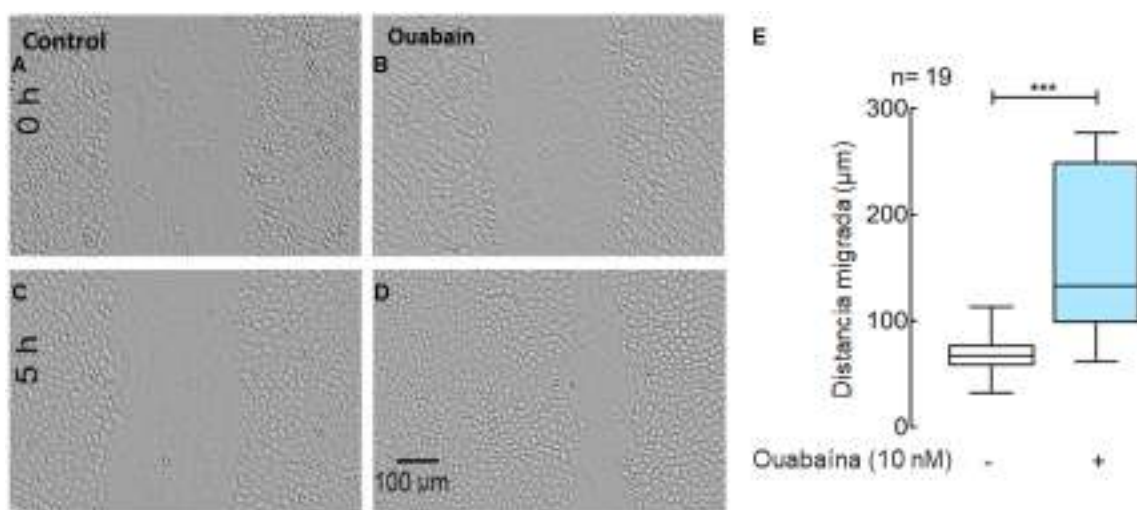


Figura 11. La ouabaína acelera la reparación de heridas. Las imágenes A-D, son representativas de microscopía de luz del ensayo de reparación de heridas con células MDCK. A y B, son heridas de monocapas de MDCK a las 0 h. C y D, muestran los mismos campos después de 5 h con y sin 10 nM de ouabaína. E, es la cuantificación de la distancia migrada de células MDCK durante el tratamiento con ouabaína. La caja blanca representa las células control; la caja azul son las células incubadas con 10 nM de ouabaína. *** p < 0,001, prueba de t no pareada de dos colas.

Este ensayo consiste en rasgar una monocapa de células confluentes y medir el grado de cierre de la herida en un marco de tiempo determinado. Las imágenes, representativas de microscopía de luz de campo amplio, mostraron el tamaño de la herida inmediatamente después de realizarse (Fig. 11A,B), y 5 h más tarde en las condiciones de control (Fig. 11C) o tratadas con ouabaína (Fig. 11D). Encontramos que 10 nM ouabaína aceleró la migración colectiva de las monocapas de células

MDCK. La medición de 19 experimentos independientes mostró que la distancia de las células MDCK tratadas con ouabaína aumentó significativamente en comparación con las células de control (Fig. 11E).

2. La ouabaína acelera la reparación de heridas a través de cSrc y ERK1/2

Nuestro grupo ha reportado, que la ouabaína afecta la adhesión celular y la polaridad a través de una vía de señalización intracelular que incluye a las cinasas cSrc y ERK1/2 (Cereijido *et al.* 2012). Nuestra hipótesis es que estas cinasas también pueden regular la migración de células MDCK tras la estimulación con ouabaína. Por lo tanto, probamos el efecto del PP2, un inhibidor de cSrc, y el PD98059, un inhibidor de MEK1/2, que impide la activación de ERK1/2, sobre el efecto inducido por la ouabaína en la migración colectiva de células MDCK. La figura 12 muestra imágenes representativas de microscopía de luz de células MDCK cultivadas en condiciones de control (Fig. 12A) y también tratadas con 10 nM de ouabaína (Fig. 12B). La adición de 10 μ M de PP2 a los medios de cultivo (Fig. 12C,D) y de 25 μ M de PD98059 (Fig. 12E,F) bloqueó el efecto de 10 nM de ouabaína en la migración celular. La medida de la distancia migrada de cuatro réplicas biológicas independientes (Fig. 12G), confirmó que la inhibición de las cinasas cSrc y ERK1/2, impiden el efecto de la ouabaína observado en la migración colectiva de células MDCK, lo que demuestra la participación de la activación de cSrc y ERK1/2 en este proceso. Las imágenes presentadas en la figura 12H, son western blots representativos que demuestran que la ouabaína activó a cSrc y ERK1/2, y que PP2 y PD98059 bloquearon esta activación, como se había mostrado anteriormente (Rincon-Heredia *et al.* 2014).

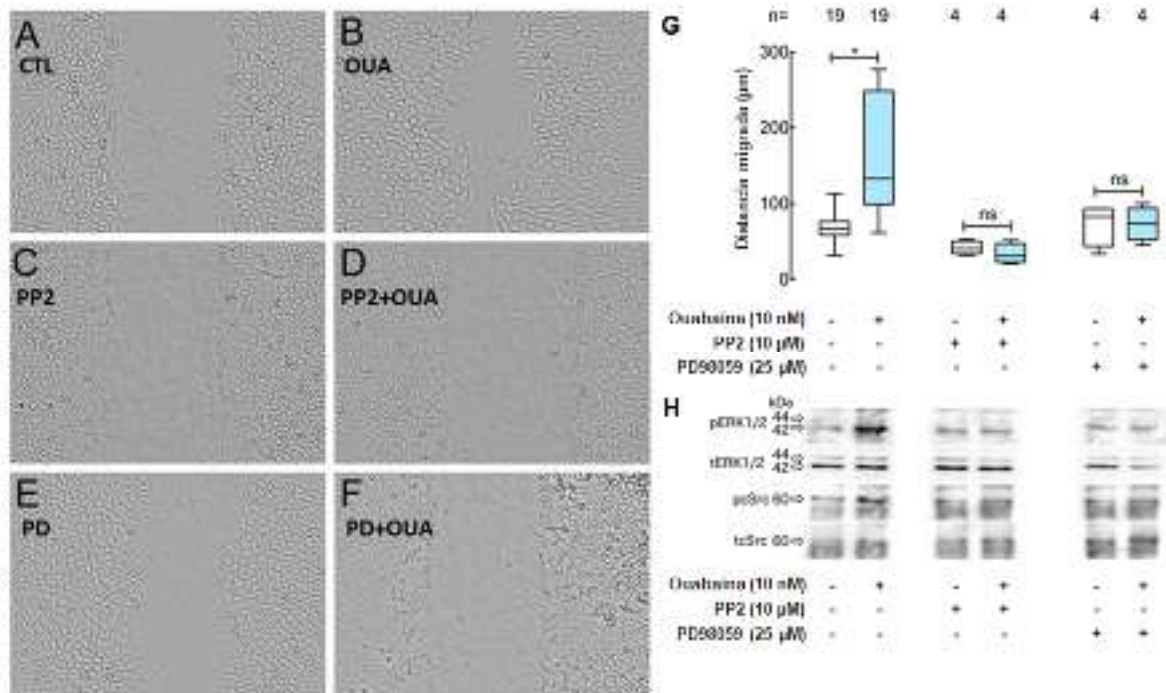


Figura 12. La ouabaína acelera la cicatrización de heridas a través de cSrc y ERK1/2.

Las imágenes son representativas de microscopía de luz del ensayo de reparación de heridas con las células MDCK. Las monocapas de MDCK heridas se incubaron 5 h (A) sin o (B) con 10 nM ouabaína, con o sin un inhibidor de cSrc (C,D; PP2 10 µM) o ERK1 / 2 (E,F; PD98059 de 25 µM) durante 5 h. Los inhibidores se añadieron a los medios de cultivo 1 h antes de la ouabaína. G, El gráfico muestra el análisis estadístico de la distancia que las células MDCK migraron colectivamente durante el ensayo de cicatrización de heridas. Las cajas blancas representan células de control; Las cajas azules son las células incubadas con ouabaina. H, Imágenes representativas de western blots de extractos de células enteras con anticuerpos contra el total (tcSrc, 60 KDa) o fosforilado (pcSrc) cSrc, o total (tERK1/2, 42 y bandas de 44 KDa) o fosforilado (pERK1/2) ERK1/2. * p <0.05, prueba ANOVA, Bonferroni.

3. El aumento de la migración inducido por la ouabaína requiere la activación de FAK

La migración celular colectiva requiere de una unión más laxa en la adhesión célula-célula de la región cercana a la herida, el ensamblaje y desmontaje cíclico de las adherencias focales y la activación de FAK, una cinasa que participa en ambos procesos (Bjerke *et al.* 2014). Estos hechos nos llevaron a investigar si FAK es necesaria para la inducción del efecto de la ouabaína en la migración colectiva de células MDCK. Para probar esta posibilidad, expresamos el péptido dominante

negativo FRNK, en las células MDCK (Heidkamp *et al.* 2002; Koshman *et al.* 2010), y realizamos ensayos de reparación de herida. La figura 13 muestra imágenes representativas de microscopía de luz de células MDCK, cultivadas en condiciones control (Fig. 13A,C) y también tratadas con ouabaína 10 nM (Fig. 13B,D), que muestra la reparación de la herida que produce la ouabaína. La expresión del FRNK transfectado (Fig. 13C,D), no altera la herida del control, pero bloquea el efecto del cierre impuesto por la ouabaína (Fig. 13D), produciendo distancias de migración similares a las de las células control. Como se esperaba, las células transfectadas con el fragmento FRNK expresaron el péptido dominante negativo, como se muestra en un western blot representativo en la figura 13E, pero no así las células que se transfectaron con el vector vacío.

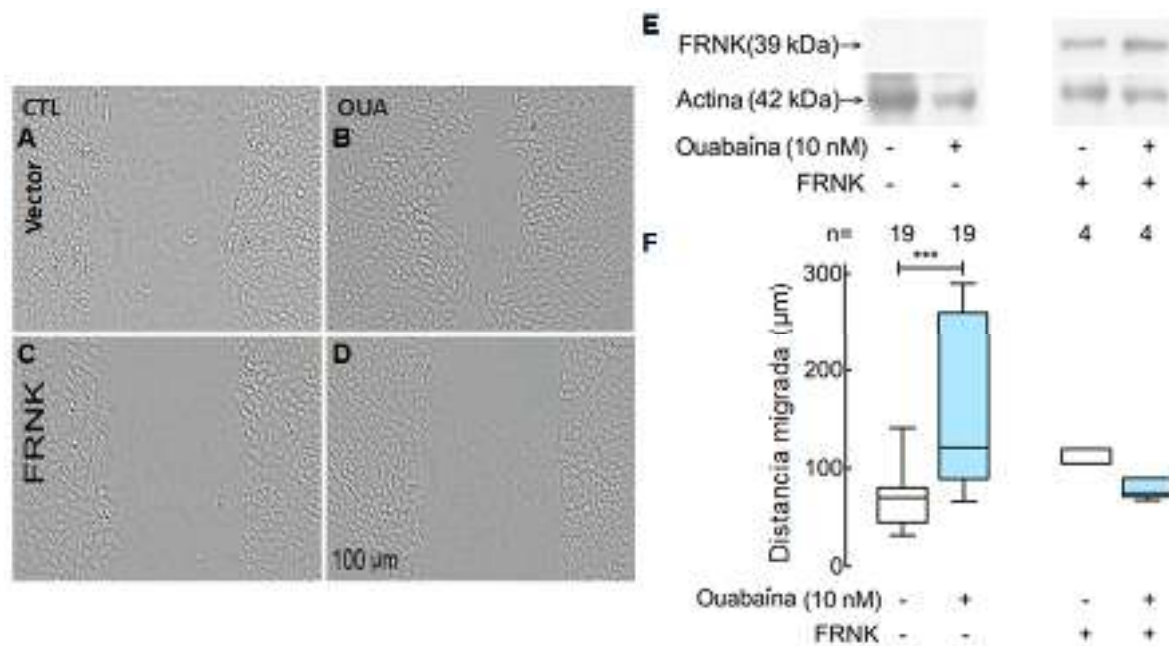


Figura 13. El aumento de la migración inducido por la ouabaína requiere la activación de FAK. Imágenes representativas, obtenidas por microscopía de luz, de monocapas de MDCK transfectadas sin (A, B) o con (C, D) un plásmido que codifica FRNK, una secuencia negativa dominante de FAK. A las 24 h después, las monocapas se incubaron durante 5 h sin (A,C) o con (B,D) 10 nM de ouabaína. E, imágenes de electrotransferencia e inmunodetección representativas que muestran la expresión de FRNK y de actina de las monocapas de MDCK. F, muestra la cuantificación de la distancia migrada de las células MDCK tras la incubación de ouabaína. Las cajas blancas representan células control; Las cajas azules son las células incubadas con ouabaína. * p<0.05, prueba ANOVA, Bonferroni.

La distancia migrada de las células MDCK que expresan el FRNK fue estadísticamente idéntica a la de las células control y confirmó que la inhibición de FAK, con la expresión del FRNK, impidió el efecto de la ouabaína en la migración colectiva de células MDCK (Fig. 13F).

4. La migración inducida por ouabaína depende de las MMPs

Otro mecanismo bien conocido para la inducción de la migración celular consiste en la secreción de MMPs que modifican la MEC o eliminan o liberan péptidos, como el HB-EGF, a partir de sus precursores membranales o de sus almacenes en la MEC, que provocan una migración celular más rápida (Lu *et al.* 2011; Mifune *et al.* 2005). Nos preguntamos si las concentraciones fisiológicas (10 nM) de ouabaína, también pueden inducir la activación de las MMPs para acelerar la migración. Para probar esta hipótesis, utilizamos el inhibidor genérico de MMPs, GM6001, en el ensayo de reparación de heridas.

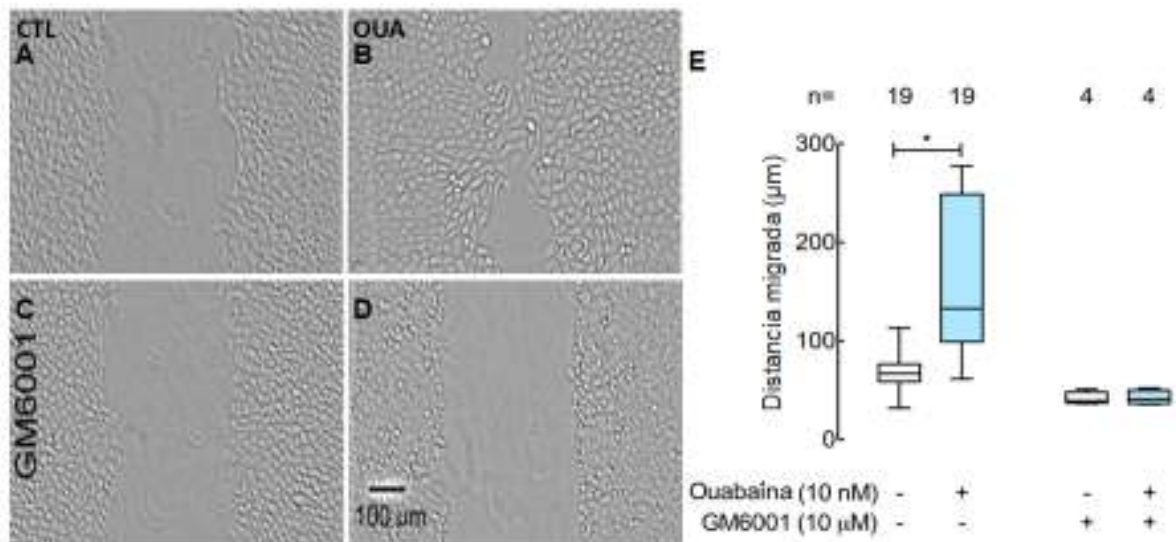


Figura 14. La migración inducida por ouabaína depende de las MMPs. A-D, son imágenes representativas de microscopía de luz de células MDCK durante un ensayo de reparación de heridas. Las monocapas de células se incubaron 5 h sin (A,C) o con (B,D) 10 nM de ouabaína, C y D con 25 µM de GM6001, inhibidor genérico de las MMPs. El GM6001 se añadió 1 h antes de la ouabaína. E, representa la medición de la distancia migrada de las células MDCK después de los tratamientos. Las cajas blancas representan células control; las cajas azules son las células incubadas con ouabaína. * $p < 0.05$, prueba ANOVA, Bonferroni.

Las imágenes de la figura 14 (A,C) son representativas de microscopía de luz de las células MDCK de control y tratadas con GM6001 tratadas, las cuales no mostraron diferencias cuando las células se cultivaron en ausencia de ouabaína. Sin embargo, cuando se añadió el inhibidor a los medios de cultivo en presencia de la ouabaína, se eliminó el efecto de la hormona en la reparación de las heridas (Fig. 14D) en comparación con las células tratadas solo con ouabaína (Fig. 14B), según lo confirma el análisis estadístico. Estos datos sugieren que el mecanismo potencial mediante el cual la ouabaína induce la migración celular es la activación de MMPs.

5. La migración inducida por ouabaína promueve la secreción de la MMP-2

A continuación investigamos cual MMP podría estar involucrada en la migración celular. Por la facilidad de estudiarlas, restringimos el análisis a las MMP secretadas con actividad gelatinolítica en los medios de cultivo de monocapas de células MDCK. Esta actividad en particular, resulta de la activación de la MMP-2 y la MMP-9, según lo detectado por la actividad gelatinolítica de bandas ubicadas entre 72 y 63 KDa (MMP-2) y 93 KDa (MMP-9). Los medios de cultivo de monocapas de células MDCK, que se obtuvieron de los ensayos de reparación de heridas, muestran las bandas características de 72–63 KDa que resultan de la actividad de la MMP-2 en el zimograma (Fig. 15A). Esta señal se intensificó significativamente por adición de la ouabaína al medio de cultivo (Fig. 15A,B). Es importante destacar que no se detectó ninguna banda a 93 KDa, lo que sugiere que MMP-9 no está asociada con los procesos de migración celular de las células MDCK inducidos por ouabaína (Fig. 15A).

Un western blot representativo mostró que la MMP-2 aparecía como bandas de 72 y 63 KDa, correspondientes a sus formas inactiva y activa, respectivamente (Fig. 15C,D). El aumento en la actividad gelatinolítica inducida por 5 h de incubación con ouabaína, correlacionó con un aumento en la cantidad de proteína de la MMP-2 en el medio de cultivo (Fig. 15D) y una reducción en los extractos de proteína celular total (Fig. 15C), lo que sugiere que la ouabaína indujo la secreción y la activación de la MMP-2, que ya estaba presente en las células. Estos resultados

sugieren que la ouabaína promueve la secreción y la activación de la MMP-2 en la migración de las células MDCK.

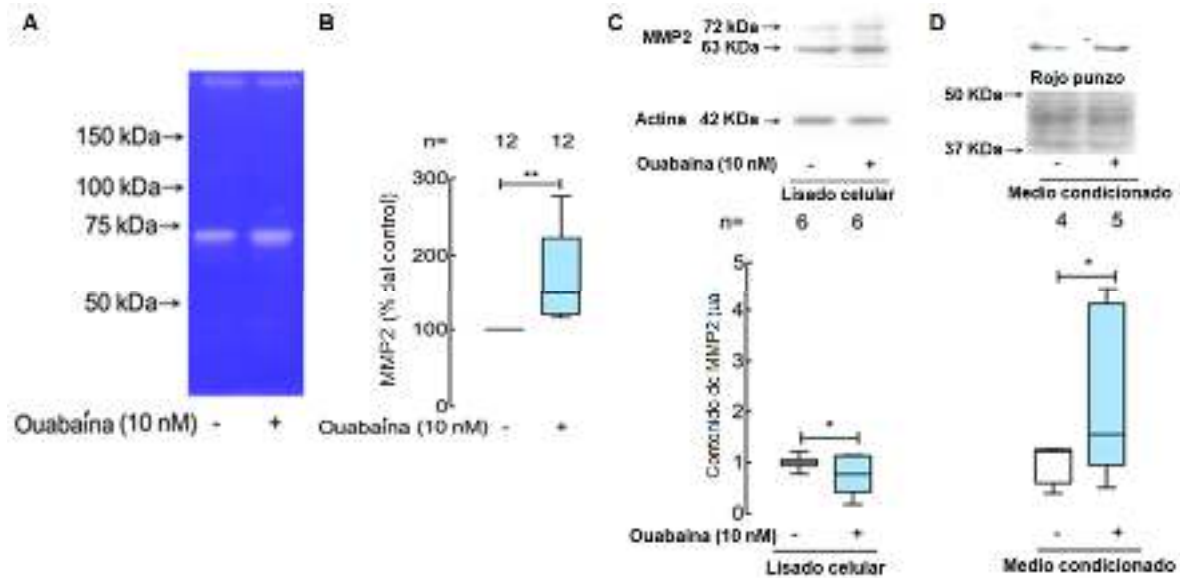


Figura 15. La ouabaína induce la secreción y activación de la MMP-2. A, muestra un zimograma representativo de un gel de gelatina, que contiene proteínas secretadas al medio de cultivo de las monocapas de MDCK, que se utilizaron en el ensayo de reparación de heridas después de 5 h de incubación con o sin ouabaína 10 nM. B, corresponde al análisis densitométrico de los zimogramas. C, muestra el western blot representativo de MMP-2 obtenida de los lisados celulares de las monocapas de MDCK y la cuantificación de las bandas obtenidas sin y con ouabaína. D, muestra el inmunoblot representativo de MMP-2 obtenida de los medios de cultivo de células y la cuantificación de las bandas obtenidas sin y con ouabaína. La banda a 72 KDa, muestra pro-MMP-2 y la banda a 63 KDa, muestra la MMP-2 activa. * $p < 0.05$, prueba ANOVA, Bonferroni; ** $p < 0.01$ prueba t no pareada.

Posteriormente, investigamos si la activación de la MMP-2 correlaciona con el efecto inducido por la ouabaína en la migración celular colectiva, mediante el cultivo de las células tratadas con ouabaína y con el inhibidor iMMP-2 (Fig. 16). Las imágenes representativas de microscopía de luz, muestran que la migración inducida por ouabaína (Fig. 16A vs. B), fue bloqueada por iMMP-2 (Fig. 16C vs. D). De acuerdo con nuestra hipótesis, encontramos diferencias significativas entre las células tratadas con el iMMP-2 y las células control (Fig. 16E). Estos datos demostraron que el iMMP-2 tiene un efecto que bloquea la migración inducida por

ouabaína, lo que sugiere que la MMP-2 puede ser una de las MMPs necesarias para la migración inducida por ouabaína en el modelo epitelial cultivado de MDCK.

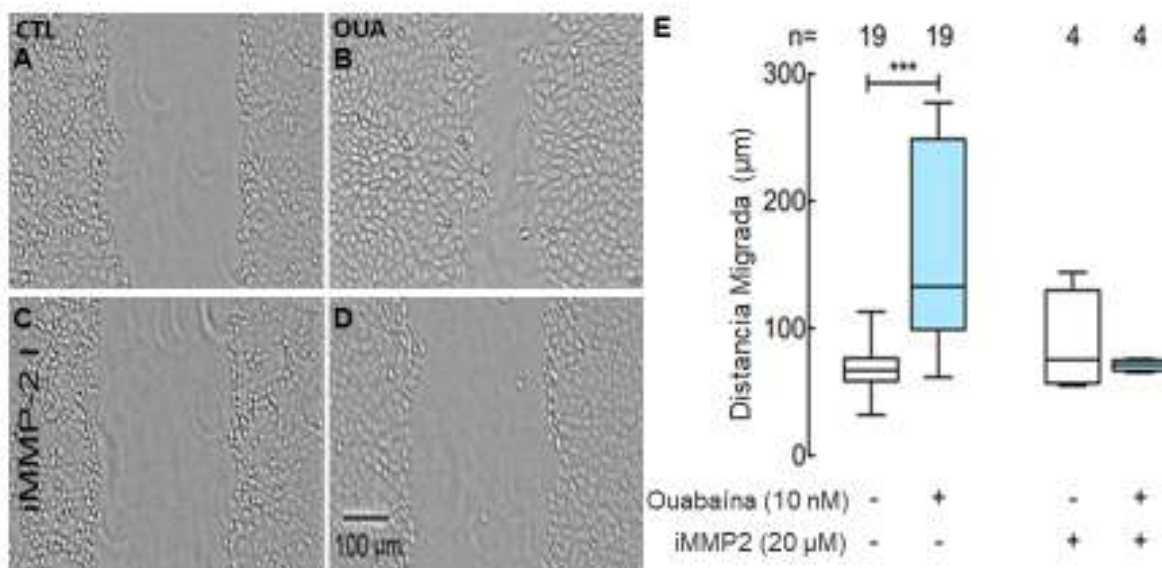


Figura 16. La migración inducida por la ouabaína requiere de la activación de la MMP-2.

Las imágenes de microscopía de luz A-D son representativas del ensayo de reparación de heridas de las células MDCK. Las células se cultivaron sin (A, C) o con (B, D) ouabaína 10 nM durante 5 h, (C, D) con o (A, B) sin el inhibidor de la MMP-2, el iMMP-2 (20 µM). E, muestra la cuantificación de la migración de las células MDCK en el ensayo de reparación de heridas. Las cajas blancas representan células control; las cajas azules son las células incubadas con ouabaína. *** $p < 0,001$, prueba ANOVA, Bonferroni.

6. La secreción y activación de la MMP-2, inducida por la ouabaína, requiere de la activación de cSrc y ERK1/2

Si la MMP-2 participa en la migración inducida por ouabaína, su secreción debe ser controlada por la misma vía de señalización, cSrc-ERK1/2, que controla la migración celular, como un efector río abajo de esta ruta. Para probar esta hipótesis, utilizamos el PP2 y el PD98059 para bloquear la activación de cSrc y ERK1/2, respectivamente, y evaluamos el efecto de inhibir estas vías de señalización en la secreción y activación de la MMP-2 inducida por ouabaína. Un western blot representativo, mostró que la inhibición de cSrc o ERK1/2, bloquea el efecto de ouabaína sobre la activación de la MMP-2 en los medios de cultivo (Fig. 17). La medición de al menos cuatro experimentos independientes, sugiere que la ouabaína

promueve la migración colectiva de células MDCK, que están asociadas con la secreción de la MMP-2, dependiente de cSrc y ERK1/2.

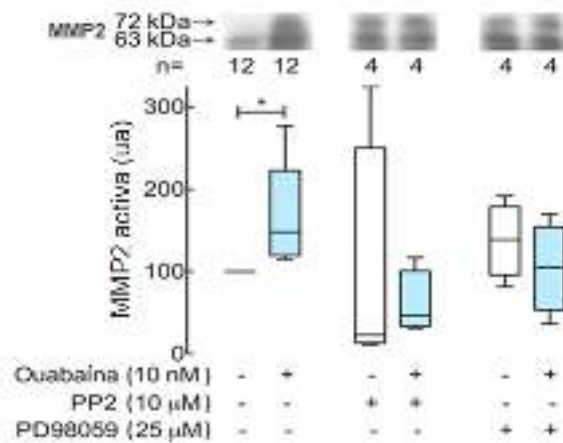


Figura 17. La secreción y activación de la MMP-2, inducida por la ouabaína, depende de la activación de cSrc y ERK1/2. Western blot representativo de la MMP-2 secretada y activa de células MDCK después del ensayo de reparación de heridas. Las células se incubaron con o sin 10 nM ouabaína y con o sin 10 μM PP2 (inhibidor de cSrc) o 25 μM PD98059 (inhibidor de ERK1/2). Las barras blancas representan las células control y las barras azules representan las células incubadas con ouabaína. * p<0.05, prueba ANOVA, Bonferroni.

Estos resultados sugieren que la unión de la ouabaína a la Na⁺,K⁺-ATPasa acelera la migración colectiva de las células MDCK, a través de la activación de la cascada de señalización cSrc-ERK1/2-FAK y promoviendo la expresión, secreción y la actividad de MMP-2.

Discusión

La Na⁺,K⁺-ATPasa es un transportador de membrana que actúa como una molécula de adhesión celular (Gloor *et al.* 1990; Shoshani *et al.* 2005) y un receptor que activa diferentes vías de señalización (Aperia *et al.* 2016). Es importante destacar que la Na⁺,K⁺-ATPasa responde a la ouabaína (Schatzmann 1953), que es uno de los varios esteroides cardiotónicos endógenos con papeles fisiológicos, en gran parte desconocidos (Hamlyn y Manunta 2015). Nuestro grupo reportó anteriormente que una concentración alta de ouabaína (≥ 300 nM) induce endocitosis y degradación de las moléculas de adhesión celular y, en consecuencia, el desprendimiento de células de entre ellas y del substrato (Contreras *et al.* 1999; Contreras *et al.* 2004; Rincon-Heredia *et al.* 2014). También, mostramos que la concentración de 10 nM de ouabaína fortalece las uniones estrechas (Larre *et al.* 2010), aumenta la comunicación celular mediada por uniones GAP (Larre *et al.* 2006; Ponce *et al.* 2014, 2016) y la cantidad de E-cadherina y β -catenina en la membrana plasmática, así como la cantidad de esta última proteína en el núcleo (Castillo *et al.* 2019).

En el presente trabajo, propusimos que la ouabaína, a una concentración de 10 nM, regula la adhesión celular y los procesos celulares asociados, debería regular la migración celular colectiva, ya que este proceso requiere de uniones célula-célula y un montaje de contactos focales en la proximidad del borde de migración, la actividad contráctil de las fibras de estrés de actina y el desmontaje de los contactos focales que se encuentran en regiones posteriores al borde de migración (Vedula *et al.* 2013).

En este estudio, mostramos que la migración celular colectiva inducida por ouabaína, requiere la activación de las cinasas cSrc, ERK1/2 y FAK, ya que su inhibición bloquea el aumento que produce la ouabaína en la migración celular colectiva. El mecanismo más simple para explicar este proceso, implicaría que estas cinasas operan de manera orquestada y lineal. Dado que cSrc y ERK1/2 se activan dentro de los 15 min, posteriores a la exposición de la ouabaína (RinconHeredia *et*

al. 2014), es posible que cSrc se active primero, lo que lleva a la activación de ERK1/2, o que ambas cinasas se activen y funcionen simultáneamente para acelerar la migración. De manera similar, el receptor al EGF activa tanto a cSrc como a ERK1/2 en los 5 min, después de la exposición al EGF, para inducir el sellado de uniones estrechas de células MDCK (García-Hernández *et al.* 2015). Sin embargo, es necesario investigar más a fondo la activación de la cinasa a una resolución temporal y espacial más alta para comprender mejor la secuencia de señalización en la migración inducida por ouabaína.

La cinasa FAK modula las adhesiones focales, las uniones adherentes, el reciclaje de los componentes de adhesión en el endosoma, así como la expresión genética de supresores de tumor, p53 y p21, en respuesta al estrés de daño celular (Kleinschmidt y Schlaepfer 2017). La eliminación genética de FAK exhibe una gran cantidad de adhesiones focales, lo que sugiere que la función normal de FAK es debilitar de las uniones focales y adherentes (Sieg *et al.* 2000). El hecho de que la migración inducida por ouabaína requiera de la activación de FAK, coincide con este desensamble dinámico de las uniones de FAK en el complejo proteico de las adhesiones focales y adherentes.

La inhibición de cSrc por el PP2 impidió no solo la aceleración de la migración inducida por ouabaína, sino que disminuyó el promedio la migración basal a un nivel más bajo que el observado en la condición control. Sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente diferente. Esta diferencia podría explicarse por el hecho de que mientras que cSrc es estructural y funcionalmente un componente esencial de las adhesiones focales, también es un residente transitorio pero importante regulador de otras uniones célula-célula (Horton *et al.* 2016; Zaidel-Bar *et al.* 2007; Ebneth 2008; Flores-Maldonado *et al.* 2017). Estos hechos abren la posibilidad de que cSrc ejerza su papel en múltiples lugares de la célula: como un activador trans de la vía de señalización del receptor al EGF y como socio de FAK o como componente transitorio de las uniones célula-célula y célula-sustrato. Es necesario realizar más investigaciones para comprender completamente el papel de la cSrc en la migración inducida por ouabaína.

Posteriormente, propusimos que una consecuencia plausible del tratamiento con ouabaína y la activación de cSrc-ERK1/2, es la secreción y activación de una de las varias MMPs. De acuerdo con esta hipótesis, demostramos que la activación de las MMPs sensibles al G6001 y al iMMP-2, son necesarias para la migración inducida por ouabaína. La actividad gelatinolítica basal de MMP-9 de los medios de las células migratorias es despreciable y el tratamiento con ouabaína no la modifica, lo que indica que esta MMP no desempeña un papel en la inducción de la migración por ouabaína. Teniendo en cuenta las limitaciones técnicas de los zimogramas de gelatina, es difícil atribuir la activación de la MMP-2 a la ouabain. Por esta razón, los datos obtenidos a través de los zimogramas generalmente se interpretan como la "cantidad" en lugar de la "actividad" de las MMPs (Soto-Guzman *et al.* 2010). Sin embargo, nuestros análisis de western blots mostraron niveles significativamente más altos de la forma activa de MMP-2, de 63 KDa. Nuestros datos sugieren fuertemente que la ouabaína induce la síntesis y la secreción de MMP-2, que puede desempeñar un papel importante en la migración celular inducida por ouabaína. Sin embargo, el GM6001 y el iMMP-2 pueden inhibir otras MMP solubles y las MMPs de la familia A de las Desintegrinas y Metaloproteasas (ADAMs, por sus siglas en inglés) (Mifune *et al.* 2005; Reiss y Bhakdi 2017). Por lo tanto, no podemos descartar la posibilidad de la participación de otras MMPs solubles o algún miembro de la familia ADAM, en la aceleración de la migración colectiva de células MDCK, bajo el tratamiento con ouabaína.

El aumento de la secreción de la MMP-2 y otras MMPs, puede cambiar la composición de la MEC y, por lo tanto, acelerar la migración celular colectiva (Vedula *et al.* 2013). Nuestros resultados demuestran que la actividad de al menos una MMP es esencial para este proceso, ya que GM6001 y iMMP-2 bloquearon la migración inducida por ouabaína. Proponemos que la ouabaína puede aumentar la migración por dos mecanismos potenciales: primero, una mayor activación de la MMP podría inducir el procesamiento del precursor del EGF en la membrana plasmática, liberando EGF maduro y activo en los medios, donde se uniría al EGFR y, a su vez, aceleraría la migración. Al respecto, se ha demostrado que el EGF aumenta la producción de MMPs en las células de cáncer de pulmón (Liu *et al.*

2013). Además, otro miembro de la familia del EGF, el HB-EGF, también promueve la migración de las células MDCK (Singh *et al.* 2004). En segundo lugar, la MMP-2 podría modificar directamente el ECM, facilitando el movimiento celular (Visse y Nagase 2003; Vargová *et al.* 2012).

Conclusión

Nuestro estudio demuestra que ouabaína, a una concentración de 10 nM, promueve la secreción de la MMP-2 dependiente de la activación de cSrc-ERK1/2-FAK y quizás alguna otra MMPs, que a su vez, aceleran la reparación de heridas en monocapas de células MDCK (Fig. 18).

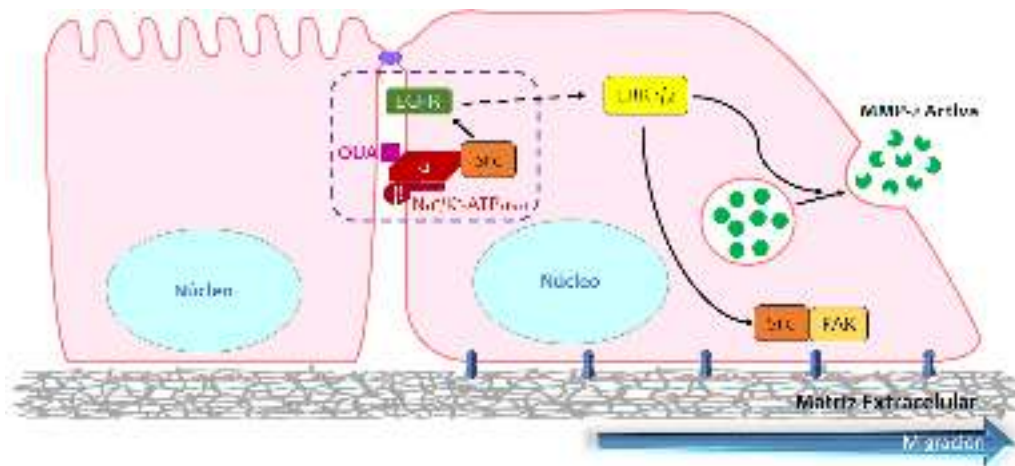


Figura 8. Señalización en la migración celular colectiva inducida por ouabain. La ouabaína induce la incorporación de Na⁺,K⁺-ATPasa en un signalosoma, que incluye al EGFR y cSrc, donde cSrc transactiva el EGFR, que induce la activación de ERK1/2 y FAK. La activación de estas cinasas provoca un aumento en la secreción y activación de la MMP-2 en los medios, necesaria para acelerar la migración celular colectiva de las células MDCK.

Perspectivas

El hecho que la ouabaína sea producida de manera endógena en el organismo, abre posibilidades muy interesantes que merecen ser estudiadas. Por ejemplo:

1. ¿Cuál es el mecanismo por el cual la ouabaína promueve la activación de la MMP-2?
2. ¿La MMP-2 se encuentra interaccionando con proteínas de unión célula-célula para direccionar la migración inducida por ouabaína?
3. ¿Cuál es el complejo de polaridad que dirige la migración inducida por ouabaína?
4. ¿Cuáles otras MMPs participan el proceso de migración inducido por ouabaína?

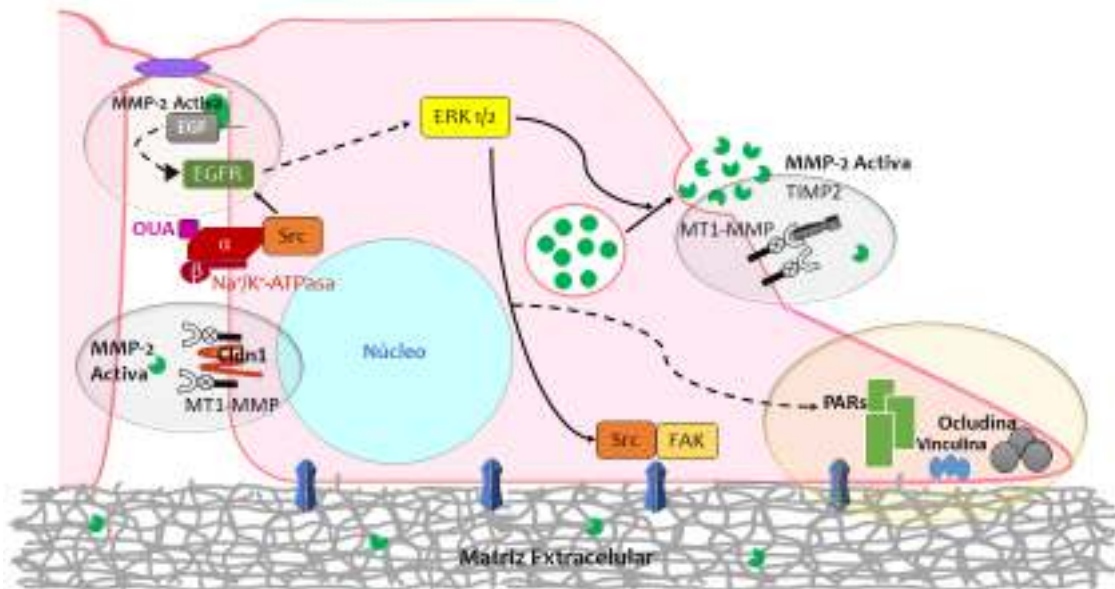


Figura 19. Perspectivas

Bibliografía

- Aizman, Oleg, Per Uhlén, Mark Lal, Hjalmar Brismar, and Anita Aperia. 2001. "Ouabain, a Steroid Hormone That Signals with Slow Calcium Oscillations." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (23): 13420–13424. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=60886&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Akimova, Olga A, Alexandra Grygorczyk, Richard A Bunday, Nathalie Bourcier, Michael Gekle, Paul A Insel, and Sergei N Orlov. 2006. "Transient Activation and Delayed Inhibition of Na⁺,K⁺,Cl⁻ Cotransport in ATP-treated C11-MDCK Cells Involve Distinct P2Y Receptor Subtypes and Signaling Mechanisms." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (42): 31317–31325.
- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. 1995. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* Nov 17;270(46):27489-94.
- Altamirano, Julio, Yanxia Li, Jaime DeSantiago, Valentino Piacentino, Steven R Houser, and Donald M Bers. 2006. "The Inotropic Effect of Cardioactive Glycosides in Ventricular Myocytes Requires Na⁺-Ca²⁺ Exchanger Function." *The Journal of Physiology* 575 (Pt 3): 845–54. doi:10.1113/jphysiol.2006.111252. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1995692&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Antolovic, R, N Bauer, M Mohadjerani, H Kost, H Neu, U Kirch, E G Grünbaum, and W Schoner. 2000. "Endogenous Ouabain and Its Binding Globulin: Effects of Physical Exercise and Study on the Globulin's Tissue Distribution." *Hypertension Research Official Journal of the Japanese Society of Hypertension* 23 Suppl: S93–S98.
- Aperia A, Akkuratov EE, Fontana JM, Brismar H (2016) Na⁺-K⁺-ATPase, a new class of plasma membrane receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 310(7):C491–C495. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00359.2015>.
- Arnaud A (1888) Sur la matière cristallisée active des flèches empoisonnées des çomalis extraite du bois d'ouabaïo. *Compt Rendus* 106:1011–1014.
- Bagrov, Alexei Y, Joseph I Shapiro, and Olga V Fedorova. 2009. "Endogenous Cardiotonic Steroids: Physiology, Pharmacology, and Novel Therapeutic Targets." *Pharmacological Reviews* 61 (1): 9–38. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2763610&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bauer, Natali, Jochen Müller-Ehmsen, Ulrike Krämer, Njde Hambarchian, Carsten Zobel, Robert H G Schwinger, Horst Neu, Ulrike Kirch, Ernst-Günther Grünbaum, and Wilhelm Schoner. 2005. "Ouabain-like Compound Changes Rapidly on Physical Exercise in Humans and Dogs: Effects of Beta-blockade and Angiotensin-converting Enzyme Inhibition." *Hypertension* 45 (5): 1024–1028. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15837822>.
- Béguin, Pascal, Gilles Crambert, Saida Guennoun, Haim Garty, Jean-Daniel Horisberger, and Käthi Geering. 2001. "CHIF, a Member of the FXFD Protein Family, Is a Regulator of Na,K-ATPase

- Distinct from the Γ -subunit." *The The European Molecular Biology Organization Journal* 20 (15): 3993–4002.
- Betanzos, A, P Nava, B E Jaramillo, L Gonz, and Ave Polit. 2003. "Tight Junction Proteins" 81: 1–44.
- Bjerke MA, Dzamba BJ, Wang C, DeSimone DW (2014) FAK is required for tension-dependent organization of collective cell movements in *Xenopus* mesendoderm. *Dev Biol* 394(2):340–356. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.07.023>.
- Blanco, G, and R W Mercer. 1998. "Isozymes of the Na-K-ATPase: Heterogeneity in Structure, Diversity in Function." *American Journal of Physiology* 275 (5 Pt 2): F633–F650. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815123>.
- Bolívar, J J, A Lázaro, S Fernández, E Stefani, V Peña-Cruz, C Lechene, and M Cereijido. 1987. "Rescue of a Wild-type MDCK Cell by a Ouabain-resistant Mutant." *American Journal of Physiology* 253 (1 Pt 1): C151–C161. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3300360.
- Borkakoti, N. 2004. "Matrix Metalloprotease Inhibitors: Design from Structure." *Biochemical Society Transactions* 32 (Pt 1): 17–20. doi:10.1042/. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14748704>.
- Burrige K, Chrzanowska-Wodnicka M (1996) Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12(1):463–518. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.463>.
- Cai, Haiping, Liang Wu, Weikai Qu, Deepak Malhotra, Zijian Xie, Joseph I Shapiro, and Jiang Liu. 2008. "Regulation of Apical NHE3 Trafficking by Ouabain-induced Activation of the Basolateral Na⁺-K⁺-ATPase Receptor Complex." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 294 (2) (February): C555–63. doi:10.1152/ajpcell.00475.2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077602>.
- Carru, Ciriaco, Luca Deiana, Salvatore Sotgia, Giovanni Mario Pes, and Angelo Zinellu. 2004. "Plasma Thiols Redox Status by Laser-induced Fluorescence Capillary Electrophoresis." *Electrophoresis* 25 (6) (March): 882–9. doi:10.1002/elps.200305768. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15004850>.
- Castillo A, Ortuño-Pineda C, Flores-Maldonado C, Larre I, Martínez Rendón J, Hinojosa L, Ponce A, Ogazón A, Serrano M, Valdes J, Contreras RG, Cereijido M. 2019. Ouabain Modulates the Adherens Junction in Renal Epithelial Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2019;52(6):1381-1397. doi: 10.33594/000000097.
- Cereijido, M, R G Contreras, and L Shoshani. 2004. "Cell Adhesion, Polarity, and Epithelia in the Dawn of Metazoans." *Physiological Reviews* 84 (4) (October): 1229–62. doi:10.1152/physrev.00001.2004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15383651>.
- Cereijido, M, R G Contreras, L Shoshani, M R Garc, and D F. 2003. "Membrane Targeting" 81: 81–115.
- Cereijido, M, R G Contreras, L Shoshani, and I Larre. 2012. "The Na⁺-K⁺-ATPase as Self-adhesion Molecule and Hormone Receptor." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 302 (3) (February 1): C473–81. doi:10.1152/ajpcell.00083.2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22049208>.

- Cereijido, M, L Shoshani, and R G Contreras. 2000. "Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions. I. Biogenesis of Tight Junctions and Epithelial Polarity." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 279 (3) (September): G477–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10960345>.
- Cereijido M, Shoshani L, Contreras RG. 2001. "The Polarized Distribution of Na⁺, K⁺-ATPase and Active Transport Across Epithelia." *The Journal of Membrane Biology* 184 (3) (December 1): 299–304. doi:10.1007/s00232-001-0097-y. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11891555>.
- Charras GT, Coughlin M, Mitchison TJ, Mahadevan L. 2008. "Life and times of a cellular bleb". *Biophys. J.* 94 (5): 1836-53. doi:10.1529/biophysj.107.113605. PMC 2242777.
- Charvat S, Chignol M-C, Souchier C, Le Griel C, Schmitt D, Serres M (1998) Cell migration and MMP-9 secretion are increased by epidermal growth factor in HaCa T-Ras transfected cells. *Exp Dermatol* 7(4):184–190. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.1998.tb00322.x>
- Chávez, Enrique, Luis Castro-Sánchez, Mineko Shibayama, Victor Tsutsumi, Eduardo Pérez Salazar, Mario G Moreno, and Pablo Muriel. 2012. "Effects of Acetyl Salicylic Acid and Ibuprofen in Chronic Liver Damage Induced by CCl₄." *Journal of Applied Toxicology: JAT* 32 (1) (January): 51–9. doi:10.1002/jat.1638. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21360558>.
- Conacci-Sorrell, Maralice E, Tamar Ben-Yedidia, Michael Shtutman, Elena Feinstein, Paz Einat, and Avri Ben-Ze'ev. 2002. "Nr-CAM Is a Target Gene of the beta-catenin/LEF-1 Pathway in Melanoma and Colon Cancer and Its Expression Enhances Motility and Confers Tumorigenesis." *Genes & Development* 16 (16): 2058–2072. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12183361.
- Contreras, R G, D Flores-Beni Tez, C Flores-Maldonado, I Larre, L Shoshani, and M Cereijido. 2006. "Na⁺,K⁺-ATPase and Hormone Ouabain:new Roles for an Old Enzyme and an Old Inhibitor." *Cellular and Molecular Biology NoisyleGrand France* 52 (8): 31–40. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17535734.
- Contreras, R G, C Flores-Maldonado, A Lázaro, L Shoshani, D Flores-Benitez, I Larré, and M Cereijido. 2004. "Ouabain Binding to Na⁺,K⁺-ATPase Relaxes Cell Attachment and Sends a Specific Signal (NACos) to the Nucleus." *The Journal of Membrane Biology* 198 (3): 147–158. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15216416>.
- Contreras, R G, A Lázaro, A Mújica, L González-Mariscal, J Valdés, M R García-Villegas, and M Cereijido. 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. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7563030.
- Contreras, R G, L Shoshani, C Flores-Maldonado, A Lázaro, and M Cereijido. 1999. "Relationship Between Na(+),K(+)-ATPase and Cell Attachment." *Journal of Cell Science* 112 (Pt 2): 4223–4232. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10564641.
- Cortes-Reynosa P, Robledo T, Macías-Silva M, Wu S, Salazar E (2008) Src kinase regulates metalloproteinase-9 secretion induced by type IV collagen in MCF-7 human breast cancer cells. *Matrix Biol* 27(3):220–231. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2007.11.003>

- Dmitrieva, R I, A Y Bagrov, E Lalli, P Sassone-Corsi, D M Stocco, and P A Doris. 2000. "Mammalian Bufadienolide Is Synthesized from Cholesterol in the Adrenal Cortex by a Pathway That Is Independent of Cholesterol Side-chain Cleavage." *Hypertension* 36 (3): 442–448. <http://hyper.ahajournals.org/cgi/content/abstract/36/3/442>.
- Doris, P A. 1996. "Endogenous Inhibitors of the Na,K Pump." *Mineral And Electrolyte Metabolism* 22 (5-6): 303–310.
- Doris, P A, A Hayward-Lester, D Bourne, and D M Stocco. 1996. "Ouabain Production by Cultured Adrenal Cells." *Endocrinology* 137 (2): 533–539.
- Du, Dan, Feilai Xu, Lihou Yu, Chenyi Zhang, Xuefeng Lu, Haixin Yuan, Qin Huang, et al. 2010. "The Tight Junction Protein, Occludin, Regulates the Directional Migration of Epithelial Cells." *Developmental Cell* 18 (1) (January 19): 52–63. doi:10.1016/j.devcel.2009.12.008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20152177>.
- Duarte S, Baber J, Fujii T, Coito AJ (2015) Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol* 44–46(May):147– 156. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.004>.
- Dvela, Moran, Haim Rosen, Hagit Cohen Ben-Ami, and David Lichtstein. 2012. "Endogenous Ouabain Regulates Cell Viability." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 302 (2) (January 15): C442–52. doi:10.1152/ajpcell.00336.2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22031604>.
- Ebnet K (2008) Organization of multiprotein complexes at cell– cell junctions. *Histochem Cell Biol* 130(1):1–20. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0418-7>.
- Elkareh J, Kennedy DJ, Yashaswi B, Vetteth S, Shidyak A, Kim EGR, Smaili S et al (2007) Marinobufagenin stimulates fibroblast collagen production and causes fibrosis in experimental uremic cardiomyopathy. *Hypertension* 49(1):215–224. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000252409.36927.05>.
- Ellerbroek, S M, Y I Wu, C M Overall, and M S Stack. 2001. "Functional Interplay Between Type I Collagen and Cell Surface Matrix Metalloproteinase Activity." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (27) (July 6): 24833–42. doi:10.1074/jbc.M005631200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11331272>.
- El-Okdi, Nasser, Sleiman Smaili, Vanamala Raju, Amjad Shidyak, Shalini Gupta, Larisa Fedorova, Jihad Elkareh, et al. 2008. "Effects of Cardiotonic Steroids on Dermal Collagen Synthesis and Wound Healing." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 105 (1) (July): 30–6. doi:10.1152/jappphysiol.00119.2008. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2494826&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Fedorova, Olga V, Igor A Zhuravin, Natalia I Agalakova, Liubov A Yamova, Mark I Talan, Edward G Lakatta, and Alexei Y Bagrov. 2007. "Intrahippocampal Microinjection of an Exquisitely Low Dose of Ouabain Mimics NaCl Loading and Stimulates a Bufadienolide Na/K-ATPase Inhibitor." *Journal of Hypertension* 25 (9): 1834–1844. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17762648>.
- Flores-Maldonado C, Verdejo-Torres O, Campos-Blázquez J, Cabrera AR, García-Hernández V, Rincon-Heredia R, Contreras RG (2017) Lysosomal degradation of junctional proteins. In: *Lysosomes—associated diseases and methods to study their function*. InTech, London. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69370>.

- Furuse, M, K Fujita, T Hiiragi, K Fujimoto, and S Tsukita. 1998. "Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with No Sequence Similarity to Occludin." *The Journal of Cell Biology* 141 (7) (June 29): 1539–50. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2132999&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Furuse, M, K Furuse, H Sasaki, and S Tsukita. 2001. "Conversion of Zonulae Occludentes from Tight to Leaky Strand Type by Introducing Claudin-2 into Madin-Darby Canine Kidney I Cells." *The Journal of Cell Biology* 153 (2) (April 16): 263–72. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2169456&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Furuse, M, T Hirase, M Itoh, a Nagafuchi, S Yonemura, and S Tsukita. 1993. "Occludin: a Novel Integral Membrane Protein Localizing at Tight Junctions." *The Journal of Cell Biology* 123 (6 Pt 2) (December): 1777–88. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2290891&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- García-Hernández V, Flores-Maldonado C, Rincon-Heredia R, Verdejo-Torres O, Bonilla-Delgado J, Meneses-Morales I, Gariglio P, Contreras RG (2015) EGF regulates Claudin-2 and -4 expression through Src and STAT3 in MDCK cells. *J Cell Physiol* 230(1):105–115. <https://doi.org/10.1002/jcp.24687>.
- Giannelli, G, J Falk-Marzillier, O Schiraldi, W G Stetler-Stevenson, and V Quaranta. 1997. "Induction of Cell Migration by Matrix Metalloprotease-2 Cleavage of Laminin-5." *Science* 277 (5323): 225–228. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9211848.
- Gloor S, Antonicek H, Sweadner KJ, Pagliusi S, Frank R, Moos M, Schachner M (1990) The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the beta subunit of the Na,K-ATPase. *J Cell Biol* 110(1):165–174. <https://doi.org/10.1083/jcb.110.1.165>.
- Goldstein I, Lax E, Gispán-Herman I, Ovadia H, Rosen H, Yadid G, Lichtstein D (2012) Neutralization of endogenous digitalis-like compounds alters catecholamines metabolism in the brain and elicits anti-depressive behavior. *Eur Neuropsychopharmacol* 22(1):72–79. <https://doi.org/10.1016/j.euronuro.2011.05.007>.
- Hamlyn JM, Manunta P (2015) Endogenous cardiogenic steroids in kidney failure: a review and an hypothesis. *Adv Chronic Kidney Dis* 22(3):232–244. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2014.12.005>.
- Hamlyn, J M, M P Blaustein, S Bova, D W DuCharme, D W Harris, F Mandel, W R Mathews, and J H Ludens. 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 (July): 6259–6263. <http://www.pnas.org/content/88/14/6259.full.pdf>.
- Hanke, JH; Gardner, JP; Dow, RL; Changelian, PS; Brissette, WH; Weringer, EJ; Pollok, BA; Connelly, PA (1996). "Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation". *The Journal of Biological Chemistry*. 271 (2): 695–701.
- Heidkamp MC, Bayer AL, Kalina JA, Eble DM, Samarel AM (2002) GFP-FRNK disrupts focal adhesions and induces anoikis in neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res* 90(12):1282–1289. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000023201.41774.EA>

- Heussen C, Dowdle EB (1980) Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* 102(1):196–202. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90338-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90338-3).
- Horton ER, Humphries JD, Stutchbury B, Jacquemet G, Ballestrem C, Barry ST, Humphries MJ (2016) Modulation of FAK and Src adhesion signaling occurs independently of adhesion complex composition. *J Cell Biol*. <https://doi.org/10.1083/jcb.201508080>.
- Huber, D. 2000. "Occludin Modulates Transepithelial Migration of Neutrophils." *Journal of Biological Chemistry* 275 (8) (February 25): 5773–5778. doi:10.1074/jbc.275.8.5773. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.275.8.5773>.
- Ikenouchi, Junichi, Hiroyuki Sasaki, Sachiko Tsukita, Mikio Furuse, and Shoichiro Tsukita. 2008. "Loss of Occludin Affects Tricellular Localization of Tricellulin" 19 (November): 4687–4693. doi:10.1091/mbc.E08.
- Kai F, Drain AP, Weaver VM. 2019. The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey. *Dev Cell*. May 6;49(3):332-346. doi: 10.1016/j.devcel.2019.03.026.
- Kaplan JH. 2002. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem*. 71:511-35. Epub 2001 Nov 9.
- Kleinschmidt EG, Schlaepfer DD (2017) Focal adhesion kinase signaling in unexpected places. *Curr Opin Cell Biol* 45(April):24–30. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.01.003>.
- Koefoed-Johnsen, Valborg, and Hans H Ussing. 1958. "The Nature of the Frog Skin Potential." *Acta Physiologica Scandinavica* 42 (3-4): 298–308. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-1716.1958.tb01563.x/abstract>.
- Kometiani, P. 1998. "Multiple Signal Transduction Pathways Link Na⁺/K⁺-ATPase to Growth-related Genes in Cardiac Myocytes. THE ROLES OF Ras AND MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES." *Journal of Biological Chemistry* 273 (24) (June 12): 15249–15256. doi:10.1074/jbc.273.24.15249. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.273.24.15249>.
- Kong, Ling, Lei Sun, Hongxin Zhang, Qin Liu, Ye Liu, Linhua Qin, Guojun Shi, et al. 2009. "An Essential Role for RIG-I in Toll-like Receptor-stimulated Phagocytosis." *Cell Host & Microbe* 6 (2) (August 20): 150–61. doi:10.1016/j.chom.2009.06.008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19683681>.
- Koshman YE, Kim T, Chu M, Engman SJ, Iyengar R, Robia SL, Samarel AM (2010) FRNK inhibition of focal adhesion kinasedependent signaling and migration in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(11):2226–2233. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.21276.1>.
- Kotova, Olga, Lubna Al-Khalili, Sara Talia, Catherine Hooke, Olga V Fedorova, Alexei Y Bagrov, and Alexander V Chibalin. 2006. "Cardiotonic Steroids Stimulate Glycogen Synthesis in Human Skeletal Muscle Cells via a Src- and ERK1/2-dependent Mechanism." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (29): 20085–94. doi:10.1074/jbc.M601577200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16714287>.
- Larre, Isabel, Aida Castillo, Catalina Flores-Maldonado, Ruben G Contreras, Ivan Galvan, Jesus Muñoz-Estrada, and Marcelino Cerejido. 2011. "Ouabain Modulates Ciliogenesis in Epithelial Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108

(51): 20591–6. doi:10.1073/pnas.1102617108.
<http://www.pnas.org/content/108/51/20591.abstract>.

Larre, Isabel, and Marcelino Cerejido. 2010. "Na,K-ATPase Is the Putative Membrane Receptor of Hormone Ouabain." *Communicative Integrative Biology* 3 (6): 625–628. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21331260>.

Larre, Isabel, Arturo Ponce, Rosana Fiorentino, Liora Shoshani, Rubén G Contreras, and Marcelino Cerejido. 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): 10911–10916. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1544148&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Lauffenburger, D a, and a F Horwitz. 1996. "Cell Migration: a Physically Integrated Molecular Process." *Cell* 84 (3) (February 9): 359–69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608589>.

Li, J, Georgiy R , Markus Kruusmägi, Padideh Kamali-Zare, Xiao-Li Liu, Ann-Christine Eklöf, Sergey Zelenin, Hjalmar Brismar, and Anita Aperia. 2010. "Ouabain Protects Against Adverse Developmental Programming of the Kidney." *Nature Communications* 1 (May) (January): 42. doi:10.1038/ncomms1043. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2963829&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Liu, Jiang, Riad Kesiry, Sankaridrug M Periyasamy, Deepak Malhotra, Zijian Xie, and Joseph I Shapiro. 2004. "Ouabain Induces Endocytosis of Plasmalemmal Na/K-ATPase in LLC-PK1 Cells by a Clathrin-dependent Mechanism." *Kidney International* 66 (1) (July): 227–41. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00723.x. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2904182&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Liu J, Tian J, Haas M, Shapiro JI, Askari A, Xie Z (2000) Ouabain interaction with cardiac Na⁺/K⁺-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations. *J Biol Chem* 275(36):27838–27844. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002950200>.

Loubatieres A, Arnaud A.1948. Pouvoirs inotrope positif et chronotrope négatif de l'ouabaïne mis en évidence sur les mouvements automatiques du muscle papillaire du coeur foetal humain. *C R Seances Soc Biol Fil.* Jun; 142(11-12):795-7.

Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z (2011) Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(12):a005058. <https://doi.org/10.1101/cshpe rspec t.a005058>

Mao, Y.; Varoglu, M.; Sherman, D.H. "Molecular characterization and analysis of the biosynthetic cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564." *Chemistry & Biology* **1999**, 6, 251–263

Matsuda M., Kubo A., Furuse M. and Tsukita S. 2004. "A peculiar internalization of claudins, tight junctionspecific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells". *Journal of Cell Science*. November: 117 (7).

McNulty, Amy L, J Brice Weinberg, and Farshid Guilak. 2009. "Inhibition of Matrix Metalloproteinases Enhances in Vitro Repair of the Meniscus." *Clinical Orthopaedics and Related Research* 467 (6) (June): 1557–67. doi:10.1007/s11999-008-0596-6.

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2674160&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Mifune M, Ohtsu H, Suzuki H, Nakashima H, Brailoiu E, Dun NJ, Frank GD. 2005. G protein coupling and second messenger generation are indispensable for metalloprotease-dependent, heparinbinding epidermal growth factor shedding through angiotensin II type-1 receptor. *J Biol Chem* 280(28):26592–26599. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502906200>.
- Mousson A, Sick E, Carl P, Dujardin D, De Mey J, Rondé P. 2018. Targeting Focal Adhesion Kinase Using Inhibitors of Protein-Protein Interactions. *Cancers (Basel)*. 2018 Aug 21;10(9). pii: E278. doi: 10.3390/cancers10090278.
- Mouw, J.K., Ou, G., and Weaver, V.M. (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 771–785.
- Nesher, Maoz, Moran Dvela, Vincent U Igbokwe, Haim Rosen, and David Lichtstein. 2009. “Physiological Roles of Endogenous Ouabain in Normal Rats.” *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 297 (6) (December): H2026–34. doi:10.1152/ajpheart.00734.2009. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19837951>.
- Nishimura, Noriko, Midori Masuda, and Hakuo Takahashi. 1999. “Increases in Plasma Ouabainlike Immunoreactivity During Surgical Extirpation of Pheochromocytoma”: 135–139.
- Ogawa, Haruo, Takehiro Shinoda, Flemming Cornelius, and Chikashi Toyoshima. 2009. “Crystal Structure of the Sodium-potassium Pump (Na⁺,K⁺-ATPase) with Bound Potassium and Ouabain.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (33) (August 18): 13742–7. doi:10.1073/pnas.0907054106. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2728964&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Orlov SN, Thorin-Trescases N, Kotelevtsev SV, Tremblay J, Hamet P (1999) Inversion of the intracellular Na⁺/K⁺ ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of Caspase-3. *J Biol Chem* 274(23):16545–16552. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.23.16545>.
- Oweis, Shadi, Liang Wu, Pawel R Kiela, Hui Zhao, Deepak Malhotra, Fayez K Ghishan, Zijian Xie, Joseph I Shapiro, and Jiang Liu. 2006. “Cardiac Glycoside Downregulates NHE3 Activity and Expression in LLC-PK1 Cells.” *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 290 (5) (May): F997–1008. doi:10.1152/ajprenal.00322.2005. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16352745>.
- Padilla-Benavides, Teresita, María L Roldán, Isabel Larre, David Flores-Benitez, Nicolas Villegas-Sepúlveda, Ruben G Contreras, Marcelino Cerejido, and Liora Shoshani. 2010. “The Polarized Distribution of Na⁺,K⁺-ATPase: Role of the Interaction Between β Subunits.” Edited by Keith E Mostov. *Molecular Biology of the Cell* 21 (13): 2217–2225.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(3):221–233. <https://doi.org/10.1038/nrm2125>.
- Pedersen, Peter L, and Ernesto Carafoli. 1987. “Ion Motive ATPases . I . Obiquity , Properties , and Significance to Cell Function”: 146–150.
- Pilcher, B. K. 1997. “Cell Type-specific Inhibition of Keratinocyte Collagenase-1 Expression by Basic Fibroblast Growth Factor and Keratinocyte Growth Factor. A COMMON RECEPTOR

- PATHWAY." *Journal of Biological Chemistry* 272 (29) (July 18): 18147–18154. doi:10.1074/jbc.272.29.18147. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.272.29.18147>.
- Ponce A, Larre I, Castillo A, García-Villegas R, Romero A, FloresMaldonado C, Martinez-Rendón J, Contreras RG, Cerejido M (2014) Ouabain increases gap junctional communication in epithelial cells. *Cell Physiol Biochem* 34(6):2081–2090. <https://doi.org/10.1159/000366403>.
- Ponce A, Larre I, Castillo A, Flores-Maldonado C, Verdejo-Torres O, Contreras RG, Cerejido M (2016) Ouabain modulates the distribution of connexin 43 in epithelial cells. *Cell Physiol Biochem* 39(4):1329–1338. <https://doi.org/10.1159/000447837>
- Prassas, Ioannis, and Eleftherios P Diamandis. 2008. "Novel Therapeutic Applications of Cardiac Glycosides." *Nature Reviews Drug Discovery* 7 (11): 926–935. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18948999>.
- Reiss K, Bhakdi S (2017) The plasma membrane: penultimate regulator of ADAM Sheddase function. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864(11 Pt B):2082–2087. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.06.006>.
- Rhaleb, Nour-Eddine, Saraswati Pokharel, Umesh C Sharma, Hongmei Peng, Edward Peterson, Pamela Harding, Xiao-Ping Yang, and Oscar a Carretero. 2013. "N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro Inhibits Interleukin-1 β -mediated Matrix Metalloproteinase Activation in Cardiac Fibroblasts." *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* (May 8). doi:10.1007/s00424-013-1262-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23652767>.
- Ra H-J, Parks WC (2007) Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol* 26(8):587–596. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2007.07.001>.
- Rajasekaran SA, Palmer LG, Moon SY, Peralta Soler A, Apodaca GL, Harper JF, Zheng Y, Rajasekaran AK (2001) Na⁺, K-ATPase activity is required for formation of tight junctions, desmosomes, and induction of polarity in epithelial cells. *Mol Biol Cell* 12(12):3717–3732. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.12.3717>.
- Reiss K, Bhakdi S (2017) The plasma membrane: penultimate regulator of ADAM Sheddase function. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864(11 Pt B):2082–2087. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.06.006>.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Gary Borisy J, Parsons T, Horwitz AR (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302(5651):1704–1709. <https://doi.org/10.1126/science.1092053>.
- Rincon-Heredia Ruth, Flores-Benitez David, Flores-Maldonado Catalina, Bonilla-Delgado José, García-Hernández Vicky, Verdejo-Torres Odette M., Castillo Aida M., Larré Isabel, Poot-Hernández Augusto C., Franco Martha, Gariglio Patricio, Reyes José L. and Contreras Rubén G. 2013. "Ouabain Induces Endocytosis and Degradation of Tight Junction Proteins through ERK1/2-dependent Pathways." *Experimental Cell Research*.
- Roelle, S. et al. (2003) Matrix metalloproteinases 2 and 9 mediate epidermal growth factor receptor transactivation by gonadotropinreleasing hormone. *J. Biol. Chem.* 278, 47307–47318.
- Rossi B, Ponzio G, Lazdunski M (1982) Identification of the segment of the catalytic subunit of (Na⁺, K⁺)ATPase containing the digitalis binding site. *EMBO J* 1(7):859–861.

- Saitou, M, M Furuse, H Sasaki, J D Schulzke, M Fromm, H Takano, T Noda, and S Tsukita. 2000. "Complex Phenotype of Mice Lacking Occludin, a Component of Tight Junction Strands." *Molecular Biology of the Cell* 11 (12) (December): 4131–42.
- Santiskulvong C, Rozengurt E. 2003. "Galardin (GM 6001), a broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor, blocks bombesin- and LPA-induced EGF receptor transactivation and DNA synthesis in rat-1 cells". *Exp. Cell Res.* **290** (2): 437–46. doi:10.1016/S0014-4827(03)00355-0.
- Sawaya, R, Y Go, a P Kyritsis, J Uhm, B Venkaiah, S Mohanam, Z L Gokaslan, and J S Rao. 1998. "Elevated Levels of Mr 92,000 Type IV Collagenase During Tumor Growth in Vivo." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 251 (2) (October 20): 632–6. doi:10.1006/bbrc.1998.9466. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792825>.
- Scarpa E, Mayor R (2016) Collective cell migration in development. *J Cell Biol* 212(2):143–155. <https://doi.org/10.1083/jcb.201508047>.
- Schatzmann HJ (1953) Cardiac glycosides as inhibitors of active potassium and sodium transport by erythrocyte membrane. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 11(4):346–354.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9(7):671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schoner, Wilhelm. 2002. "Endogenous Cardiac Glycosides, a New Class of Steroid Hormones." *The Federation of European Biochemical Societies Journal* 269 (10): 2440–2448. <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1033.2002.02911.x>.
- Shin, Kunyoo, Vanessa C Fogg, and Ben Margolis. 2006. "Tight Junctions and Cell Polarity." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22 (January): 207–35. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104219. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16771626>.
- Shin, Kunyoo, Qian Wang, and Ben Margolis. 2007. "PATJ Regulates Directional Migration of Mammalian Epithelial Cells." *EMBO Reports* 8 (2) (February): 158–64. doi:10.1038/sj.embor.7400890. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1796763&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Shoshani, Liora, Rubén G Contreras, María L Roldán, Jacqueline Moreno, Amparo Lázaro, María S Balda, Karl Matter, and Marcelino Cereijido. 2005. "The Polarized Expression of Na⁺,K⁺-ATPase in Epithelia Depends on the Association Between Beta-subunits Located in Neighboring Cells." *Molecular Biology of the Cell* 16 (March): 1071–1081. doi:10.1091/mbc.E04. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=551474&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD (2000) FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2(5):249–256. <https://doi.org/10.1038/35010517>.
- Simon, D. B. 1999. "Paracellin-1, a Renal Tight Junction Protein Required for Paracellular Mg²⁺ Resorption." *Science* 285 (5424) (July 2): 103–106. doi:10.1126/science.285.5424.103. <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.285.5424.103>.

- Singh, Nripen, Kara Pizzelli, Jonathan K Romero, James Chrostowski, Greg Evangelist, James Hamzik, Neil Soice, and K S Cheng. 2013. "Clarification of Recombinant Proteins from High Cell Density Mammalian Cell Culture Systems Using New Improved Depth Filters." *Biotechnology and Bioengineering* 110 (7) (July): 1964–72. doi:10.1002/bit.24848. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23334838>.
- Singh AB, Tsukada T, Zent R, Harris RC (2004) Membrane-associated HB-EGF modulates HGF-induced cellular responses in MDCK cells. *J Cell Sci* 117(Pt 8):1365–1379. <https://doi.org/10.1242/jcs.01037>.
- Skou, J C. 1957. "The Influence of Some Cations on an Adenosine Triphosphatase from Peripheral Nerves." *Biochimica et Biophysica Acta* 23 (2): 394–401. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13412736>.
- Soto-Guzman A, Navarro-Tito N, Castro-Sanchez L, Martinez-Orozco R, Salazar EP (2010) Oleic acid promotes MMP-9 secretion and invasion in breast cancer cells. *Clin Exp Metas* 27(7):505–515. <https://doi.org/10.1007/s10585-010-9340-1>.
- Staehein, L a. 1973. "Further Observations on the Fine Structure of Freeze-cleaved Tight Junctions." *Journal of Cell Science* 13 (3) (November): 763–86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4203962>.
- Stebbing, J, A Filipović, and G Giamas. 2013. "Claudin-1 as a Promoter of EMT in Hepatocellular Carcinoma." *Oncogene*. doi:10.1038/onc.2012.591. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23318416>.
- Sternlicht, Mark D, and Zena Werb. 2001. "How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behaviour." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17: 463–516.
- Steroids, Endogenous Cardiogenic. 2010. "NIH Public Access" 1802 (12): 1230–1236. doi:10.1016/j.bbdis.2010.03.011. ENDOGENOUS.
- Sukita, S Hoichiro T. 1999. "Claudin Multigene Family Encoding Four-transmembrane Domain" 96 (January): 511–516.
- Terauchi, R, and N Kitamura. 2000. "Requirement of Regulated Activation of Ras for Response of MDCK Cells to Hepatocyte Growth Factor/scatter Factor." *Experimental Cell Research* 256 (2) (May 1): 411–22. doi:10.1006/excr.2000.4850. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10772814>.
- Tian, Jiang, Ting Cai, Zhaokan Yuan, Haojie Wang, Lijun Liu, Michael Haas, Elena Maksimova, Xinyun Huang, and Zi-Jian Xie. 2006. "Binding of Src to Na⁺/K⁺-ATPase Forms a Functional Signaling Complex." Edited by Guido Guidotti. *Molecular Biology of the Cell* 17 (1): 317–326. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16267270>.
- Tokhtaeva E, Sachs G, Sun H, Dada LA, Sznajder JI, Vagin O (2012) Identification of the amino Acid region involved in the intercellular interaction between the B1 subunits of Na⁺/K⁺-ATPase. *J Cell Sci* 125(Pt 6):1605–1616. <https://doi.org/10.1242/jcs.10014> 9.
- Tokhtaeva E, Sun H, Deiss-Yehiely N, Wen Y, Soni PN, Gabrielli NM, Marcus EA et al (2016) The O-glycosylated ectodomain of FXD5 impairs adhesion by disrupting cell–cell trans-dimerization of Na⁺, K⁺-ATPase B 1 subunits. *J Cell Sci* 129(12):2394–2406. <https://doi.org/10.1242/jcs.18614> 8.

- Torre C, and Steven J Wang. 2010. "NIH Public Access" 136 (5): 493–501. doi:10.1001/archoto.2010.25.Reduction.
- Tsukita, S, M Furuse, and M Itoh. 1999. "Structural and Signalling Molecules Come Together at Tight Junctions." *Current Opinion in Cell Biology* 11 (5): 628–633. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.biomednet.com/article/cbb503>.
- Tymiak AA, Norman JA, Bolgar M, DiDonato GC, Lee H, Parker WL, Lo LC, Berova N, Nakanishi K, Haber E (1993) Physicochemical characterization of a ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(17):8189–8193. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.8189>.
- Vagin O, Tokhtaeva E, Sachs G (2006) The role of the B1 subunit of the Na, K-ATPase and its glycosylation in cell–cell adhesion. *J Biol Chem* 281(51):39573–39587. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606507200>.
- Vargová V, Pytliak M, Mechírová V (2012) Matrix metalloproteinases. In: Gupta SP (ed) *Matrix metalloproteinase inhibitors*, vol 103. *Experientia Supplementum*. Springer Basel, Basel, pp 1–33. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0364-9_1.
- Vasioukhin, V, C Bauer, M Yin, and E Fuchs. 2000. "Directed Actin Polymerization Is the Driving Force for Epithelial Cell-cell Adhesion." *Cell* 100 (2) (January 21): 209–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10660044>.
- Vedula SR, Ravasio A, Lim CT, Ladoux B (2013) Collective cell migration: a mechanistic perspective. *Physiology (Bethesda)* 28(6):370–379. <https://doi.org/10.1152/physiol.00033.2013>.
- Vilchis-Nestor CA, Roldán ML, Leonardi A, Navea JG, Padilla-Benavides T, Shoshani L. 2019. Ouabain Enhances Cell-Cell Adhesion Mediated by β_1 Subunits of the Na⁺,K⁺-ATPase in CHO Fibroblasts. *Int J Mol Sci*. Apr 29;20(9). pii: E2111. doi: 10.3390/ijms20092111.
- Visse, Robert, and Hideaki Nagase. 2003. "Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry." *Circulation Research* 92 (8) (May 2): 827–39. doi:10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730128>.
- Wang H, Haas M, Liang M, Cai T, Tian J, Li S, Xie Z (2004) Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biol Chem* 279(17):17250–17259. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313239200>.
- Whittaker, Mark, and Andrew Ayscough. 1988. "Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors – Current Status and Future Challenges" 17 (1): 3–12.
- Xie, Z. 1999. "Intracellular Reactive Oxygen Species Mediate the Linkage of Na⁺/K⁺-ATPase to Hypertrophy and Its Marker Genes in Cardiac Myocytes." *Journal of Biological Chemistry* 274 (27) (July 2): 19323–19328. doi:10.1074/jbc.274.27.19323. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.274.27.19323>.
- Yamada K, Goto A, Nagoshi H, Terano Y, Omata M (1997) Elevation of ouabainlike compound levels with hypertonic sodium chloride load in rat plasma and tissues. *Hypertension* 30(1 Pt 1):94–98. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.30.1.94>.

- Ye, Qiqi, Fangfang Lai, Moumita Banerjee, Qiming Duan, Zhichuan Li, Shuyi Si, and Zijian Xie. 2013. "Expression of Mutant A1 Na/K-ATPase Defective in Conformational Transition Attenuates Src-mediated Signal Transduction." *The Journal of Biological Chemistry* 28 (8) (February 22): 5803–14. doi:10.1074/jbc.M112.442608. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23288841>.
- Yuan, Zhaokan, Ting Cai, Jiang Tian, Alexander V Ivanov, David R Giovannucci, and Zijian Xie. 2005. "Na / K-ATPase Tethers Phospholipase C and IP3 Receptor into a Calcium-regulatory Complex" 16 (September): 4034–4045. doi:10.1091/mbc.E05.
- Zaidel-Bar R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, Iyengar R, Geiger B (2007) Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol* 9(8):858–867. https://doi.org/10.1038/ncb08_07-858.
- Zhang, M, J J Wang, and Y J Chen. 2006. "Effects of Mechanical Pressure on Intracellular Calcium Release Channel and Cytoskeletal Structure in Rabbit Mandibular Condylar Chondrocytes." *Life Sciences* 78 (21) (April 18): 2480–7. doi:10.1016/j.lfs.2005.10.043. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16325208>.