

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA

IDENTIFICACIÓN DEL TRANSPORTE DE SODIO DE LA GLÁNDULA
MAMARIA DE RATA LACTANTE .

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

ADRIANA MARGARITA LÓPEZ BARRADAS .

México, D. F.

2002

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Nutriología Molecular del Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán y en la Unidad de Fisiología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, ubicada en el Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del INCMNSZ, bajo la asesoría del Dr. Armando R. Tovar Palacio, y en colaboración con el Dr. Gerardo Gamba Ayala .

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad *Iztapalapa* se encuentra dentro del padrón de excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número de registro 309-0.

Mi agradecimiento al CONACyT por la beca otorgada para la realización de estudios de Maestría con el número de becario 153020. Y por el apoyo económico otorgado al proyecto con el número de convenio 212226-5-25637M.

Agradecimientos

Al Dr. Armando Roberto Tovar Palacio por su tutoría durante la realización de esta tesis .

Al Dr. Gerardo Gamba por su asesoría y colaboración en este proyecto.

A las Dras. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz, Ma. Del Consuelo Plata Ramos, Nimbe Torres y Torres y Adriana Monroy Guzmán por su invaluable apoyo y asesoría para la realización de esta tesis.

Al Dr. David Díaz Pontones coordinador del programa de Maestría y Doctorado en Biología Experimental de la UAMI.

A todos los Profesores del Programa de Maestría en Biología Experimental de la UAMI.

A la Lic. Violeta Luna y Griselda Puerto Avila por su apoyo y atenciones que siempre me brindaron.

Dedicatoria

A mi familia, que en el tiempo que realicé esta tesis ha crecido de forma maravillosa.

A mis amigos por su amistad y apoyo.

INDICE

INDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	vi
INTRODUCCION	1
• Efecto de la composición iónica de la leche sobre la diferencia de potencial transepitelial en glándula mamaria de cabra.	6
JUSTIFICACION	15
HIPOTESIS	16
OBJETIVOS	17
MATERIAL Y METODOS	18
• Extracción de ARN total.	19
• Extracción de ARNm.	21
• Fraccionamiento de ARNm poli (A)+	22
• Extracción y preparación de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> .	23
• Evaluación estadística.	24
RESULTADOS	25
RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSION	36
PERSPECTIVAS	37
BIBLIOGRAFIA	38

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Estructura de la glándula mamaria.	3
Fig. 2 Diagrama de las rutas de secreción a través del epitelio Mamario.	5
Fig. 3 Concentraciones iónicas del alvéolo y los potenciales de Membrana.	7
Fig. 4 Modificación en el contenido de lactosa, iones y volumen en leche de cabra.	9
Fig. 5 Relación entre la concentración de iones y lactosa en la Leche.	10
Fig. 6 Expresión funcional en ovocitos de <i>X. laevis</i> del ARNm de glándula mamaria de rata lactante.	26
Fig. 7 Efecto temporal sobre la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos inyectados con agua o con ARNm de la glándula mamaria lactante.	27
Fig. 8 Efecto del tiempo de preincubación en la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos de <i>X. laevis</i> inyectados con ARNm de la glándula mamaria lactante	28
Fig. 9 Curva de tiempo de incubación en ovocitos inyectados con ARNm de la glándula mamaria lactante o con agua.	29

Fig. 10 La captación de $^{22}\text{Na}^+$ en los ovocitos inyectados con ARNm de la glándula mamaria lactante aumenta conforme disminuye la tonicidad del medio.	30
Fig. 11 Curva de dosis respuesta en los ovocitos inyectados con la glándula mamaria lactante.	31
Fig. 12 Inhibición por gadolinio ($10\mu\text{M}$) sobre el ARNm de glándula mamaria de rata lactante.	32
Fig. 13 Fracciones del gradiente de sacarosa.	34
Fig. 14 Captación de $^{22}\text{Na}^+$ en las diferentes fracciones de ARNm de glándula mamaria lactante.	35
Fig. 15 Expresión del ARNm fraccionado de glándula mamaria Lactante.	36

RESUMEN

La leche materna en algunas especies es hiposódica. El mecanismo a través del cual se mantiene la leche en estas condiciones es desconocido, sin embargo se ha propuesto la presencia de un canal de sodio activado por estiramiento. La señal que posiblemente activa estos canales es la concentración de lactosa, ya que esta ejerce un efecto osmótico sobre las células de los acinos glandulares. Sin embargo, en la actualidad no se han caracterizado cinética y molecularmente estos canales en la glándula mamaria. Para la identificación de proteínas de membrana, entre ellas canales iónicos, se ha utilizado la expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis*. El objetivo del trabajo es determinar si existe un ARN mensajero en la glándula mamaria de rata lactante que responda a cambios en la osmolaridad. Los resultados del presente estudio muestran la presencia de un transporte de sodio que sólo es evidente al inyectar los ovocitos con ARNm de glándula mamaria lactante cuando se incuban en un medio hipotónico (100 mOs). Así, a menor tonicidad del medio, mayor es la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en los ovocitos inyectados. Esta respuesta es proporcional a la concentración de ARNm inyectado en el ovocito. El ovocito requiere de 96 h para poder procesar el ARNm inyectado para expresarlo funcionalmente. El tiempo óptimo de preincubación de los ovocitos inyectados con el ARNm en el medio hipotónico fue de 30 min. El tiempo de máxima captación de $^{22}\text{Na}^+$ en medio hipotónico de los ovocitos inyectados con ARNm que fueron preincubados por 30 min en medio hipotónico fue también de 30 min.

En ninguno de los experimentos se observó captación $^{22}\text{Na}^+$ cuando los ovocitos se inyectaron con agua tanto en medio isotónico como hipotónico, indicando que la respuesta fue específica del ARNm. Se ha descrito que el lantánido trivalente gadolinio (Gd^{3+}) inhibe el transporte de iones a través de canales activados por estiramiento. Los resultados obtenidos sugieren la posible presencia de un canal de sodio activado por el estiramiento generado por la hipotonicidad del medio. Para estudiar esta posibilidad se incubaron ovocitos inyectados con ARNm en un medio conteniendo $10\mu\text{M}$ de GdCl_3 . Los resultados mostraron que el Gd^{3+} redujo en un 55% la captación de $^{22}\text{Na}^+$. Estudios de captación de iones y también electrofisiológicos en algunos tejidos han mostrado una reducción por cloruro de gadolinio en la actividad de canales activados por estiramiento semejante a la obtenida en este trabajo. Por lo anterior se sugiere que el transporte de sodio expresado en los ovocitos inyectados con ARNm de glándula mamaria pudiera pertenecer a la familia de los activados por estiramiento. El ARNm de glándula mamaria lactante fue fraccionado en un gradiente de sacarosa, y se mostró que las fracciones 10-13 que tienen una masa de aproximadamente 2.0 kb captaron mas $^{22}\text{Na}^+$ lo que indica que probablemente en estas fracciones se encuentre el mensaje que codifica para esta proteína.

INTRODUCCION

La lactancia es el proceso natural de alimentación inicial de los mamíferos. Los primeros seis meses en el ser humano, al igual que las tres primeras semanas de vida de la rata, representan el período de mayor velocidad de crecimiento, de aquí que la demanda de nutrimentos impuesta por la cría a la madre es elevada, y corresponde a ésta cubrirla mediante una producción de leche adecuada en calidad y cantidad.

Desde la década de los cincuentas se ha estudiado en diferentes especies la composición de la leche y los mecanismos involucrados en su síntesis. Sin embargo, el estudio de las adaptaciones metabólicas que presenta la madre durante la lactancia, es una área que ha recibido poca atención.

En todas las especies la glándula mamaria tiene la misma estructura básica, está formada por tejido glandular o parénquima, y tejido de sostén o estroma. El tejido glandular se organiza en pequeños sacos o alvéolos, formados por una capa de epitelio glandular y rodeados por células mioepiteliales contráctiles. Los alvéolos convergen en un sistema de conductos que desembocan en el pezón (1).

La unidad funcional de la glándula mamaria es el alvéolo, como se muestra en la figura 1. Se encuentra constituida por una sola capa de células epiteliales o células alveolares secretoras de leche dispuestas en torno a una cavidad o lumen. Estas células absorben de la sangre los precursores para la síntesis de proteínas y lípidos de la leche, los cuales son liberados al lumen alveolar (1).

La lactancia de la rata dura alrededor de 21 días, de los cuales el periodo comprendido entre los días 12 y 14 es considerado como el de máxima producción láctea, en el que la rata produce alrededor de 125 ml de leche por Kg de peso corporal con un promedio de 40 ml de leche por día.

Se ha demostrado en estudios por diferencias arteriovenosas que entre los días 12 y 14 de lactancia existe una mayor captación de aminoácidos por la glándula mamaria, lo que se asocia con la mayor producción de leche (2,3).

Durante la lactancia también existen otras modificaciones fisiológicas, como la hiperplasia del tejido mamario y la hipertrofia de diferentes tejidos como el hígado, el riñón, el tracto digestivo y el corazón (4). Se presentan también modificaciones bioquímicas que incluyen un aumento de la glucólisis, de la síntesis de lactosa, la esterificación de ácidos grasos, la lipogénesis y la síntesis de proteínas en el tejido mamario (3). En el hígado se observa un aumento en la esterificación de los ácidos grasos y la lipogénesis, mientras que la cetogénesis disminuye. En el tejido adiposo hay aumento en la lipólisis y disminuye la lipogénesis y la glucólisis (3).

En el inicio de la lactancia se produce una secreción denominada calostro, con un contenido elevado en proteínas y bajo en azúcares y grasa. El calostro que es rico en inmunoglobulinas, principalmente IgA secretora, se produce durante unos tres días, y después de un período de secreción transicional, a las dos semanas se establece la secreción de leche madura. La composición láctea varía significativamente entre distintas especies animales (4).

Se han establecido diversos mecanismos a través de los cuales se secretan los constituyentes de la leche, como son: 1) transferencia directa de nutrientes del plasma al lumen alveolar, eg. agua y glucosa entre otros., 2) la ruta del Golgi, en donde los nutrientes son empaquetados y excretados al lumen alveolar por exocitosis, eg. proteínas, lactosa, citrato, etc., 3) la ruta de secreción de lípidos a través de glóbulos de grasa que son extruidos de la membrana apical hacia el lumen alveolar, eg. triglicéridos, hormonas, vitaminas liposolubles, y factores de crecimiento entre otros., 4) transporte vesicular por transcitosis, eg. inmunoglobulinas, transferrina y prolactina., 5) ruta paracelular, en donde pasan sustancias directamente del fluido intersticial a la leche (5).

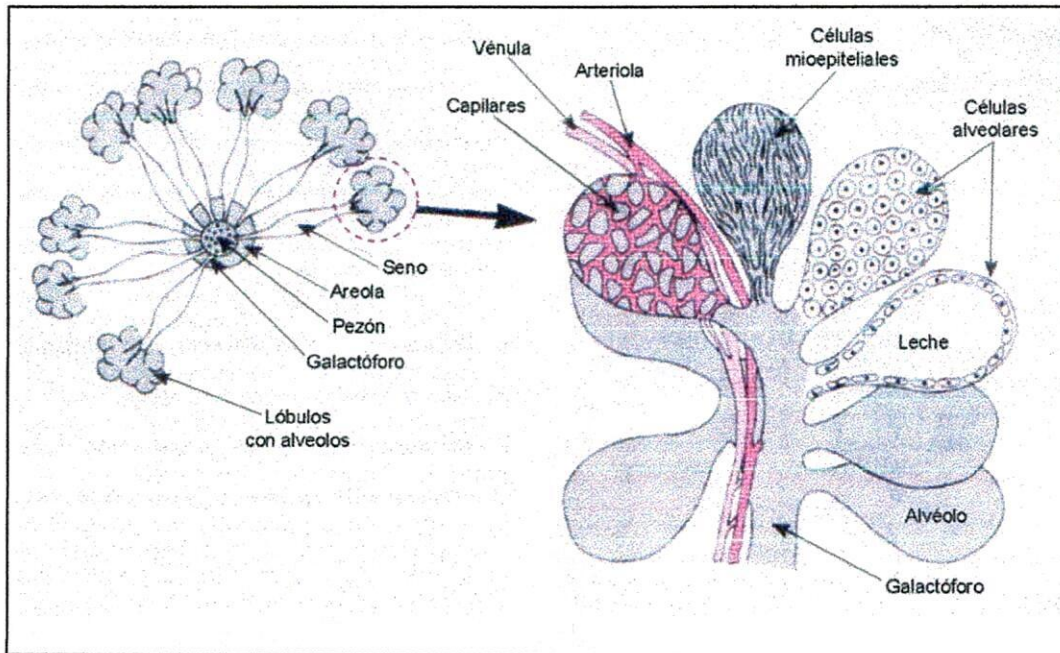


Fig 1. Estructura de la glándula mamaria.

La célula alveolar sintetiza en su citoplasma los constituyentes de la leche, a partir de sustancias que derivan del plasma :

Proteínas. La caseína y la lactoalbúmina, después de su síntesis en el retículo endoplásmico, se empaquetan en vesículas en el aparato de Golgi, éstas se mueven hacia el extremo apical de la célula donde por exocitosis, descargan su contenido al lumen alveolar (6).

Hidratos de carbono. La lactosa es el azúcar principal de la leche, se sintetiza a partir de la glucosa plasmática dentro de las vesículas del aparato de Golgi. El paso final de la síntesis de la lactosa se debe a la acción enzimática del complejo lactosa – sintetasa, enzima formada por dos proteínas que se unen en el aparato de Golgi, la galactosiltransferasa y la lactoalbúmina (7,8).

Grasa. Los lípidos de la leche son fundamentalmente triglicéridos, se sintetizan a partir de glucosa y ácidos grasos libres, o se obtienen a partir de triglicéridos plasmáticos. La célula glandular transporta pequeñas gotas lipídicas rodeadas de membranas desde el extremo basal al apical, donde se liberan al lumen alveolar (9). Otros constituyentes lipídicos de la leche son colesterol, fosfolípidos, vitamina E y vitamina D (10).

La concentración de los principales iones como son el Na^+ , K^+ y Cl^- , es muy diferente entre el compartimento plasmático y la leche. Como se muestra en la tabla 1, en el humano la concentración de sodio y cloruro son significativamente menores en la leche que en el plasma, mientras que lo opuesto ocurre para el potasio (11-13).

Tabla 1.
Concentración de iones en plasma y leche humana (mM).

	Leche*+	Plasma†
Sodio	6.5	138.0
Potasio	14.0	4.6
Calcio	4.0	2.25†
Cloruro	12.1	107.0
Fosfato	1.2	0.43+
Citrato	1.5	—

* Concentración total difusible.

+ Jennes (1985) (11).

† Greer (1982) (14).

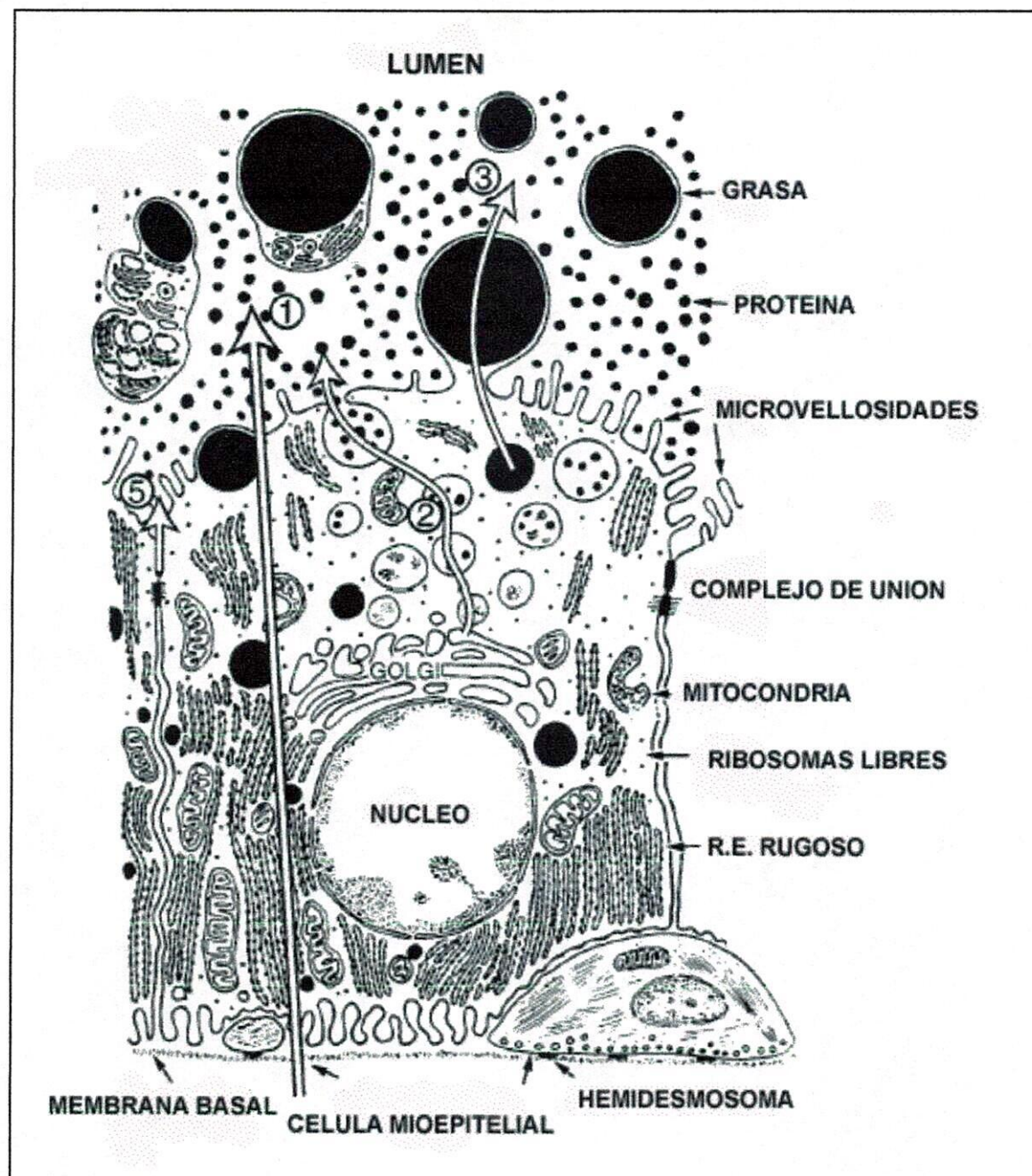


Figura 2. Diagrama de las rutas de secreción a través del epitelio mamario (5).

Efecto de la composición iónica de la leche sobre la diferencia de potencial transepitelial en glándula mamaria de cabra.

Linzell y Peaker proponen un esquema para el mecanismo por medio del cual la glándula mamaria mantiene la composición iónica de la fase acuosa de la leche. Una característica clave de esta hipótesis es que el Na^+ y el K^+ mantienen un equilibrio electroquímico a través de la membrana apical del alvéolo. El resultado es que las concentraciones de Na^+ y K^+ son más bajas en la leche que dentro del lactocito (6).

Linzell y Peaker también proponen la existencia de canales para Na^+ y K^+ en la membrana apical de la célula secretora en donde el movimiento de iones entre el lactocito y el lumen alveolar determinan la concentración iónica de la leche, manteniendo un equilibrio electroquímico a través de la membrana apical (6,13).

Blatchford y Peaker muestran que la glándula mamaria es sensible a la diferencia de potencial transepitelial debido a la concentración de Na^+ , K^+ y Cl^- en el lumen alveolar. Sus resultados muestran la incapacidad de la membrana apical para discriminar entre el Na^+ y el K^+ . Esta evidencia sugiere que la permeabilidad para el Na^+ y el K^+ es idéntica, es decir pueden existir canales no específicos y canales específicos para cada ion (15).

Para lograr esta diferencia de concentraciones de iones entre el plasma y la leche se ha postulado que depende de la presencia de acarreadores específicos para los iones presentes en las células del epitelio de la glándula mamaria. Se ha establecido que para la movilización de iones en la glándula mamaria existen diferentes sistemas de transporte entre los que se encuentran la Na^+ , K^+ ATPasa, el cotransporte de Na^+ , K^+ y Cl^- y la presencia de canales de sodio, potasio y cloruro en la membrana apical entre otros (16).

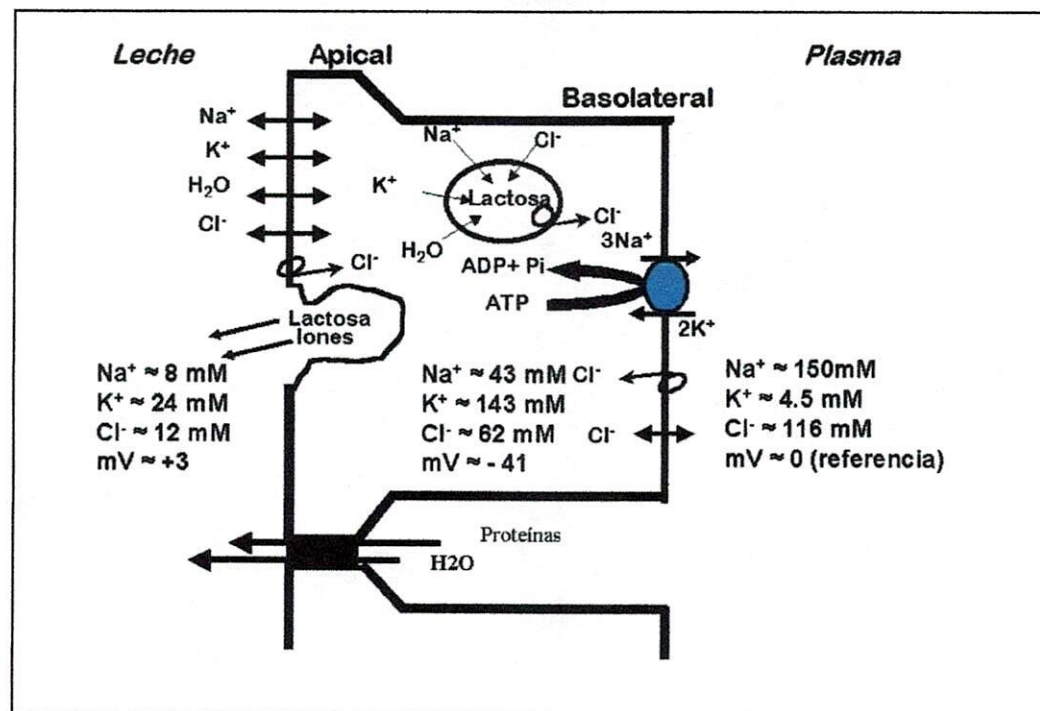


Figura 3. Concentraciones iónicas del alvéolo y los potenciales de membrana (5).

Se ha propuesto un modelo (figura 3) que toma en cuenta el movimiento de sodio, potasio y cloruro a través del epitelio de la glándula mamaria durante la lactancia para mantener la composición iónica de la leche. En esta hipótesis, las principales características son que la concentración de sodio en el interior de la célula alveolar se mantiene baja a través de la acción de la bomba de Na^+ , K^+ ATPasa, que se localiza sólo en la membrana basolateral (9,12). Por otro lado, también se propone que estos iones se distribuyen libremente entre el interior de la célula y el lumen alveolar de acuerdo a la diferencia de potencial eléctrico presente en la membrana apical (12,13). Sin embargo, aún no se ha demostrado molecularmente cual es el mecanismo a través del cual el alvéolo logra mantener a la leche hiposódica.

Por lo tanto la glándula mamaria puede generar y mantener diferentes gradientes de Na^+ , K^+ , y Cl^- entre la leche y el plasma (17). Se ha demostrado en diferentes especies que el tejido mamario, durante la lactancia, presenta actividad de Na^+ , K^+ ATPasa sensible a ouabaína, y por estudios histoquímicos se ha mostrado que la Na^+ , K^+ ATPasa se localiza

únicamente en la membrana basolateral (18). Se ha postulado la posible presencia de un cotransporte Na^+ , K^+ y Cl^- en el tejido mamario de la rata lactante sensible a furosemida que se localiza en la membrana basolateral (19). Este transporte es electroneutro ya que su estequiometría es de 1 Na^+ : 2 K^+ : 2 Cl^- (20,21). Además de lo anterior en la membrana apical se ha postulado la presencia de canales para Na^+ , K^+ y Cl^- . Se sugiere la presencia de un canal catiónico no específico, sin embargo hasta el presente no se han identificado estos canales (21-23).

Estos iones proveen una contribución significativa de la osmolaridad total de la leche en muchas especies, y la transferencia de estos iones a través del epitelio mamario determinan el volumen de la leche secretada (24). El aumento de volumen de la leche en el lumen alveolar, podría provocar una distensión y deformación celular (estiramiento) en el alvéolo lo que incrementaría la presión dentro de este y posiblemente pudiera regular el transporte de los iones Na^+ , K^+ y Cl^- .

La composición iónica del calostro humano es muy diferente a la leche madura, el calostro contiene una concentración de 50 mM de sodio y 60mM de cloruro en comparación a la leche madura que es de 6mM y 12mM para sodio y cloruro respectivamente (12). Evidencias experimentales en cobayo y cabra sugieren que el transporte vía paracelular es el responsable de la alta concentración de sodio y cloruro en el calostro (12,13). En cabra la transferencia de iones y lactosa entre leche y plasma vía paracelular ocurre hacia el final de la gestación y al inicio de la lactancia. El mecanismo por el cual las paredes paracelulares permiten esta transferencia durante el embarazo y se cierran herméticamente durante la lactancia es desconocido (10).

Las células secretoras mamarias transportan grandes cantidades de los iones Na^+ , K^+ y Cl^- en una forma vectorial, pero al mismo tiempo mantienen de un modo delicado el contenido intracelular de los iones. Las concentraciones de sodio y potasio son inversamente proporcionales a la concentración de lactosa (25). Se ha observado en diferentes especies que el cambio en el contenido de sodio y de lactosa en la leche se presenta después de que se ha cerrado la ruta paracelular (26,27). Así conforme avanza la lactancia la

concentración de sodio tiende a disminuir y la lactosa a incrementar como se muestra en la figura 4, alcanzando un máximo durante el período de mayor producción de leche (12,13,28).

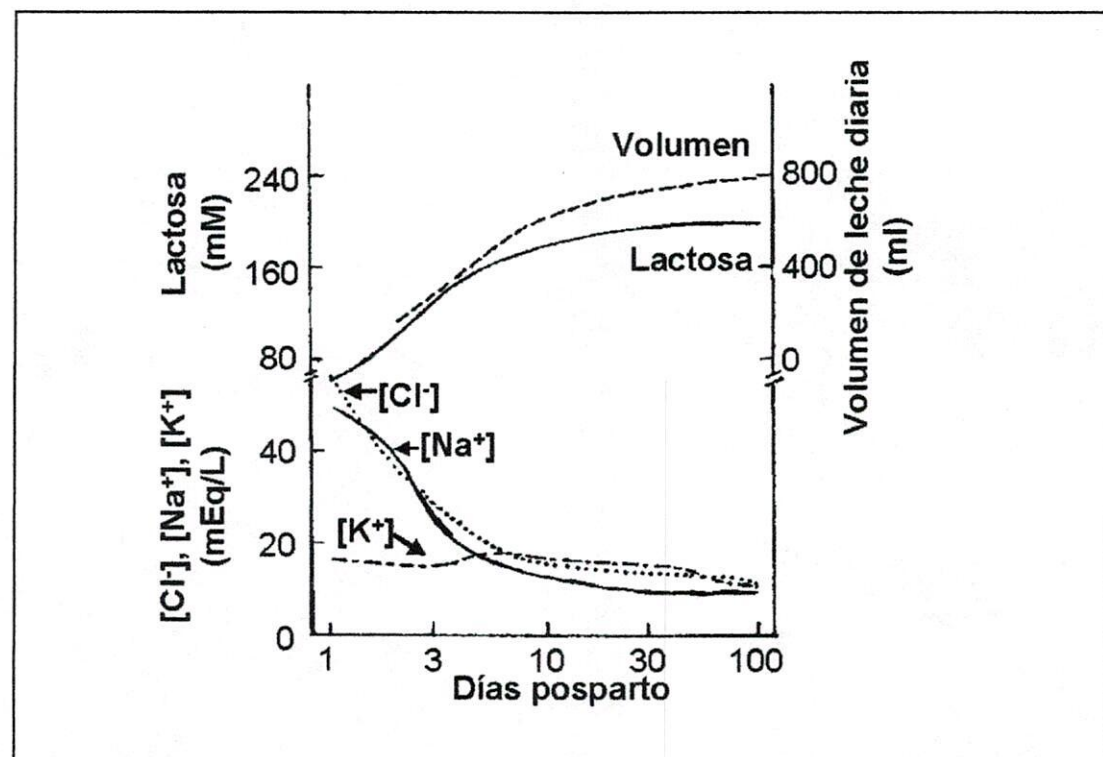


Figura 4. Modificaciones en el contenido de lactosa, iones y volumen en leche de cabra (12,13,28).

Resultados en estudios de perfusión de la glándula mamaria de cabra indican que la secreción de lactosa es la que establece la diferencia de potencial entre el fluido intracelular y la leche, lo que mantiene las concentraciones de sodio y potasio en la leche más bajas que en el lactocito (28). Se especula que el efecto osmótico de la lactosa estimularía el transporte de sodio hacia el interior del lactocito, lo que le facilitaría mantener elevadas concentraciones de lactosa en la leche y al mismo tiempo mantenerla hiposódica (30).

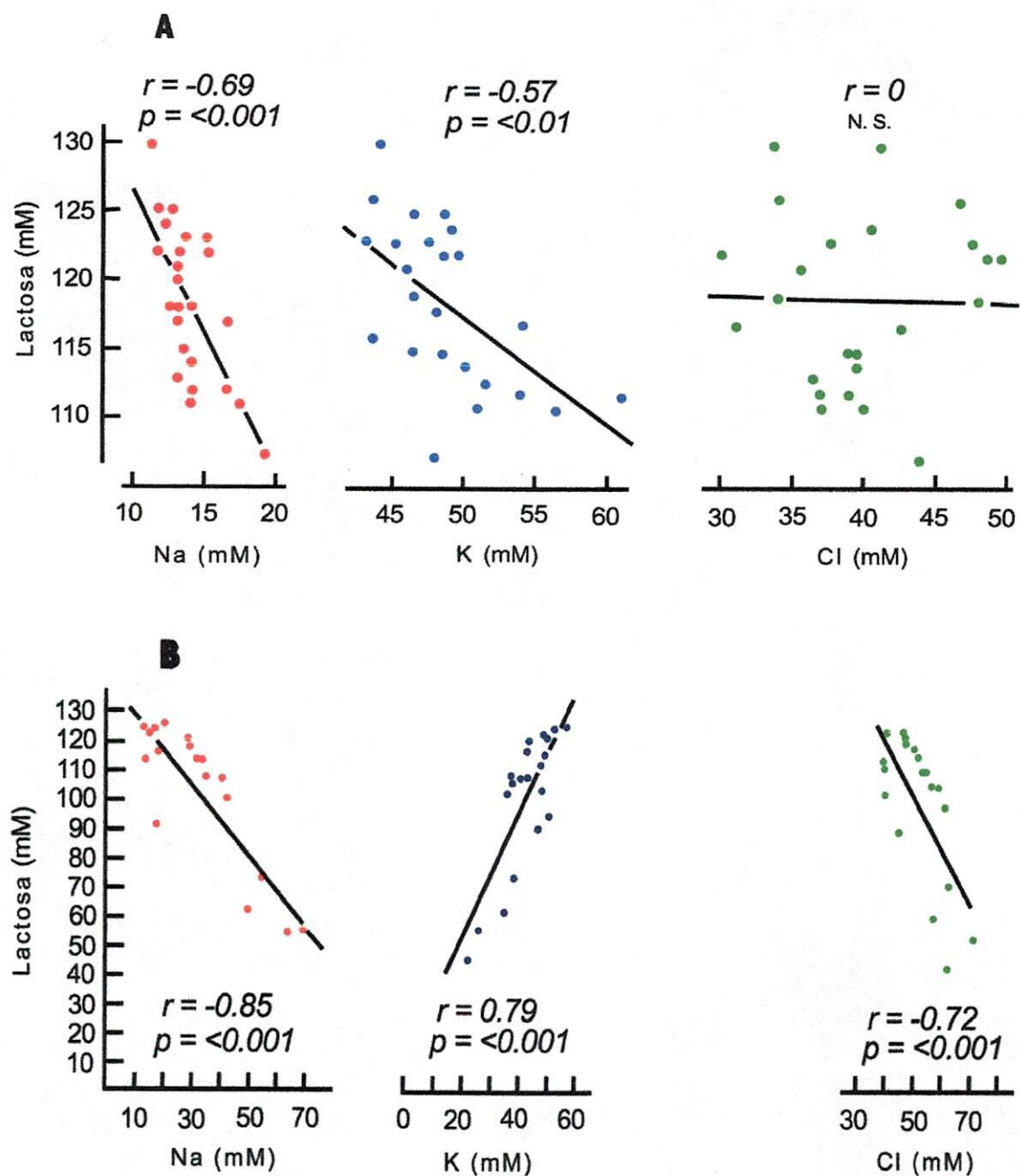


Figura 5. Relación entre la concentración de iones y lactosa en la leche (25,29).

Como se observa en la figura 4A, durante el período de la lactancia la concentración de lactosa es inversamente proporcional a la concentración de los iones de sodio y potasio, sin embargo no existe una asociación con el ion cloruro (29).

La oxitocina es una hormona que participa en la fosforilación de la miosina y en la contracción de células mioepiteliales (31). En la figura 4B se observa el efecto de la inyección de oxitocina sobre la concentración de iones en la leche de cabra. La gráfica muestra que existe un incremento en la concentración de Na^+ y Cl^- en contraste con la disminución de la concentración de K^+ y lactosa. Estos datos indican que un aumento de oxitocina influye en la permeabilidad de los iones en el alvéolo. Esto esta posiblemente mediado por un aumento en el transporte paracelular de iones, que también se observa al final de la gestación. Se postula la existencia de uniones permeables durante el embarazo y en los primeros días de la lactancia, sin embargo, estas uniones se vuelven impermeables cuando se establece la lactancia y la concentración de iones en la leche depende posiblemente de la presencia de canales para iones (25,29).

En el modelo de Linzell y Peaker se predice la presencia de canales para Na^+ , K^+ y Cl^- , en la membrana apical de las células secretoras mamarias. Varias líneas experimentales apoyan la evidencia de esta predicción. Primero Blatchford y Peaker mostraron que la diferencia de potencial a través de la glándula mamaria lactante de la cabra puede alterarse variando las concentraciones de Na^+ , K^+ y Cl^- , en el lumen de la glándula en forma tal que es consistente con la presencia de canales para cada uno de estos iones en la membrana apical. (15).

Sin embargo, se encontró que la membrana apical no es capaz de discriminar entre Na^+ y K^+ . En este sentido, se han identificado canales no específicos para cationes en cultivo de células epiteliales mamarias de ratón (22). Se han aislado fragmentos citoplásmicos a partir de la leche de cabra que están rodeados de membrana apical, los cuales transportan K^+ (23).

Finalmente membranas aisladas de leche de vaca derivadas de la zona apical de las células secretoras expresan canales para K^+ y Cl^- (21). A pesar de la identificación de estos canales ninguno ha sido caracterizado electrofisiológicamente, ni molecularmente.

Se ha observado que la acumulación de leche en el lumen alveolar produce una distensión de los alveolos y una deformación celular que puede jugar un papel importante en la actividad secretora durante la lactancia. La distensión celular tiene efectos sobre el transporte de iones en la glándula mamaria. Enamoto y cols encontraron que la estimulación mecánica con un microelectrodo en células mamarias de ratón en cultivo produce una rápida despolarización seguida de una prolongada hiperpolarización (32). Esto indica la existencia de canales sensibles al estiramiento en las células epiteliales mamarias, sin embargo hasta la fecha no se han identificado.

Se han descrito recientemente en diversos tejidos la existencia de canales activados por estiramiento de la membrana en condiciones de hipotonicidad, los cuales son parcialmente inhibidos por concentraciones micromolares de gadolinio (Gd_3^{+}) (33). Los canales iónicos activados por el estiramiento de la membrana tienen como característica el activarse cuando el potencial de membrana celular es negativo formando un gradiente electroquímico a favor de la acumulación intracelular de Na^+ , Ca^{+} y K^{+} . Posiblemente la activación de estos canales se da como una respuesta de defensa ante la exposición excesiva del hinchamiento celular, pero no a la exposición moderada a cambios de volumen celular. Estos canales iónicos se pueden activar o inhibir de acuerdo al potencial de membrana impuesto por el estiramiento de la membrana celular.

Los cambios en el volumen celular se asocian con una variedad de funciones metabólicas. Por ejemplo el hinchamiento celular favorece la síntesis de proteína, e inhibe la degradación de proteínas, glucógeno y lípidos.

Estos canales se han implicado en una amplia variedad de respuestas a perturbaciones mecánicas las que incluyen regulación del volumen celular, el incremento intracelular de calcio, la proliferación celular, la expresión génica, la síntesis de ADN, la descarga de los barorreceptores, la actividad eléctrica cardíaca y la liberación del factor natriurético (33) entre otros. Hasta la fecha no se conoce la estructura molecular de estas proteínas.

Para la identificación y caracterización de proteínas de membrana se ha hecho uso de la expresión funcional de los ARNm de estas proteínas utilizando ovocitos de *Xenopus laevis*, los cuales fueron utilizados por primera vez como instrumento para estudiar los mecanismos de traducción proteica, en 1971 por Gordon y colaboradores, (1981) (34). Estos autores observaron que los ovocitos de *Xenopus* eran capaces de sintetizar hemoglobina al inyectarlos con el ARNm de reticulocitos de conejo. Es decir demostraron que los ovocitos pueden sintetizar una proteína a partir del ARNm de otra especie animal (35). Diez años después, el receptor del neurotransmisor acetilcolina fue la primera proteína de membrana estudiada en ovocitos de *Xenopus*. Sumikawa y colaboradores inyectaron ovocitos de *Xenopus* con el ARNm del órgano eléctrico de la anguila Torpedo marmorata. Estos experimentos mostraron que el receptor de acetilcolina, compuesto por varias subunidades, fue sintetizado y apropiadamente insertado en la membrana celular de los ovocitos, lo que demostró que los ovocitos no solo eran capaces de sintetizar proteínas a partir del ARNm inyectado, sino que también podían llevar a cabo modificaciones postraduccionales, tales como glicosilación, secreción o inserción en la membrana (36).

La creciente utilización de los ovocitos de *Xenopus* en proyectos de clonación de proteínas de membrana se debe a que éstos tienen las siguientes ventajas sobre las células somáticas (37) :

- 1) Los ovocitos expresan la proteína de interés a partir de la inyección de su ARNm.

- 2) El 95% de los ovocitos expresan apropiadamente la información del ARNm inyectado.
- 3) El control del medio ambiente de los ovocitos se logra fácilmente con cambios simples de la solución de incubación.
- 4) Debido a su tamaño, los ovocitos se pueden microinyectar y manejar en forma individual. Esta ventaja es de gran utilidad en la expresión de canales iónicos.

JUSTIFICACION.

Para la movilización de iones en la glándula mamaria se han establecido diferentes sistemas de transporte dentro de los que se encuentran la Na^+ , K^+ ATPasa, el cotransporte Na^+ , K^+ y Cl^- y la presencia de canales para Na^+ , K^+ y Cl^- en la membrana apical. Sin embargo ningún estudio ha relacionado el mecanismo y la vía a través del cual se regula la concentración del sodio por cambios osmóticos como el ejercido por la lactosa.

Teóricamente el efecto osmótico de la lactosa estimularía el transporte de sodio, lo que le facilitaría mantener elevadas concentraciones de lactosa en la leche y al mismo tiempo mantenerla hiposódica.

La identificación de este tipo de canales activados por estiramiento en la glándula mamaria permitiría conocer el mecanismo a través del cual se mantiene la leche materna con baja concentración de sodio, lo cual es vital en los primeros meses de vida del neonato. Además permitiría caracterizar a nivel cinético y molecular los canales activados por cambios del volumen alveolar, de los cuales ninguno ha sido identificado a nivel de secuencia nucleotídica y de su regulación de expresión génica.

HIPOTESIS.

Durante el período de mayor producción de leche el tejido mamario requiere mantener la concentración de sodio baja en la leche la cual depende de la concentración alta de lactosa, por lo que posiblemente exista un mecanismo de regulación en la expresión de los transportadores de sodio en la glándula mamaria inducidos por cambios en la osmolaridad.

OBJETIVO GENERAL.

Describir el transporte de sodio inducido por hipotonicidad de la glándula mamaria de rata lactante utilizando el sistema de expresión funcional con ovocitos de *Xenopus laevis*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Describir el efecto de la osmolaridad extracelular, sobre el transporte de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con ARNm de glándula mamaria lactante.
- Relacionar la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos de *Xenopus laevis* en diferentes condiciones de osmolaridad con dosis crecientes de ARNm de glándula mamaria lactante.
- Determinar el efecto del inhibidor de canales activados por estiramiento gadolinio sobre la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos de *Xenopus laevis*, inyectados con ARNm de glándula mamaria lactante.
- Determinar la máxima expresión, del ARNm fraccionado de glándula mamaria de rata lactante en de *Xenopus laevis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar obtenidas del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de ciclo luz-oscuridad de 12 horas a una temperatura ambiente y alimentadas con una dieta normal (laboratory autoclavable rodent diet) y agua a libre demanda. Se consideró la fecha de parto como primer día de lactancia.

Extracción de los tejidos

El tejido mamario, se obtiene de ratas en el 12° día de lactancia, previamente dormidas con CO₂, entre las 9:00 y 10:00 horas. Posteriormente se decapitan y se separa el tejido mamario del abdomen, enjuagándolo en solución salina al 0.9% fría. Se toman muestras de tejido de 500 mg para la extracción del ARN, se depositan en nitrógeno líquido y se guardan a - 80°C hasta el momento de la determinación.

Extracción del ARN total

El ARN total se aisló por una extracción con tiocianato de guanidina y por un gradiente de cloruro de cesio (38,39) Todas las soluciones utilizadas para la extracción de ARN deben ser preparadas con agua tratada con dietil-pirocarbonato al 0.1% (DEPC) y el material de vidrio debe estar libre de ARNasas, lo cual se logra horneándolo a 180°C durante 4 horas.

Agua DEPC al 0.1%:

Agua DEPC al 0.1%	
Dietil-pirocarbonato	3ml
Agua desionizada	3000ml

Agitación 4 horas, condiciones de autoclave: 15 min a 15lbs/pulg²

Extracción de ARN total con tiocianato de guanidina y cloruro de cesio (CsCl).

Se deben preparar 8 mL de la solución de tiocianato de guanidina y 4mL de la de CsCl por muestra.

Para 6 muestras se debe preparar las siguientes soluciones:

Solución de tiocianato de guanidina

Tiocianato de guanidina 4M	23.63g
Citrato de sodio 1M pH 7.0	1.25ml

Para disolver calentar en baño maría a 40°C, aforar a 50mL con agua DEPC y esterilizar con membrana de nylon 0.22µm, guardar a 4°C.

Solución de cloruro de cesio

Cloruro de cesio

CSCI 5.7M	23.0g
Acetato de sodio 3M pH 5.2	200µl

Aforar a 25ml con agua DEPC y esterilizar con membrana de nylon 0.22µm, guardar a temperatura ambiente.

Solución de sarcosil al 10%

Sarcosil	10.0g
Agua DEPC c.b.p	100ml

PROCEDIMIENTO :

- A) Colocar en tubos de 50ml estériles 8ml de tiocianato de guanidina 4M, agregar 56 μ l de β -mercaptoetanol (en la campana), pesar de 0.5 a 1.0g de tejido previamente congelado con nitrógeno líquido, homogeneizar a alta velocidad (polytron PT-2000 Velocidad 3) hasta obtener el tejido completamente lisado, agregar 400 μ l de sarcosil al 10%, mezclar por inversión.
- B) Centrifugar (J2-MC, rotor JA-20) durante 15 minutos a una temperatura de 18°C, transferir el sobrenadante (desechando el botón) a un tubo de centrifuga (Beckman 331374), con 4ml de CsCl 5.7M, acomodarlo en su camisa y cerrarla, ultracentrifugar (XL-90 rotor SW 40 Ti), a 29, 000 rpm, 18 h a una temperatura de 18°C, (Nota: si la temperatura baja el CsCl se precipita).
- C) Decantar el sobrenadante, ponerlos en una gradilla boca abajo, y cortar el tubo en el 1/4 inferior, resuspender el botón con 300 μ l de agua DEPC filtrada por dos ocasiones pasarlo a un tubo eppendorf estéril previamente etiquetado.
- D) Precipiar el ARN con 60 μ l de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 999 μ l de etanol absoluto. Guardar a -70 °C durante 24 h.
- E) Centrifugar, a 14, 000rpm por 30 min a 4°C, eliminar el sobrenadante y lavar con etanol al 70% mezclar por inversión y centrifugar, a 14, 000 rpm por 15 min a 4°C, quitar totalmente el etanol cuidando de no tirar el botón, secar en speed vac 4 min y resuspender con agua DEPC filtrada (100 μ l).

F) Guardar a -80°C por 24h y leer en el espectrofotómetro 260/280nm (Beckman DU 640).

G) Para verificar su integridad se realizó electroforesis en agarosa con formaldehído como agente desnaturalizante. Mostrando las 2 subunidades del ARN total se continúa con el aislamiento del ARN mensajero.

EXTRACCIÓN DEL ARN MENSAJERO.

El 0.2% del ARN total es ARN mensajero por lo se parte de 1.25 mg de ARN total y se utilizan columnas de Oligo dT (Kit de purificación de RNAm Pharmacia Cat. No. XY-012-00-05) (40). Se cuantifica el ARNm en el espectrofotómetro a 260/280nm y se analiza su integridad utilizando la reacción de la transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para verificar la presencia de β -actina.

El procedimiento de obtención del ARNm utilizando el kit de purificación es el siguiente:

- Las columnas se invierten en un tubo corex de 15ml estéril y se lavan dos veces con un 1mL de amortiguador con alta concentración de sal. Se deja fluir y se reemplaza el tubo corex.
- 1.25 mg de ARN total se disuelven con 1ml de amortiguador de elución, se calienta a 65°C por 5 minutos, se coloca el ARNm en hielo y se adicionan 200 μl de amortiguador para la muestra; se mezcla suavemente con la micropipeta.
- La muestra se coloca en la columna y se deja fluir.
- Se calienta en baño maría a 65°C con el amortiguador de elución.
- Se centrifuga a 1600 rpm por 2 minutos, y se añaden 250 μl de amortiguador de alta concentración de sal; se repite este paso.
- Se lava 3 veces con 250 μl de amortiguador de baja concentración en sal .

- g) Se reemplaza el tubo corex, y se lava 4 veces con 250 μ l de amortiguador de elución.
- h) Para concentrar el ARNm se agregan 100 μ l de amortiguador de muestra, 10 μ l de glucógeno y 2.5 ml de etanol absoluto. Se guarda a -80°C por 24h, se centrifuga a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C , y se cuantifica el ARNm con amortiguador TE. Se analiza la integridad de β -actina por RT-PCR y se almacena a -80°C en alícuotas de una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para ser inyectado más tarde al ovocito.

FRACCIONAMIENTO DEL ARN POLI (A)⁺

Para verificar el gradiente se prepararon una solución de sacarosa al 5% conteniendo 0.005% de rojo de fenol y otra de sacarosa al 25% con 0.025% de rojo de fenol. Se colocan cada una de las soluciones (4ml de cada solución) en un generador de gradientes en su depósito correspondiente que se coloca en una parrilla de agitación. Al momento de abrir las válvulas del generador de gradiente, la mezcla de las soluciones de sacarosa sale por una canula fina y se desliza por las paredes de un tubo de polialómero (14X89mm) en donde se va formando el gradiente del 5% al 25% de sacarosa. Al término se coloca el tubo de polialomero en un soporte, se le hace un agujero en la base (aguja de insulina 25X16mm) y se recolectan alícuotas de 15 gotas en 18 tubos eppendorf. Se cuantifica en el espectro a una $\lambda=555.0$ nm y se grafica en papel semilogarítmico los datos de absorbancia contra el número de fracciones. Se obtuvo una correlación $R= 0,97985$, lo que indica que el gradiente es lineal. Conociendo que la formación del gradiente era correcta se procedió a fraccionar el Poli (A)⁺.

Con este fin se utilizó el generador de gradiente y se utilizaron los 4 ml de las soluciones de sacarosa al 5% y al 25% en un tubo de polialomero (14X89mm) (peso/peso 10 mM tris base, pH 7.4, EDTA 1 mM y SDS al 0.2%), el ARNm (150 μg) disueltos en 3 ml de EDTA 1 mM conteniendo SDS al 0.5%. Se calentó la muestra a 70°C por 10 min, se aplicó al tubo de polialómero y se centrifugo a 40,000rpm por 4 h a 20°C (41).

Se colocó el tubo de polialómero en un soporte y se colectaron fracciones de 15 gotas. Las fracciones se cuantificaron con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260/280nm y se verificó su integridad por electroforesis en gel de agarosa utilizando formaldehído como agente desnaturalizante (42). Una vez fraccionado el ARNm (150µg) se se almaceno a -80°C hasta ser inyectado a los ovocito de *Xenopus laevis* a una concentración de 0.5 µg/µl.

EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS OVOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*.

Anestesiar una rana *Xenopus laevis* (Carolina Biological Suply, Buelington, NC y Nasco, Atkinson MI) por inmersión en tricaina al 0.17% (ácido etil éster 3-aminobenzoico), se hace una pequeña incisión en la parte inferior del abdomen y cortar suficientes lóbulos para obtener los ovocitos necesarios, suturar la herida incluyendo el peritoneo interno con seda #5., los ovocitos, fueron incubados durante una hora en agitación continua en un medio libre de Ca^{+} , ([mM] 82.5 NaCl , 2.0 KCl, 1.0 MgCl_2 y 5.0 Hepes/Tris, pH 7.4), conteniendo 2mg/ml de collagenasa tipo B. Posteriormente los ovocitos en estadio V y VI fueron transferidos a Ringer de rana ND96 ([mM] 96.0 NaCl , 2.0 KCl, 1.8 CaCl_2 , 1.0 MgCl_2 y 5.0 Hepes/Tris, pH 7.4), defoliculados manualmente, utilizando pinzas finas e incubados toda la noche a 18°C (43). Al día siguiente los ovocitos que resisten la manipulación (comúnmente >95%) fueron inyectados con 50 nl de agua como control o con agua conteniendo 0.5 µg/µl de ARNm .

Los ovocitos fueron incubados en solución ND96, adicionada con piruvato de sodio (25 mM) y gentamicina (5 mg/ml) durante cuatro días . La captación de $^{22}\text{Na}^{+}$ fue realizada en grupos de 20 a 30 ovocitos cuatro días después de la inyección utilizando el siguiente protocolo: una incubación de 30 min en una solución 100 mOsm ([mM] 40.0 NaCl , 10.0 KCl, 1.8 CaCl_2 , 1.0 MgCl_2 y 5.0 Hepes/Tris, pH 7.4), conteniendo ouabaina(1 mM), amilorida (0.1 Mm) y bumetanida (0.1 mM) seguido por un período de captación de 30 min

en una solución 100 mOsm conteniendo ouabaína, amilorida y bumetanida en las concentraciones citadas y 2 μCi de $^{22}\text{Na}^+$ por ml (NEN).

La ouabaína fue agregada para evitar el flujo de $^{22}\text{Na}^+$ por la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ y la amilorida para prevenir la captación de $^{22}\text{Na}^+$ por canales de sodio o del cotransportador Na^+/H^+ . La exclusión K^+ extracelular y la adición de bumetanida al medio de captación fue para prevenir la captación $^{22}\text{Na}^+$ mediante el cotransportador de $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ endógeno expresado en ovocitos. La solución de 200mOsm en ND40 fue ajustada con 100mM de sacarosa (44).

ANALISIS ESTADISTICO.

Los estudios se realizaron a través la medición de la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en grupos de 20-25 ovocitos inyectados con ARNm o con agua. Los datos se muestran como promedio $\pm$ error estándar. La unidad de captación del isótopo radioactivo ($^{22}\text{Na}^+$) fue pmol/ovocito/h. La valoración de las diferencias entre cada uno de los grupos se realizó con análisis de varianza (ANOVA) de una vía y de múltiple comparación, con las pruebas de corrección de Bonferroni o con el análisis de varianza por rangos de una vía de Kruskal-Wallis, con el proceso de múltiple comparación por el método de Dunn. Una $p \leq 0.05$ fue considerada como significativa.

RESULTADOS

Para determinar la existencia de canales activados por estiramiento de la membrana, se hizo uso del análisis de expresión funcional utilizando ovocitos de *Xenopus laevis*. Se analizaron las propiedades funcionales del ARNm de la glándula mamaria de rata lactante con este sistema y se midió la captación de $^{22}\text{Na}^+$.

Inicialmente, el análisis de la expresión funcional se realizó al cuarto día después de la inyección de los ovocitos con el ARNm de glándula mamaria e incubando los ovocitos a una temperatura de 32°C en el momento de la captación con el isótopo radioactivo. Para determinar si el estiramiento de la membrana provocaba un aumento en la captación del $^{22}\text{Na}^+$ se modificó la osmolaridad del medio de incubación.

A diferencia de la mayoría de la células eucarióticas, la isotonicidad de estas células es de alrededor de 200 mOs (37). Así que se procedió a estudiar inicialmente el efecto de la incubación de los ovocitos inyectados con ARNm de glándula mamaria de rata lactante en un medio que contenía 200 mOs y otro de 100 mOs (hipoosmolar).

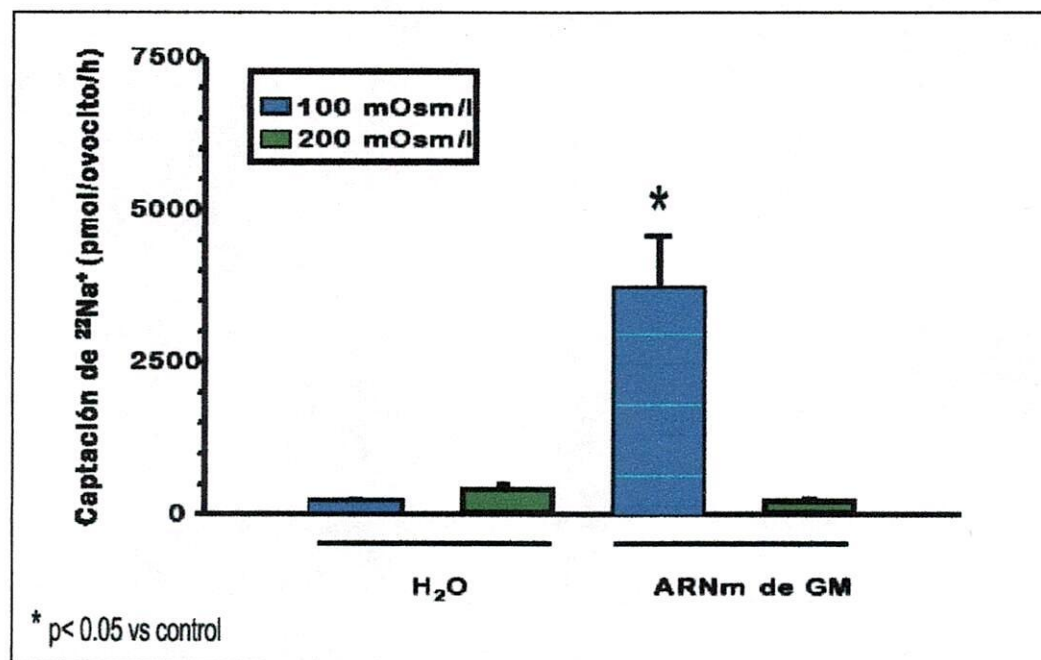


Figura 6. Expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis* del ARNm de glándula mamaria de rata lactante.

Los experimentos de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con el ARNm de glándula mamaria lactante mostraron un incremento de la captación del $^{22}\text{Na}^+$ fué significativamente mayor en comparación con los ovocitos inyectados con agua (5193 ± 1690 vs 110 ± 8 pmol/ovocito/h) cuando estos se incubaron en un medio hipoosmótico. Como se observa en la figura 6 el incremento en la captación de $^{22}\text{Na}^+$ se presenta sólo en los ovocitos inyectados con ARNm expuestos a medio hipotónico, mientras que en el medio isotónico (187 ± 81 vs 273 ± 27 pmol/ovocito/h) no existió una diferencia significativa entre los controles inyectados con agua y los que se les inyectó ARNm. Por lo tanto el incremento en captación de $^{22}\text{Na}^+$ solo se observó en los ovocitos inyectados con el ARNm de glándula mamaria e incubados en un medio hipotónico. Esto indicó que en el tejido de glándula mamaria lactante se expresa un ARNm que permite la entrada de $^{22}\text{Na}^+$ debido al cambio osmótico, probablemente exista un estiramiento de la membrana que active este transporte.

Con este antecedente se procedió a establecer las condiciones apropiadas de la expresión del ARNm de glándula mamaria lactante en los ovocitos de *Xenopus laevis*. Primero se buscó el día óptimo de expresión del ARNm en los ovocitos. Se inyectaron las células con el ARNm y se midió su captación a las 48, 72, 96, 120 y 144 h después de la inyección.

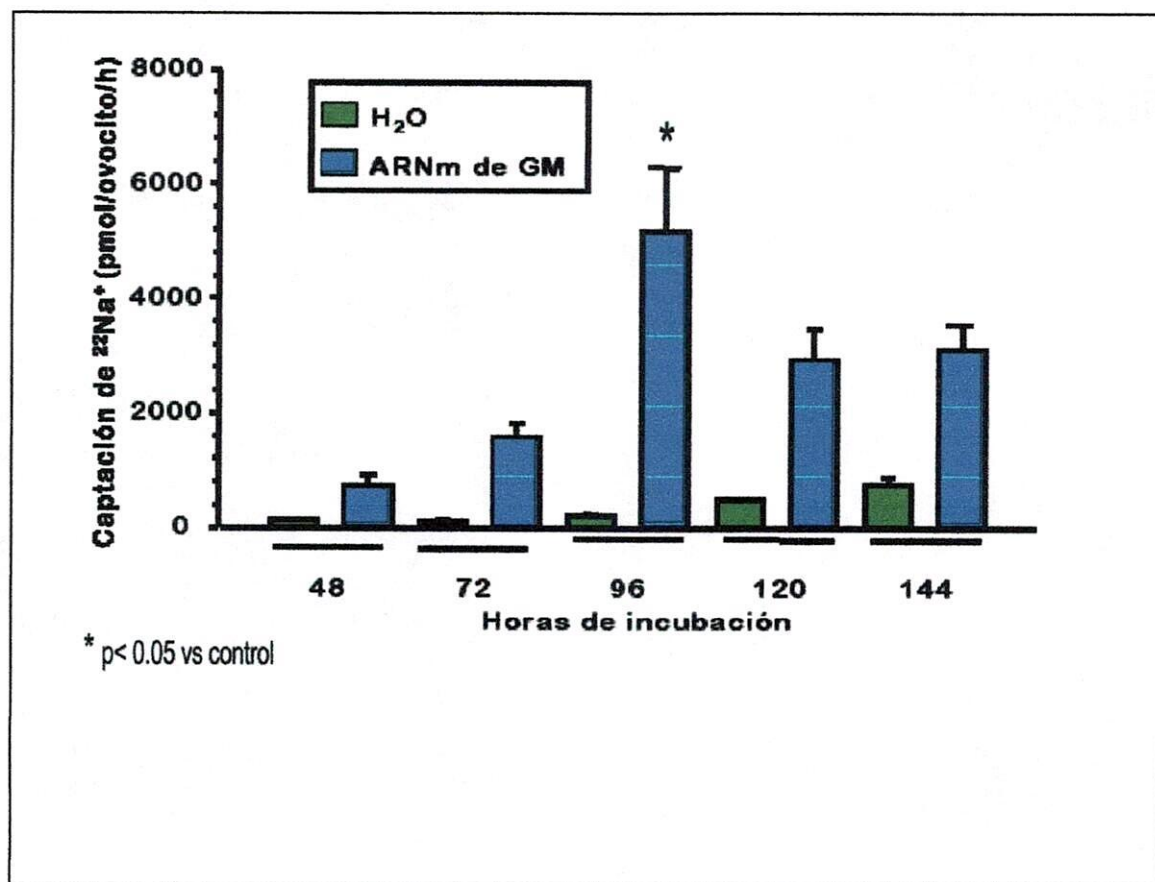


Figura 7. Efecto temporal sobre la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos inyectados con agua o con ARNm de la glándula mamaria lactante.

Como se muestra en la figura 7, el ARNm de glándula mamaria requiere de 96 h para ser procesado por el ovocito, ya que a este tiempo se observó la máxima captación de $^{22}\text{Na}^+$.

Los ovocitos inyectados con agua mostraron un captación de $^{22}\text{Na}^+$ significativamente menor comparada con los inyectados con el ARNm de glándula mamaria.

Posteriormente, se evaluó el tiempo de preincubación anterior al ensayo de captación para determinar cual es el tiempo óptimo para el estiramiento de la membrana del ovocito. Con este fin se preincubaron los ovocitos en medio hipotónico (100 mOs).

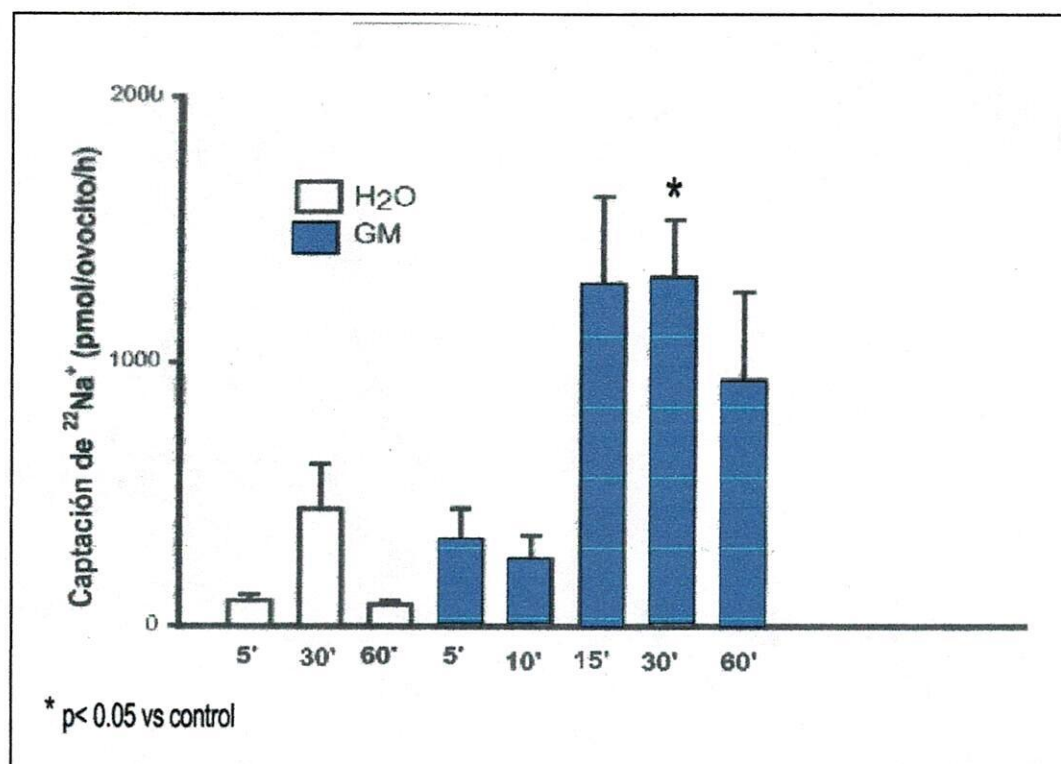


Figura 8. Efecto del tiempo de preincubación en la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos de *X. laevis* inyectados con ARNm de la glándula mamaria lactante .

La figura 8 muestra que el grupo de ovocitos inyectados con el ARNm presenta una maxima captación de $^{22}\text{Na}^+$ entre los 15 y los 30 min de preincubación en medio hipotónico. Nuevamente los ovocitos inyectados con agua mostraron una captación de este ión significativamente menor. En base a estos resultados se concluyó que 30 min de

preincubación en medio hipotónico eran suficientes para estimular a los canales activados por estiramiento.

El siguiente experimento se realizó con la finalidad de establecer el tiempo óptimo de captación de $^{22}\text{Na}^+$. Se realizó la cinética de captación de $^{22}\text{Na}^+$ en los ovocitos de *Xenopus laevis* midiendo la velocidad de captación a los 5, 10, 15, 30 y 60 min.

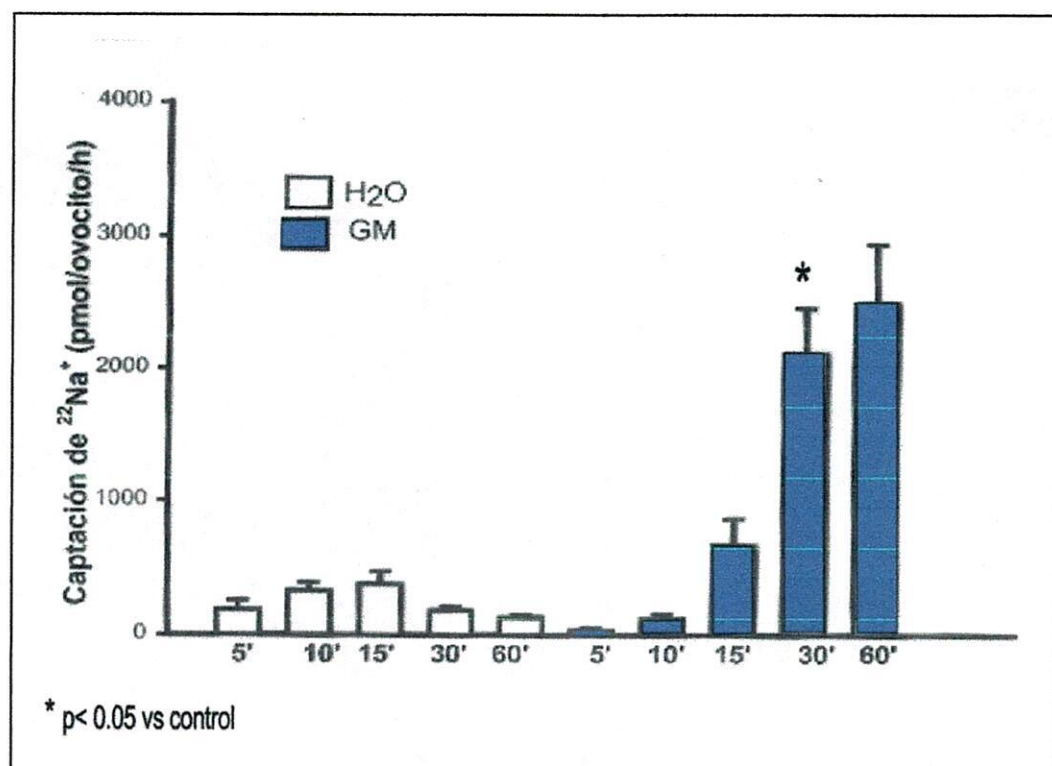


Figura 9. Curva de tiempo de incubación en ovocitos inyectados con ARNm de la glándula mamaria lactante o con agua.

Los resultados de la figura 9 muestran que a los 30 min de incubación se obtiene una mayor captación de $^{22}\text{Na}^+$. A los 60 min se observa que se alcanzó saturación, por lo que el tiempo de 30 min permite una valoración real de la captación de este catión. Nuevamente, los ovocitos inyectados con agua presentan una menor captación de $^{22}\text{Na}^+$ con diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los que fueron inyectados con ARNm a los 30 min.

Con las condiciones óptimas de expresión del ARNm, de preincubación en un medio hipotónico, y de captación de $^{22}\text{Na}^+$ se procedió a analizar el efecto de diversos grados de hipotonicidad del medio para determinar si la expresión era dependiente de la tonicidad. Se midió la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos preincubados en medios que tenían entre 100 y 70 mOs.

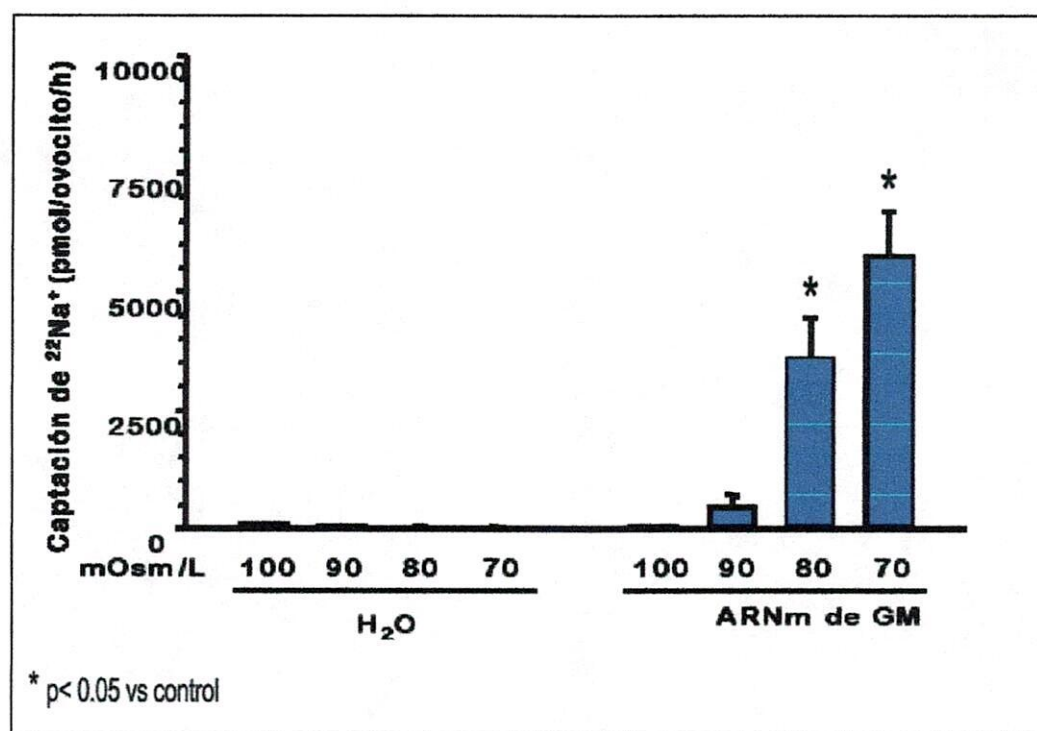


Figura 10. Captación de $^{22}\text{Na}^+$ en los ovocitos inyectados con ARNm de la glándula mamaria lactante.

En la figura 10, se muestra que conforme disminuye la tonicidad del medio, la captación de $^{22}\text{Na}^+$ de ovocitos inyectados con ARNm de glándula mamaria lactante incrementa significativamente, lo que no se observa en los ovocitos inyectados con agua (3597 ± 874 , 5576 ± 935 vs 38 ± 8 , 35 ± 7 pmol/ovocito/h). Estos resultados confirman, que la captación de $^{22}\text{Na}^+$ es dependiente del ARNm inyectado y de la osmolaridad del medio., aunque no se valoró el cambio de tamaño del ovocito en las diferentes osmolaridades, se observó

claramente que existía un incremento del tamaño de los ovocitos en las osmolaridades bajas (70 y 80 mosm).

Posteriormente se determinó si la respuesta era dosis dependiente de la cantidad de ARNm inyectado. Se inyectaron ovocitos con diferentes concentraciones del ARNm de glándula mamaria lactante (3.15-50 ng) y se midió la captación de $^{22}\text{Na}^+$.

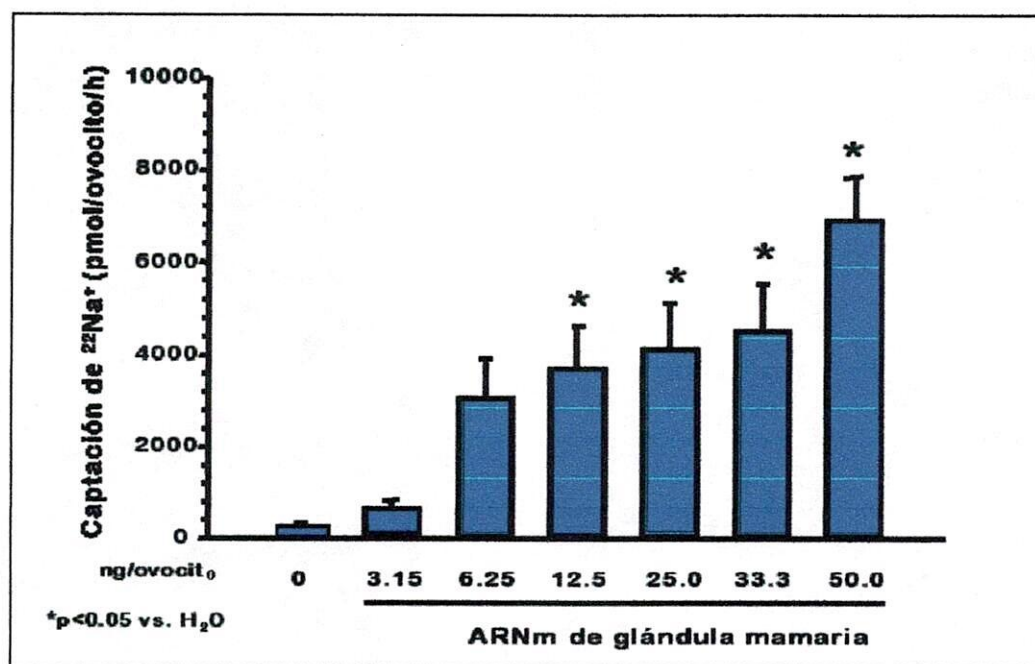


Figura 11 . Curva de dosis respuesta en los ovocitos inyectados con ARNm de la glándula mamaria lactante.

La figura 11 muestra claramente como el incremento de la concentración del ARNm de glándula mamaria lactante aumentó la captación de $^{22}\text{Na}^+$ de forma dosis dependiente. Con estos resultados se determinó que la concentración de ARNm a inyectarse en el ovocito debería ser de 50 ng.

Se ha descrito la existencia de canales catiónicos no específicos activados por estiramiento en la glándula mamaria en condiciones de hipotonicidad, los cuales son inhibidos parcialmente por el lantánido trivalente gadolinio (45). Para determinar el efecto del gadolinio sobre la función del ARNm de glándula mamaria lactante se realizaron ensayos de captación de $^{22}\text{Na}^+$ en ovocitos inyectados con el ARNm de GML expuestos a diferentes concentraciones de cloruro de gadolinio.

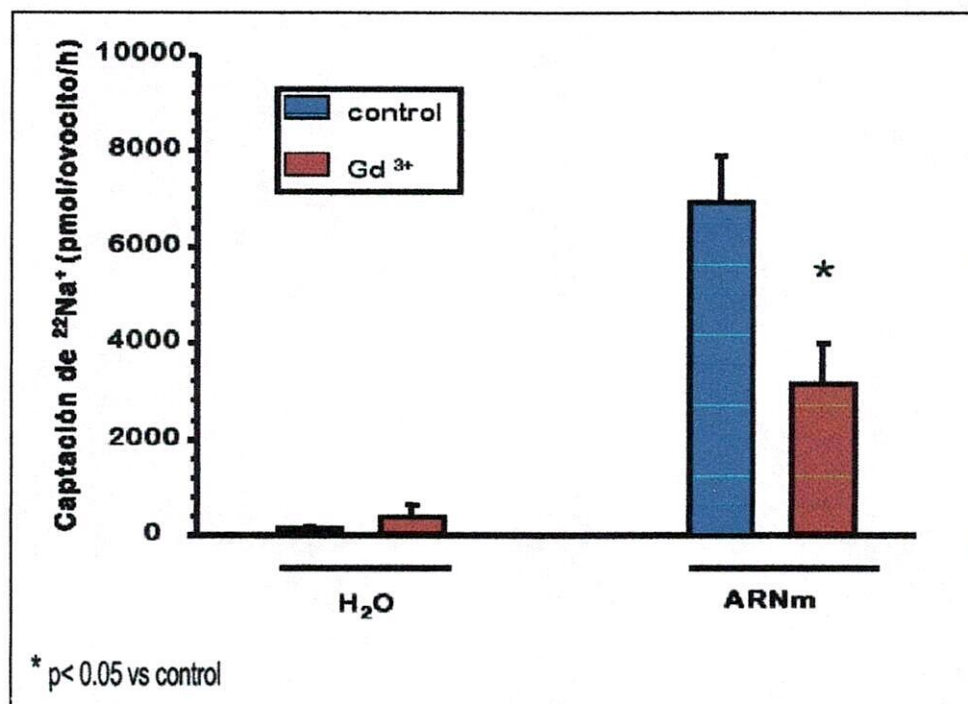


Figura 12. Inhibición por cloruro de gadolinio (10 μM) sobre el ARNm de glándula mamaria de rata lactante.

La figura 12 muestra que el cloruro de gadolinio a una concentración de 10 μM inhibe parcialmente la captación de $^{22}\text{Na}^+$. Se observa que los ovocitos inyectados con ARNm en presencia de gadolinio, reducen la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en comparación con aquellos que no se incubaron con este inhibidor (de 6914 ± 964 a 3129 ± 879 pmol/ovocito/h). Esta respuesta es similar a la reportada en otros estudios donde se inhibieron canales activados por estiramiento con gadolinio (46).

El análisis de las figuras anteriores demuestran que el efecto que se observó es específico del ARNm de glándula mamaria lactante inyectado en los ovocitos, ya que sólo se observa un incremento significativo en la captación de $^{22}\text{Na}^+$ bajo las diferentes condiciones de estudio. Por lo que se procedió a fraccionar por tamaño el ARNm de glándula mamaria lactante por medio de un gradiente de sacarosa, para determinar en cual fracción se encuentre posiblemente el mensaje que codifica para esta proteína.

Antes de realizar el fraccionamiento del ARNm, se determinó la linealidad del gradiente de sacarosa de 5% a 25% utilizando rojo fenol. Como se muestra en la figura 12, el gradiente fue lineal para la mayoría de las fracciones obtenidas.

GRADIENTE DE SACAROSA.

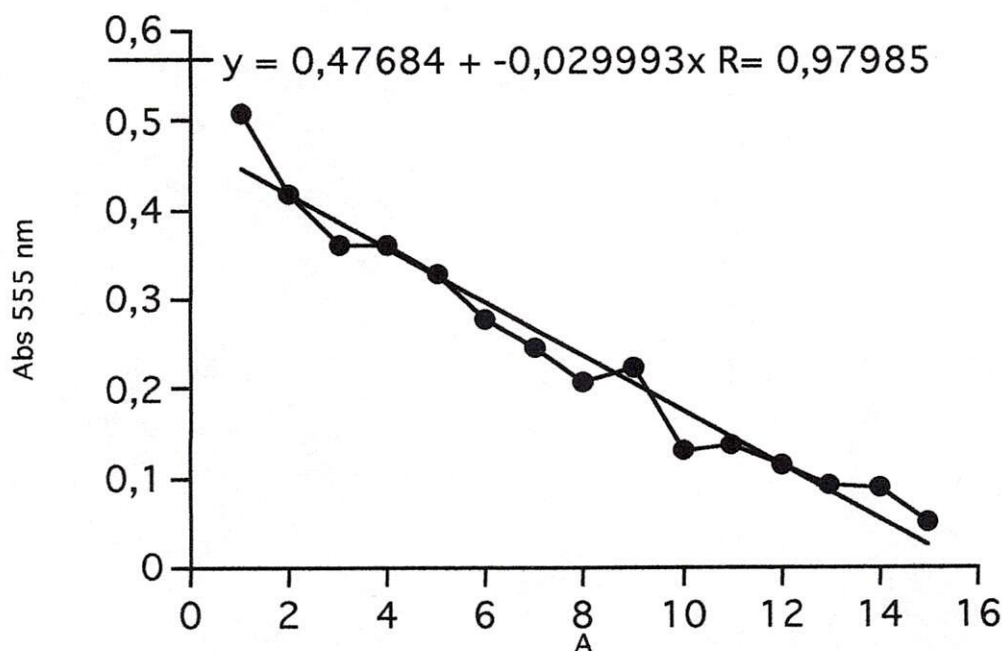


Figura 13 . Fracciones del gradiente de sacarosa.

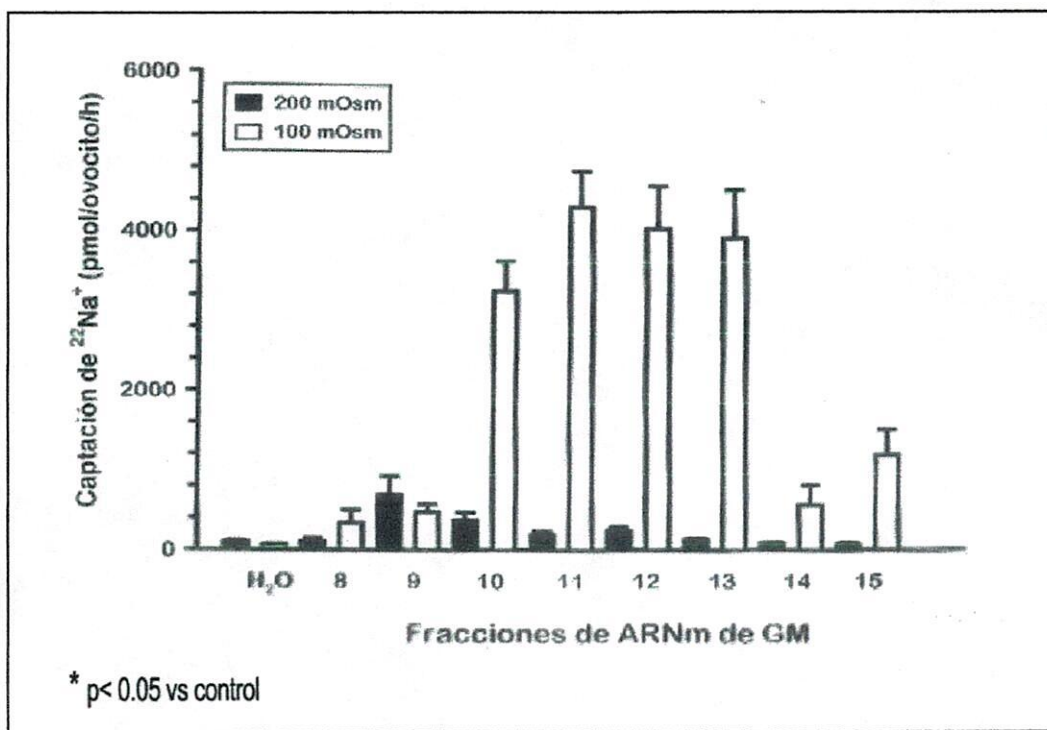


Figura 14. Captación de $^{22}\text{Na}^+$ en las diferentes fracciones de ARNm de glándula mamaria lactante.

En la figura 14 se muestran las diferentes fracciones del ARNm inyectadas a los ovocitos y expuestos a medio hipotónico o isotónico. Se observó que la captación de $^{22}\text{Na}^+$ fue significativamente mayor en los ovocitos incubados en el medio hipotónico comparada con los incubados en medio isotónico.

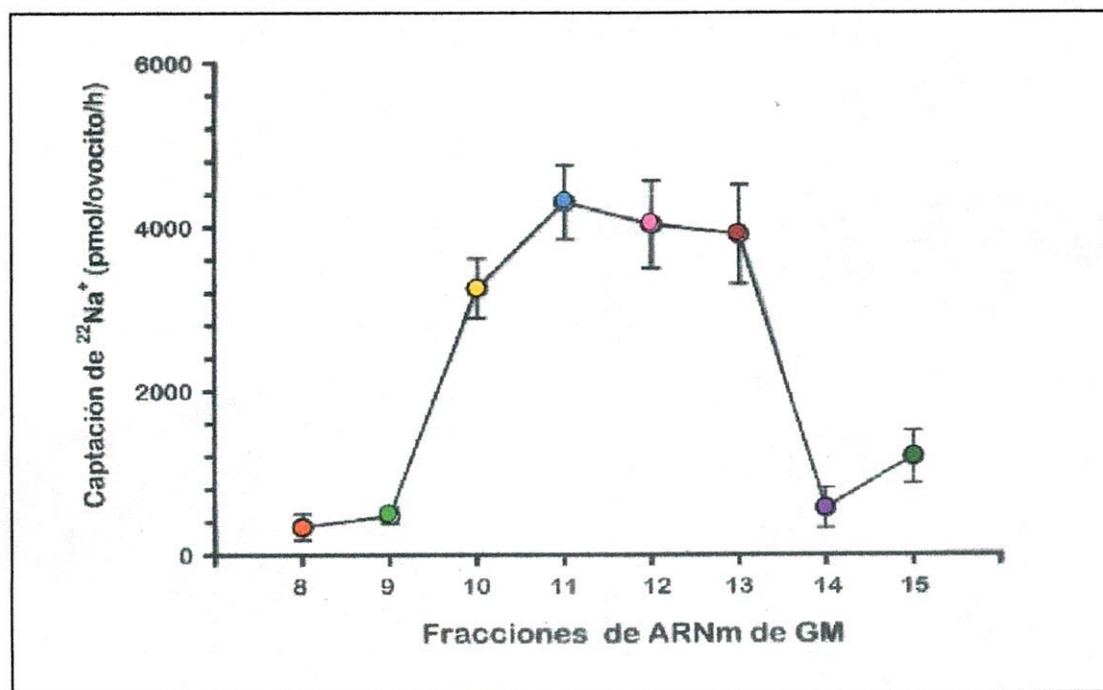


Figura 15 . Expresión del ARNm fraccionado de glándula mamaria lactante.

Un análisis más detallado de las 18 fracciones de ARNm inyectadas a los ovocitos mostró que las fracciones 10 - 13 tienen una masa de aproximadamente 2.0 kb captaron más $^{22}\text{Na}^+$ (F8 337 ± 163 , F9 471 ± 96 , F10 1644 ± 506 , F11 5560 ± 738 , F12 4924 ± 905 , F13 3901 ± 601 , F14 561 ± 241 , F15 1182 ± 320 pmol/ovocito/h) lo que indica que probablemente en estas fracciones se encuentre el mensaje que codifica para la proteína transportadora de sodio activada por estiramiento de la membrana y que es parcialmente inhibida por gadolinio.

RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSION.

- ✓ El ARNm de la glándula mamaria de rata lactante induce la captación de $^{22}\text{Na}^+$ en el ovocito que sólo es evidente en medio hipotónico.
- ✓ El ovocito requiere de 96 horas para procesar el ARNm inyectado.
- ✓ Los tiempos óptimos del medio de preincubación e incubación fueron de 30 minutos.
- ✓ La captación de $^{22}\text{Na}^+$ es dependiente de la concentración y tonicidad del medio y es parcialmente inhibida por el gadolinio.
- ✓ La captación de $^{22}\text{Na}^+$ fué significativamente mayor utilizando las fracciones 10 - 13 del ARNm obtenidas de un gradiente de sacarosa con una masa de aproximadamente 2.0 kb.

Con la información obtenida en el presente trabajo, junto con lo que se conoce sobre la fisiología del transporte de iones en la glándula mamaria, se propone que el mecanismo probable de regulación de las concentraciones de sodio en la glándula mamaria lactante, involucra transporte de iones sensibles a los cambios en la tonicidad del medio en la membrana apical del lactocito.

La glándula mamaria puede así regular y mantener las concentraciones iónicas en el lumen alveolar, Linzell, Peaker, Blatchford, Enomoto y Shennan (1971,1977,1988,1987, 2000) suponen que el mecanismo por medio del cual se regulan las concentraciones de sodio en el alveolo, son:

- La membrana apical posee canales catiónicos no específicos .
- Canales específicos para cada ión.
- Canales activados por estiramiento.

Nosotros proponemos que el efecto osmótico de la lactosa en el lumen alveolar, trae como consecuencia la distensión de la membrana apical, activando posiblemente el transporte de sodio que mantienen la leche baja este ión..

El presente trabajo muestra una nueva visión sobre la fisiología del transporte de sodio en la glándula mamaria.

PERSPECTIVAS :

Para saber si existe un canal de sodio en la glándula mamaria proponemos :

1. Apartir de las fracciones 10-13 del ARNm sintetizar una biblioteca .
2. Sintetizar ARNc a partir del ADNc y hacer ensayos de expresión funcional hasta obtener una sólo clona que exprese el mensaje que codifica para esta proteína.
3. Caracterizar la clona.
4. Realizar estudios electrofisiológicos.

BIBLIOGRAFIA

1. Casey, M. L., Macdonald, P. C. & Sympson, E., R. (1985) Endocrinological Changes of Pregnancy.
2. Viña, J., Puertes, I. R., Saenz, G. T. & Viña, J. R. (1981) Role of prolactin in amino acid uptake by the lactating mammary gland of the rat. *FEBS Lett.* 126: 250-262.
3. Williamson, D. H. (1980) Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. *FEBS Lett* 117: K93-K105.
4. Challis, J. R. & Olso, D. M. (1988) *The Physiology of Reproduction* Raven Press, New York.
5. Shennan, D. B. & Peaker, M. (2000) Transport of milk constituents by the gland mammary. *Physiol. Rev.* 80: 925-951.
6. Linzell, J. L. & Peaker, M. (1971) Mechanism of milk secretion. *Physiol. Rev* 51: 564-597.
7. Kuhn, N. J., Wooding, F. P. & White, A. (1980) Properties of galactosyltransferase-enriched vesicles of Golgi membranes from lactating-rat mammary gland. *Eur. J. Biochem.* 103: 377-385.
8. Wiled, C. J. & Kuhn, N. J. (1981) Lactose synthesis and the utilization of glucose by the rat mammary ascini. *Int. J. Biochem.* 13: 311-316.
9. Munday, J. (1984) Macronutrients and production milk of lactating rats. *Fed. Proc.* 42: 443-454.

10. Neville, M. C., Allen, J. C. & Waters, C. (1993) The mechanisms of milk secretion. In M.C. Neville & M.R. Neifert, eds. *Lactation. Physiology, nutrition, and breast feeding*. Plenum Press, New York.
11. Jenness, R. (1979) The composition of human milk, *Semin.Perinatol.* 3:225-329.
12. Peaker, M. (1977) The aqueous phase of milk: Ion and water transport, in: *Comparative Aspects of lactation*. Academic Press, New York: 113-134.
13. Peaker, M. (1978) Ion and water transport in the mammary gland, in *lactation: A Comprehensive Treatise*. Academic Press, New York: 437-462.
14. Greer, F. R., Tsang, R. C., Seari, J. E., Levin, R. S. & Stichen, J. J. (1982) Mineral homeostasis during lactation-relationship to serum 1,25 dihydroxyvitamin D, 25 hydroxyvitamin D, parathyroid hormone, and calcitonin. *Am. J. Clin. Nutr.* 36: 431-437.
15. Blatchford, D. R. & Peaker, M. (1988) Efecct of ionic composition of milk on transepithelial potential in the goat mammary gland. *J. Physiol.* 402: 533-541.
16. Chipperfield, A. R. (1986) The Na,K,Cl cotransport system. *Clin. Sci* 71: 465-476.
17. Peaker, M. & Taylor, J. C. (1975) Milk secretion in the rabbit: Changes during lactation and the mechanism of ion transport. *J. Physiol.* 253: 527-545.
18. Johnson, M. P. & Wooding, F. P. (1978) Adenosine triphosphatase distribution in mammary tissue. *Histochem. J.* 10: 171-183.
19. Shennan, D. B. & McNeillie, S. A. (1990) Efflux of chloride from lactating rat mammary tissue. *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.* 95: 367-371.
20. Berga, S. E. & Neville, M. C. (1985) Sodium and potassium distribution in the lactating mouse mammary gland in vivo. *J. Physiol.* 361: 219-232.
21. Shennan, D. B. (1992) K and Cl transport by mammary secretory cell apical membrane vesicles isolated from milk. *J. Dairy Res.* 59: 339-348.

22. Furuya, K. (1989) Single calcium-activated potassium channel in cultured mammary epithelial cells. *Pflugers Arch.* 414: 118-124.
23. Smith, K. M. & Sheenan, D. V. (1990) K^+ (Rb^+) transport by a mammary secretory cell apical membrane fraction isolated from goat milk. *Exp. Physiol.* 75: 349-358.
24. Sheenan, D. B. (1998) Mammary gland membrane transport systems. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia* 3: 247-258.
25. Linzell, J. L. & Peaker, M. (1971) The effects of oxytocin on milk removal on milk secretion in the goat. *J. Physiol.* 216: 717-734.
26. Peaker, M. (1976) Lactation: some cardiovascular and metabolic consequences and the mechanism of lactose and ion secretion into milk. In C.F.S. 45, ed. Breast feeding and the mother Associated Scientific Publishers, Amsterdam.
27. Peaker, M. (1977) Mechanism of milk secretion: milk composition in relation to potential difference across the mammary epithelium. *J. Physiol.* 270: 489-505.
28. Kulski, J. K. & Hartmann, P. E. (1981) Changes in human milk composition during the initiation of lactation. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 59: 101-114.
29. Linzell, J. L. & Peaker, M. (1974) Changes in colostrum composition and in the permeability of the mammary epithelium at about the time of parturition in the goat. *J. Physiol.* 243: 129-151.
30. Linzell, J. L. & Peaker, M. (1971) Intracellular concentration of sodium, potassium and chloride in the lactating mammary gland and their relation to the secretory mechanism. *J. Physiol.* 216: 683-700.
31. Genuth, S. M. (1992) The endocrine system. In R.M. Berne & N.M. Levy, eds. *Physiology Mosby Year Book*, St. Louis.

32. Enamoto, K., Furuya, K., Maeno, T., Edwards, C. & Oka, T. (1987) Mechanically induced electrical responses in murine mammary epithelial cells in primary culture. *FEBS Lett* 223: 82-86.
33. Susuki, M., Murata, M., Ikeda, M., Miyoshi, T. & Imai, M. (1998) Primary structure and functional expression of a novel non-selective cation channel. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 242: 191-196.
34. Gordon, J. B., Lane, C. D., Woodland, H. R. & Marbaix, G. (1971) Use of frogs eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233: 177-182.
35. Lane, C. D., Marbaix, G. & Gordon, J. B. (1971) Rabbit haemoglobin synthesis in frog cells: the translation of reticulocyte 9 s RNA in frog oocytes. *J. Mol. Biol.* 61: 73-91.
36. Sumikawa, K., Houghton, M., Emtage, J. S., Richards, D. M. & Barnard, E. A. (1981) Active multi-subunit ACh receptor assembled by translation of heterologous mRNA in *Xenopus* oocytes. *Nature* 292: 862-864.
37. Gamba, G. (1993) Clonación de proteínas de membrana y los ovocitos de *Xenopus laevis*. *Rev. Invest. Clin.* 45: 171-181.
38. Chirgwin, J. J., Przbyla, A. E., MacDonald, R. J. & Rutter, W. J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299.
39. Glisin, V., Crkvenjakov, R. & Byus, C. (1974) Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* 13: 2633-2637.
40. Aviv, H. & Leder, P. (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 1408-1412.

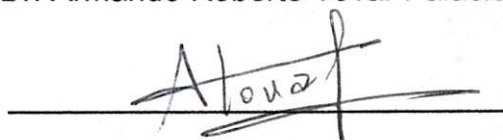
41. Geering, K., Claire, M., Gaeggeler, H. P. & Rossier, B. C. (1985) Receptor occupancy vs. induction of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and Na^+ transport by aldosterone. *Am. J. Physiol.* 248: C102-C108.
42. Blobel, G. & Sabatini, D. (1971) Dissociation of mammalian polyribosomes into subunits by puromycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68: 390-394.
43. Gamba, G., Miyanosita, A., Lombardi, M., Litton, J., Lee, W. S., Hediger, M. A. & Hebert, S. C. (1994) Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J. Biol. Chem.* 269: 17771-17778.
44. Plata, C., Meade, P., Vazquez, N., Hebert, S. C. & Gamba, G. (2002) Functional properties of the apical $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter isoforms. *J. Biol. Chem.* 277: 11004-11012.
45. Biagi, B. A. & Enyeart, J. J. (1990) Gadolinium blocks low- and high-threshold calcium current in pituitary cells. *Am. J. Physiol.* 259: C15-C20.
46. Susuki, M., Sato, J., Kutsuwada, K., Oooki, G. & Imai, M. (1999) Cloning of a stretch-inhibitable nonselective cation channel. *J. Biol. Chem.* 274: 6330-6335.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la presente tesis el día 16 de Agosto del 2002.

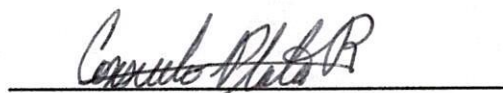
Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz.


Presidente.

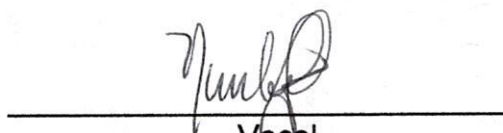
Dr. Armando Roberto Tovar Palacio.


Vocal

Dra. Ma. Del Consuelo Plata Ramos.


Vocal

Dra. Nimbe Torres y Torres.


Vocal

Dra. Adriana Monroy Guzmán.


Secretario