Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

"La ouabaína estimula la Comunicación Intercelular Mediada por Uniones Comunicantes en Células Cancerosas"

TESIS

Que presenta

M. en C. Mauricio Serrano Rubí

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en la Especialidad de Fisiología Celular y Molecular

Directores de la tesis

Dr. Arturo Ponce Balderas y

Dr. Marcelino Cereijido Mattioli

México, Ciudad de México Octubre, 2021

Dedicatorias

Dedicada a todas las personas que me han apoyado a lo largo de mi camino en la vida, no solo en esta etapa académica sino las que estuvieron ahí para brindarme su apoyo en todos los aspectos, no los nombro uno por uno, porque la lista es larga, he tenido la suerte de toparme con la buena gente de este mundo.

A Poe, no a Edgar, sino a mi perro, porque gracias a él he aprendido el arte la paciencia, porque me ayudo salir del hoyo de depresión en el que estaba sumergido y ha trabajado conmigo no solo cuando se acuesta a mi lado a oírme teclear sino también en mi hobbie de enseñar a otros perros a que se parezcan a él.

A Lucero, mi amiga y compañera que ha creído en mí y en todos mis proyectos, que nuestra empresa crezca hasta donde nos imaginamos, un “Lambo” te espera a medio camino

Agradecimientos

Deseo expresar mi gratitud a toda la gente que ha aportado a mi formación académica…

Agradecimientos especiales a las Dras. Lorena Hinojosa y Aida, quienes me han enseñado pacientemente todas las técnicas de laboratorio que aprendí y que gracias a que las aprendí de una manera tan rigurosa y limpia, en un corto periodo de tiempo ya he tenido trabajos relacionados al cultivo celular y a los ensayos PCR, a ellas mi total respeto, y pueden contar conmigo siempre.

A mis compañeros de laboratorio: Dr. Alejandro, Dra. Jaqueline y Eduardo, quienes a su modo me aconsejaron y brindaron su apoyo siempre que lo necesité, gracias por los buenos ratos que hicieron el trabajo del laboratorio mucho menos pesado.

Al Dr. Ponce, cuya asesoría fue imprescindible para la elaboración de este proyecto y tesis, siempre voy a admirar la capacidad para sacarle jugo sustancialmente a los datos, lucharé por aprender esa capacidad, si bien el tiempo en el laboratorio no fue suficiente, lo seguiré de cerca para seguirme sorprendiendo de su habilidad.

A Pirincho, el Dr. Marcelino Cereijido, porque gracias a él pude saber que uno puede vivir haciendo lo que ama, ha sido y seguirá siendo por siempre mi modelo a seguir en el camino de la ciencia. “La nuca de Cereijido” próximamente…

Este Trabajo fue realizado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con una beca de doctorado para Mauricio Serrano Rubí y con recursos del donativo 285263, del fondo sectorial para apoyo a la investigación, otorgado al Dr. Marcelino Cereijido Mattioli.

Prologo

Si has llegado hasta esta tesis, lo más seguro es que hayas dado con ella mientras buscabas incrementar tus conocimientos acerca del cáncer, la comunicación celular o porque simplemente sigues de cerca el trabajo del equipo del Dr. Marcelino Cereijido y el Dr Arturo Ponce. Cualquiera que sea el caso es necesario hacer un recuento de antecedentes, para saber cómo, en nuestro laboratorio, comenzó el interés por relacionar los efectos de la ouabaína con un potencial agente anticancerígeno y qué tiene que ver la comunicación celular con todo este asunto.

Indice

Agradecimientos 3
Prologo 4
RESUMEN 7
ABSTRACT 8
INTRODUCCION 9
ANTECEDENTES 12
A.1 Glicósidos Cardiacos 12
A.2 La Ouabaína. 14
A.3 Comunicación intercelular mediada por unionescomunicantes (gap junctions) 17
A.4 Na^+/K^+-ATPasa 18
A.5 La ouabaína como hormona. 20
A.6 Efecto de ouabaína en la fisiologia epitelial. 22
A.6.1 Ouabaína incrementa la hermeticidad causada por las unionesestrechas (TJ). 23
A.6.2 Ouabaína acelera la ciliogenesis 24
A.6.3 Ouabaína modula las uniones adherentes 25
A.6.4 Ouabaína incrementa la comunicación intercelular mediada poruniones comunicantes. 26
A.7 El cáncer. 28
A.7.1 Proliferación sostenida. 29
A.7.2 Evasión de supresores del crecimiento 29
A.7.3 Resistencia a la apoptosis 30
A.7.4 Activación de la inmortalidad replicativa. 30
A.7.5 Inducción de la angiogénesis 30
A.7.6 Activación del proceso de invasión y metástasis 31
A.7.7 Inestabilidad genómica 32
A.7.8 Inflamación 33
A.7.8 Reprogramación del metabolismo energético 34
A.7.9 Evasión del sistema inmune: 35
A.8 El cáncer y la CIMUC 36
A.9 Antecedentes de mi trabajo de maestría 39
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 41
OBJETIVOS 42
Objetivo General 42
Objetivos particulares: 42
HIPOTESIS 43

MATERIALES Y METODOS 44
MM.1. Cultivo celular 44
MM.2 Medición de la comunicación intercelular de unión gap mediante ensayos de transferencia de colorante (amarillo lucifer) 45
MM.3. Productos químicos 46
MM.4. Análisis estadístico 46
RESULTADOS 48
R.1 Efecto de ouabaína en la CIMUC de células derivadas decáncer cervicouterino. 49
R.2 Efecto de ouabaína en la CIMUC de células derivadas decáncer mamario. 54
R.3 Efecto de ouabaína en la CIMUC de células derivadas decáncer de pulmón 57
R.4 Efecto de ouabaína en la CIMUC de células derivadas decáncer de colon. 57
R.5 Efecto de ouabaína en la CIMUC de células derivadas decáncer de próstata. 60
R.6. Octanol suprime el aumento de CIMUC inducido porouabaína. 63
R.7. No se requiere síntesis de nuevas unidades de proteínas oARNm para que la ouabaína induzca el incremento de CIMUC. 66
R.8. Participación de c-Src,ERK1/2 y Rho-ROCK en las vías de señalización involucradas en el incremento de CIMUC inducidopor ouabaína. 70
DISCUSIÓN 74
CONCLUSIONES 80
PERSPECTIVAS DE TRABAJO 81
BIBLIOGRAFÍA 83
APENDICE 92

RESUMEN

Las uniones comunicantes (en inglés gap junctions) son estructuras moleculares que permiten la comunicación entre células vecinas. Se ha mostrado que la Comunicación Intercelular, Mediada por Uniones Comunicantes (CIMUC) está notoriamente reducida en las células cancerosas comparadas a sus contrapartes normales. Se ha observado que ouabaína, una sustancia derivada de la planta, ampliamente conocida por sus propiedades terapéuticas en el corazón, influye de diversas maneras en varios tipos de cáncer, aunque su mecanismo de acción aún no se entiende completamente. Puesto que, en estudios previos se ha demostrado que ouabaína aumenta CIMUC en las células epiteliales (MDCK), el propósito de este trabajo fue investigar si esta substancia influye en la CIMUC en células derivadas de distintos tipos de cáncer, incluyendo cervicouterino (CasKi, SiHa y Hela), mamario (MDA-MB-321 y MCF7), pulmón (A549), colon (SW480) y páncreas (HPAF-II). Para ello, se realizaron ensayos de transferencia de colorantes para medir y comparar CIMUC en células en monocapas maduras, con y sin tratamiento con ouabaína (0,1, 1, 10, 50 y 500 nM). Los resultados muestran que ouabaína induce un incremento estadístico significativo de CIMUC en todas estas variedades de células del cáncer, aunque con distinta sensibilidad. Además, mostramos que la síntesis de nuevos nucleótidos o subunidades de proteínas no es necesaria, y que los mecanismos de señalización responsables de esta respuesta incluyen Csrc, ErK1/2 y ROCK-Rho. Estos resultados pueden contribuir a explicar cómo la ouabaína influye en el cáncer.

ABSTRACT

Gap junctions are molecular structures that allow communication between neighboring cells. It has been shown that gap junctional intercellular communication (CIMUC) is notoriously reduced in cancer cells compared to their normal counterparts. Ouabain, a plant derived substance, widely known for its therapeutic properties on the heart, has been shown to play a role in several types of cancer, although its mechanism of action is not yet fully understood. Since we have previously shown that ouabain enhances CIMUC in epithelial cells (MDCK), here we probed whether ouabain affects CIMUC in a variety of cancer cell lines, including cervico-uterine (CasKi, SiHa and Hela), breast (MDA-MB-321 and MCF7), lung (A549), colon (SW480) and pancreas (HPAF-II). For this purpose, we made dye transfer assays to measure and compare CIMUC in monolayers of cells with and without treatment with ouabain (0.1, 1, 10, 50 and 500 nM). We found that ouabain induces a statistically significant enhancement of CIMUC in all of these cancer cell lines, albeit with distinct sensitivity. Additionally, we show that synthesis of new nucleotides or protein subunits is not required, and that Csrc, ErK1/2 and ROCK-Rho mediate the signaling mechanisms. These results may contribute to explaining how ouabain influences cancer.

INTRODUCCION

La ouabaína es un compuesto de notable interés que, debido a sus propiedades químicas, ha sido útil para los seres humanos durante mucho tiempo; inicialmente para fines de caza y guerra y más tarde como medicina para tratar la hipotensión y las arritmias cardíacas. La ouabaína es un glucósido cardíaco, producido como metabolito secundario por las especies vegetales *Acokanthera schimperi* y *Strophanthus gratus,* ambas nativas del este de África (Hollman,1985). Esta substancia induce un efecto inotrópico positivo sobre el corazón debido a que inhibe la Na^+/K^+ ATPasa de los cardiomiocitos, lo que lleva a un aumento del sodio intracelular, que a su vez reduce la actividad del intercambiador sodio-calcio (NCX), que aporta una mayor concentración intracelular de calcio. Este efecto, a nivel tisular resulta en un incremento en la fuerza de contracción del corazón.

Por este motivo, la ouabaína fue utilizada como cardiotónico por varias décadas, aunque este uso está actualmente descontinuado, debido a su índice terapéutico estrecho (Haustein, 1984). Sin embargo, dos hechos han vuelto a despertar interés en esta sustancia: En primer lugar, se ha descrito que la ouabaína se expresa endógenamente en algunas especies de mamíferos, incluidos los humanos, lo cual ha llevado a considerarla actualmente como una hormona (Hamlyn et al., 1998; Schoner et al., 2003; Bagrov et al., 2009; Hamlyn 2014), y en segundo lugar, que a la Na^+/K^+ -ATPasa se le ha atribuido un nuevo papel, como el receptor que transduce la unión de la ouabaína para desencadenar una o más cascadas de señalización, lo que lleva a modificaciones genéticas y funcionales de varios procesos celulares (Li et al., 2009; Xie,2003). Además del efecto bien conocido de ouabaína sobre el sistema cardiovascular y el control de la presión arterial, recientes hallazgos han revelado nuevos papeles en aspectos celulares fundamentales, tales como proliferación, apoptosis, adherencia de célula, diferenciación, migración (Contreras et al., 2006; Aperia 2006). Estos hallazgos habían llevado a considerar el ouabaína como agente terapéutico nuevo prometedor para luchar contra el cáncer (Al Ghoul y Valdes, 2008; Newman et al., 2008).

Las uniones comunicantes (o gap junctions) son estructuras moleculares, que consisten en grupos de canales co-expresados entre dos células vecinas, lo que les permite intercambiar iones y moléculas pequeñas. Un canal de unión gap consiste en dos hemicanales (conexones), uno aportado por cada célula. A su vez, cada conexión está constituida por seis subunidades de conexina (Willecke et al., 2002; Saez et al., 2003). A partir del trabajo pionero de Loewenstein y Kanno que describe que las células hepáticas cancerosas tienen una Comunicación Intercelular, Mediada por Uniones Comunicantes (CIMUC) reducida (Loewenstein y Kanno, 1966,1967), se han acumulado pruebas experimentales que demuestran una relación entre CIMUC o la expresión de conexinas y propiedades relacionadas con el cáncer. Por un lado, se ha descrito que la disminución de la expresión de conexinas y la pérdida de CIMUC está, en muchos casos asociada con la aparición y progresión del cáncer (Aasen et al., 2017; Leithe et al., 2017) y, a la inversa, que la re-expresión de las conexinas en las células cancerosas normaliza el control del crecimiento celular y reduce el crecimiento tumoral (Kandouz y Batist, 2010)~~;~~ .Pero por otro lado, varios reportes muestran que la reexpresión de las conexinas y el CIMUC intenso están asociados con un alto potencial invasivo y la capacidad metastásica de las células cancerosas (Czyz,2007;Naus y Laird,2010;Defamie et al,2014). El grupo de trabajo en el que desarrolle mi proyecto había demostrado, antes de mi participación, que la ouabaína, en un rango nanomolar de concentración, influye en varias propiedades de las células epiteliales que incluyen las uniones estrechas, uniones adherentes y ciliogénesis (Larre et al., 2010,2011; Castillo et al., 2019). Además, mediante ensayos de transferencia de colorante, así como mediciones de capacitancia, demostraron que ouabaína incrementa la CIMUC después de pocos minutos de tratamiento, con una respuesta máxima después de una hora (Ponce et al., 2014). También demostraron que: (1) Las Conexinas 32 y 43 están involucradas en esta respuesta; (2) No se requiere síntesis de nuevas subunidades de conexina dentro de una hora de tratamiento, sino una reubicación de las subunidades de conexina previamente sintetizadas y (3) que la Na(+) /K(+)-ATPasa es el receptor primario que media una cascada de señalización en la que participan c-Src y ERK1/2 (Ponce et al., 2016). Estos resultados llevaron a

investigar, en este trabajo, si la ouabaína influye en la CIMUC de células cancerosas. Para ello, se seleccionaron varias líneas celulares cancerosas derivadas de distinto origen, incluyendo cervicouterino (CaSki, SiHa y HeLa), mamario (MCF7, MDA-MB-231), pulmón (A549), colon (SW480) y páncreas (HPAF-II). En cada uno de estos tipos de células se realizaron ensayos de transferencia de colorante, para medir y comparar CIMUC a varias concentraciones de ouabaína en el rango nanomolar.

ANTECEDENTES

A.1 Glicósidos Cardiacos

Los glicósidos cardiacos, también llamados compuestos digitálicos, son un grupo de cientos de substancias que tienen similitud en sus propiedades químicas, así como en el efecto que producen en los mamíferos, más notablemente sobre tejido cardiaco. Algunos de los más conocidos son ouabaína, digoxina, digitoxina, bufalina, marinobufagenina, proscilaridina. Dichos compuestos, que se expresan como metabolitos secundarios en diversas especies vegetales y en algunos animales tienen, como propiedad química más notable, la presencia de ciclopentanoperhidrofenantreno (también llamado esterano) un hidrocarburo policíclico que también es la base estructural de la que derivan los esteroides, como el colesterol y sus derivados, como la progesterona, la aldosterona, el cortisol y la testosterona. Los compuestos digitálicos se clasifican a su vez en cardenólidos y bufadienólidos, originalmente encontrados en la piel de sapo (p. ej. bufalina). Ambos comparten un núcleo esteroideo (colesterol), sin embargo, los cardenólidos tienen un anillo lactónico pentamérico, mientras que en los bufadienolidos este anillo lactónico es hexamérico. Los bufadienólidos fueron identificados por primera vez en el sapo cuyo nombre científico en *bufo bufo* y de ahí proviene su nombre (Alonso-Álvarez, 2012). Los cardenólidos se producen como metabolitos secundarios en algunas especies vegetales. La función biológica de los glicósidos cardiácos, tanto en los sapos como en las plantas, es proteger al organismo en contra de la depredación por parte de carnívoros y animales forrajeros respectivamente, ya que estos compuestos químicos en altas concentraciones son tóxicos (figura 1). (Alonso-Álvarez, 2012).

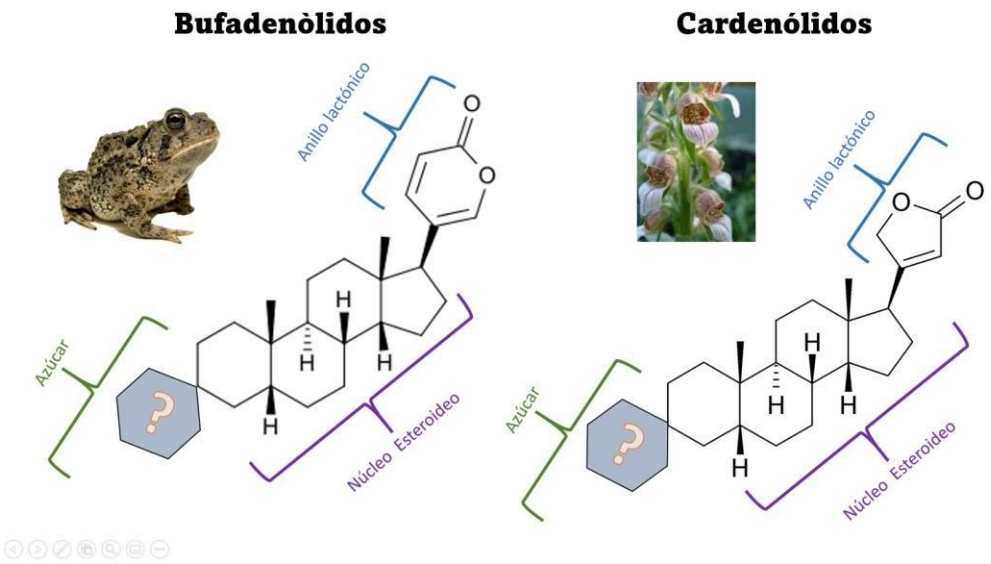


Figura 1 Glicósidos cardiacos. La figura muestra la estructura química de los dos grupos de glicósidos cardiacos

Los glucósidos cardiacos, precisamente reciben ese nombre ya que se han utilizado principalmente para incrementar la fuerza y velocidad de las contracciones del miocardio, esto se da debido a un efecto ionotrópico positivo en el que debido al bloqueo de la Na/K-Atpasa, cambia la función del intercambiador de sodio/calcio. Los efectos tonificantes de los glucósidos cardiacos funcionan tanto en células sanas como enfermas; el incremento en la fuerza de las contracciones provoca un mejor vaciado sistólico y disminuye la magnitud diastólica. (Manunta et al.,2004).

Con el uso de glicósidos cardiacos decrece la presión venosa y la presión final diastólica disminuye. Estos compuestos también producen disminución refleja de resistencia periférica en pacientes con fallo cardiaco, Este efecto es compensador directo de la vasoconstricción, por lo que el uso de glicósidos cardiacos se recomienda en la insuficiencia sistólica pero no en la diastólica. (Manunta et al., 2018).

Los glicósidos cardiacos, entre los que figura la ouabaína, inhiben la Na/K-Atpasa, que es un componente fundamental en todas la células, su función normal es la de mantener el gradiente electroquímico de los iones de de Na/K, sacando de la célula 3 iones de sodio e ingresando al interior celular 2 de potasio a costa de energía (ATP). Cuando un glicósido cardiaco inhibe las funciones de la Na/K-Atpasa, incrementa la concentración intracelular de Sodio, afectando así al intercambiador de Na/Ca++ que normalmente saca Calcio de l célula e ingresa sodio, el calcio acumulado es recuperado por el retículo sarcoplásmico, que a la llegada de un potencial de membrana, libera calcio al citoplasma en concentraciones más elevadas de las normales ocasionando una contracción más sostenida de las bandas de actina/miosina. (Manunta et al., 2018).

A.2 La Ouabaína.

La ouabaína es uno de los glicósidos cardiacos más conocidos. Su nombre proviene del idioma somalí waabaayo que significa “veneno en flecha”. El ser humano aprendió acerca de las propiedades de plantas que, hoy se sabe, producen ouabaína como metabolito secundario, pues observaron que animales forrajeros que las consumían morían envenenados. Fue así como las tribus Hadza y Sam del sureste de África, los Penan de Borneo, hasta algunas de la Amazonia como los Shuar y los Ureu-wau-wau (Figura 2 CyD), utilizaron macerados de plantas de los géneros Acokanthera , Nerium, Asclepias, Strophanthus, Apocynaceae y Digitalis. (Figura 2 B), para envenenar los dardos y flechas con propósitos de cacería o bélicos.

El primer acercamiento del uso terapéutico de los glicósidos cardiacos como cardiotónico lo hizo el medico inglés William Whitering (Figura 2E), quien realizó estudios formales de los efectos de infusiones de una planta conocida como “fox glove” (Digitalis Pupurea), para tratar la enfermedad de “dropsy”, también conocida

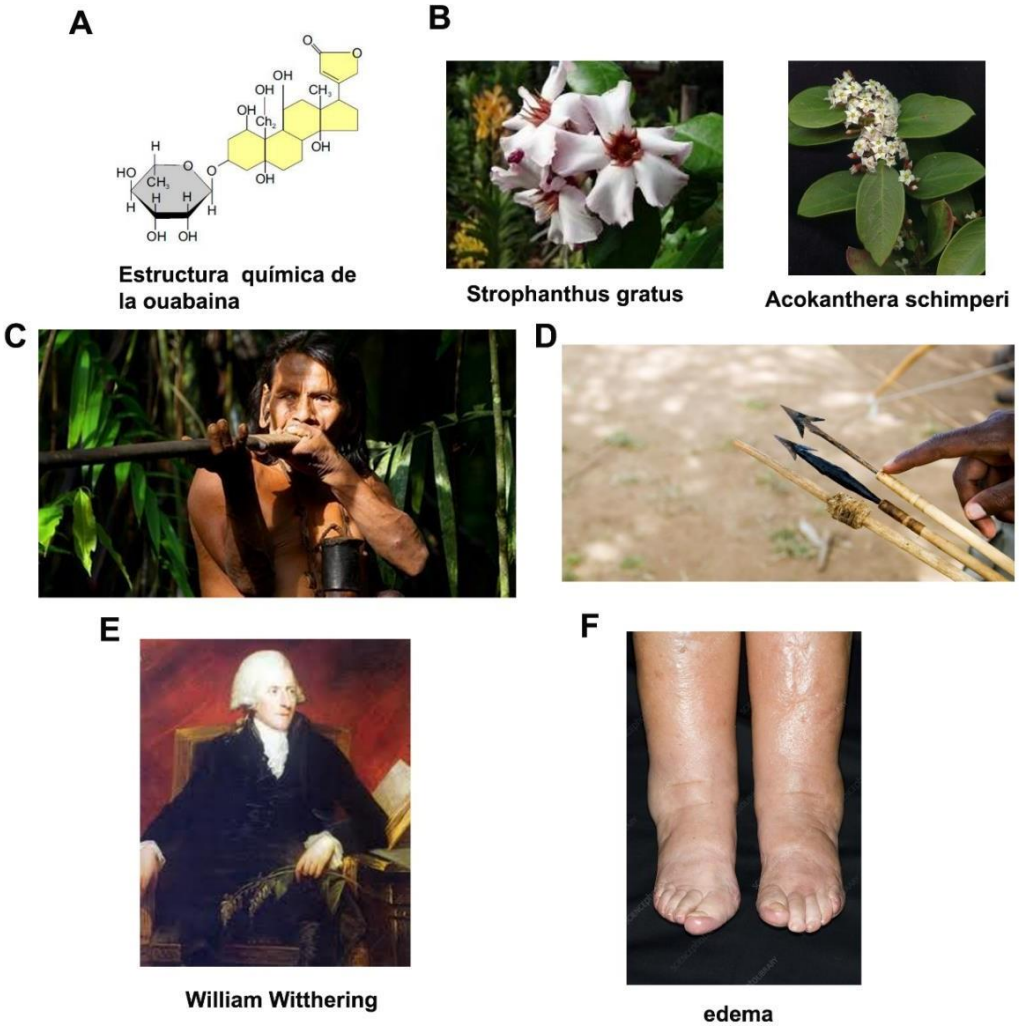


Figura 2. Ouabaína. (A) estructura química de la ouabaína (B) imágenes de las especies vegetales de las que se extrae ouabaína (C y D) ilustraciones del uso empírico de ouabaína. (E) Imagen de William Witthering. (D) Imagen que muestra el efecto quye causa el edema en las extremidades inferiores.

como edema maligno, teniendo bastante éxito, ya que sus pacientes tratados presentaron disminución de la hinchazón de las extremidades, así como mejorías en el estado general de la salud (Larre et al. 2014). Hoy en día se sabe que este padecimiento no es el problema en sí, sino que se es ocasionado por un fallo en el corazón y hoy en día se conoce como insuficiencia cardíaca congestiva (Figura 2F). Esta enfermedad es causa de un defecto en el cierre de la válvula tricúspide del corazón, lo cual provoca que no cierre adecuadamente durante la diástole

ventricular y la sangre retorne a las venas y capilares , provocando que el espacio intersticial se llene de líquido. (Roca-Jácome, 2004). Como consecuencia de esta falla, se genera hipoxia en muchos tejidos, por lo que se generan señales de supervivencia que son captadas por el corazón y le generan hipertrofia para compensar la disfuncionalidad causada por este defecto en el sellado de la válcula tricúspide (Roca-Jácome, 2004).

En 1835 Societè de Pharmacie de París creó un premio para quien encontrase el principio activo de estas plantas, debido al éxito del uso de las infusiones de Whitering. Como resultado se originó una carrera intelectual y de trabajo bioquímico que llevó a aislar varios de los metabolitos secundarios de estas pantas y cuando se encontraron se les denomino en conjunto digitálicos, entre los que figura la ouabaína.

La ouabaína posee una estructura química similar al resto de los glucósidos cardiacos. Por un lado tiene un azúcar, la L-ramnosa, unido a una ouabagenina, que a su vez consta de un anillo lactónico pentamérico y un núcleo esteroideo (Figura 2 A). La ouabaína pertenece al grupo de los glicósidos cardiacos, cardenólidos, característicos de las plantas cuya configuración estereoquímica es siguiente: los carbonos C5 y C14 tienen cada uno un grupo hidroxil β-orientados, el C3 un azúcar L-ramnosa y una lactona b-orientada en el C19. (Hamlyn et al., 1991)

Desde que se logró su aislamiento, al ouabaína fue considerada un medicamento, sin embargo, existen registros de su uso, por medio de infusiones o macerados con diversos propósitos desde tiempos antiquísimos. El primer registro que se tiene sobre su uso, fue por la tribu de los Inées, nativos de Gabón en África Occidental, quienes machacaban plantas, para ponerlas en las flechas con las que cazaban. En 1865 Pélikan observó y estudió el «veneno cardíaco» extraído de la raíz del Ouabolo (Strophantus gratus). Posteriormente se hicieron otras publicaciones similares, entre las que se cuentan las de Frasser, Stoll , Arnaud, Wiggers y Stimson, Polaillon, Vaquez, Scherlag y colaboradores, Frasser, Lapicque , Kisch, entre otros que han publicado diversos estudios entorno a la ouabaína y sus efectos. Fueron muchos los años en los que se usó tanto a la ouabaína como el estrofanto en la práctica

médica; Se les podía encontrar en las farmacias o droguerías locales pues su uso era muy común. Sin embargo, debido a los avances tecnológicos y la salida al mercado de nuevos productos cardiotónicos mejorados, que tienen una vida media mas larga y por lo tanto son mas rentable, el uso de la ouabaína comenzó a escasear.

A.3 Comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes (gap junctions)

La comunicación intercelular es uno de los elementos más determinantes en la fisiología celular y se lleva a cabo de distintas maneras, entre las cuales se incluye la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes (CIMUC). La CIMUC cumple un sin número de funciones tanto a nivel celular como tisular, e incluso de órganos completos como el corazón. Entre las funciones se les atribuyen está el mantenimiento de la homeostasis órgano-tisular, la diferenciación celular, la cooperación metabólica, así como la respuesta sincronizada frente a las condiciones ambientales. Estos procesos pueden lograrse gracias a la comunicación directa de los citoplasmas de células contiguas, que desde luego utilizan a las uniones comunicantes, para pasar sustancias pequeñas de hasta 1 KDa, que llevan señales de una célula a otra vecina. Las uniones comunicantes son estructuras formadas por un hexámero de proteínas denominadas conexinas. A través de un poro central los conexones pueden compartir sustancias, neutras o con carga, con el exterior celular cuando se encuentran solos cuando este está abierto; los conexones tienen la facultad de cerrarse también en determinadas circunstancias. No obstante, un conexón también pueden estar acoplado a otro de una célula vecina, forma una unidad comunicante que da paso a la comunicación intercelular (Meşe, Richard, & White, 2007). Los conexones generalmente no se encuentran aislados, sino que forman grupos de tamaño considerable que aparecen en las imágenes de de criofractura como hexágonos o círculos . (Shivers & McVicar, 1995)

A.4 Na^+/K^+-ATPasa

La Na+/K+-ATPasa es un componente molecular integral de la membrana que está presente en todas las formas de vida conocidas hasta el momento, unicelulares o pluricelulares. Esta molécula genera un diferencial electroquímico entre la célula y el ambiente que le rodea, sacando Na+ a la par que introduce K+, lo cual contribuye a que se mantenga el gradiente electroquímico de las células. Esta actividad se realiza en contra de gradiente, debido a esto, se requiere de gasto de energía, es decir de ATP (Figura 4). La Na+/K+-ATPasa, es por tanto, la molécula encargada de mantener el gradiente electroquímico de los iones de sodio y potasio y como consecuencia también del potencial de membrana en reposo, que es indispensable en los procesos de repolarización de las células excitables; de hecho es tan importante que esta sola molécula es responsable del 30% del gasto energético en humanos. La Na+/K+-ATPasa está formada por 3 subunidades que reciben el nombre de las tres primeras letras del abecedario griego (α,β y γ), la alfa y beta des expresan de manera ubicua en todos los tejidos y por su parte la subunidad gamma lo hace tejido específicamente (Therien, Goldshleger, Karlish, & Blostein, 1997). E Existen cuatro isoformas de la subunidad alfa, y tres de la beta en humanos y en otros mamíferos como las ratas solo se han identificado 3 de esas isoformas, lo cual implica que su aparición se ha dado de manera evolutiva, aunque no se tiene estudiado con detenimiento (Shull et al., 1985). También se ha determinado que de estas isoformas la mas abundante es al isoforma α1 es la mas abundantey se encuentra, probablemente en todas las estirpes celulares. Sin embargo estudios bioquímicos han mostrado que las 4 isoformas, provienen de ajustes de un mismo gen; es esta isoforma la que tiene una mayor sensibilidad por la ouabaína y otros glicósidos cardiacos. La isoforma α1 es la que se ha demostrado como la responsable de la manutención de gradientes electroquímicos y su expresión es indispensable pues se ha observado que ratones con un knock out de este gen no son viables y mueren poco después del parto (Golovina et al., 2003). En segundo lugar de importancia lo ocupa la isoforma α2, también posee un sitio de unión para la ouabaína sin embargo es menos sensible que la isoforma.

Por otro lado, la subunidad β se relaciona con procesos de maduración y ensamblaje a la membrana plasmática (Blanco y Mercer, 1998; Kawamura y Noguchi, 1992). Se sabe que tanto la subunidad alfa como de la beta se expresan equitativamente en razón de 1:1 ya que ambas son necesarias para que la Na+/K-ATPasa sea funcional. En los epitelios la subunidad β funciona como molécula de adhesión y se piensa que podría ser la primer molécula adhesiva que apareció en la historia de la evolución de la vida como la conocemos. Las distintas isoformas de la subunidad α (α1, α2 y α3) presentan una distribución diferencial en las distintas estirpes de tejidos y se les asocia con funciones específicas. La subunidad α1 se expresada en cerebro, riñón, músculo esquelético y cardíaco, mientras que la isoforma α3 sólo se expresa en riñón y cerebro (Martín-Vasallo et al., 1994). Las subunidades subunidad α2/ α3 con frecuencia se encuentran en la literatura como una sola debido a sus similitudes estructurales, funcionales y farmacológicas. Más recientemente se describió una isoforma que fue descrita primero en ratas, específicamente en el testículo, se trata de la subunidad α4, que también ahora ha sido descrita en humanos, aunque no se ha descrito del todo la razón de su presencia en los testículos.

Como ya se mencionó anteriormente, la ouabaína y otros glicósidos cardiacos se unen a la subunidad α de la Na+/K+-ATPasa. La topología de esta subunidad consta de diez segmentos transmembranales denominados de m1 a M10 y se ha determinado que en los segmentos de m1 a m6, en los fragmentos extracelulares, se encuentra el sitio de unión a la ouabaína; en conjunto todos los segmentos pesan aproximadamente 112 KDa. Es precisamente la isoforma 1 de la subunidad α de la Na+/K+-ATPasa la que tiene mayor afinidad por ouabaína (Km < 10-8), en la figura 3A se observa la orientación sugerida por Magpusao y colaboradores en 2015. También realizaron simulaciones in silico de como los segmentos αm1, αm4 y αm6 interactúan con diferentes glicósidos cardiacos y encontraron que la parte más importante para que estos se unan a la subunidad alfa de la Na+/K+ATPasa es el núcleo esteroideo, en orden de importancia le sigue la lactona y por último el azúcar. (Magpusao et al., 2015)

A.5 La ouabaína como hormona.

Como ya he mencionado, la ouabaína se descubrió a partir de fuentes vegetales. Sin embargo, su alta afinidad por la subunidad alfa de la Na^+/K^+ -ATPasa llevó a plantear la hipótesis de que una substancia similar o idéntica podría producirse endógenamente en el organismo de animales, incluyendo al hombre. Se encontró que efectivamente existe una substancia con propiedades químicas prácticamente idénticas a la ouabaína (Figura 3). La demostración de esta hipótesis ha llevado a considerar actualmente a la ouabaína como una hormona circulante (Hamlyn et al., 1991; Hamlyn Et al., 1998; Kawamura et al., 1999; Koniyama et al., 2001) que actúa rápidamente y se ha encontrado ya en varias especies. Por un lado, se logró aislar ouabaína endógena proveniente de glándulas adrenales e hipotálamo de bovinos (Yamada et al., 1992; Tymiak et al., 1993; Li et al., 1998; Kawamura et al., 1999), también se ha hallado cuantiosamente en otros tejidos como las en células adrenomedulares de rata (Ferrandi et al., 1993; Komiyama et al., 2001).

Por esta razón hoy se les considera tanto al hipotálamo como a las glándulas adrenales como los principales lugares de síntesis de ouabaína (Komiyama et al.,). Ouabaína posee una vida media de 5 a 8 minutos y es eliminada vía hígado (Antolovic et al., 2000) y mediante la orina (De Angelis et al., 1997). Durante el ejercicio es secretada humoralmente ouabaína (Antolovic et al., 2000) y en condiciones de hipoxia (De Angelis et al., 1998), aunque aún no se sabe cómo se regula la producción y secreción de esta hormona.

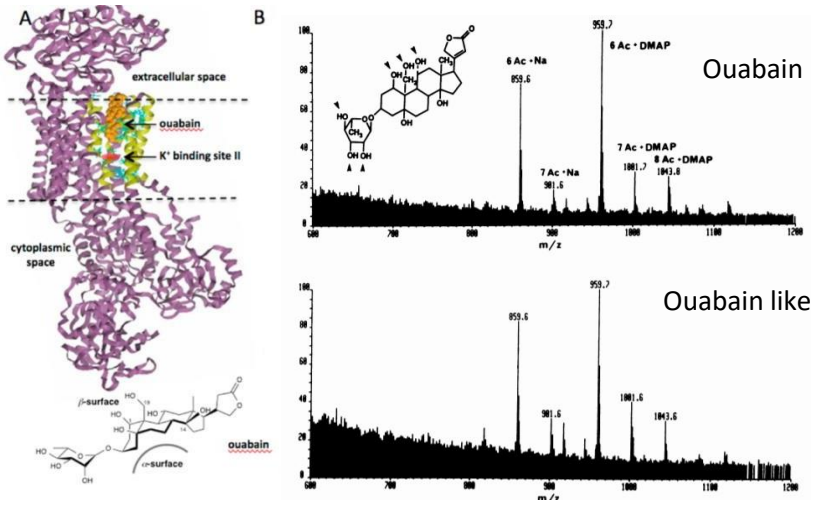


Figura 3. **Ouabaina endógena.** A) estructura del sitio de unión a la ouabaína (Matpusao, 2015) B) La comparación del perfil de espectrometría de masas, entre la ouabaína exógena, aislada de fuentes vegetales (*arriba*) y el compuesto aislado (ouabain-like) a partir de animales (*abajo*) indica que ambas son idénticas químicamente. Imagen tomada de Hamlyn et al., (1991)

La demostración de que la ouabaína se produce endógenamente en los mamíferos, ha despertado, consecuentemente el interés por saber cuál es su papel fisiológico, en el organismo en general y, particularmente para el grupo de trabajo con el que he realizado mi trabajo, en la fisiología de células epiteliales.

A.6 Efecto de ouabaína en la fisiologia epitelial.

En 1999, el grupo de trabajo de Contreras observó que el tratamiento de monocapas maduras de células MDCK con ouabaína 1µM ocasiona que los componentes de membrana asociados con el contacto y la adhesión célula-célula y célula-sustrato sean endocitadas, causando que las células se despeguen (figura 4). No obstante también se pudo constatar que a pesar de que las células se despegan, no presentan signos de apoptosis, ni necrosis (Contreras et al., 1999). Esta

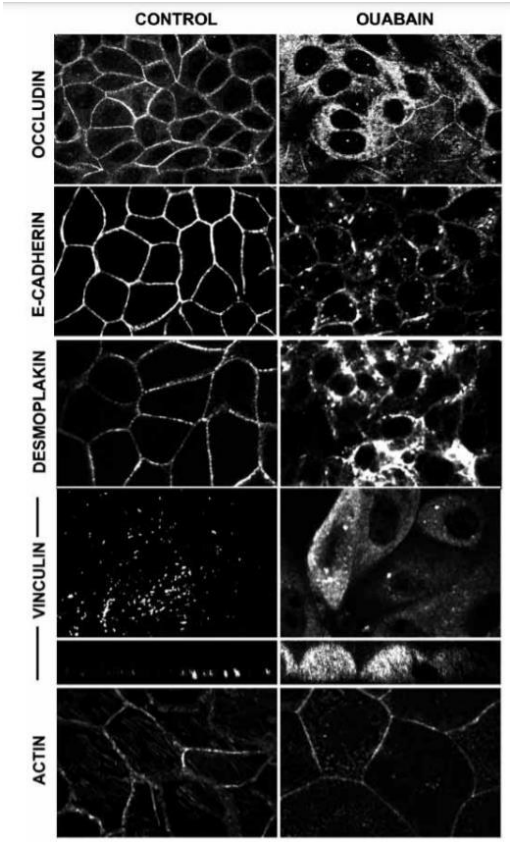


Figura 4. Uniones célulares Ocludina, E-Cadherina, demoplaquina y vinculina se desacoplan y endocitan al ser tratadas con Ouabaína 1 µM. Tomado de Contreras et al., 1999

observación llevó hipotetizar que en concentraciones fisiológicas (10 - 70 nM), la ouabaína modula propiedades de las células epiteliales relacionadas con contactos célula-celula y célula-substrato, que incluyen entre otras a las uniones estrechas (en inglés tight junctions), las uniones adherentes y las uniones comunicantes (o gap junctions). Siguiendo esa hipótesis, el grupo de trabajo del Dr. Cereijido ha estudiado y descrito el efecto que ouabaína produce, en concentraciones

nanomolares sobre las uniones estrechas, uniones adherentes y uniones comunicantes. A continuación, describiré brevemente los resultados.

A.6.1 Ouabaína incrementa la hermeticidad causada por las uniones estrechas (TJ).

Larre y colaboradores (2010) demostraron que el tratamiento, con ouabaína 10 y 50 nM, de celulas MDCK en monocapa madura no inhibe el bombeo de K + ni perturban el equilibrio de K + de la célula, sin embargo, sí modula el grado de sellado de la TJ, medido por la resistencia eléctrica transepitelial (TER) así como el flujo de dextran (JDEX). Esta modulación va acompañada de cambios en los niveles y patrones de distribución de las claudinas 1, 2 y 4. También demostraron que dichos cambios en TER, JDEX, y la expresion de claudinas están mediados a través de vías de señalización que contienen ERK1/2 y c-Src.

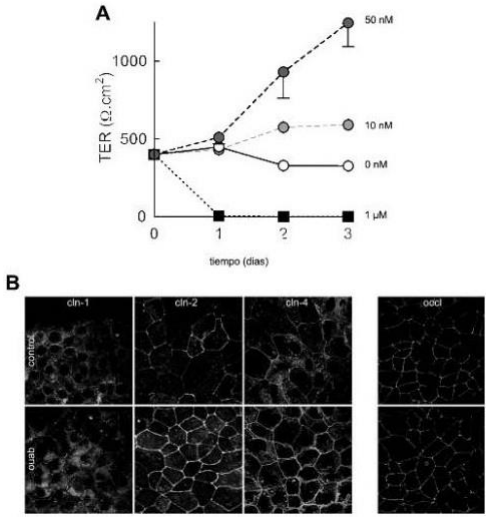


Figura 5. Efecto de ouabaína sobre la hermeticidad producida por uniones estrechas. (A) Grafica que muestra el valor promedio de TER en función del tiempo y la concentración de ouabaína. (B) Imágenes de inmunofluorescencia, obtenidas por microscopia confocal, comparan la intensidad de marca de claudinas 1, 2 y 4 y de ocludina en condiciones control y bajo tratamiento con ouabaína 10 nM. Imagen modificada de Larre et al, 2010.

A.6.2 Ouabaína acelera la ciliogenesis

Posteriormente, para saber si ouabaína en concentración nanomolar influye sobre la polaridad apical-basolateral evaluaron su efecto sobre la ciliogenesis, dado que el cilio se produce en la cara apical solamente después de que se han diferenciado las caras apical y basolateral, una vez conformada la monocapa epitelilal.Para este propósito, Larre y colaboradores (2011) hicieron estudios iinmunohistoquimicos para comparar la proporción de células ciliadas en presencia y ausencia de ouabaína y encontraron que el tratamiento con ouabaína ocasiona que los cilios se produzcan más rápidamente, además de que se desarrollan con una mayor longitud, como se muestra en la figura 6.

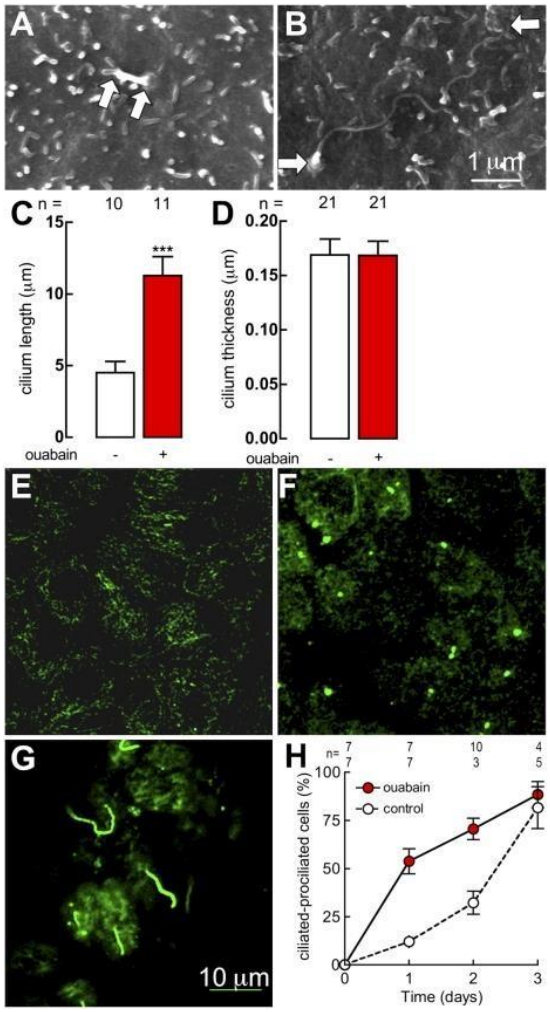


Figura 6. Ouabaína, en una concentración de 10 nM, acelera ciliogenesis. Micrografías electrónicas de barrido de un cilio (entre flechas) en una monocapa que ha estado confluente durante 12 h (A), o 3 d (B) en condiciones de control. Longitud de los cilios (C) y espesor (D) medidos en micrografías de microscopía electrónica de barrido de células MDCK de tipo salvaje, bajo control (barras blancas) o 24 h de tratamiento con ouabaína (barras rojas); P < 0,001. Las monocapas de las células de MDCK se marcaron con antiacetylated α- tubulina en cero (e), 24 h (f), o 72 h (g) en confluencia. Ciliogénesis observada en monocapas confluentes bajo control (círculos abiertos) y ouabain (círculos rojos) tratamiento en función del tiempo (H). Tomado de Larre et al.,2011

A.6.3 Ouabaína modula las uniones adherentes

Las uniones adherentes, también llamadas zonula adherens o desmosomas en banda, son complejos de unión que se forman en las células epiteliales, uniendo células vecinas. Situadas próximas y basales a las uniones estrechas, las uniones adherentes están constituidas por distintos tipos de proteínas, entre las que destacan, mas notablemente la E-cadherina, β-catenina y γ-catenina (Figura 7A). Mediante ensayos de inmunofluorescencia e inmunoblots, Castillo y colaboradores (2019) evaluaron el efecto del tratamiento con ouabaína 10 nM sobre el contenido celular y nuclear de E-cadherina, β-catenina y γ-catenina en monocapas cultivadas de células renales caninas de Marin Darby (MDCK), así demostraron que este tratamiento aumentó el contenido celular de las proteínas de unión adherentes E-cadherina, β-catenina y γ-catenina y desplazó β-catenina y γ-catenina de la membrana plasmática el núcleo (Figura 7B).

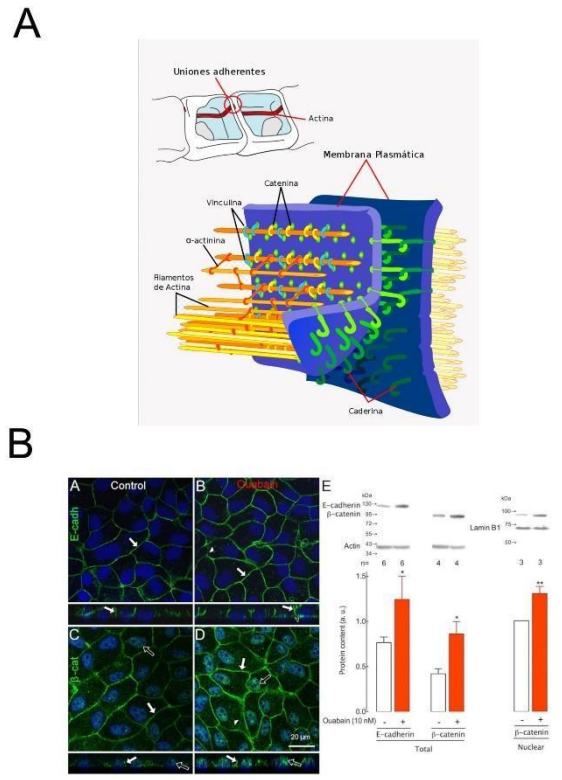


Figura 7. Ouabaína modula las uniones adherentes. (A) El dibujo esquematiza la estructura molecular de las uniones adherentes y sus componentes principales. (B) imágenes de inmunohistoquimica obtenidas con microscopía confocal, comparan la expresión de E-cadherina (arriba) y beta-catenina (abajo) en condiciones control (izquierda) y despues de tratamiento con ouabaina 10 nM (derecha). La coloración en verde indica la expresión de las proteínas de interés mientras la coloración azul es resultado de contratincion de los núcleos con Hoescht. La parte (E) muestra, en la parte superior un ensayo de inmunoblot de E-cadherina y beta-catenina en ambas condiciones edxperimentales, así como la marca de actina para referencia. La parte inferior compara la densidad relativa de la expresión de cada proteína en condiciones control vs tratamiento con ouabaina. (Tomado de Castillo et al 2019).

A.6.4 Ouabaína incrementa la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes.

Ponce y colaboradores hicieron ensayos de transferencia de colorante y de acople capacitivo para saber si ouabaína, en concentraciones nanomolares influye sobre la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes (CIMUC). El primer enfoque metodológico consistió en inyectar al azar e individualmente, células en monocapa madura, con una solución que contenía una mezcla neurobiotina y dextran-FITC. Dado que la neurobiotina es de bajo peso molecular, puede difundir, a través de uniones comunicantes, a las células vecinas, si estas se encuentran presentes y abiertas, de manera que el número de células teñidas es un buen estimador de la CIMUC. La figura 8 (A yB) muestra imágenes que comparan el número de células teñidas al conjugar neurobiotina con streptavidina-TRITC (rojo) en monocapas con y sin tratamiento con ouabaína 10 nM. La marca amarilla es la mezcla del verde y el rojo, el verde proviene de la marca de dextran FITC, que no difunde a través de las UC. La figura C compara el curso temporal del valor promedio de células teñidas, con y sin tratamiento con ouabaína. Como se observa el incremento es estadísticamente significativo ya desde los 30 minutos de tratamiento, alcanzando un máximo a la hora. Este resultado también fue observado haciendo ensayos electrofisiológicos para medir la capacitancia con whole cell patch clamp. Como se muestra en la figura 8E, la ouabaína induce un incremento significativo en la capacitancia, que es abatida cuando las células se tratan con octanol, un agente desacoplador conocido. La figura 8D muestra que el tratamiento con cicloheximida y citocalasina D no afectan el incremento en el número de células comunicadas, inducido por ouabaína, lo cual sugiere que no se requiere síntesis de nuevas unidades de mRNA o de proteínas para que se lleve a cabo este efecto.

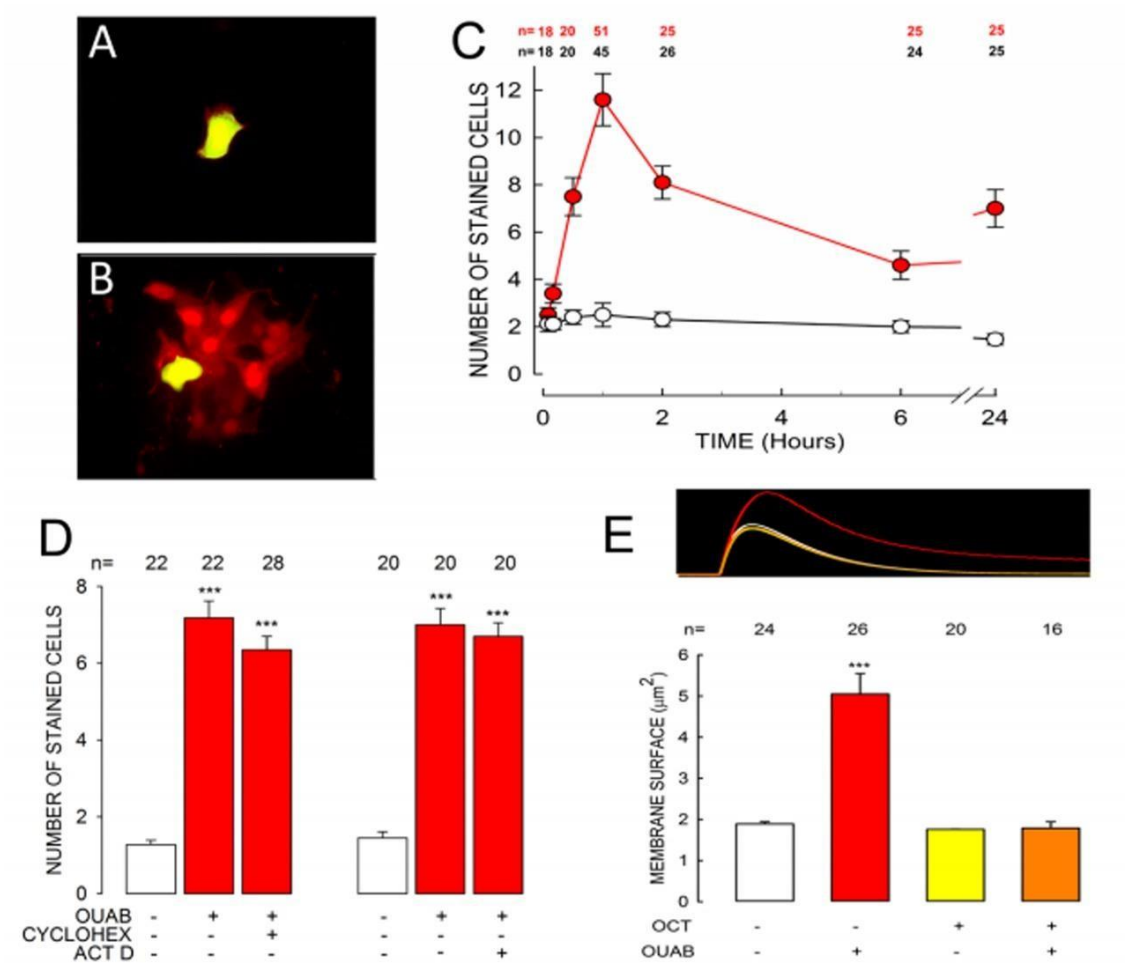


Figura 8. Efecto de ouabaína sobre la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes. (A-B) Imágenes representativas de ensayos de inyección de colorantes en células en monocapa sin y con tratamiento de ouabaína. Las células teñidas en rojo revelas la difusión de neurobiotina; la marca amarilla indica la célula inyectada. (C) Grafica que muestra el curso temporal del número promedio de células teñidas con y sin tratamiento con ouabaína. (D) Grafica de barras que compara el numero promedio de células teñidas en las condiciones que se indican en la parte inferior. Se muestra que ni cicloheximida ni actinomicina D afectan el incremento de CIMUC. (E) grafica de barras compara el valor promedio de la superficie de membrana obtenido mediante registros de capacitancia en las condiciones indicadas en la parte inferior. Tomado de Ponce et al., 2014

A.7 El cáncer.

La palabra cáncer proviene del griego “karkinos”, que significa cangrejo, y parte de la observación de unas protuberancias formadas durante un cáncer de mama avanzado con forma de este crustáceo. Es una denominación antigua, que data de hace 25 siglos, y aunque hasta hace algún tiempo era tratado como una misma enfermedad, hoy se sabe que hay una enorme variedad de cánceres; la malignidad, invasividad, resistencia y otras características dependen del fenotipo que tenga cada variante. No obstante, los esfuerzos por comprender esta enfermedad, ha resultado que existen ciertas características que todos los tipos de cáncer presentan y se les ha denominado “Hallmarks o distintivos del cáncer”.

Los múltiples estudios en torno a esta enfermedad ha llevado a los oncólogos a afirmar que los tumores cancerosos no son simplemente una masa de células apartadas del resto de los órganos, con una tasa de proliferación y crecimiento celular acelerada, pues hoy se sabe que tienen una estructura y organización compleja tejidos compuestos por distintos tipos celulares interactúan homo y heterotípicamente. Un tumor canceroso posee células madre cancerosas, fibroblastos asociados, células endoteliales, pericitos, células inflamatorias y células cancerosas primarias, además de las invasivas que poseen la capacidad de migrar hacia otros tejidos, así como también están rodeadas de células normales del paciente. De forma sintética la revisión hecha por Hannahan y Weinberg habla de 6 Hallmarks del cáncer que están relacionados con las capacidades biológicas particulares esta enfermedad, en adición hay 2 hallmarks emergentes pues fueron asentados recientemente, y 3 condiciones de reciente descubrimiento, de los tumores cancerosos que permiten habilitar a otras células no cancerosas para hacer que “trabajen para ellos” (Hanahan & Weinberg, 2011).

Estos Hallmarks o distinticos del cáncer son.

A.7.1 Proliferación sostenida

En condiciones normales, los distintos tipos de tejidos regulan la producción y secreción de señales inductoras de crecimiento y división celular, asegurando que el número de células sea controlado. Al mantener esta homeostasis, los tejidos son capaces de sostener la estructura y el correcto funcionamiento de los mismos. Dichas señales se hacen llegar a las células blanco principalmente a través factores de crecimiento que se unen a sus respectivas proteínas receptoras presentes, que por lo regular se ubican en superficie de la membrana celular y ancladas a esta, y que normalmente, tienen al menos, un dominio intracelular del tipo tirosina quinasa que ayuda a desencadenar cascadas de señalización. No obstante, las células cancerosas pierden dicha regulación de este tipo de señales transmitidas por los factores de crecimiento. Esto lo logran gracias a que son capaces de inducir y sostener señales estimuladoras de crecimiento y proliferación autónomas, por lo que pueden crecer y reproducirse de manera descontrolada.

A.7.2 Evasión de supresores del crecimiento

Las células cancerosas también evaden programas de señalización que regulan negativamente el crecimiento y la proliferación celular. Varias de estas cascadas de señalización, dependen de la activación de los genes supresores de tumores. Estos supresores encuentran inactivados o bien mutados durante las neoplasias. Dos de los genes supresores de tumores más estudiados codifican para las proteínas Rb (retinoblastoma-associated) y TP-53, que operan a manera de terminales centrales en dos circuitos regulatorios clave que son complementarios uno del otro y que guían las “decisiones”, o mejor dicho, mecanismos programados de las células, llevándolas a hacia la proliferación o bien a la activación de programas de senescencia o apoptosis.

A.7.3 Resistencia a la apoptosis

Como seguramente sabe el lector, la apoptosis celular es una muerte programada que se desencadena en respuesta a distintos estreses fisiológicos que las células en condición normal sufren con el fin de evitar daños más significativos. Sin embargo, durante el proceso de tumorigénesis estos inductores de la apoptosis, se encuentran alterados y con desequilibrios en la señalización que resultan de la superregulación de oncogenes o bien del daño al DNA asociado con la hiperproliferación. Por ejemplo, los genes P53 o Bcl2 determinan este distintivo del cáncer, ya que se encuentran alterados en células neoplásicas, dando lugar a la resistencia a la muerte celular programada.

A.7.4 Activación de la inmortalidad replicativa

Casi todas las estirpes celulares normales, son capaces de llevar a cabo un número limitado de ciclos celulares de crecimiento y división, debido a los procesos descritos anteriormente y a que existe la inhibición por contacto. Este proceso se ha asociado a la senescencia, evento en el que la célula adquiere un estado en el que no prolifera pero sí es viable, y comienza así la crisis que comprende la muerte celular. Ahora bien, las células cancerosas adquieren un potencial replicativo ilimitado que genera generar tumores macroscópicos. Esta capacidad está asociada principalmente una alta actividad de la enzima telomerasa, que así mismo se encuentra sobre expresada en la mayoría de los tumores y les permite adquirir ese crecimiento descontrolado característico de las células cancerosas, mismo que se obtiene mediante la evasión del desencadenamiento de la apoptosis o la senescencia.

A.7.5 Inducción de la angiogénesis

En un organismo complejo sano, los órganos y tejido que lo componen requieren del sistema circulatorio para suplir todas sus necesidades tanto energéticas, como hormonales y de provisión de oxígeno para realizar todos los procesos fisiológicos que lo mantienen vivo; a su vez, el las células de estos tejidos también requieren de

un modo para evacuar desechos metabólicos y esta función también es cumplida por este sistema.

Las células cancerosas no son la excepción, ya que a pesar de que muchos de sus procesos fisiológicos están alterados, siguen necesitando de irrigación sanguínea para subsistir. Por esta razón las células presentes en una neoplasia o tumores secundarios, son capaces de secretar el factor de crecimiento endotelial vascular (Vascular Endothelial Groth Factor, VEGF), que es el principal responsable de inducir la angiogénesis, es decir la neovascularización (formación de vasos sanguíneos) que nutre a un tumor. En un inicio se pensaba que esta solo era necesaria en cuando el tumor era de un tamaño tal que requiriera de su propia vascularización, sin embargo estudios más recientes demuestran que la el proceso de angiogénesis se inicia desde estadios tempranos de desarrollo, es decir, desde la fase premaligna de la progresión neoplásica (Raica et al, 2009; Hanahan and Folkman, 1996).

A.7.6 Activación del proceso de invasión y metástasis

Sin duda, unos de los eventos más peligrosos y letales para un paciente que sufre de cáncer, es cuando las células cancerosas, adquieren la capacidad soltarse del tumor primario para migrar e invadir otros tejidos, sobre todo cuando estas generan un nuevo tumor en órganos vitales, tales como el hígado o el cerebro, órganos bastante recurrentes cuando se habla de la instalación de un tumor secundario, a este proceso se le denomina metástasis.

En este proceso ha sido blanco de numerosos estudios, ya que si se evita la metástasis de las células cancerosas, esto se traduce en una mejor expectativa para el paciente. La metástasis consiste en una secuencia de cambios en la expresión genética de células cancerosas que conllevan a una transformación fenotípica.

El primer paso consiste en la invasión local o migración hacia tejidos aledaños, le sigue la intravasación de las células cancerosas hacia los vasos linfáticos y sanguíneos próximos. Una vez pasada la barrera de los vasos sanguíneos y linfáticos, las células cancerosas escapan de la circulación y se introducen en el parénquima del tejido distal (extravasación), aunque este paso pareciera aleatorio no lo es, los distintos tipos de cánceres realizan metástasis típicas, es decir invaden ciertos órganos o tejidos específicos, lo cual lo logran mediante el reconocimiento de un microambiente. Luego de la extravasación, si existen las condiciones adecuadas, se establece un tumor secundario con crecimiento continuo e independiente en una zona distal a la del tumor primario. Es así como las células cancerosas pasan por una serie de modificaciones, tanto en su forma como en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular que les permiten mantener interacción con las células nativas de los órganos en los que se instalan.

Para lograr todo lo anterior se requiere de la regulación de moléculas de adhesión y contacto celular, tanto es así que se ha determinado que muchas de ella son o bien oncogenes o bien genes supresores de tumores, por ejemplo, la E-Cadherina, una de proteínas clave en este proceso, ya que es una molécula de adhesión fundamental en las interacciones célula-célula. Se ha observado que el aumento en la expresión de E-Cadherina incrementa a su vez el mantenimiento de la quiescencia de las células epiteliales, por lo que es un antagonista de la invasión y la metástasis, cuando se habla de tumores primarios. Por otra parte, la desregulación de expresión de dicha proteína potencia los fenotipos que permiten la invasión y metástasis (Berx and van Roy, 2009; Cavallaro and Christofori, 2004).

A.7.7 Inestabilidad genómica

Muchas de las características distintivas del cáncer se adquieren mediante la mutación de diversos genes (Hanahan and Weinberg, 2011). La tasa mutaciones en las células cancerosas está aumentado, si se les compara con las células sanas. Esto se debe a defectos y saltos en la replicación celular que afectan a varios componentes de la maquinaria de mantenimiento del DNA también conocidos como

guardianes del genoma. Estos pueden ser tales como: genes cuyos productos están involucrados en (a) detectar un daño en el DNA y activar mecanismo de reparación, (b) en reparar el DNA de forma directa e indirecta (c) que inactivan o interceptan moléculas mutagénicas previo a un daño en el genoma (Negrini et al., 2010; Ciccia and Elledge, 2010; Jackson and Bartek, 2009; Kastan, 2008; Harper and Helledge 2007; Friedberg et al., 2006). Estos cambios en el funcionamiento de los mecanismo de protección ya mencionados pueden deberse a mutaciones que se altera la expresión de dichos genes, ya sea inhibiéndolos, o decreciéndolos mediante cambios epigenéticos, o bien que se hallen mutados y por tanto no cumplan su función. Aunque las variaciones genómicas cambien entre los distintos tipos de tumores, la inestabilidad genética se da en todos ellos, pues sin estas moléculas protectoras las células cancerosas tienden a acumular mutaciones, en ocasiones letales y es por ello que también se han vuelto un importante blanco cuando se habla de contrarrestar el cáncer. Sin embargo, en células cancerosas viables, los genotipos resultantes de dichas mutaciones o variaciones epigenéticas son selectivamente ventajosos y por lo tanto, beneficiosos para la progresión tumoral, debido a que favorece la aceleración del proceso neoplásico y permite la adquisición de otros características distintivas del cáncer tratados anteriormente.

A.7.8 Inflamación

Con el fin de mantener la homeostasis de un organismo, el sistema inmune responde ante cualquier amenaza o agente ya sea interno o externo. Cuando digo factores internos me refiero precisamente a las células defectuosas o dañadas que pueden originar un tumor. No obstante, la respuesta inflamatoria resultante que es llevada a cabo en su mayoría por parte del sistema inmune innato tiene un efecto positivo, es decir, ayuda al tumor, en la tumorigénesis mediante la liberación de moléculas bioactivas al microambiente tumoral. Desde luego, se incluyen moléculas como factores de crecimiento y de supervivencia que sostienen la proliferación celular y limitan la muerte celular respectivamente, también se han registrado enzimas modificadoras de la matriz extracelular que facilitan la angiogénesis,

invasión y metástasis, así mismo se encuentran efectores proangiogénicos y señales que llevan a la activación de la transición epitelial-mesenquimal (TEM) y otros programas celulares que facilitan la activación de otras capacidades distintivas del desarrollo de tumores (DeNardo et al., 2010; Grivennikov et al., 2010; Qian and Pollard, 2010; Colotta et al., 2009).

A.7.8 Reprogramación del metabolismo energético

Como ya lo mencioné anteriormente las células cancerosas tienen una proliferación celular continua y descontrolada, esta no solamente es posible gracias a los defectos en los mecanismos que regulan dicho crecimiento celular, sino también por cambios en el metabolismo energético que hacen posible una mayor tasa de crecimiento y división que tiene lugar en este tipo de células en comparación con las células sanas. Las células cancerosas modifican su comportamiento metabólico y la forma de producción energética, incluso en condiciones de oxígeno escaso, favoreciendo el glicólisis y limitando el transporte de piruvato a la mitocondria. Se trata de un fenómeno conocido como “glicólisis aeróbica” (Wargurg, 1930). Por ello, como el lector puede deducirlo, si tiene algo de conocimiento de bioquímica, el rendimiento de ATP es mucho menor si se le compara con la eficiencia que tienen las células sanas en la obtención de esta moneda energética. Debido a que el número de ATP obtenido en la glucólisis es mucho menor cuando se le compara a los que resultan de la fosforilación mitocondrial oxidativa, las células cancerosas compensan compensar esta baja eficiencia mediante la sobreexpresión de transportadores de glucosa, como GLUT1, cuya función es aumentar el flujo de glucosa al citoplasma (Jones and Thomson, 2009; De Berardinis et al., 2008; Hsu and Sabatini, 2008). Estas modificaciones en el metabolismo provocan que los intermediarios formados durante la glicólisis, tomen parte de rutas anabólicas, por ejemplo, aquellas en las que se sintetizan nucleósidos y aminoácidos, facilitando así la biosíntesis de orgánulos y macromoléculas, necesarios para la formación de

nuevas células (Vander Heiden et al., 2009; Potter, 1958). Esta reprogramación metabólica, es decir, que células cancerosas favorezcan el glicólisis, se ha relacionado con la activación de algunos oncogenes, como Ras o Myc, o incluso con genes supresores de tumores mutados, como P53, y con condiciones de hipoxia. Esto tiene un efecto retroactivo, ya que la constante activación de estas moléculas puede contribuir al aumento de la expresión de factores de transcripción inducible por hipoxia como HIF1α y HIF2α, que favorecen el glicólisis (Semenza, 2010; Kroemer y Pouyssegur, 2008).

A.7.9 Evasión del sistema inmune:

Según la teoría de la vigilancia inmunológica, todos los organismos, células y tejidos, se encuentran constantemente monitorizados por el sistema inmune. Este vigilante tiene la responsabilidad de reconocer y eliminar agentes extraños y células defectuosas del mismo organismo, entre ellas algunas células potencialmente cancerosas, funciona como una barrera que impidiendo la formación y progresión de tumores. De acuerdo con lo que propone esta teoría, los solo aquellos tumores que logran evadir la detección por parte del sistema inmune o que consiguen limitar el alcance el mismo consiguen asentarse proliferar. Ejemplo de esto es, cómo las células cancerosas son capaces de desviarla atención de las células “naturales killers” y los linfocitos T citotóxicos CD8+ por medio de la secreción de factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) u otros factores inmunosupresores (Yang et al., 2010; Shields et al., 2010).

A.8 El cáncer y la CIMUC

En los últimos años el estudio del cáncer ha cobrado gran importancia, sin duda acorde con la enorme incidencia y complejidad que este grupo de enfermedades representa. Sin embargo, gran parte de la investigación realizada se ha enfocado principalmente sobre el tratamiento del cáncer mediante diversos fármacos desarrollados o bien sobre los estudios acerca de los cambios genéticos y epigenéticos que tienen lugar al presentarse este padecimiento, dejando de lado, al menos un poco, la comprensión de la fisiopatológica del cáncer y el papel de las uniones comunicantes

Como lo mencioné anteriormente, la CIMUC permite el paso de señales y moléculas de hasta 1 kDa. En las células cancerosas este mecanismo es fundamental ya que gracias a través de las uniones comunicantes pueden pasar moléculas como el AMPc, Ca^{++}, y algunos aminoácidos. Algunas de los procesos que más se sirven de estas estructuras son: a apoptosis celular, la familia de receptores y ligandos VEGF y las vías de señalización de AKT, EGF, P53 e inhibición de metaloproteasas de matriz (Asadi-Khiavi, Hamzeiy, Khani, Nakhlband, & Barar, 2011). Por ejemplo, se sabe que el EGF junto con las vías de señalización que desencadena poseen un papel importantísimo en las neoplasias derivadas de epitelio mamario y de pulmón (Cameron et al., 2003).

En gran medida la idea central de este trabajo fue inspirada por un trabajo realizado en 1967 por el grupo de Loewenstein W. y Kanno Y., así como, desde luego, los aportes del nuestro grupo de trabajo, en torno al papel fisiológico de la ouabaína. En el estudio de Loewenstein y Kano se exploró mediante ensayos electrofisiológicos el grado de comunicación de hepatocitos de rata sanos y canceroso. Lo que se observó fue un parteaguas en el estudio del cáncer ya que por un lado se determinó que las células de hígado de rata sanas presentan CIMUC mientras que las cancerosas no.

Para los tiempos de este estudio ya se conocía la existencia de las uniones comunicantes, pero para ubicarnos en el proceso mental de estos investigadores,

vale la pena recordar cómo fue que se enteraron en esos tiempos, de que existen las uniones comunicantes. En estos ensayos electrofisiológicos se utilizaban dos electrodos uno para emitir un pulso eléctrico y otro más para registrarlo en las células vecina, en efecto estos pulsos lograban registrarse aunque atenuados, hecho que concordaba con la ley de cable, no obstante, se observó que el pulso registrado en las células vecinas era mucho mayor al esperado, debido a que se consideraba que este pulso debe pasar a través de varias membranas celulares, que suman en serie la resistencia de sus membranas. Estas observaciones llevaron a deducir que existen estructuras que facilitan el paso de corriente entre una célula y otra, hoy sabemos que esos componentes son precisamente las uniones comunicantes.

Regresando al trabajo de Loewenstein y Kano, entre las conjeturas que se hicieron acerca de por qué las células cancerosas no se comunican, resaltó una que tenía en cuenta las funciones de estas estructuras. Como se sabe las uniones comunicantes están involucradas en procesos de diferenciación y sincronización de tejidos, entonces, Loewenstein y Kano dejaron entre dicho en los múltiples congresos en los que dieron a conocer sus hallazgos, que quizá el cáncer podía deberse a una desconexión entre células, pues estas entraban en una especie de esquizofrenia celular que les impedía sincronizarse y ponerse de acuerdo para formar estructuras complejas, creciendo desordenada y descontroladamente como sabemos hoy que lo hacen las células cancerosas.

Futuros trabajos confirmaron las observaciones de Lowenstenin y Kano, por ejemplo, Lee y colaboradores en 1992 describen que en células de cáncer de mama epiteliales se expresan en menor cantidad las conexinas 26 y 43 en comparación con células de epitelio mamario normal. Este trabajo también sugiere que la falta de conexinas y por tanto de uniones comunicantes se da a nivel transcripcional. Se apoyan de diversas evidencias encontradas a partir de sus experimentos que fueron: (1) Comprobaron mediante secuenciación que los genes que codifican para dichas conexinas se encuentran íntegros, es decir, sin alteraciones, al menos en

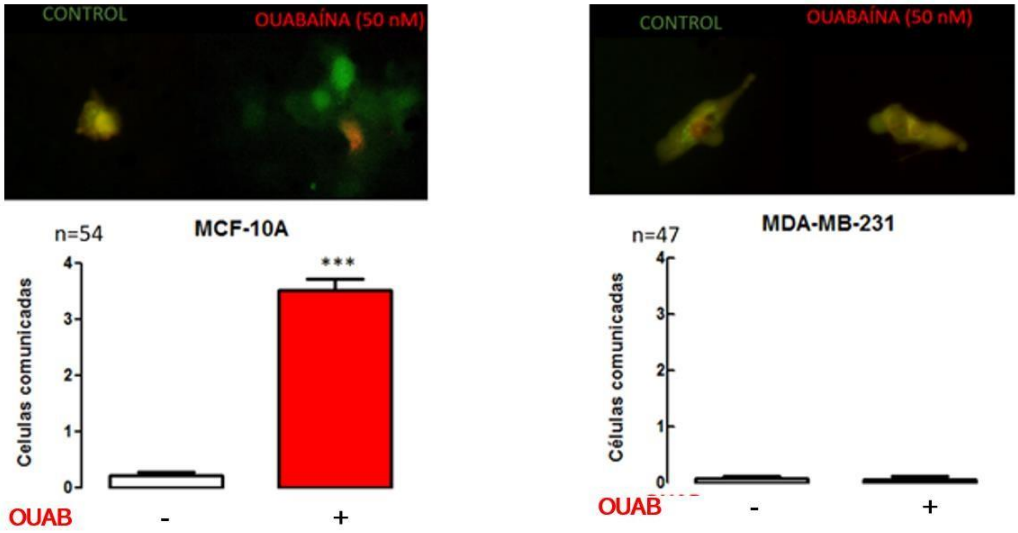
las células cancerosas que estudiaron, (2) los ARN mensajeros de esta proteínas se están pobremente expresados en células de tumores primarios pero ya aumentaban su expresión en las metastásicas, (c) Los ARN mensajeros de estas dos conexinas, en células normales son estables en presencia de actinomicina D lo que indica que los transcritos no son degradados rápidamente, por consiguiente, su ausencia en células cancerosas no se debe a degradación del mismo (Lee, et al., , 1992).

En otros estudios, se realizaron ensayos de transferencia de colorante con amarillo Lucifer, en los que resultó que en las células de epitelio normal (línea celular 81N) había transferencia de colorante de una célula inyectada a sus vecinas, pero no en las células cancerosas (línea celular 21 MT-2) reforzando las observaciones de Loewenstein y Kano.

Se han hecho estudios más recientes acerca de cómo influyen las conexinas en el cáncer, de modo que hoy en día se han relacionado conexinas como la 43, 32 y 26 con el cáncer, de manera paradójica y aparentemente contradictoria. Por una parte investigaciones del grupo de Yano en el año 2001 nos dice que al si se transfectan células de cáncer de hígado (HepG2) con conexina 26, se reduce la capacidad invasiva que estas poseen debido al aumento de la actividad de metaloproteasas (Yano & Yamasaki, 2001); más adelante en el trabajo de Stoletov y colaboradores en el 2013, resultó que las conexinas 43 y 26 propician la invasión metastásica en cáncer de mama y melanoma (Stoletov et al., 2013). En condiciones fisiológicas normales estas conexinas tienen roles importantes en la migración celular no patológica durante el desarrollo embrionario, y en la neurogénesis en particular en la migración de la cresta neural (Gstein, 2007) y las neuronas precursoras del córtex (Elias et al., 2007) e incluso en el proceso de sanación de una herida.

A.9 Antecedentes de mi trabajo de maestría

Como ya había mencionado, al comenzar este escrito, esta tesis de doctorado emerge a partir los resultados que obtuve en el trabajo de maestría. Por lo cual es importante mencionar lo que se observó. Se seleccionaron dos tipos celulares, uno de epitelio mamario no canceroso (MCF-10A) y otro de células mamarias cancerosas (MDA-MB-231). Se hicieron ensayos de transferencia de colorante que



consistieron en inyectar, en monocapas confluentes de los dos tipos seleccionados, una sola célula con dos sustancias, diclorofluoresceina que pesa 500 Da y puede

Figura 10. La comunicación intercelular no incrementó en las células cancerosas en los primeros ensayos. Lado Izquierdo: Se observan ensayos de transferencia de colorantes células MCF10-A (no cancerosas), en condiciones control solo se puede observar la célula inyectada teñida en amarillo por los traslapes de la coloración de la streptavidina-rodamina (rojo) y diclofloresceìna (verde); cuando se tratan con ouabaína 50nM la comunicación incrementa, y además de la célula inyectada (amarillo) se observan todas aquellas comunicadas y teñidas por el verde de la diclorofluoresceìna. Derecha: Ensayos de transferencia de colorante en células MDA-MB-231 (cáncer triple negativo), en condiciones control se observa la célula inyectada con ambos colorantes, no hay células comunicadas, la comunicación no incrementa cuando se tratan con ouabaína 50 nM. Tomado de Serrano-Rubí et al 2015

pasar a través de las uniones comunicantes, y Streptavidina-rodamina que pesa 30 KDa para marcar las células inyectadas. En el caso de las células “no cancerosas”,

se determinó que no existe comunicación en las células en condiciones control, mientras que si se les trata con ouabaína 50 nM la comunicación aumenta significativamente en un 400%. Por otro lado, las células cancerosas en condiciones control no presentaron comunicación y tampoco ésta se incrementó cuando se les trata con ouabaína 50 nM. (Figura 10) (Serrano-Rubi et al 2015).

No obstante, esta única observación no basta para desechar la idea de que la ouabaína pudiese hacer que las células cancerosas se comuniquen. Hasta ahora el efecto de la ouabaína como modulador de proteínas de unión (oclusora, comunicante, adherente,) se ha probado sólo en células epiteliales. Sin embargo, las células MDA-MB-231 poseen un fenotipo que dista mucho de un epitelio, aunque están clasificadas como tal en la ATCC. Si bien en esta línea cancerosa no se puedo observar un incremento en la comunicación a 50 nM de ouabaína, existen líneas de células también mamarias cancerosas que conservan mucho mejor las cualidades y proteínas típicas de los epitelios, como por ejemplo las MCF-7. Tampoco debe descartarse que la ouabaína pueda realizar su función en otras concentraciones mayores a los 50 nM utilizados en mi tesis de maestría.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El interés del presente trabajo se basa en dos antecedentes fundamentales: (1) La observación de que algunos glicósidos cardiacos, entre los que destaca la ouabaína, producen varios efectos en células epiteliales MDCK, dentro de las cuales destaca notablemente la estimulación de las células a comunicarse entre ellas a través de Uniones Comunicantes y (2) La descripción de que existe una relación entre el cáncer y la disminución en capacidad de las células a comunicarse entre ellas, como fue descrito inicialmente por los trabajos de Lowenstein y Kanno de 1954 Como se describió en el capítulo de antecedentes, las observaciones descritas sobre la propiedad de ouabaína de incentivar la Comunicación intercelular mediada por Uniones Comunicantes (CIMUC), se ha descrito solamente en las células MDCK, las cuales son una línea epitelial de origen renal de canino, por lo que es necesario robustecer esta hipótesis a otros tejidos, ya sea epiteliales de distintos órganos o inclusive de otro tipo de tejidos.

Por otro lado, la descripción de que la CIMUC es disminuida en células cancerosas, nos ha incentivado a investigar si la ouabaína podría restituir esa capacidad perdida en las células cancerosas, por lo que el desarrollo de este trabajo tiene el interés, por un lado de robustecer la hipótesis general de la influencia de ouabaína sobre la CIMUC y por el otro el de probar su influencia en células cancerosas, lo cual podría eventualmente llevar a proponer nuevas alternativas al problema biomédico del cáncer y a explicar porque la ouabaína influye en dicho problema.

OBJETIVOS

Objetivo General

Probar si la ouabaína, produce un aumento en la comunicación intercelular mediada por Uniones Comunicantes (CIMUC) en células cancerosas.

Objetivos particulares:

1. Para cada una de las líneas celulares derivadas de cáncer, incluidas en este estudio. Hacer ensayos de transferencia de colorante (Amarillo Lucifer) en células tratadas con distintas concentraciones de ouabaína en el rango nanoMolar (0, 0.1, 10,50,100 y 500 nM), posteriormente analizar estadísticamente los datos recopilados para probar si en alguna de esas condiciones experimentales la ouabaína produce un cambio estadísticamente significativo en la CIMUC.

2. Demostrar que las células adquieren la tinción a través de Uniones Comunicantes

3. Probar si se requiere de síntesis de nuevas unidades de mRNA y/o de proteínas para estos efectos.

4. Probar si en la respuesta están involucrados los componentes cSRC, Erk ½ y Rho-ROCK.

HIPOTESIS

La ouabaína influye en la Comunicación intercelular mediada por Uniones Comunicantes en todos o algunos de los distintos tipos de células derivadas de cáncer de distinto origen.

MATERIALES Y METODOS

MM.1. Cultivo celular

Las células CaSKi se obtuvieron de la American Type Culture Collection ATCC (CRL-1550) y se cultivaron en medio RPMI1640, suplementadas con penicilina-estreptomicina 10.000 U/µg/ml (Cat. 15140122, Thermo Fisher Scientific) y 10% GIBCO SFB (Thermo Fisher, A4766801). Las células de SiHa fueron obtenidas de ATCC (HTB-35) y cultivadas en medio DMEM, complementado con penicilina-estreptomicina 10.000 U/µg/ml y 10% GIBCO SFB. Las células HeLa fueron amablemente donadas por el Dr. Javier Camacho (Departamento de Farmacología, CINVESTAV). Las células HeLa fueron cultivadas en el medio de DMEM, complementado con la penicilina-estreptomicina 10.000 U/µg/ml y el 10% GIBCO SFB. MDA-MB-231 se obtuvieron a partir de ATCC (HTB 26) y se cultivaron en medios RPMI 1640 complementados con 10,000 U/µg/ml de penicilina-estreptomicina y 10% de SFB. Las células MCF-7 se obtuvieron de ATCC (HTB-22) y se cultivaron en medios DMEM F-12, complementados con 10,000 U/µg/ml de penicilina-estreptomicina y 10% de SFB. La línea celular A549 fue amablemente donada por el Dr. Javier Camacho (Departamento de Farmacología, CINVESTAV). Las células A549 fueron cultivadas en el medio de F12K, complementado con la penicilina-estreptomicina 10.000 U/µg/ml y el 10% GIBCO SFB. La línea celular SW480 fue amablemente donada por el Dr. Camacho (Departamento de Farmacología, CINVESTAV). Las células A549 fueron cultivadas en el medio DMEM/F12 (Invitrogen, 12400024), complementado con penicilina-estreptomicina 10.000 U/µg/ml y el 10% SFB. La línea celular HPAF-II fue amablemente donada por el Dr. José Segovia (Departamento de Fisiología, CINVESTAV). Las células HPAF-II se cultivaron en medio RPMI1640, suplementadas con penicilina-estreptomicina 10.000 U/µg/ml y SFB al 10%.

Todas las líneas celulares se cultivaron en una atmósfera de CO2 al 5% a 36,5 °C. Para los ensayos de transferencia de colorantes, las células se sembraron al 80% de confluencia en cubreobjetos de vidrio estériles, depositadas en cajas “multiwell”

de 24 pozos (Corning, Costar). Una vez alcanzada la confluencia, las células fueron transferidas a un medio con SFB reducido al 1% durante 24 horas antes de recibir los tratamientos con ouabaína.

MM.2 Medición de la comunicación intercelular de unión gap mediante ensayos de transferencia de colorante (amarillo lucifer)

Las células para ensayar se sembraron al 80% de confluencia sobre cubreobjetos de vidrio y se incubaron con un medio que contenía un 10% de SFB. Después de 24 horas el SFB en los medios de cultivo se redujo al 1%, durante 24 horas antes de los tratamientos esto con el propósito de depurar la ouabaína que contiene el suero fetal per se. Posteriormente, los cubreobjetos se incubaron durante una hora con ouabaína en diferentes concentraciones en el rango nanoMolar (0, 0,1, 1, 10, 50 y 500 nM). Las micropipetas se elaboraron a partir de tubos capilares de vidrio de borosilicato(Kimax,34500-99) en un tirador vertical David-Kopf (DKI-700c). Aquellos con una resistencia eléctrica de punta de 5-10 MOhms se rellenaron con una solución salina que contenía 120 mM KCl,5 mM NaCl, 1 mM MgCl2 y 5 mM HEPES, (pH 7,4) y Amarillo Lucifer (1%). Después de llenarse, las pipetas se unieron al dispositivo de soporte, que se montó en un micromanipulador (PCS-750; Burleigh Instruments). Los cubreobjetos en los que se habían cultivado monocapas celulares, se colocaron en una cámara translúcida, llena de PBS más solución de Ca2 + (1,8 mM), a temperatura ambiente. Para el empalamiento de células la cámara fue montada en la platina de un microscopio invertido (Diaphot 300; Nikon) equipado con epifluorescencia. Se realizaron tres ensayos independientes en cada línea celular. En cada ensayo, se hicieron alrededor de 30 repeticiones por cubreobjetos. En cada repetición, las células fueron elegidas aleatoriamente, de entre las que constituían la monocapa, luego empaladas e inyectadas, una a la vez, utilizando un dispositivo de microinyección accionado neumáticamente (IM300; Narishige). Después de que cerca de 30 a 50 células se inyectaran, los cubreobjetos fueron aclarados con PBS y fijados sumergiéndose en el paraformaldehído del 4%, después enjuagados (3x) con PBS y montados usando

VECTASHIELD® (H-1000; Vector Laboratories, Burlingame CA, USA). Las imágenes de ocho bits de las células fluorescentes se adquirieron a temperatura ambiente utilizando un microscopio invertido Zeiss M200 equipado con lente objetivo Plan-NeoFluar 63x N.A. 1.25, una cámara AxioCam MRm y el software Axovision 4.8. Las imágenes capturadas fueron importadas en el software FIJI Is Just ImageJ (versión 2.8, NIH, Bethesda, MD, EE. UU.) para ajustar el brillo y el contraste y GIMP (versión 2.8.10, NIH) para componer las figuras.

MM.3. Productos químicos

Ouabaína (O-3125; Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA) fue preparada en DMSO. Amarillo Lucifer se obtuvo de Sigma-Aldrich (67764-47-5). En los ensayos correspondientes las células fueron tratadas con 10 µM PP2, un inhibidor de la c-Src quinasa (MEK-1; 513000; Merk Millipore, Darmstadt GE) y 25 µM PD98059, un inhibidor del mitógeno extracelular quinasa-1 (529573; Merk Millipore). Y-27632 (Merck KGaA, Cat 688000, Darmstadt, Alemania), fue preparado como un “stock” de 10 mM en agua, y utilizado a una concentración de 1 µM.

MM.4. Análisis estadístico

Los datos recopilados en este trabajo fueron procesados y analizados estadísticamente utilizando la aplicación Microsoft Office 365 Excel y Sigmaplot 14.5. Los datos se generaron contando el número de células teñidas con amarillo lucifer, como consecuencia de la inyección de una sola de ellas. Los resultados mostrados son el producto de tres ensayos experimentales independientes. El número de datos se indica en las cifras y en el texto. Los datos se representan como el valor medio y la dispersión como el error estándar de la media (SE). El análisis estadístico, como se indica en el texto y las figuras, consistió en una prueba ONEWAY, seguida de pruebas de comparación múltiple, en el caso de que los datos no cumplieran con el criterio de normalidad requerido para un análisis paramétrico, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de una prueba de comparación emparejada con respecto a un control (Método de Dunn).

Se consideró un criterio mínimo de $P<0.05$ para una diferencia estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Para saber si la ouabaína afecta la CIMUC hicimos análisis de los ensayos de transferencia de colorante en las diversas líneas celulares consideradas en este trabajo. Considerando que el Número de Células Teñidas (NCT), como resultado de haber inyectado una de ellas con amarillo lucifer, es un adecuado estimador de la CIMUC, para cada condición experimental, hicimos un número determinado de repeticiones (n), y en cada repetición NCT, para después calcular el valor promedio del número de células teñidas ($\bar{Y}_{NCT}$) así como el error estándar (ES). Con los datos recopilados se hizo, en primer lugar, un análisis ANOVA (Kruskal-Wallis), para probar la hipótesis de que la ouabaína induce un cambio significativo en CIMUC en al menos una de las concentraciones probadas. Seguidamente se comparó el $\bar{Y}_{NCT}$ de cada una de las concentraciones de ouabaína con el $\bar{Y}_{NCT}$ del grupo control (prueba de Dunn) para determinar qué concentraciones produjeron una diferencia estadísticamente significativa.

Además de esto, se ajustaron los datos, por regresión no lineal, a un modelo de dosis-respuesta (Ecuación sigmoidal):

$$\bar{Y}_{NCT,x} = \bar{Y}_{NCT,0} + \frac{\bar{Y}_{NCT,max}}{1 + e^{-(\frac{x-EC50}{b})}}$$

Donde *x* es la concentración de prueba, $\bar{Y}_{NCT,x}$ es el valor promedio del número de células teñidas a una determinada (x) concentración de ouabaína, $\bar{Y}_{NCT,max}$ es la máxima respuesta observada, $\bar{Y}_{NCT,0}$ es numero promedio de células teñidas en condiciones control, EC50 es la concentración necesaria para obtener la mitad del efecto y b es el coeficiente de Hill, un parámetro que determina la sensibilidad de la respuesta.

A continuación, se describen los resultados obtenidos en cada una de las líneas celulares consideradas en este estudio, agrupadas de acuerdo con el tipo de cáncer

al que pertenecen. Para cada una de las líneas celulares se muestra una figura compuesta que en la parte superior (A) ilustra una serie de imágenes representativas de cada condición experimental, mientras que en la parte inferior se muestra, por un lado (B) un histograma que compara los valores de $\bar{Y}_{NCT}$ de cada concentración de ouabaína con el control, así como el resultado de la comparación estadística, y por el otro (C) El ajuste de los datos a la ecuación sigmoidal, incluyendo la curva con el mejor ajuste. Asimismo, los resultados obtenidos del análisis estadístico (ANOVA, Kruskal-Wallis y Prueba de Dunn) se resumen en la tabla 1, mientras que los resultados del ajuste de los datos al modelo de dosis-respuesta se resumen en la tabla 2.

R.1 Efecto de ouabaína en la CIMUC de células derivadas de cáncer cervicouterino.

R.1.1. Efecto de ouabaína sobre la CIMUC en células CasKi. CaSki es una línea celular epitelial derivada del carcinoma epidérmico del cuello uterino metastásico al mesenterio del intestino delgado. Fueron obtenidas de una mujer caucásica de 40 años que había experimentado previamente la irradiación y el tratamiento quirúrgico de la malignidad (Patillo et al., 1977). Como se muestra en la figura R.1, y se resume en la tabla 1. CIMUC en células CasKi sin tratamiento es notablemente reducida, pues el valor de $\bar{Y}_{NCT}$ es de solo 1.4±0.1 células teñidas por inyección. No obstante, el tratamiento con ouabaína induce un incremento de $\bar{Y}_{NCT}$ que ya es estadísticamente significativo desde 0.1 nM, con 2.0 ±0.1 células teñidas por inyección ($p<0.05$). A partir de 0.1 nM, la $\bar{Y}_{NCT}$ se incrementa con la concentracion de ouabaína, alcanzando un valor maximo (6.5±0.2, $p<0.001$) cuando las células se tratan con 10 nM, y posteriormente el valor decae ligeramente a 5.2±0.2 a 500 nM. El ajuste de estos datos a la ecuación sigmoidal indica una EC50 de 0.5 nM y un valor de $\bar{Y}_{NCT,max}$ (Ymax) de 6 células teñidas por inyección.

R.1.2 Efecto de ouabaína sobre la CIMUC en células SiHa. Siha es una línea celular epitelial, adherente, obtenida carcinoma de células escamosas cervicales de una mujer asiática de 55 años relacionado con el virus del papiloma humano (Friedl et al., 1970). Como se muestra en la figura R.2, y se resume en la tabla 1. La CIMUC

en células SiHa sin tratamiento también es notablemente reducida, pues el valor de $\bar{Y}_{NCT}$ es de solo 1.3±0.1 células teñidas por inyección. El tratamiento con ouabaína induce un incremento de $\bar{Y}_{NCT}$ que ya es estadísticamente significativo a partir de 1 nM, con 2.1 ±0.1 células teñidas por inyección ($p<0.05$). A partir de 1 nM, la $\bar{Y}_{NCT}$ se incrementa con la concentracion de ouabaína, alcanzando un valor maximo (5.3±0.2, $p<0.001$) cuando las células se tratan con 50 nM, y posteriormente el valor decae ligeramente a 4.3±0.2 a 500 nM. Del ajuste de estos datos se obtuvo una EC50 de 2.1 nM y una $\bar{Y}_{NCT,max}$ (Ymax) de 5.3 células teñidas por inyección.

R.1.3 Efecto de ouabaína sobre la CIMUC en células Hela. HeLa es una línea celular epitelial, adherente, derivada de un adenocarcinoma cervical, tomado de una mujer de raza negra de 31 años. Fue la primera línea celular humana en tener éxito in vitro (Jones et al., 1971). Como se muestra en la figura R.3, y se resume en la tabla 1. La CIMUC en células HeLa sin tratamiento también es notablemente reducida, pues el valor de $\bar{Y}_{NCT}$ es de solo 1.1±0.1 células teñidas por inyección. El tratamiento con ouabaína induce un incremento de $\bar{Y}_{NCT}$ que ya es estadísticamente significativo a partir de 1 nM, con 2.0 ±0.1 células teñidas por inyección ($p<0.05$). A partir de 1 nM, la $\bar{Y}_{NCT}$ se incrementa con la concentración de ouabaína, alcanzando un valor máximo (4.8±0.2, $p<0.001$) cuando las células se tratan con 500 nM, Del ajuste de estos datos se obtuvo una EC50 de 5.8 nM y una $\bar{Y}_{NCT,max}$ (Ymax) de 5.9 células teñidas por inyección.

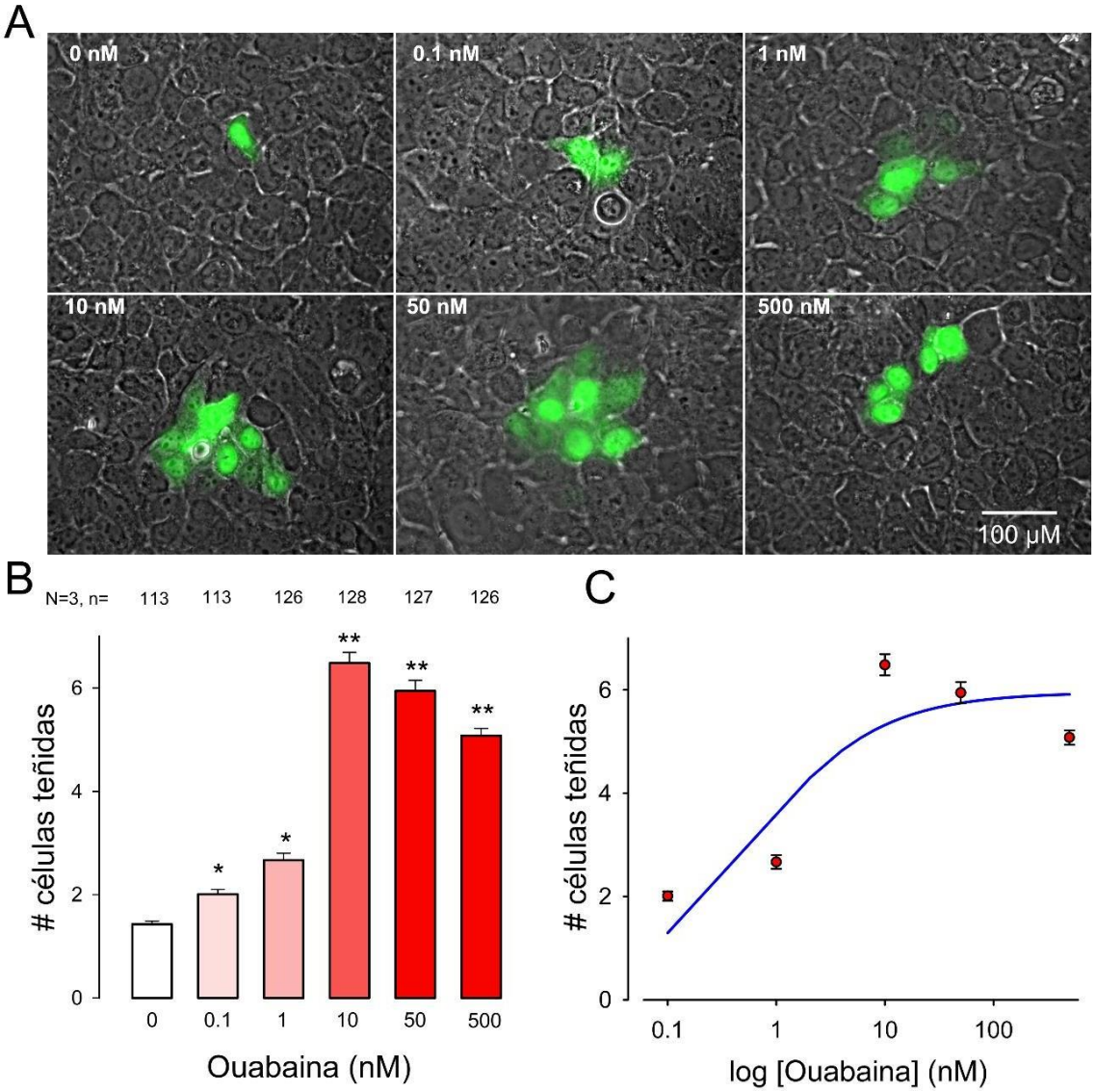


Figura R.1 Efecto de ouabaína en la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes en células CaSki. A). Imágenes representativas de los resultados obtenidos al hacer ensayos de transferencia de colorante (Amarillo Lucifer) después de tratamiento con ouabaína en las distintas concentraciones que se indican en cada imagen. Las imágenes fueron seleccionadas para coincidir con el valor modal de cada concentración. Las células se teñidas se muestran en color verde sobre un fondo gris que corresponde a un campo de contraste de fases. (B) Histograma que compara el valor promedio y error estándar del número de células teñidas en cada concentración ensayada. Los números arriba de cada barra indican el número de ensayos de transferencia. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control. (*) indica $p<0.05$, (**) indica $p<=.001$. (C) Ajuste de los datos a una función de Hill de 4 parámetros. La línea azul indica el mejor ajuste después de regresión no lineal.

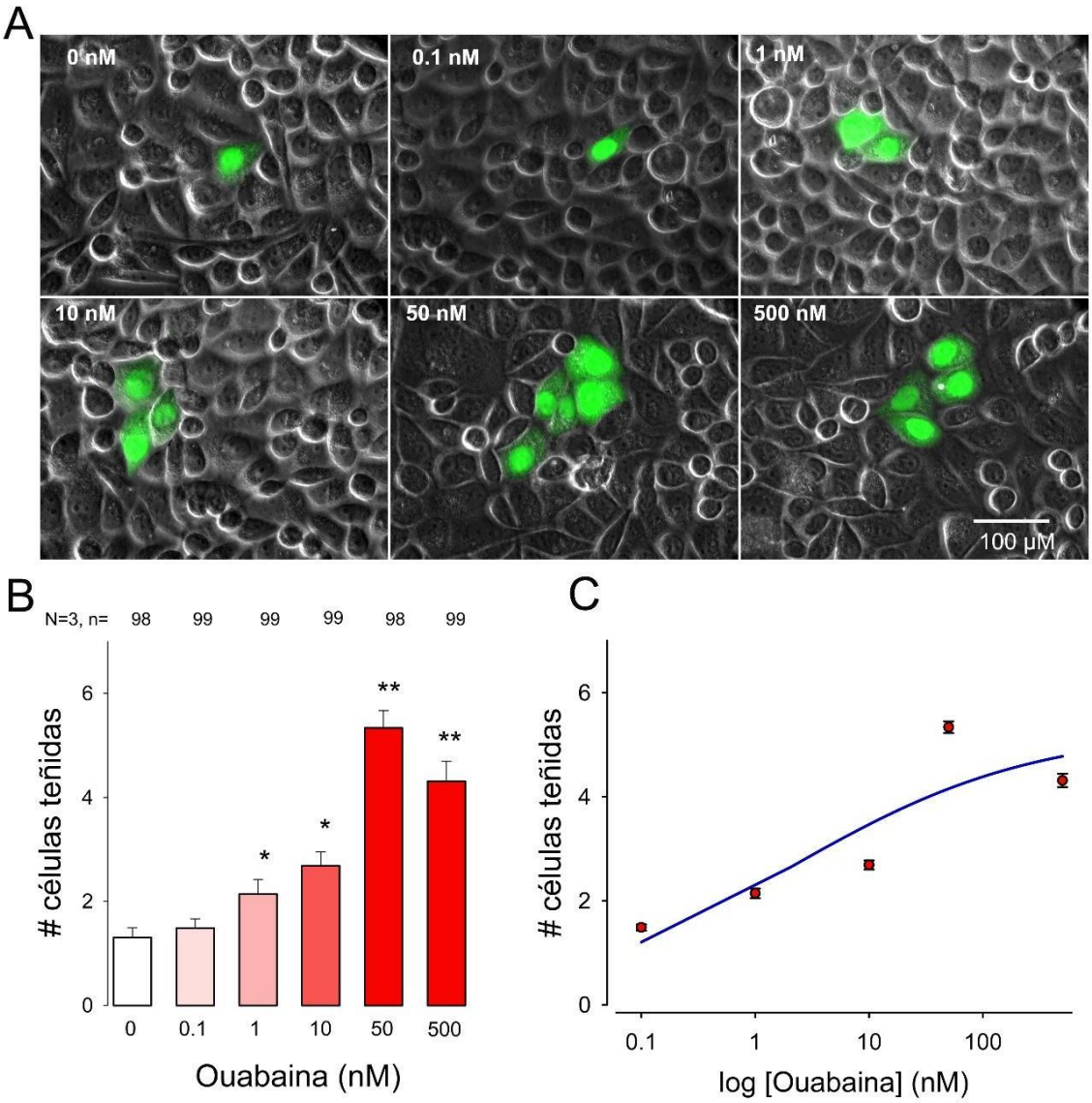


Figura R.2 Efecto de ouabaína en la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes en células SiHa. A). Imágenes representativas de los resultados obtenidos al hacer ensayos de transferencia de colorante (Amarillo Lucifer) después de tratamiento con ouabaína en las distintas concentraciones que se indican en cada imagen. Las imágenes fueron seleccionadas para coincidir con el valor modal de cada concentración. Las células se teñidas se muestran en color verde sobre un fondo gris que corresponde a un campo de contraste de fases. (B) Histograma que compara el valor promedio y error estándar del número de células teñidas en cada concentración ensayada. Los números arriba de cada barra indican el número de ensayos de transferencia. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control. (*) indica $p<0.05$, (**) indica $p<=.001$. (C) Ajuste de los datos a una función de Hill de 4 parámetros. La línea azul indica el mejor ajuste después de regresión no lineal.

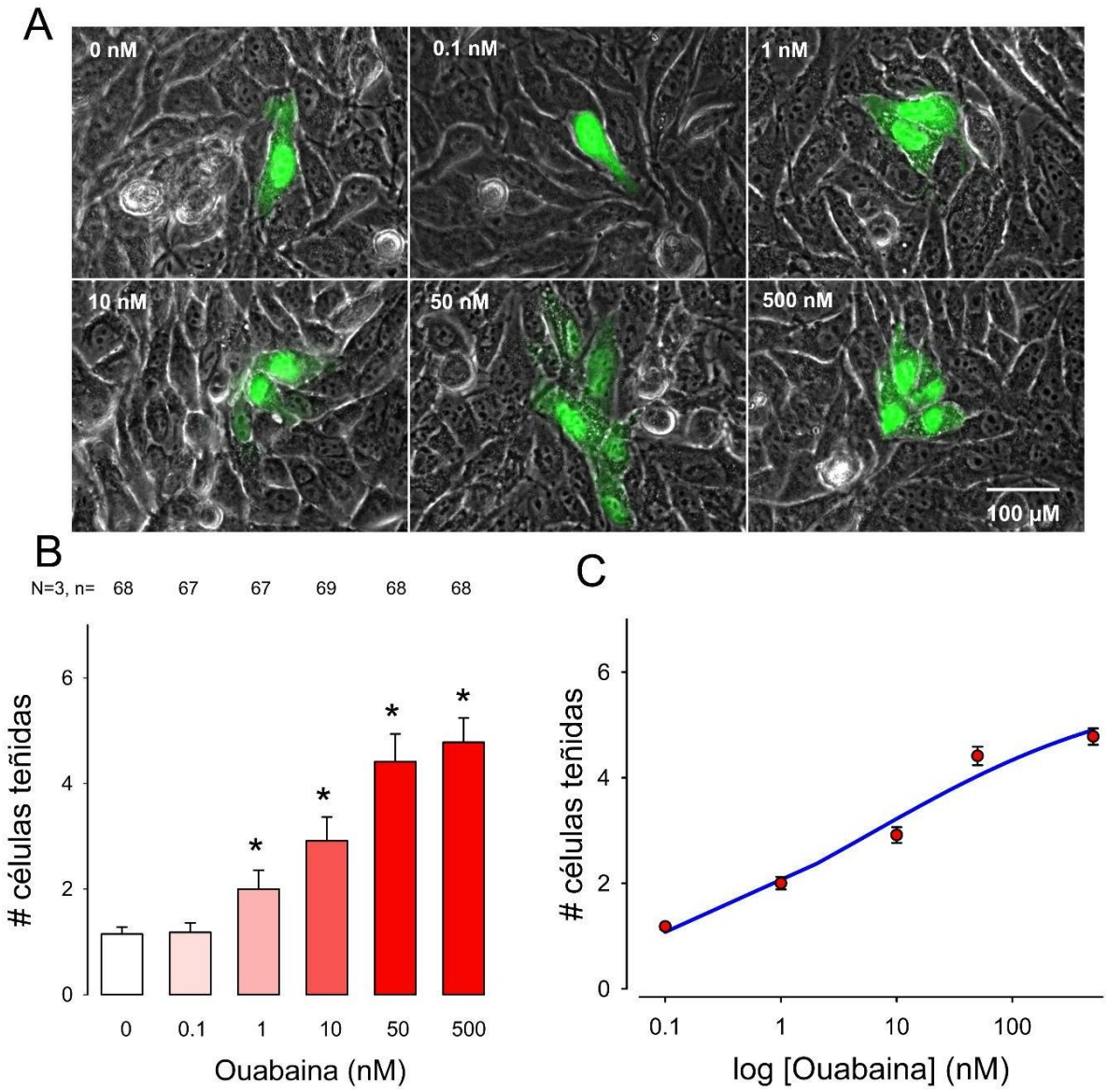


Figura R.3. Efecto de ouabaína en la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes en células Hela. A). Imágenes representativas de los resultados obtenidos al hacer ensayos de transferencia de colorante (Amarillo Lucifer) después de tratamiento con ouabaína en las distintas concentraciones que se indican en cada imagen. Las imágenes fueron seleccionadas para coincidir con el valor modal de cada concentración. Las células se teñidas se muestran en color verde sobre un fondo gris que corresponde a un campo de contraste de fases. (B) Histograma que compara el valor promedio y error estándar del número de células teñidas en cada concentración ensayada. Los números arriba de cada barra indican el número de ensayos de transferencia. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control. (*) indica $p<0.05$, (**) indica $p<=.001$. (C) Ajuste de los datos a una función de Hill de 4 parámetros. La línea azul indica el mejor ajuste después de regresión no lineal

R.2 Efecto de ouabaína en la CIMUC de células derivadas de cáncer mamario.

R.2.1 Efecto de ouabaína sobre la CIMUC en célula s MDA-MB-231. MDA-MB-231 es una variedad de células adherentes, epiteliales derivada de una efusión pleural de una mujer caucásica de 51 años con un adenocarcinoma mamario metastático. Es una línea celular de cáncer de mama triple negativo (TNBC) altamente agresiva, invasiva y mal diferenciada, ya que carece de expresión del receptor de estrógenos (ER) y del receptor de progesterona (PR), así como de la amplificación del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano 2, HER2 (Soule et al., 1973). Como se muestra en la figura R.4, y se resume en la tabla 1. La CIMUC en células MDA-MB-231 sin tratamiento también es notablemente reducida, pues el valor de $\bar{Y}_{NCT}$ es de solo 1.7±0.1 células teñidas por inyección. El tratamiento con ouabaína induce un incremento de $\bar{Y}_{NCT}$ que ya es estadísticamente significativo a partir de 1 nM, con 2.1 ±0.1 células teñidas por inyección ($p<0.05$). A partir de 1 nM, la $\bar{Y}_{NCT}$ se incrementa con la concentración de ouabaína, alcanzando un valor máximo (3.0±0.2, $p<0.001$) cuando las células se tratan con 500 nM, Del ajuste de estos datos se obtuvo una EC50 de 37.8 nM y una $\bar{Y}_{NCT,max}$ (Ymax) de 2.7 células teñidas por inyección.

R.2.2 Efecto de ouabaína sobre la CIMUC en células MCF7. MCF7 es una línea celular adherente con características del epitelio mamario diferenciado, derivado de un carcinoma ductal invasor del pecho, tomado de una mujer caucásica de 67 años (Cailleau et al., 1974). Como se muestra en la figura R.5, y se resume en la tabla 1. La CIMUC en células SiHa sin tratamiento también es notablemente reducida, pues el valor de $\bar{Y}_{NCT}$ es de solo 2.0±0.1 células teñidas por inyección. El tratamiento con ouabaína induce un incremento de $\bar{Y}_{NCT}$ que ya es estadísticamente significativo a partir de 0.1 nM, con 2.8 ±0.1 células teñidas por inyección ($p<0.05$). A partir de 0.1 nM, la $\bar{Y}_{NCT}$ se incrementa con la concentración de ouabaína, alcanzando un valor maximo (4.8±0.2, $p<0.001$) cuando las células se tratan con 50 nM, y posteriormente el valor decae ligeramente a 2.7±0.2 a 500 nM. Del ajuste de estos datos se obtuvo una EC50 de 0. 21 nM y una $\bar{Y}_{NCT,max}$ (Ymax) de 3.8 células teñidas por inyección.

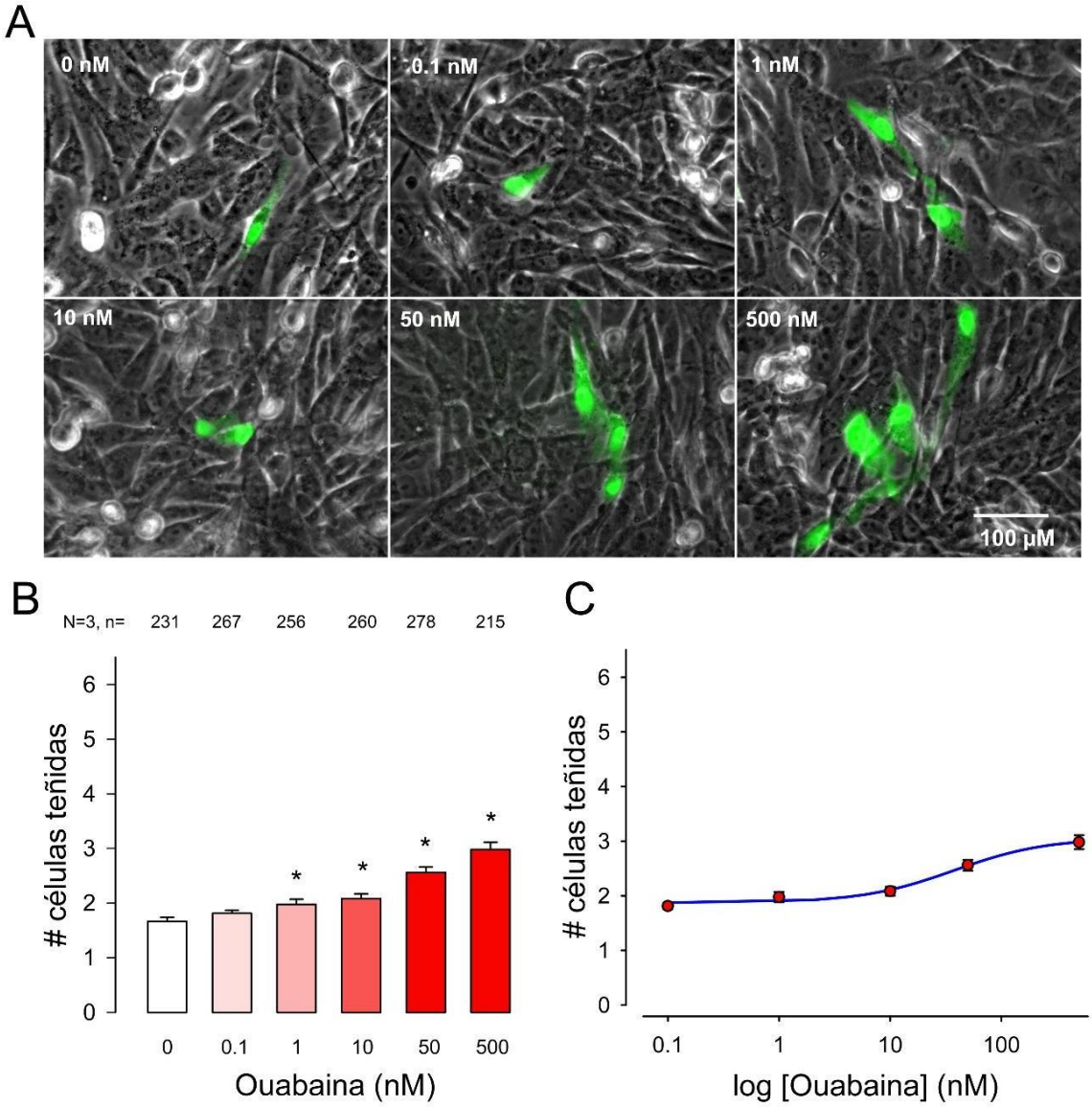


Figura R.4. Efecto de ouabaína en la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes en células MDA-MD-231. A). Imágenes representativas de los resultados obtenidos al hacer ensayos de transferencia de colorante (Amarillo Lucifer) después de tratamiento con ouabaína en las distintas concentraciones que se indican en cada imagen. Las imágenes fueron seleccionadas para coincidir con el valor modal de cada concentración. Las células se teñidas se muestran en color verde sobre un fondo gris que corresponde a un campo de contraste de fases. (B) Histograma que compara el valor promedio y error estándar del número de células teñidas en cada concentración ensayada. Los números arriba de cada barra indican el número de ensayos de transferencia. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control. (*) indica $p<0.05$, (**) indica $p<=.001$. (C) Ajuste de los datos a una función de Hill de 4 parámetros. La línea azul indica el mejor ajuste después de regresión no lineal.

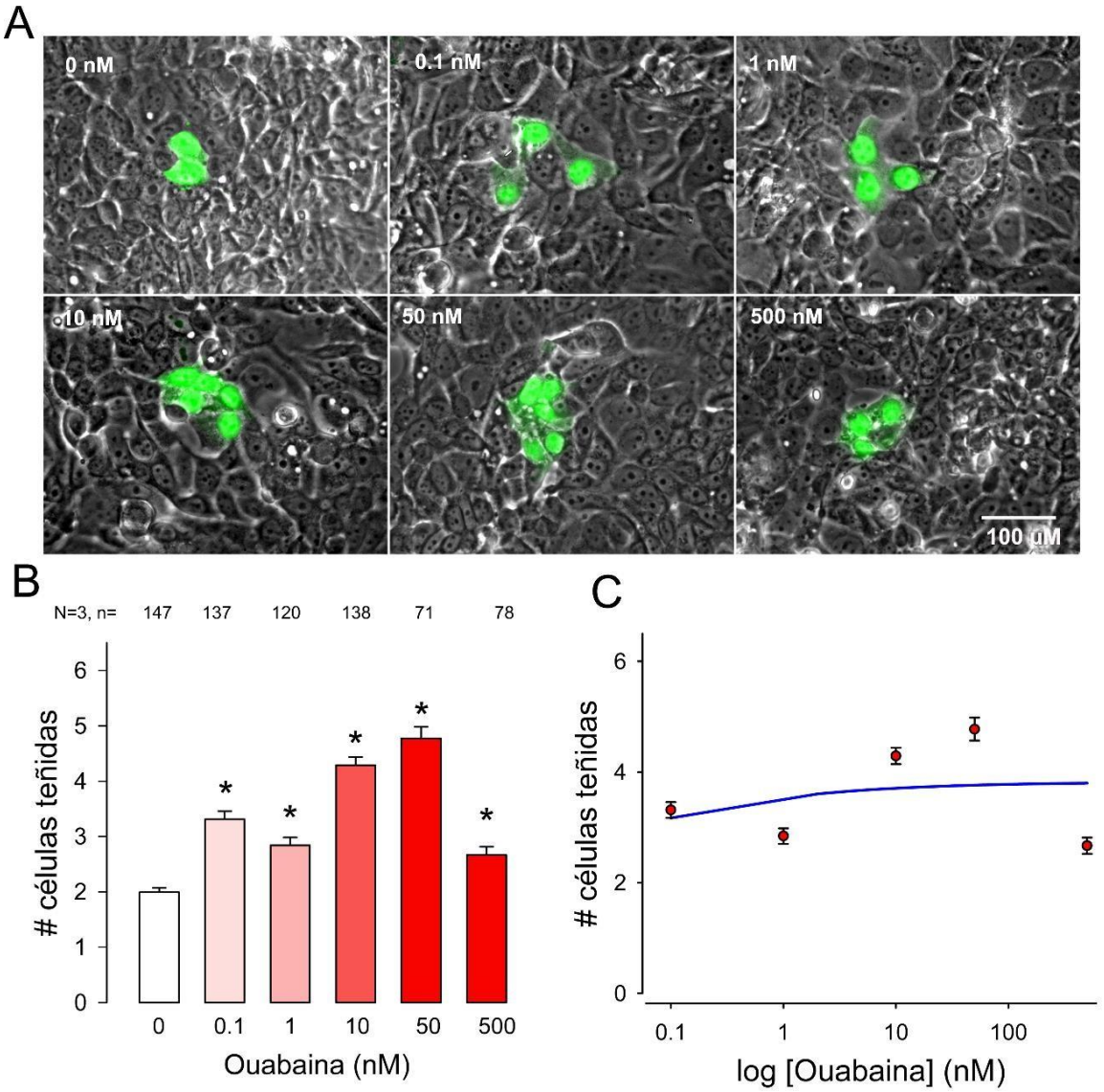


Figura R.5. Efecto de ouabaína en la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes en células MCF7. A). Imágenes representativas de los resultados obtenidos al hacer ensayos de transferencia de colorante (Amarillo Lucifer) después de tratamiento con ouabaína en las distintas concentraciones que se indican en cada imagen. Las imágenes fueron seleccionadas para coincidir con el valor modal de cada concentración. Las células se teñidas se muestran en color verde sobre un fondo gris que corresponde a un campo de contraste de fases. (B) Histograma que compara el valor promedio y error estándar del número de células teñidas en cada concentración ensayada. Los números arriba de cada barra indican el número de ensayos de transferencia. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control. (*) indica $p<0.05$, (**) indica $p<=.001$. (C) Ajuste de los datos a una función de Hill de 4 parámetros. La línea azul indica el mejor ajuste después de regresión no lineal.

R.3 Efecto de ouabaína en la CIMUC de células derivadas de cáncer de pulmón

R.3.1 Efecto de ouabaína sobre la CIMUC en células A549. A549 es una línea celular epitelial adherente, derivada de una biopsia del carcinoma del pulmón de un varón caucásico de 58 años (Foster et al., 1998). Como se muestra en la figura R.6, y se resume en la tabla 1. La CIMUC en células A549 sin tratamiento también es notablemente reducida, pues el valor de $\bar{Y}_{NCT}$ es de solo 1.4±0.1 células teñidas por inyección. El tratamiento con ouabaína induce un incremento de $\bar{Y}_{NCT}$ que es estadísticamente significativo a partir de 10 nM, con 3.5 ±0.1 células teñidas por inyección ($p<0.05$). A partir de 10 nM, la $\bar{Y}_{NCT}$ se incrementa con la concentracion de ouabaína, alcanzando un valor maximo (5.0±0.2, $p<0.001$) cuando las células se tratan con 50 nM, y posteriormente el valor decae ligeramente a 4.6±0.2 a 500 nM. Del ajuste de estos datos se obtuvo una EC50 de 2.0 nM y una $\bar{Y}_{NCT,max}$ (Ymax) de 5.3 células teñidas por inyección.

R.4 Efecto de ouabaína en la CIMUC de células derivadas de cáncer de colon.

R.4.1 Efecto de ouabaína sobre la CIMUC en células SW480. SW480 es una línea celular epitelial adherente, aislada de un adenocarcinoma primario que surge en el colon (Liebovitz el al., 1976). Como se muestra en la figura R.2, y se resume en la tabla 1. La CIMUC en células SW480 sin tratamiento también es notablemente reducida, pues el valor de $\bar{Y}_{NCT}$ es de solo 1.7±0.1 células teñidas por inyección. El tratamiento con ouabaína induce un incremento de $\bar{Y}_{NCT}$ que ya es estadísticamente significativo a partir de 1 nM, con 3.3 ±0.1 células teñidas por inyección ($p<0.05$). A partir de 1 nM, la $\bar{Y}_{NCT}$ se incrementa con la concentracion de ouabaína, alcanzando un valor maximo (5.9±0.2, $p<0.001$) cuando las células se tratan con 10 nM, y posteriormente el valor decae ligeramente a 4.3±0.2 a 500 nM. Del ajuste de estos datos se obtuvo una EC50 de 0.3 nM y una $\bar{Y}_{NCT,max}$ (Ymax) de 5.7 células teñidas por inyección.

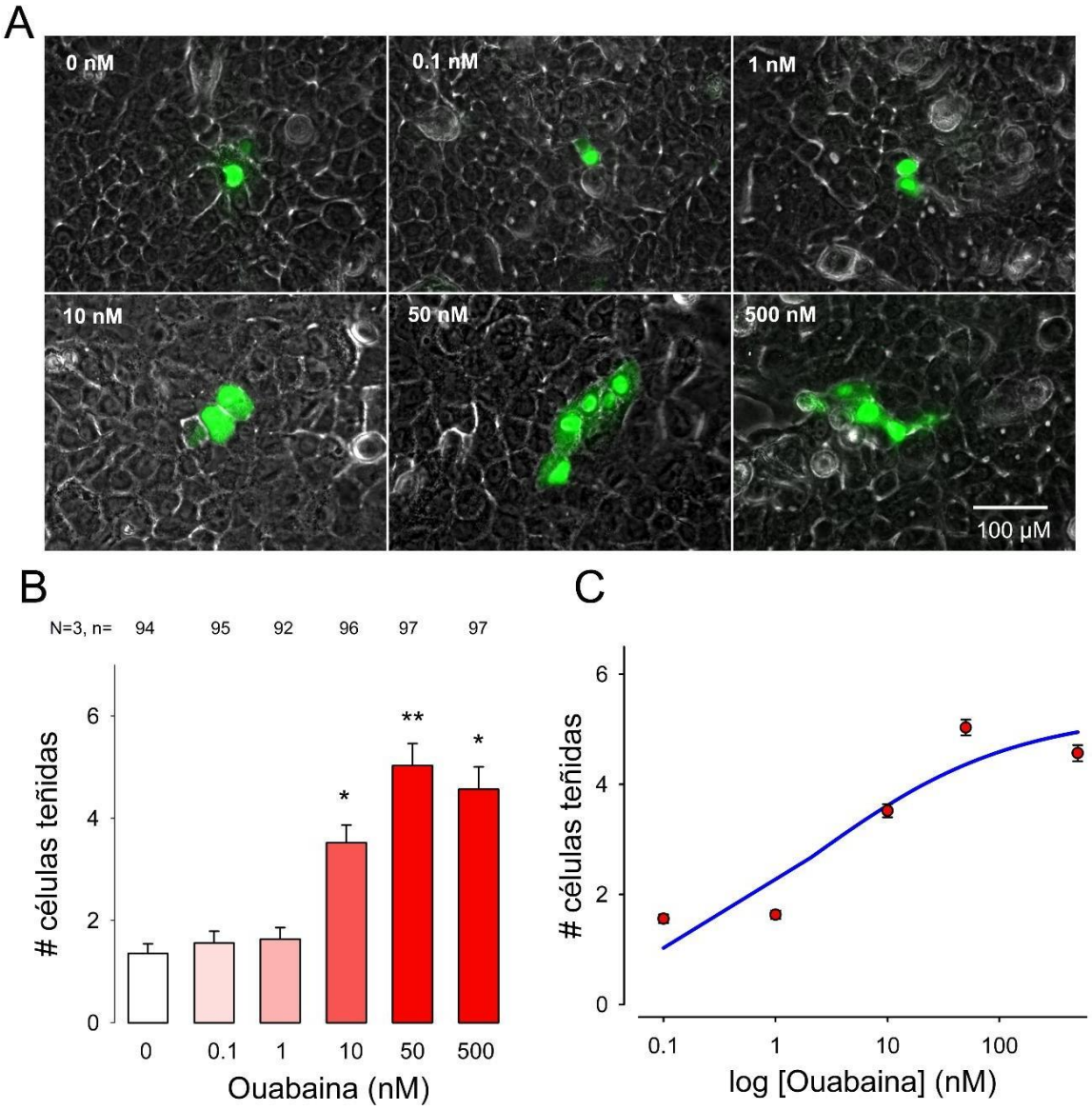


Figura R.6. Efecto de ouabaína en la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes en células A549. A). Imágenes representativas de los resultados obtenidos al hacer ensayos de transferencia de colorante (Amarillo Lucifer) después de tratamiento con ouabaína en las distintas concentraciones que se indican en cada imagen. Las imágenes fueron seleccionadas para coincidir con el valor modal de cada concentración. Las células se teñidas se muestran en color verde sobre un fondo gris que corresponde a un campo de contraste de fases. (B) Histograma que compara el valor promedio y error estándar del número de células teñidas en cada concentración ensayada. Los números arriba de cada barra indican el número de ensayos de transferencia. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control. (*) indica $p<0.05$, (**) indica $p<=.001$. (C) Ajuste de los datos a una función de Hill de 4 parámetros. La línea azul indica el mejor ajuste después de regresión no lineal.

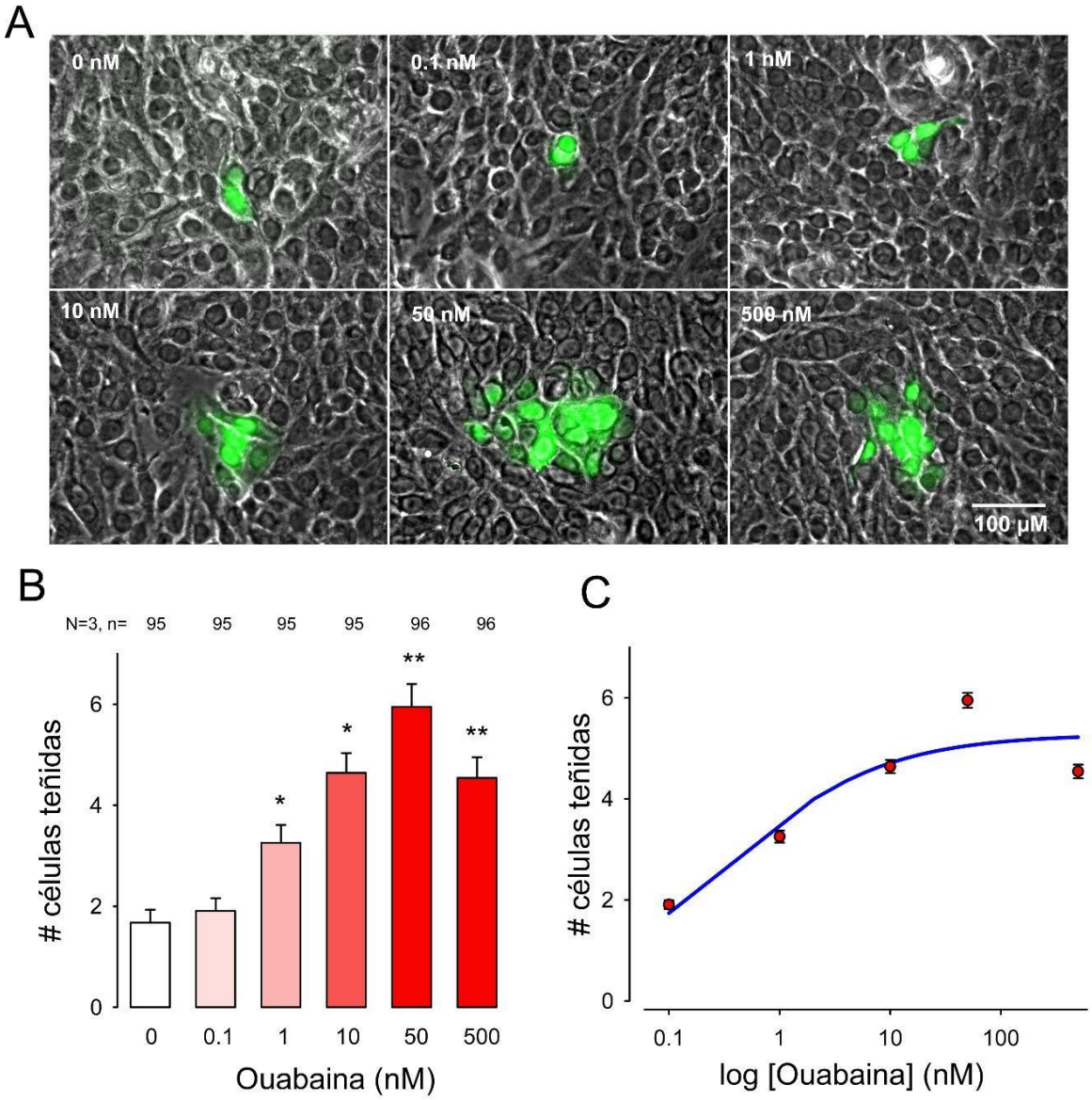


Figura R.7. Efecto de ouabaína en la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes en células SW480. A). Imágenes representativas de los resultados obtenidos al hacer ensayos de transferencia de colorante (Amarillo Lucifer) después de tratamiento con ouabaína en las distintas concentraciones que se indican en cada imagen. Las imágenes fueron seleccionadas para coincidir con el valor modal de cada concentración. Las células se teñidas se muestran en color verde sobre un fondo gris que corresponde a un campo de contraste de fases. (B) Histograma que compara el valor promedio y error estándar del número de células teñidas en cada concentración ensayada. Los números arriba de cada barra indican el número de ensayos de transferencia. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control. (*) indica $p<0.05$, (**) indica $p<=.001$. (C) Ajuste de los datos a una función de Hill de 4 parámetros. La línea azul indica el mejor ajuste después de regresión no lineal.

R.5 Efecto de ouabaína en la CIMUC de células derivadas de cáncer de próstata.

R.5.1 Efecto de ouabaína sobre la CIMUC en células Hpaf-II. Hpaf-II es una línea celular epitelial adherente, derivada del líquido ascítico de un varón de 44 años, paciente caucásico con adenocarcinoma **pancreático (**Metzgar et al., 1982; Kim et al, 1989). Como se muestra en la figura R.8, y se resume en la tabla 1. La CIMUC en células Hpaf-II sin tratamiento también es notablemente reducida, pues el valor de $\bar{Y}_{NCT}$ es de solo 1.1±0.1 células teñidas por inyección. El tratamiento con ouabaína induce un incremento de $\bar{Y}_{NCT}$ que ya es estadísticamente significativo a partir de 1 nM, con 2.5 ±0.2 células teñidas por inyección ($p<0.05$). A partir de 1 nM, la $\bar{Y}_{NCT}$ se incrementa con la concentración de ouabaína, alcanzando un valor maximo (5.4±0.2, $p<0.001$) cuando las células se tratan con 10 nM, y posteriormente el valor decae ligeramente a 4.6±0.2 a 500 nM. Del ajuste de estos datos se obtuvo una EC50 de 0.6 nM y una $\bar{Y}_{NCT,max}$ (Ymax) de 5.1 células teñidas por inyección.

Con base en los resultados hasta aquí mostrados, se puede concluir entonces que (1) Las células cancerosas, efectivamente tienen, notablemente disminuida la CIMUC, como lo indican los valores obtenidos de $\bar{Y}_{NCT}$ en condiciones control, que en todas las líneas celulares tuvieron un rango de entre 1.1 y 2.0 células teñidas por inyección. (2) La ouabaína efectivamente incremento la CIMUC, como se comprueba por el hecho de que la prueba ANOVA reportó un resultado afirmativo ($p<0.05$) en todas las líneas celulares (Tabla 1).

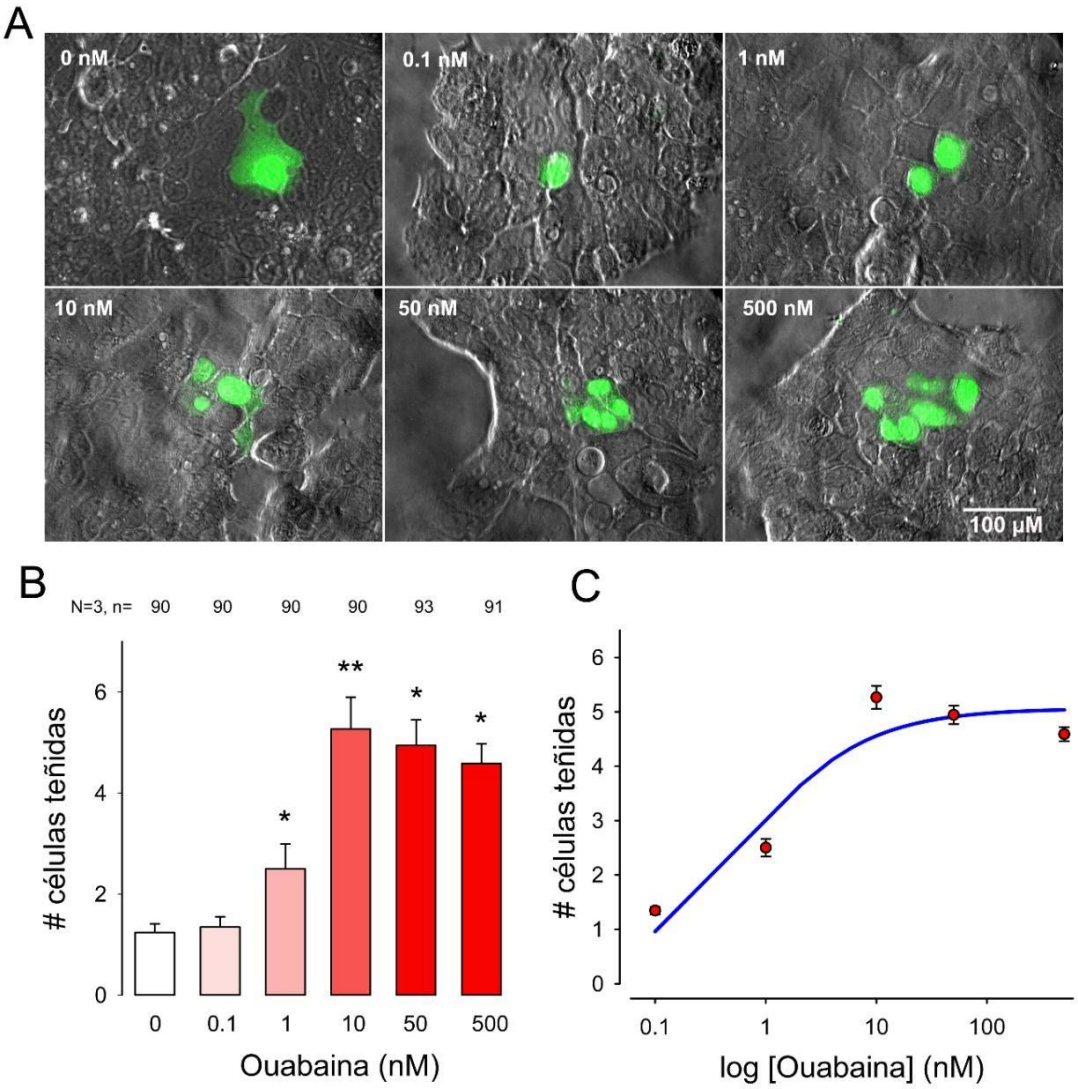


Figura R.8. Efecto de ouabaína en la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes en células Hpaf II. A). Imágenes representativas de los resultados obtenidos al hacer ensayos de transferencia de colorante (Amarillo Lucifer) después de tratamiento con ouabaína en las distintas concentraciones que se indican en cada imagen. Las imágenes fueron seleccionadas para coincidir con el valor modal de cada concentración. Las células se teñidas se muestran en color verde sobre un fondo gris que corresponde a un campo de contraste de fases. (B) Histograma que compara el valor promedio y error estándar del número de células teñidas en cada concentración ensayada. Los números arriba de cada barra indican el número de ensayos de transferencia. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control. (*) indica $p<0.05$, (**) indica $p<=.001$. (C) Ajuste de los datos a una función de Hill de 4 parámetros. La línea azul indica el mejor ajuste después de regresión no lineal.

Linea Cel	Ouabaina (nM)																			
	0			0.1				1				10				50				500
	Yx	SE	n	Yx	SE	n	p<0.05	Yx	SE	n	p<0.05	Yx	SE	n	p<0.05	Yx	SE	n	p<0.05	Yx
CaSki	1.4	0.1	113	2.0	0.1	113	No	2.7	0.1	126	Si	6.5	0.2	128	Si	5.9	0.2			
SiHa	1.3	0.1	98	1.5	0.1	99	No	2.1	0.1	99	Si	2.7	0.1	99	Si					
HeLa	1.1	0.0	68	1.2	0.1	67	No	2.0	0.1	67	Si	2.9	0							
MDA	1.7	0.1	231	1.8	0.1	267	No	2.0	0.1	256										
MCF7	2.0	0.1	147	3.3	0.1	137	Si	2												
A549	1.4	0.1	94	1.6	0.1															
SW480	1.7	0.1																		
Hpaf1																				

Tabla 1. Resumen del análisis estadístico del efecto de ouabaína sobre la CIMUC en las distintas líneas cancerosas incluidas en este estudio. La tabla muestra, para cada línea celular, de manera resumida los valores de Yx, el valor promedio de numero de células teñidas como resultado de una inyección de amarillo lucifer, así como el error estándar (ES) y el número de repeticiones (n) que resultaron de cada una de las distintas concentraciones de ouabaína que se analizaron. También se muestra, para cada concentración el resultado de comparaciones múltiples. También se muestra, para cada línea celular el resultado de la prueba ANOVA (Kruskal-Wallis).

Linea Cel	Ymax	Hill Coef	EC50	y0	R
CaSki	6.0	-0.7	0.6		0.6
SiHa	5.3	-0.4	2.1		0.7
HeLa	5.9	-0.4	5.8		0.8
MDA	2.7	-1.0	37.8	1.9	0.5
MCF7	3.8	-0.4	0.0		0.3
A549	5.3	-0.5	2.0		0.8
HPAF1	5.1	-0.8	0.6		0.7
SW480	5.7	-0.6	0.3		0.7

Tabla 2. Resúmen los valores resultantes tras el ajuste de los datos al modelo sigmoidal.

R.6. Octanol suprime el aumento de CIMUC inducido por ouabaína.

Para probar que las células vecinas se tiñen a través de uniones comunicantes, probamos, en células MCF7 y MDA-MB-231, el efecto del octanol, un bloqueador de uniones gap ampliamente conocido (Weingart y Bukauskas, 1998; Manjarrez-Marmolejo y Franco-Pérez, 2016), en la respuesta observada por ouabaína. En ambos tipos de células comparamos $\bar{Y}_{NCT}$ con y sin tratamiento de ouabaína y octanol. Como se muestra en la Figura 4, el tratamiento de las células MCF7 con octanol, sin ouabaína, no produjo un cambio significativo de $\bar{Y}_{NCT}$ (1,1±0,03, n=96) en comparación con el de la condición de control, (1,2±0,04, n=97); el tratamiento con ouabaína, sin octanol produjo un aumento significativo de $\bar{Y}_{NCT}$ (4,8±0,38, n=96) en comparación con el control; el tratamiento con ouabaína + octanol redujo significativamente $\bar{Y}_{NCT}$ (1,3±0,05) en comparación con el obtenido con ouabaína solamente (Mann-Whitney Rank Sum Test, p<0,001).

El tratamiento de las células MDA-MD-231 con octanol produjo resultados similares: El valor de $\bar{Y}_{NCT}$ de células tratadas con octanol (1,4±0,07, n=100) no fue significativamente diferente del control (1,46±0,07, n=100); las células tratadas con ouabaína tuvieron una $\bar{Y}_{NCT}$ 3.06±0.10 (n=100), que fue notablemente mayor que el control (p<0.001); el tratamiento con ouabaína + octanol redujo significativamente la $\bar{Y}_{NCT}$ (1,59±0,07,n=100), en comparación con la obtenida con ouabaína solamente (p<0,001). Estos resultados demuestran, por lo tanto, que las células vecinas a las células inyectadas con amarillo lucifer, adquieren la tinción a través uniones comunicantes.

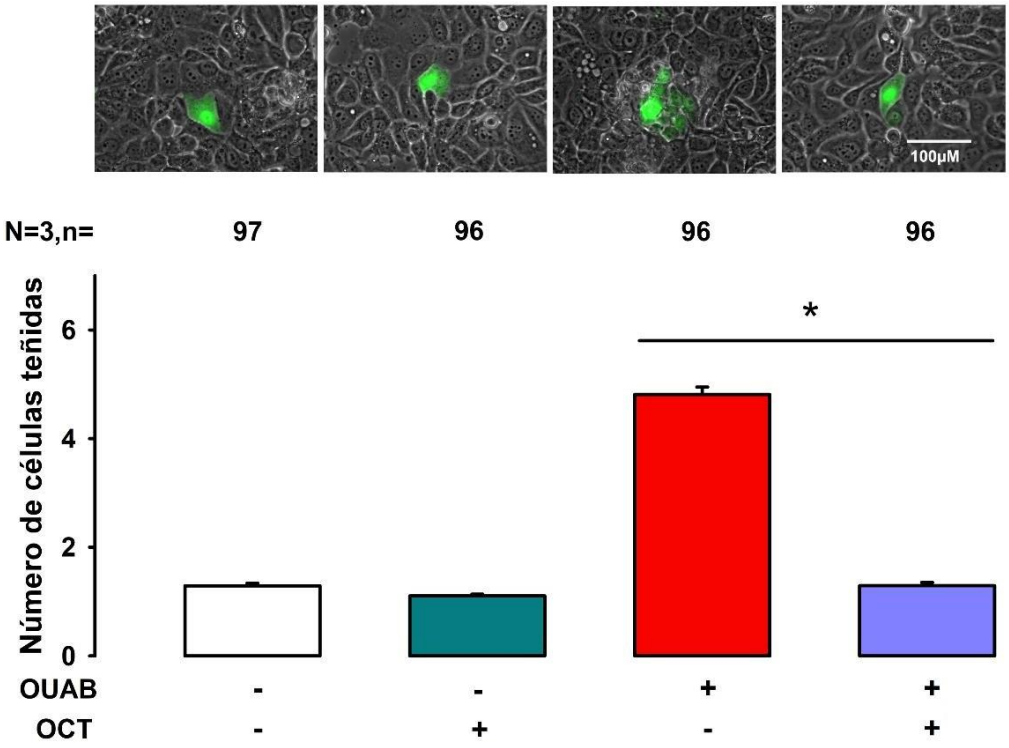


Figura R.9. Octanol anula el incremento en la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes ocasionada por ouabaína en células MCF7. En la figura se muestra, en la parte superior, imágenes representativas de los resultados obtenidos al hacer ensayos de transferencia de colorante (Amarillo Lucifer), en las distintas condiciones experimentales señaladas al pie de cada barra del histograma. Las imágenes fueron seleccionadas para coincidir con el valor modal de Yx en cada condición experimental. Las células se teñidas se muestran en color verde sobre un fondo gris que corresponde a un campo de contraste de fases. El histograma que compara Yx y error estándar del número de células teñidas en cada condición ensayada. Los números arriba de cada barra indican el número de ensayos de transferencia. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control. (*) indica $p<0.05$.

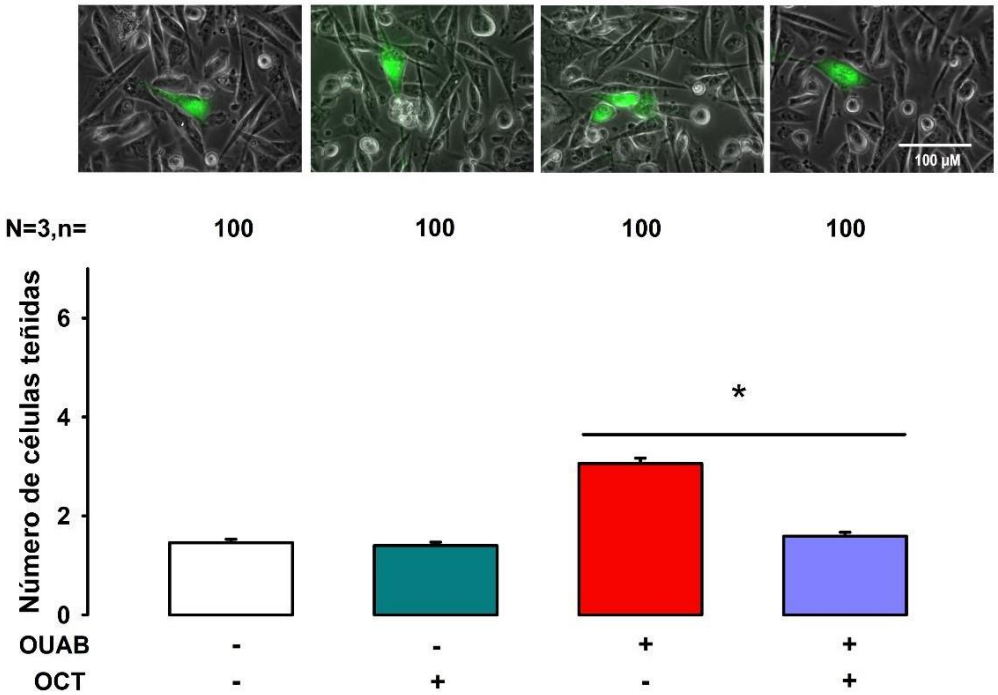


Figura R.10. Octanol anula el incremento en la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes ocasionada por ouabaína en células MDA-MB-231. En la figura se muestra, en la parte superior, imágenes representativas de los resultados obtenidos al hacer ensayos de transferencia de colorante (Amarillo Lucifer), en las distintas condiciones experimentales señaladas al pie de cada bartra del histograma. Las imágenes fueron seleccionadas para coincidir con el valor modal de Yx en cada condición experimental. Las células se teñidas se muestran en color verde sobre un fondo gris que corresponde a un campo de contraste de fases. El histograma que compara Yx y error estándar del número de células teñidas en cada condición ensayada. Los números arriba de cada barra indican el número de ensayos de transferencia. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control. (*) indica $p<0.05$.

R.7. No se requiere síntesis de nuevas unidades de proteínas o ARNm para que la ouabaína induzca el incremento de CIMUC.

Como hemos descrito anteriormente, hemos probado el efecto de la ouabaína sobre CIMUC variando la concentración de ouabaína, pero manteniendo constante el tiempo de tratamiento durante una hora, esto debido a que en nuestros estudios previos con células MDCK hemos observado que este es el momento en el que se consigue una respuesta máxima. En los mismos estudios anteriores, hemos demostrado que durante este tiempo no se requiere ninguna síntesis de nuevas unidades de proteínas para lograr esa respuesta. Por lo tanto, en este trabajo nos preguntamos si las variedades de células derivadas de cáncer requieren la síntesis de ARNm o de nuevas subunidades de proteína para que ouabaína induzca el aumento de CIMGJ. Para este propósito, se sondeó el efecto de la cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, y la actinomicina D, un inhibidor de la síntesis de ARNm, en CIMUC inducida por ouabaína, Hicimos tres ensayos independientes de transferencia de colorante en células MDA y MCF7 para medir y comparar $\bar{Y}_{NCT}$ bajo las siguientes condiciones: control (no tratado), o tratado con cicloheximida, actinomicina D, ouabaína + cicloheximida, ouabaína + actinomicina D. Como se muestra en la figura 5, las células MCF7 tratadas con ouabaína tenían un $\bar{Y}_{NCT}$ de 5,3±0,2 (n= 90) que fue estadísticamente diferente (p<0,001, Mann-Withney) en comparación con el control (1,5±0,1, n = 90). El $\bar{Y}_{NCT}$ de células tratadas con cicloheximida (1,4±0,1,n=90) o actinomicina D (1,5±0,1, n=91) no fue estadísticamente diferente del control (H=1,2,P=0,5, Kruskal-Wallis). Esto indica que ninguno de los dos fármacos tiene un efecto por sí mismo. El $\bar{Y}_{NCT}$de células MCF7 tratadas con ouabaína + cicloheximida (5,4±0,2, n=90) o ouabaína + actinomicina D (5,7±0,2, n=92) no fue estadísticamente diferentes (H=2,1, P=0,34) de la ouabaína (5,3±0,2, n=90), lo que indica que ni la síntesis de ARNm nuevo, ni las unidades de proteínas son necesarias para que la ouabaína mejore la CIMUC. Los resultados con células MDA fueron similares, ya que el $\bar{Y}_{NCT}$ de células tratadas con ouabaína (4,3±0,2,n=90) fue estadísticamente diferente (p<0,001, Mann-Withney) del control(1,5±0,1,n=90). Las $\bar{Y}_{NCT}$ de células tratadas con cicloheximida

(1,7±0,1,n=86) o actinomicina D (1,6±0,1, n=90) no fueron estadísticamente diferentes del control (H=1,4,P=0,5, Kruskal-Wallis). El $\bar{Y}_{NCT}$ de las células MDA tratadas con ouabaína +cicloheximida (5,4±0,2) o ouabaína + actinomicina D (5,7±0,2) no fue estadísticamente diferente~~s~~ a los de la ouabaína (H=3,1, P=0,21), lo que indica que ni se requiere síntesis de ARNm nuevo, ni unidades de proteínas para que la ouabaína mejore la CIMUC. Por lo tanto, estos resultados indican que bajo las condiciones experimentales usadas, ni en MDA ni en ~~células~~ MCF7, se requiere la síntesis de nuevas unidades de ARNm o de proteínas, para que ouabaína aumente CIMUC.

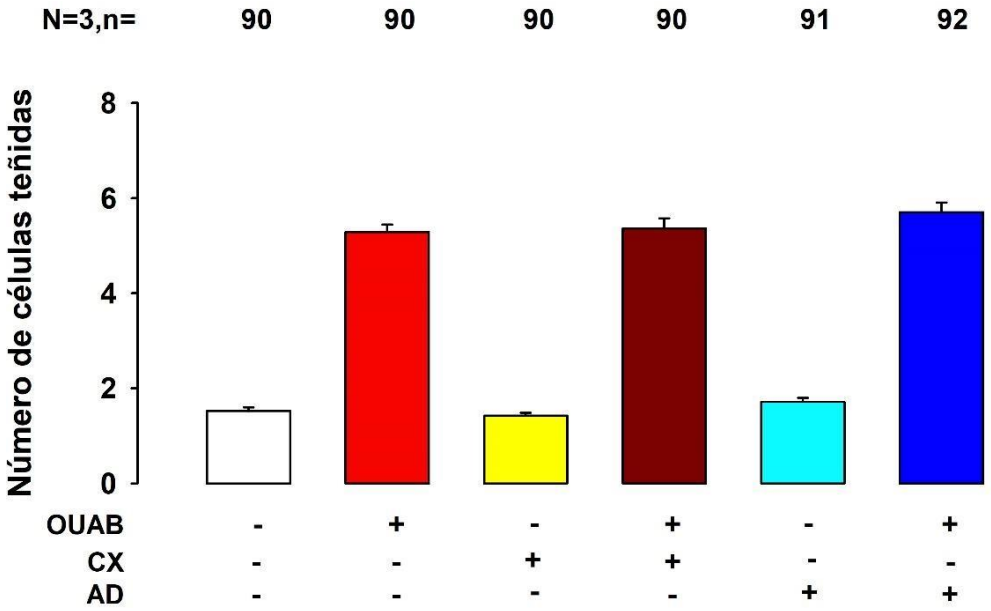


Figura R.11. Efecto de cicloheximida y actinomicina D en el incremento de CIMUC inducida por ouabaína en células MDA-MB-231..El histograma que compara el valor promedio y error estándar del número de células teñidas, en presencia y ausencia de ouabaína (OUAB) y en presencia y ausencia de cicloheximida (CX) y actinomicina D (AD). Los números arriba de cada barra indican el número de ensayos de transferencia. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control. (*) indica $p<0.05$, (**) indica $p<=.001$.

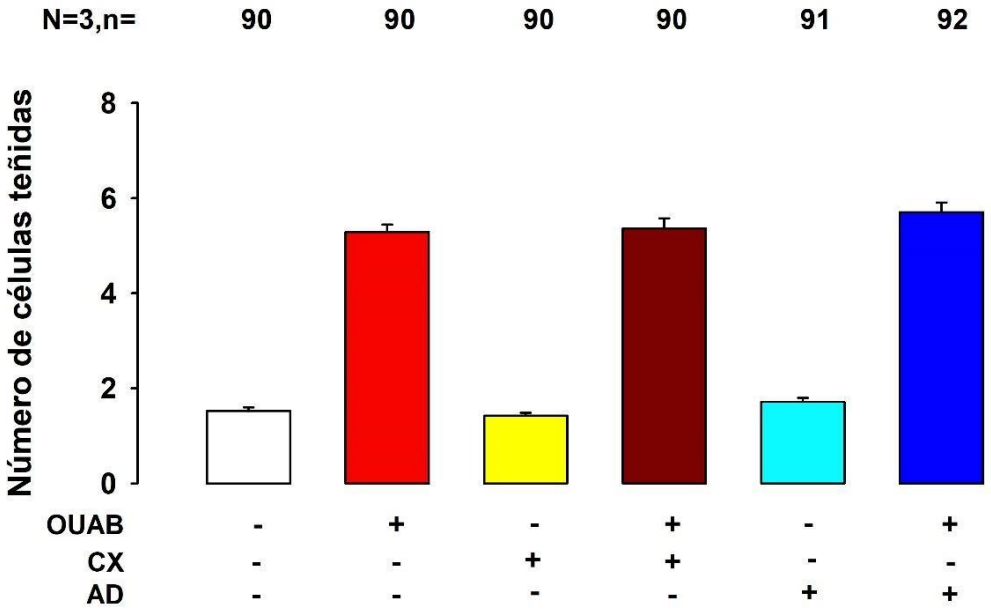


Figura R.12. Efecto de cicloheximida y actinomicina D en el incremento de CIMUC inducida por ouabaína en células MCF7. El histograma que compara el valor promedio y error estándar del número de células teñidas, en presencia y ausencia de ouabaína (OUAB) y en presencia y ausencia de cicloheximida (CX) y actinomicina D (AD). Los números arriba de cada barra indican el número de ensayos de transferencia. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control. (*) indica $p<0.05$, (**) indica $p<=.001$

R.8. Participación de c-Src,ERK1/2 y Rho-ROCK en las vías de señalización involucradas en el incremento de CIMUC inducido por ouabaína.

Se ha descrito que, además de su papel como bomba electrogénica, la Na(+)/K(+)-ATPasa también actúa como un transductor de señal, acoplado a un signalosoma, que activa varias vías de señalización intracelular (Wang et al., 2004; Zhang et al., 2006), que pueden incluir c-Src e IP3-Receptor, los cuales activan ERK1/2, que a su vez activan diversos procesos celulares como el crecimiento celular, la apoptosis y la motilidad celular (Abramowitz et al., 2003 ; et al., 2005; Barwe et al.,2004). También puede incluir Rho, una familia de pequeñas GTPasas que participan en una amplia variedad de funciones celulares como el tráfico vesicular, el ciclo celular, la dinámica transcriptómica, la polaridad celular, así como en la organización y modulación de las uniones celulares por el citoesqueleto (Heasman y Ridley, 2008 ; Mack y Georgiou, 2014;Vasioukhin et al., 2000; Kovacs et al., 2002). ROCK (Rho-associated protein kinase) es una serina-treonina quinasa que como efector de Rho A, se ha propuesto que pudiera estar implicada en el mantenimiento de la integridad de TJ en células endoteliales (Wojciak-Stothard B y Ridley, 2002).

Hemos demostrado que tanto c-Src y ERK1/2 participan en las vías de señalización por las cuales la unión de ouabaína a la ATPasa Na / K mejora CIMUC en las células epiteliales (Ponce et al., 2014: Ponce et al., 2016). Por esta razón, hemos considerado la posibilidad de que c-Src, ERK1/2 y Rho-ROCK son componentes que participan en la vía de señalización por la cual la ouabaína producir cambios en CIMUC en las líneas celulares de cáncer. Para investigarlo, realizamos el mismo abordaje experimental ya descrito, con el fin de comparar el efecto que causa la ouabaína en CIMUC por sí misma con el obtenido cuando las células también son tratadas con inhibidores específicos de c-Src, ERK1/2 y Rho-ROCK. Para probar la implicación de c-Src, analizamos el efecto de PP2 (10 μM durante 1 hora), un compuesto que ha sido demostrado ser un potente y altamente selectivo minhibidor de la familia Src tirosina cinasa (Hanke et al., 1996; Bain et al., 2007; Brandvold et al., 2012). Para probar la participación de ERK1/2, se ensayó el efecto de PD98059 (25 μM,1 hora), un compuesto que se ha demostrado que es un potente inhibidor

(IC50 = 4 μM), altamente selectivo y permeable a las células de MEK1 y MEK2 (Reiners et al., 1998; Alessi et al., 1995; Di Paola R, et al, 2010; Rojewska et al, 2015; Pan Huang et al., 2013). Para probar la implicación de Rho-ROCK, analizamos el efecto de 1μM Y-27632 (Y27), un inhibidor permeable a las células, altamente potente y selectivo de ROCK, una proteína quinasa asociada a Rho (Ishizaki et al., 2000). Se probó el efecto de estos inhibidores en las células MCF7 y MDA-MB-231. Como se muestra en la Figura 6, los $\bar{Y}_{NCT}$ después de tres ensayos independientes fueron, para MDA: Control (1,3±0,1, n=88), DP (1,5±0,1, n=86), PP2 (1,5±0,1, n=89), Y27 (1,4±0,1, n=88); ouabaína (4.1±0.2, n=86), ouabaína+PD (1.8±0.1, n=85), ouabaína+PP2 (1.9±0.1, n=88), ouabaína+Y27 (2.1±0.1, n=88); Para MCF7: Control (1.4±0.1, n=84), PD (1.4±0.1, n=85), PP2 (1.4±0.1, n=84), Y27 (1.4±0.1, n=83), ouabaína (5.4±0.2, n=84), ouabaína+PD (2.1±0.1, n=83), ouabaína+PP2 (2.1±0.1, n=84), ouabaína+Y27 (2.2±0.1, n=83).

En ambas líneas celulares, los inhibidores por si mismos no produjeron ningún efecto significativo sobre CIMUC. Esto se concluye del hecho de que, al comparar los grupos tratados con inhibidores solamente versus control, mediante la prueba de ANOVA (Kruskal-Wallis), no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa, ni para MCF7 (H-0,82, P-0,85), ni para MDA (H-4,0, P-0,25). Sin embargo, al comparar el grupo tratado sólo con ouabaína con los grupos tratados con los inhibidores más ouabaína, la prueba de Kruskal-Wallis mostró que, si hay una diferencia estadísticamente significativa, tanto para MCF7 (H-163, P<0,001) como para MDA (H-114, p<0,001). Posteriormente, las pruebas múltiples de la comparación contra el control (método de Dunn) indican que hay diferencia estadísticamente significativa (p<0,05) para todos los inhibidores, en ambas variedades de células. Estos resultados indican que en ambas líneas celulares (MCF7 y MDA-MB-231) cSrc, ERK1/2 y Rho-ROCK están incluidos en los mecanismos de señalización implicados en el efecto de la ouabaína sobre CIMUC.

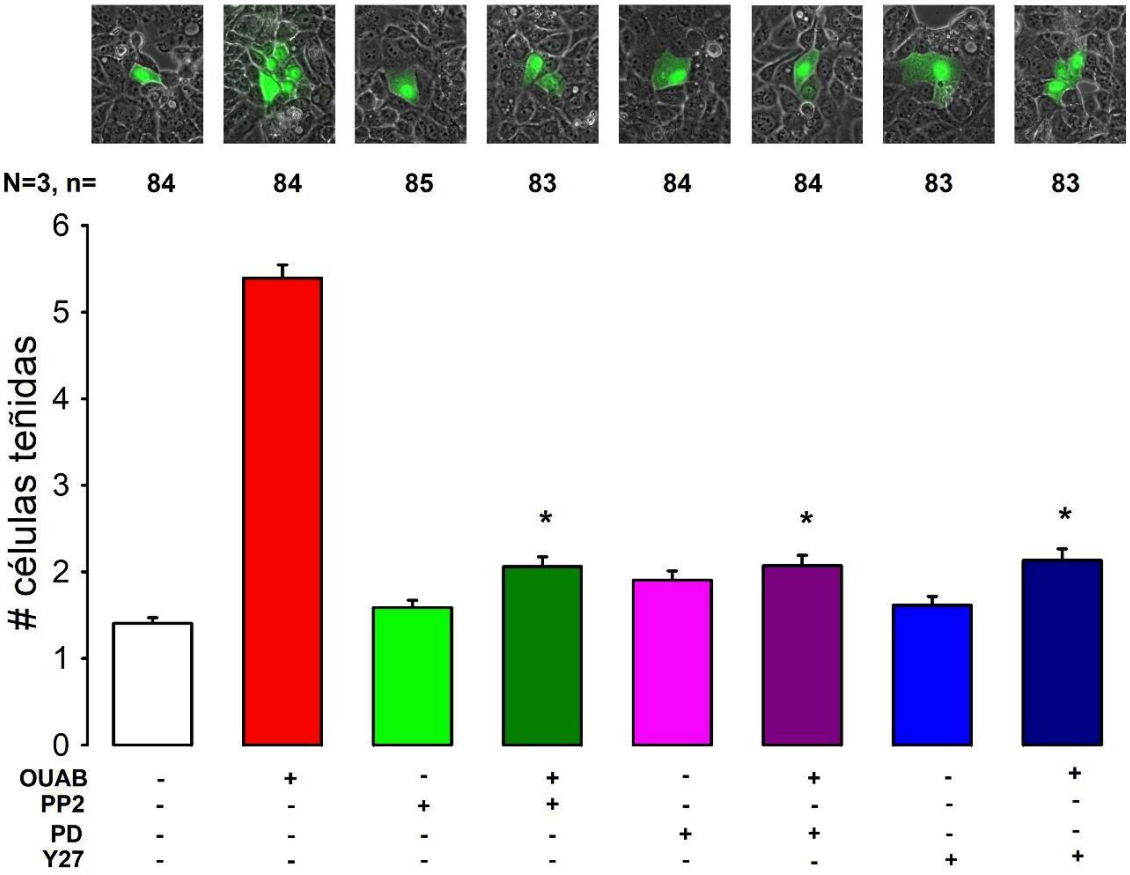


Figura R.13. Efecto de PP2, PD y Y27 en el incremento de CIMUC inducida por ouabaína en células MDA-MB-231. La figura muestra en la parte superior imágenes representativas de cada una de las condiciones anotadas en el pie de las barras del histograma. El histograma compara el valor promedio y error estándar del número de células teñidas, en presencia y ausencia de ouabaína (OUAB) y en presencia y ausencia de PP2, PD y Y27. Los números arriba de cada barra indican el número de ensayos de transferencia. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control positivo, o tratado solamente con ouabaína (*barra roja*). (*) indica $p<0.05$, (**) indica $p<=.001$.

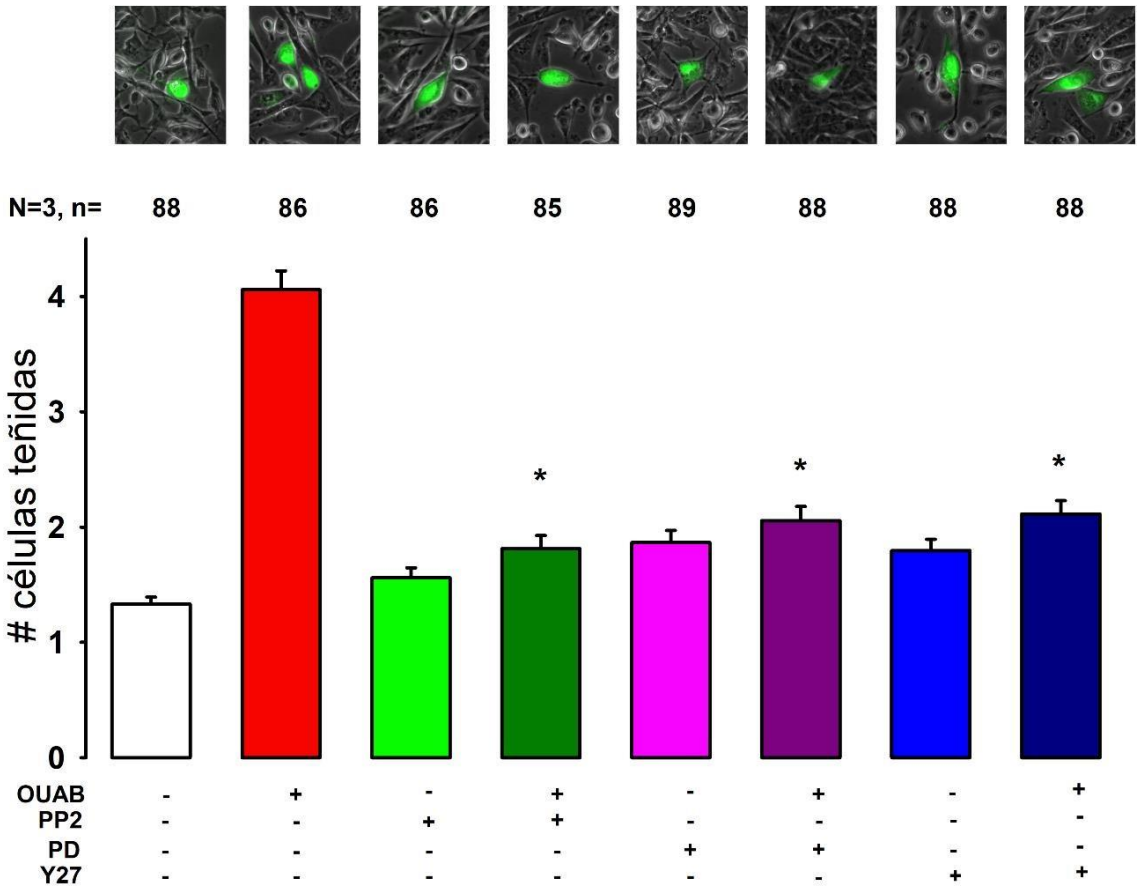


Figura R.14. Efecto de PP2, PD y Y27 en el incremento de CIMUC inducida por ouabaína en células MCF7. La figura muestra en la parte superior imágenes representativas de cada una de las condiciones anotadas en el pie de las barras del histograma. El histograma compara el valor promedio y error estándar del número de células teñidas, en presencia y ausencia de ouabaína (OUAB) y en presencia y ausencia de PP2, PD y Y27. Los números arriba de cada barra indican el número de ensayos de transferencia. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control positivo, o tratado solamente con ouabaína (*barra roja*). (*) indica $p<0.05$, (**) indica $p<=.001$.

DISCUSIÓN

El cáncer es una de las enfermedades más graves del mundo. A pesar de los grandes avances médicos y científicos, todavía se está lejos de conocer sus causas y consecuencias, y por lo mismo de reducir el número de personas que mueren en el mundo como resultado de esta enfermedad. No obstante, la comprensión del funcionamiento fisiopatológico de las células cancerosas ha resultado determinante a la hora de proponer tratamientos contra esta enfermedad, o mejor dicho “grupo de enfermedades”, ya que los canceres a pesar de tener características en común, tienen notables diferencias entre sí. Se sabe que las células se vuelven cancerosas cuando pierden el control del crecimiento y la diferenciación, que en las células normales se controla entre otras cosas por la inhibición por contacto.

Recientemente se ha encontrado que los glucósidos cardíacos, además de su acción cardiotónica, influyen en una amplia variedad de procesos celulares, muchos de ellos relacionados con el desarrollo y progresión de tumores cancerosos, como la proliferación, diferenciación y motilidad (Hollman, 1985 ;Haustein ,1984; Hamlyn 1998;Hamlyn, 2014;Schoner et al.,2003; Bagrov et al.,2009). Por esta razón, algunos glucósidos cardíacos, incluida la ouabaína, son actualmente un tema de interés como posibles nuevos agentes terapéuticos para combatir el cáncer.

Se sabe que existe una relación entre CIMUC y el cáncer, sin embargo, hasta ahora no se ha explorado si los glucósidos cardíacos influyen en CIMUC en las células cancerosas. Por esta razón, en este trabajo probamos si el ouabaína influencia CIMUC en una variedad de variedades de células derivadas del cáncer del origen cervical, de seno, del pulmón, del colon y del páncreas. En cada una de estas líneas celulares, evaluamos el efecto que el tratamiento con ouabaína, en concentraciones dentro del rango nanomolar (0,1,1,10,50 y 500 nM), produce sobre CIMUC. Para cada una de estas concentraciones, inyectamos con amarillo lucifer un cierto número de células, contamos el número de células teñidas (NCT) como resultado de esas inyecciones y comparamos estadísticamente el número promedio de células teñidas $\bar{Y}_{NCT}$ contra el grupo de control (no tratado). El hecho de que la

prueba de ANOVA (Kruskal-Wallis) sea significativa (p<0,001) para todas las líneas seleccionadas nos lleva a concluir que ~~el~~ ouabaína influencia CIMUC en todas estas variedades de células cáncer-derivadas. Posteriormente, las pruebas de comparación múltiple (método de Dunn), de cada una de las concentraciones de ouabaína contra el control, indican que el aumento de CIMUC comienza a ser significativo a partir de diferentes concentraciones, que en la mayoría de las líneas celulares parte de 1 nM, a excepción de las células MCF7 donde esto se observa a partir de 0.1 nM. Es interesante notar que, en la mayoría de las líneas celulares $\bar{Y}_{NCT}$ aumenta con la concentración a un máximo y luego parece reducirse. En las células MCF7 $\bar{Y}_{NCT}$ aumenta en 0.1 nM, después disminuye en 1 nM y después aumenta de nuevo a un máximo a 50 nM, seguido por una reducción sensible a 500 nM. Además, el comportamiento de las células MDA es notable; la respuesta se incrementa progresivamente con la dosis, sin alcanzar un máximo o una disminución posterior. Además, el valor EC50, calculado a partir del análisis de regresión de datos para ajustar una curva logística de dosis de respuesta, fue variable, siendo el más pequeño para las células MCF7 (2 pM) y el más grande para MDA (37 nM. Los resultados de este trabajo son notablemente interesantes, teniendo en cuenta los antecedentes que relacionan a las Uniones Comunicantes, CIMUC y cáncer: Desde las primeras observaciones realizadas por Loewestein y Kanno hace más de 60 años (Loewenstein y Kanno, 1966,1967), la hipótesis de una relación entre CIMUC y el cáncer se ha fortalecido con una cantidad considerable de evidencia. Por un lado, se ha demostrado una relación inversa, es decir, que la falta de comunicación o mala expresión de las conexinas está relacionada con la manifestación de características cancerígenas, pero, por otro lado, también se han descrito evidencias que muestran una relación directa, es decir, que la CIMUC intensa o la sobreexpresión de conexinas promueve el desarrollo de tumores e incluso ayuda a migrar las células tumorales a invadir el tejido circundante e intra o extravasar. Aparentemente, el estadio del desarrollo del tumor determina el papel que juega la unión gap depende del estadio del desarrollo tumoral (Czyz, 2008). En apoyo de una relación inversa, se ha descrito, por ejemplo, que, (1) Las células cancerosas, derivadas de varios tejidos distintos, disminuyen notoriamente CIMUC en

comparación con el tejido normal (Saunders et al. ,2001; Yano et al.,2001;Aasen et al.,2003; Toler et al., 2006), (2) Los agentes químicos que bloquean CIMUC también tienen propiedades carcinógenas (Rosenkranz et al., 2000). (3) La supresión experimental de la expresión de la conexina hace que las células sean más susceptibles a convertirse en carcinógenas (Avanzo et al., 2004; Dagli et al.,2004;King y Lampe,2004) y (4) la transfección de conexinas heterólogas en las células cancerosas causa la normalización del control del crecimiento celular y reduce el crecimiento tumoral (Leithe et al., 2006; Bigelow y Nguyen ,2014). Si bien es muy evidente que existe una relación entre CIMUC y Cáncer, no está claro si esto se debe a la falta de comunicación en sí misma o a la expresión reducida de las conexinas que la producen. Hay diversos estudios que muestran que es la falta de CIMUC lo que conduce al cáncer (Loewenstein y Kanno, 1967; Enomoto y Yamasaki ,1984;Yamasaki et al.,1987). También hay una cantidad notable de evidencia que muestra la asociación entre la regulación a la baja de las conexinas y la carcinogénesis (Leithe et al., 2006). Además, hay estudios que sugieren que las conexinas tienen un papel como supresores de tumores, independientemente de su papel como subunidades de las conexiones (Qin et al. , 2002; Zhang et al., 2003). Si bien la gran mayoría de la evidencia indica una relación indirecta entre las uniones gap y el cáncer, varios casos, reportados más recientemente, indican que las conexinas en algunos tumores o en estadios tumorales posteriores más bien estimulan su crecimiento y su malignidad (Aasen et al., 2017; Czyz, 2007; Naus y Laird, 2010; Defamieet al., 2014). Algunos estudios indican que el proceso de diapédesis/extravasación puede depender de la comunicación entre el cáncer y las células endoteliales (Piwowarczyk et al., 2017; Pollmann et al., 2005).

Es ampliamente sabido que la CIMUC se debe a la expresión de canales o conexones, que a su vez están constituidos por seis conexinas (Cx). Existen 21 isoformas de conexina conocidas en el genoma humano, que se nombran según su peso molecular (en kD). La mayoría de las células y tejidos expresan varias isoformas de conexina (Sohl y Willecke , 2003;Sosinsky y Nicholson ,2005). Se ha descrito que el tejido pulmonar expresa Cx26, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43 y Cx45 (Koyal, 2002); tejido mamario: Cx26, Cx32 y Cx43 (Monaghan et al., 1996; Jamieson

et al.,1998); el tejido cervical expresa Cx26, Cx30, Cx40, y Cx43 (Aasenet al.,2005) y el tejido de la próstata expresar Cx26, Cx32, y Cx43 (El Alfy et al., 2000; Habermann et al., 2002). Cabe destacar que, dentro de esta variedad de conexinas expresadas, Cx43 aparece casi invariablemente. También es interesante que cuando las células se vuelven malignas, hay una marcada reducción en la expresión de varias conexinas, entre ellas destaca de nuevo la de la conexina 43 (Bonacquisti y Nguyen ,2019; Naser Al Deen N), por lo tanto, es probable que Cx43 desempeñe un papel especial en el contexto de la relación entre las uniones gap, CIMUC y cáncer. Debido a que en este trabajo utilizamos un enfoque puramente funcional, no podemos conocer los tipos de conexinas implicadas en el aumento de CIMUC inducido por ouabaína, ni siquiera si los mecanismos involucrados son comunes a todos los tipos de células cancerosas estudiadas aquí. Pero en vista de la similitud de los resultados descritos aquí con los encontrados en las células epiteliales MDCK , en el que demostramos que el Cx43 es un participante principal (Ponce et al., 20016), es posible que Cx43 pudiera estar implicada en la respuesta obtenida de algunos de los tipos de células aquí probados.

Otro hecho importante a destacar es que la ouabaína induce CIMUC en todas las variedades de células, sin importar su origen. Como ya se ha descrito, en este estudio se incluyeron varias líneas celulares derivadas de diferentes tipos de cáncer que, aunque clasificados como epiteliales, difieren notablemente en sus propiedades morfológicas y funcionales, entre las que destaca MDA-MB-231. Estas células, a pesar de que en los registros de líneas celulares se encuentran clasificadas como de tipo epitelial, el estudio de las características morfológicas y fisiológicas de este tipo celular sugiere que han perdido su fenotipo epitelial, exhibiendo en su lugar una forma alargada, en forma de huso, con procesos celulares entrelazados. Además de su diferente morfología evidente, se ha descrito que las células MDA-MB-231 no expresan E-caderina, una de las proteínas más representativas de células epiteliales (Lombaerts et al., 2006); además, las proteínas componentes de la unión oclusora, tales como ocludinas o claudinas son reguladas a la baja o silenciadas (Tabariés et al., 2010). También se ha observado que las células MDA-MB-231, tienen regulada a la baja la conexina 43, comparadas

con células de epitelio mamario no canceroso como las células HS578T; este mismo hecho de regulación a la baja de la conexina 43 en células mamarias cancerosas, puede observarse en otras líneas como la MCF-7 y SK-BR-3 (Jiang et al., 2017). Por otro lado, los estudios sugieren que, en las células epiteliales, las uniones gap operan de manera dependiente y coordinada con las otras estructuras de contacto célula-célula (uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas (Fujimoto et al., 1997; Jongen et al., 1991;Kanno et al.,1984; Keane et al.,1988; Mege et al., 1988; Meyer et al., 1992 ;Wei et al.,2005).Por esta razón, supusimos inicialmente que las células MDA-MB-231, no responderían aumentando CIMUC en respuesta al tratamiento con ouabaína, pero, como se muestra en la figura R10 lo hicieron. Esto nos lleva a proponer que la expresión de un fenotipo epitelial no es un requisito indispensable para que la ouabaína ejerza su efecto inductor sobre CIMUC.

El hecho de que no se requiera síntesis de proteínas ni de ARNm ni proteínas, nos lleva a sugerir que la ouabaína produce este efecto a través de la reubicación de subunidades de conexinas previamente sintetizadas, o a un cambio en la cinética de apertura de las uniones gap ya ensambladas en la membrana. Por otro lado, el cambio en CIMUC inducido por ouabaína, aunque estadísticamente significativo no fue muy conspicuo. Esto sugiere que la ouabaína no es un factor decisivo que influye en CIMUC, sino que no es suficiente por sí solo y por lo tanto requiere de sinergismo con otros mecanismos moleculares aún no caracterizados. También hay que destacar que en estos estudios utilizamos un rango de tiempo de sólo una hora, en el que, como describimos, encontramos que no se requiere síntesis de ARNm o proteínas, pero eso no excluye la posibilidad de que, con tiempos de tratamiento más largos, la ouabaína opere otros mecanismos que induzcan la síntesis de proteínas y por lo tanto podrían producir una respuesta más conspicua.

Por último, debemos tener en cuenta que, si bien en este trabajo hemos demostrado que la ouabaína induce un aumento de la CIMUC, esto no implica necesariamente que sea uno de los mecanismos implicados como acción terapéutica contra el

cáncer, aunque es un precedente que vale la pena considerar para abordar estudios posteriores.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados hasta aquí mostrados, se puede concluir que:

1. Las células cancerosas efectivamente tienen notablemente disminuida la CIMUC, como lo indican los valores obtenidos de $\bar{Y}_{NCT}$, que en todas las líneas celulares tuvieron un rango de entre 1.1 y 2.0 células teñidas por inyección comparadas con células no cencerosas.

2. La ouabaína efectivamente incrementó la CIMUC, como se comprueba por el hecho de que la prueba ANOVA reportó un resultado afirmativo ($p<0.05$) en todas las líneas celulares (Tabla 1).

3. Bajo las condiciones experimentales usadas, ni en MDA ni en células MCF7, se requiere de síntesis de nuevas unidades de ARNm o de proteínas se requiere para que ouabaína aumente CIMUC.

4 cSrc, ERK1/2 y Rho-ROCK participan en los mecanismos de señalización implicados en el efecto de la ouabaína sobre CIMUC por lo menos en las dos líneas celulares estudiadas (MCF7 y MDA-MB-231),.

PERSPECTIVAS DE TRABAJO

Por todo lo mencionado en los capítulos anteriores, podemos decir que la visión a futuro de esta investigación es prometedora. Sin duda este trabajo resolvió algunas dudas respecto el efecto que tiene la ouabaína en diferentes concentraciones sobre la CIMUC en líneas de epitelios de diferente estirpe, no obstante, también nos ha arrojado muchas dudas como, por ejemplo: A qué se debe que las líneas celulares, incluidas en este trabajo, presenten diferente sensibilidad a los efectos de la ouabaína?. De entrada es necesario saber las cómo es que la ouabaína logra incrementar la CIMUC, si bien en la discusión hemos especulado al respecto acerca de este tema, es necesario confirmar que en efecto el tratamiento con ouabaína logra hacer que la ouabaína se reubique en la membrana, o bien podría tratarse de la apertura de uniones que ya se encontraban previamente instaladas, ya que la diferencia en estos cambios de en la CIMUC podría deberse simplemente a las diferencias en la maquinaria celular entre una línea celular y otra, es decir, la cantidad y el tipo de conexinas que expresa cada una.

El caso de las células MDA-MB-231, resulta especialmente interesante, si bien estas células incrementaron significativamente su CIMUC en presencia de ouabaína a diferentes concentraciones, a comparación de las otras líneas celulares el número máximo de células comunicadas es mucho menor.

Otro punto a explorar en el futuro es si la ouabaína tiene algún efecto sobre otros tipos de uniones intercelulares y esto no solo por emular los estudios de los que ya hicimos mención en el apartado de antecedentes. La razón principal es que se ha observado que, así como pasa con las uniones comunicantes, las células cancerosas expresan a la baja algunas otras moléculas de adhesión como la e-cadherina (Lombaertz 2006), así como las uniones estrechas (Cochand-Priollet B et al., 19998) y las proteínas ZO1 y ZO2, todas ellas han sido caracterizadas como supresoras de tumores (Gottardi CJ et al., 1996) (Pećina-Šlaus 2003) (Woods DF et al., 1989). Coincidentemente hoy sabemos que la ouabaína en concentraciones fisiológicas es capaz de regular a todas estas uniones intercelulares, por lo que puede porponerse y de hecho ya se ha propuesto por algunos autores como un

agente anticancerígeno, la novedad sería que ahora el problema sería abordado desde el lado fisiopatológico y no farmacéutico como se ha hecho hasta ahora.

Existe también otro trabajo pendiente en nuestro laboratorio del cual ya se tienen avances. Se trata de emular la observación hecha por el ahora Dr. Alejandro Ogazón. En el artículo de reciente publicación demostramos que células MCDK silvestres logran que células MDCK resistentes a la ouabaína incrementen su comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes, cuando se encuentran en co-cultivo y esto es orquestado presumiblemente por la prostagalandina E2 (Ogazón et al., 2021). Luego, una propuesta interesante de experimento sería sembrar células MDA-MB-231 en cocultivo con alguna otra línea celular que ~~si~~ sí sea sensible a la ouabaína y ver si la CIMUC de estas células cancerosas mejora.

BIBLIOGRAFÍA

Alonso- Alvares E., Garcia A., Cano Abad F., “Concentraciones nanomolares de ouabaína activan la vía intrínseca de la apoptosis en las células HeLa”, Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Tesis Doctoral.

Abramowitz J, Dai C, Hirschi KK, Dmitrieva RI, Doris PA, Liu L, Allen JC. Ouabain- and marinobufagenin-induced proliferation of human umbilical vein smooth muscle cells and a rat vascular smooth muscle cell line, A7r5. Circulation. 2003 Dec 16;108(24):3048-53. Epub 2003 Nov 24.

Aasen T, Mesnil M, Naus CC, Lampe PD, Laird DW. Gap junctions and cancer: communicating for 50 years. Nat Rev Cancer. 2017;17(1):74. doi:10.1038/nrc.2016.142

Aasen T, Hodgins MB, Edward M, et al. The relationship between connexins, gap junctions, tissue architecture and tumour invasion, as studied in a novel in vitro model of HPV-16-associated cervical cancer progression. Oncogene. 2003; 22:7969–80.

Aasen T, Graham SV, Edward M, et al. Reduced expression of multiple gap junction proteins is a feature of cervical dysplasia. Mol Cancer. 2005; 4:31.

Al-Ghoul M, Valdes R Jr. Mammalian cardenolides in cancer prevention and therapeutics. Ther Drug Monit. 2008;30(2):234-238. doi:10.1097/FTD.0b013e31816b90ff.

Alessi DR, et al. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. J Biol Chem, 1995, 270(46), 27489-27494

Antolovic R, Bauer N, Mohadjerani M, Kost H, Neu H, Kirch U, Grünbaum EG, Schoner W. Endogenous ouabain and its binding globulin: effects of physical exercise and study on the globulin's tissue distribution. Hypertens Res. 2000 Sep;23 Suppl:S93-8.

Aperia A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. J Intern Med. 2007;261(1):44-52. doi:10.1111/j.1365-2796.2006. 01745.x

Avanzo JL, Mesnil M, Hernandez-Blazquez FJ, et al. Increased susceptibility to urethane-induced lung tumors in mice with decreased expression of connexin43. Carcinogenesis. 2004; 25:1973–82.

Bagrov, A.Y.; Agalakova, N.I.; Kashkin, V.A.; Fedorova, O.V. Endogenous cardiotonic steroids and differential patterns of sodium pump inhibition in NaCl-loaded salt-sensitive and normotensive rats. Am. J. Hypertens. 2009, 22, 559–563

Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. Biochem J. 2007 Dec 15;408(3):297-315.

Bigelow K, Nguyen TA. Increase of gap junction activities in SW480 human colorectal cancer cells. BMC Cancer. 2014; 14:502. Published 2014 Jul 9. doi:10.1186/1471-2407-14-502

Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. Am J Physiol. 1998 Nov;275(5):F633-50

Barwe SP, Anilkumar G, Moon SY, Zheng Y, Whitelegge JP, Rajasekaran SA, Rajasekaran AK. Novel role for Na,K-ATPase in phosphatidylinositol 3-kinase signaling and suppression of cell motility. Mol Biol Cell. 2005 Mar;16(3):1082-94. Epub 2004 Dec 22.

Brandvold KR, Steffey ME, Fox CC, Soellner MB. Development of a highly selective c-Src kinase inhibitor. ACS Chem Biol. 2012 Aug 17;7(8):1393-8.

Bonacquisti EE, Nguyen J. Connexin 43 (Cx43) in cancer: Implications for therapeutic approaches via gap junctions. Cancer Lett. 2019; 442:439-444. doi: 10.1016/j.canlet.2018.10.043

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. Ouabain Modulates the Adherens Junction in Renal Epithelial Cells. Cell Physiol Biochem. 2019;52(6):1381-1397. doi: 10.33594/000000097.

Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. J Natl Cancer Inst. 1974;53(3):661-674. doi:10.1093/jnci/53.3.661

Cochand-Priollet B, Raison D, Molinie V. et al. Altered gap and tight junctions in human thyroid oncocytic tumors: a study of 8 cases by freeze-fracture. Ultrastruct Pathol. 1998;22(6):413–420

Contreras RG, Flores-Beni Tez D, Flores-Maldonado C, Larre I, Shoshani L, Cereijido M. Na+,K+-ATPase and hormone ouabain:new roles for an old enzyme and an old inhibitor. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2006;52(8):31-40. Published 2006 Dec 30.

Cronier L, Crespin S, Strale PO, Defamie N, Mesnil M. Gap junctions and cancer: new functions for an old story. Antioxid Redox Signal. 2009;11(2):323-338. doi:10.1089/ars.2008.2153

Czyz J. The stage-specific function of gap junctions during tumourigenesis. Cell Mol Biol Lett. 2008;13(1):92-102. doi: 10.2478/s11658-007-0039-5. Epub 2007 Oct 29. PMID: 17965973; PMCID: PMC6275873.

Dagli ML, Yamasaki H, Krutovskikh V, et al. Delayed liver regeneration and increased susceptibility to chemical hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing a dominant-negative mutant of connexin32 only in the liver. Carcinogenesis.2004;25:483–92.

Defamie N, Chepied A, Mesnil M. Connexins, gap junctions and tissue invasion. FEBS Lett. 2014 Apr 17;588(8):1331-8. doi: 10.1016/j.febslet.2014.01.012. Epub 2014 Jan 20. PMID: 24457198.

Di Paola R, et al. PD98059, a specific MAP kinase inhibitor, attenuates multiple organ dysfunction syndrome/failure (MODS) induced by zymosan in mice. Pharmacol Res. 2010 Feb;61(2):175-87.

El Alfy M, Pelletier G, Hermo LS, et al. Unique features of the basal cells of human prostate epithelium. Microsc Res Tech. 2000; 51:436–46.

Enomoto T, Yamasaki H. Lack of intercellular communication between chemically transformed and surrounding nontransformed BALB/c 3T3 cells. Cancer Res. 1984;44(11):5200-5203.

Ferrandi, J., Valette-Florence, P. & Fine-Falcy, S.. Aaker's brand personality scale in a French context: a replication and a preliminary test of its validity. 1993 Developments in Marketing Science, 23, 7-13

Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. Exp Cell Res. 1998;243(2):359-366. doi:10.1006/excr.1998.4172

Friedl F., Kimura I., Osato T., Ito Y. Studies on a new human cell line (SiHa) derived from carcinoma of uterus. I. Its establishment and morphology. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 135:543-545(1970)

Fujimoto K, Nagafuchi A, Tsukita S, et al. Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation. J Cell Sci. 1997; 110 (Pt 3):311–22.

Golovina E., Hoekstra E., Acquisition of desiccation tolerance in developing wheat embryos correlates with appearance of a fluid phase in membranas, 2003, Cell and Environment (2003) 26, 1815–1826

Gottardi CJ, Arpin M, Fanning AS. et al. The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93(20):10779–10784.

Habermann H, Ray V, Habermann W, et al. Alterations in gap junction protein expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. J Urol. 2002; 167:655–60

Hamlyn JM, Blaustein MP, Bova S, DuCharme DW, Harris DW, Mandel F, Mathews WR, Ludens JH. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Jul 15;88(14):6259-63. doi: 10.1073/pnas.88.14.6259. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A 1991 Nov 1;88(21):9907. PMID: 1648735; PMCID: PMC52062.

Hamlyn JM, Lu ZR, Manunta P, Ludens JH, Kimura K, Shah JR, Laredo J, Hamilton JP, Hamilton MJ, Hamilton BP. Observations on the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain. Clin Exp Hypertens. 1998 Jul-Aug;20(5-6):523-33.

Hamlyn J. M. Natriuretic hormones, endogenous ouabain, and related sodium transport inhibitors. Front. Endocrinol. 2014, 5, 199.10.3389/fendo.2014.00199.

Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, Pollok BA, Connelly PA. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. J Biol Chem. 1996 Jan 12;271(2):695-701.

Haustein KO. (1984) Therapeutic range of cardiac glycosides. In: Erdmann E. (eds) Cardiac Glycoside Receptors and Positive Inotropy. Steinkopff, Heidelberg.

Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Sep;9(9):690-701. doi: 10.1038/nrm2476. Review

Hollman. Plants and cardiac glycosides. Br Heart J. 1985 Sep; 54(3): 258–261

Ishizaki T., Uehata M., Tamechika I., Keel J., Nonomura K., Maekawa M., Narumiya S. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of Rho-associated kinase Mol. Pharmacol., 57 (2000), pp. 976–983.

Jamieson S, Going JJ, D'Arcy R, et al. Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours. J Pathol. 1998; 184:37–43.

Jones HW Jr., et al. George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. Obstet. Gynecol. 38: 945-949, 1971. PubMed: 4942173

Jiang, G., Dong, S., Yu, M., Han, X., Zheng, C., Zhu, X., & Tong, X. (2017). Influence of gap junction intercellular communication composed of connexin 43 on the antineoplastic effect of adriamycin in breast cancer cells. Oncology letters, 13(2), 857–866.

Jongen WM, Fitzgerald DJ, Asamoto M, et al. Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca2+ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. J Cell Biol. 1991; 114:545–55.

Kandouz M, Batist G. Gap junctions and connexins as therapeutic targets in cancer. Expert Opin Ther Targets. 2010;14(7):681-692. doi:10.1517/14728222.2010.487866

Kanno Y, Sasaki Y, Shiba Y, et al. Monoclonal antibody ECCD-1 inhibits intercellular communication in teratocarcinoma PCC3 cells. Exp Cell Res. 1984; 152:270–4.

Keane RW, Mehta PP, Rose B, et al. Neural differentiation, NCAM-mediated adhesion, and gap junctional communication in neuroectoderm. A study in vitro. J Cell Biol. 1988; 106:1307–19.

Kim YW, Kern HF, Mullins TD, Koriwchak MJ, Metzgar RS. Characterization of clones of a human pancreatic adenocarcinoma cell line representing different stages of differentiation. Pancreas. 1989;4(3):353-362. doi:10.1097/00006676-198906000-00013

King TJ, Lampe PD. Mice deficient for the gap junction protein Connexin32 exhibit increased radiation-induced tumorigenesis associated with elevated mitogen-activated protein kinase (p44/Erk1, p42/Erk2) activation. Carcinogenesis. 2004 May;25(5):669-80.

Koval M. Sharing signals: connecting lung epithelial cells with gap junction channels. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2002;283: L875–93.

Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. Cancer Cell. 2008 Jun;13(6):472-82. doi: 10.1016/j.ccr.2008.05.005. PMID: 18538731.

Larre I, Lazaro A, Contreras RG, Balda MS, Matter K, Flores-Maldonado C, Ponce A, Flores-Benitez D, Rincon-Heredia R, Padilla-Benavides T, Castillo A, Shoshani L, Cereijido M. Ouabain modulates epithelial cell tight junction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jun 22;107(25):11387-92. doi: 10.1073/pnas.1000500107. Epub 2010 Jun 4.

Larre I, Castillo A, Flores-Maldonado C, Contreras RG, Galvan I, Muñoz-Estrada J, Cereijido M. Ouabain modulates ciliogenesis in epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Dec 20;108(51):20591-6. doi: 10.1073/pnas.1102617108. Epub 2011 Dec 5.

Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB 3rd, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. Cancer Res. 1976;36(12):4562-4569.

Leithe E, Sirnes S, Omori Y, Rivedal E. Downregulation of gap junctions in cancer cells. Crit Rev Oncog. 2006;12(3-4):225-256. doi:10.1615/crit rev oncog. v12.i3-4.30

Li Z, Xie Z. The Na/K-ATPase/Src complex and cardiotonic steroid-activated protein kinase cascades. Pflugers Arch. 2009 Jan;457(3):635-44.

Loewenstein WR, Kanno Y. Intercellular communication and tissue growth. I. Cancerous growth. J Cell Biol. 1967;33(2):225-234. doi:10.1083/jcb.33.2.225

Loewenstein W.R., Kanno Y. Intercellular communication and the control of tissue growth: Lack of communication between cancer cells. Nature. 1966; 209:1248–1249. doi: 10.1038/2091248a0

Lombaerts, M., Van Wezel, T., Philippo, K., Dierssen, J. W. F., Zimmerman, R. M. E., Oosting, J., … Cleton-Jansen, A. M. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-tomesenchymal transition in breast cancer cell lines 2006. British Journal of Cancer, 94(5), 661–671.

Mack NA, Georgiou M. The interdependence of the Rho GTPases and apicobasal cell polarity. Small GTPases. 2014;5(2):10.

Manjarrez-Marmolejo J, Franco-Pérez J. Gap Junction Blockers: An Overview of their Effects on Induced Seizures in Animal Models. Curr Neuropharmacol. 2016;14(7):759-771.

Manunta, P., Ferrandi, M., & Bianchi, G. Ouabain. In Encyclopedia of Endocrine Diseases, 2004 (pp. 447–450).

Manunta, P., & Simonini, M.. Endogenous ouabain. In Encyclopedia of Endocrine Diseases, 2018 (pp. 564–568).

Martín-Vasallo P., Dackowski W., Emanuel J.R. and Levenson R. Identification of a putative isoform of the Na,K-ATPase betasubunit: primary structure and tissue-specific expression. 1994, J. Biol. Chem. 264,4613-4618.

Mege RM, Matsuzaki F, Gallin WJ, et al. Construction of epithelioid sheets by transfection of mouse sarcoma cells with cDNAs for chicken cell adhesion molecules. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988; 85:7274–8.

Metzgar RS, Gaillard MT, Levine SJ, Tuck FL, Bossen EH, Borowitz MJ. Antigens of human pancreatic adenocarcinoma cells defined by murine monoclonal antibodies. Cancer Res. 1982;42(2):601-608.

Meyer RA, Laird DW, Revel JP, et al. Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. J Cell Biol. 1992;119: 179–89.

Monaghan P, Clarke C, Perusinghe NP, et al. Gap junction distribution and connexin expression in human breast. Exp Cell Res. 1996; 223:29–38.

Naser Al Deen N, AbouHaidar M, Talhouk R. Connexin43 as a Tumor Suppressor: Proposed Connexin43 mRNA-circularRNAs-microRNAs Axis Towards Prevention and Early Detection in Breast Cancer. Front Med (Lausanne). 2019; 6:192. Published 2019 Aug 28. doi:10.3389/fmed.2019.00192.

Naus CC, Laird DW. Implications and challenges of connexin connections to cancer. Nat Rev Cancer. 2010 Jun;10(6):435-41. doi: 10.1038/nrc2841. PMID: 20495577.

Newman RA, Yang P, Pawlus AD, Block KI. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. Mol Interv. 2008;8(1):36-49. doi:10.1124/mi.8.1.8

Noguchi, S., Maeda, M., Futai, M., & Kawamura, M. Assembly of a hybrid from the α subunit of Na+ K+-ATPase and the β subunit of H+ K+-ATPase. 1992, Biochemical and Biophysical Research Communications, 182(2), 659–666. https://doi.org/10.1016/0006-291X(92)91783-M

Ogazon Del Toro A, Jimenez L, Serrano Rubi M, Castillo A, Hinojosa L, Martinez Rendon J, Cereijido M, Ponce A. Prostaglandin E2 Enhances Gap Junctional Intercellular Communication in Clonal Epithelial Cells. Int J Mol Sci. 2021 May 28;22(11):5813. doi: 10.3390/ijms22115813. PMID: 34071686; PMCID: PMC8198183.

Ordóñez H., Ordóñez J, ¿Réquiem por la ouabaína? ¡No! 2006 Revista Colombiana de Cardiología

Pan Huang, Yan Sun, Jinyan Yang, Siyao Chen, Angie Dong Liu, Lukas Holmberg, Xiaomei Huang, Chaoshu Tang, Junbao Du, Hongfang Jin The ERK1/2 Signaling Pathway Is Involved in Sulfur Dioxide Preconditioning-Induced Protection against Cardiac Dysfunction in Isolated Perfused Rat Heart Subjected to Myocardial Ischemia/Reperfusion. Int J Mol Sci. 2013 Nov; 14(11): 22190–22201.

Piwowarczyk K, Paw M, Ryszawy D, Rutkowska-Zapała M, Madeja Z, Siedlar M, Czyż J. Connexin43high prostate cancer cells induce endothelial connexin43 up-regulation through the activation of intercellular ERK1/2-dependent signaling axis. Eur J Cell Biol. 2017 Jun;96(4):337-346. doi:

Pollmann MA, Shao Q, Laird DW, Sandig M. Connexin 43 mediated gap junctional communication enhances breast tumor cell diapedesis in culture. Breast Cancer Res. 2005;7(4):R522-R534. doi:10.1186/bcr1042.

Ponce A, Larre I, Castillo A, García-Villegas R, Romero A, Flores-Maldonado C, Martinez-Rendón J, Contreras RG, Cereijido M. Ouabain increases gap junctional communication in epithelial cells. Cell Physiol Biochem. 2014;34(6):2081-90. doi: 10.1159/000366403. Epub 2014 Nov 28.

Ponce A, Larre I, Castillo A, Flores-Maldonado C, Verdejo-Torres O, Contreras RG, Cereijido M. Ouabain Modulates the Distribution of Connexin 43 in Epithelial Cells. Cell Physiol Biochem. 2016;39(4):1329-38. doi: 10.1159/000447837. Epub 2016 Sep 8.

Qin H, Shao Q, Curtis H, et al. Retroviral delivery of connexin genes to human breast tumor cells inhibits in vivo tumor growth by a mechanism that is independent of significant gap junctional intercellular communication. J Biol Chem. 2002; 277:29132–8.

RA Pattillo, RO Hussa, MT Story, AC Ruckert, MR Shalaby, RF Mattingly. Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line. Science. 1977 Jun 24;196(4297):1456-8. doi: 10.1126/science.867042.

Reiners JJ Jr, et al. PD98059 is an equipotent antagonist of the aryl hydrocarbon receptor and inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. Mol Pharmacol. 1998 Mar;53(3):438-45.

Roca Jácome A., Historia de los medicamentos., 2004 Segunda Edicion Academia Nacional de medicina, Vol. 12 No. 6 ISSN 0120-5633

Rojewska E, et al. PD98059 Influences Immune Factors and Enhances Opioid Analgesia in Model of Neuropathy. PLoS One. 2015 Oct 1;10(10): e0138583.

Rosenkranz HS, Pollack N, Cunningham AR. Exploring the relationship between the inhibition of gap junctional intercellular communication and other biological phenomena. Carcinogenesis. 2000; 21:1007–11.

Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, et al. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. Physiol Rev. 2003; 83:1359–400.

Saunders MM, Seraj MJ, Li Z, et al. Breast cancer metastatic potential correlates with a breakdown in homospecific and heterospecific gap junctional intercellular communication. Cancer Res. 2001;61(5):1765-1767.

Schoner W, Bauer N, Müller-Ehmsen J, Krämer U, Hambarchian N, Schwinger R, Moeller H, Kost H, Weitkamp C, Schweitzer T, Kirch U, Neu H, Grünbaum EG. Ouabain as a mammalian hormone. Ann N Y Acad Sci. 2003 Apr;986: 678-84.

Semenza, G.L. (2010), Oxygen homeostasis. WIREs Syst Biol Med, 2: 336-361. https://doi.org/10.1002/wsbm.69

Shull, G. E., Schwartz, A., Lingrel, J. B. 1985. Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the (Na++K+)ATPase deduced from a complementary DNA. Nature. 316 (6030): 691-5.

Sohl G, Willecke K. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. Cell Commun Adhes. 2003; 10:173–80.

Sosinsky GE, Nicholson BJ. Structural organization of gap junction channels. Biochim Biophys Acta. 2005; 1711:99–125.

Soule HD, Vazguez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. J Natl Cancer Inst. 1973;51(5):1409-1416. doi:10.1093/jnci/51.5.1409

Tabariès, S., Dong, Z., Annis, M. G., Omeroglu, A., Pepin, F., Ouellet, V., … Siegel, P. M. (2011). Claudin-2 is selectively enriched in and promotes the formation of breast cancer liver metastases through engagement of integrin complexes. Oncogene, 30(11), 1318–1328. https://doi.org/10.1038/onc.2010.518

Toler CR, Taylor DD, Gercel-Taylor C. Loss of communication in ovarian cancer. Am J Obstet Gynecol. 2006;194(5): e27-e31. doi: 10.1016/j.ajog.2006.01.024

Vasioukhin V, Bauer C, Yin M, Fuchs E. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. Cell 2000; 100:209-19

Wang H, Haas M, Liang M, Cai T, Tian J, Li S, Xie Z: Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na+-K+-ATPase. J Biol Chem 2004;279: 7250-17259.

Wang XQ, Yu SP. Novel regulation of Na, K-ATPase by Src tyrosine kinases in cortical neurons. J Neurochem. 2005 Jun;93(6):1515-23.

Wei CJ, Francis R, Xu X, et al. Connexin43 associated with an N-cadherincontaining multiprotein complex is required for gap junction formation in NIH3T3 cells. J Biol Chem. 2005; 280:19925–36.

Weingart R., Bukauskas F.F. Long-chain n-alkanols and arachidonic acid interfere with the Vm-sensitive gating mechanism of gap junction channels. Pflugers Arch. 1998;435(2):310–319.

Willecke K, Eiberger J, Degen J, et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. Biol Chem. 2002; 383:725–37.

Wojciak-Stothard B and Ridley AJ: Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. Vascul Pharmacol 39: 187-199, 2002.

Woods DF, Bryant PJ. Molecular cloning of the lethal(1)discs large-1 oncogene of Drosophila. Dev Biol. 1989;134(1):222–235

Xie Z. Molecular mechanisms of Na/K-ATPase-mediated signal transduction. Ann N Y Acad Sci. 2003 Apr;986: 497-503.

Yamasaki H, Hollstein M, Mesnil M, et al. Selective lack of intercellular communication between transformed and nontransformed cells as a common property of chemical and oncogene transformation of BALB/c 3T3 cells. Cancer Res. 1987; 47:5658–64.

Yano T, Hernandez-Blazquez FJ, Omori Y, et al. Reduction of malignant phenotype of HEPG2 cell is associated with the expression of connexin 26 but not connexin 32. Carcinogenesis. 2001; 22:1593–600.

Zhang YW, Kaneda M, Morita I. The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. J Biol Chem. 2003; 278:44852–6

Zhang S, Malmersjö S, Li J, Ando H, Aizman O, Uhlén P, Mikoshiba K, Aperia A: Distinct role of the N-terminal tail of the Na,K-ATPase catalytic subunit as a signal transducer. J Biol Chem 2006; 281:21954-21962.

APENDICE

Los resultados descritos en esta tesis fueron ya aceptados y publicados [1] en una revista indexada por JCR, con factor de impacto de 5.2, siendo yo primer autor. Así mismo, durante mi estancia doctoral colaboré como co-autor en otras dos publicaciones [2,3], cuyas citas describo a continuación.

1. **Serrano-Rubi M**, Jimenez L, Martinez-Rendon J, Cereijido M, Ponce A. Ouabain Promotes Gap Junctional Intercellular Communication in Cancer Cells. Int J Mol Sci. 2020 Dec 31;22(1):358. doi: 10.3390/ijms22010358. PMID: 33396341; PMCID: PMC7801950.

2. Ogazon Del Toro A, Jimenez L, **Serrano Rubi M**, Castillo A, Hinojosa L, Martinez Rendon J, Cereijido M, Ponce A. Prostaglandin E2 Enhances Gap Junctional Intercellular Communication in Clonal Epithelial Cells. Int J Mol Sci. 2021 May 28;22(11):5813. doi: 10.3390/ijms22115813. PMID: 34071686; PMCID: PMC8198183.

3. Ogazon del Toro, A.;Jimenez, L.; **Serrano Rubi, M**.;Cereijido, M.; Ponce, A. Ouabain Enhances Gap Junctional IntercellularCommunication by Inducing Paracrine Secretion of Prostaglandin E2. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 6244. https://doi.org/10.3390/ijms 22126244