

El papel de los contactos celulares en la recuperación de canales iónicos de membranas de células epiteliales

Marcelino Cerejido,* Dodanim Talavera,* Arturo Ponce,* Jesús Vega,*
María del R. García-Villegas,* Jesús Valdés*

Resumen

Las corrientes catiónicas en células MDCK son casi exclusivamente debidas a canales de K^+ . El tratamiento con tripsina-EDTA destruye la mayoría de estos canales. Cuando son resembradas, los canales se recuperan por medio de un proceso que requiere síntesis de proteínas y de mensajero. El presente trabajo demuestra que la recuperación requiere del contacto entre las células y de concentraciones normales de Ca^{2+} (1.8 mM). Las células en monocapas confluentes en presencia de 1.8 mM de Ca^{2+} exhiben corrientes de K^+ de 343 ± 82 pA, las confluentes en un medio con bajo Ca^{2+} tienen sólo 90 ± 12 pA (27% del control), y las que no establecen contactos celulares que son incubadas a su confluencia pero en Ca^{2+} extracelular normal, tienen 104 ± 21 pA (31% del control), con base en estos resultados concluimos que la expresión de canales de K^+ depende de contactos celulares y presencia de Ca^{2+} normal. Es probable, entonces que esta expresión este mediada por uvomorulina.

Palabras clave: Canales iónicos, canales epiteliales, canales K^+ , biosíntesis de canales iónicos.

Introducción

Por muchos años se supuso que la altísima selectividad iónica de las membranas biológicas estaba exclusivamente relacionada a su potencial eléctrico y, por extensión, que éste sólo tenía un

Summary

Ca²⁺ on currents in mature MDCK cells are almost exclusively due to K^+ channels. Harvesting with trypsin-EDTA destroys 80-90% of these channels. Upon replating, K^+ currents recover in 12-20 h, by means a process that requires synthesis of proteins and of RNA. In the present work we demonstrate that this restoration depends on a Ca^{2+} activated cell-cell contact. Thus, cells in confluent monolayers bathed with 1.8 mM Ca^{2+} have a K^+ current of 343 ± 82 pA, confluent without Ca^{2+} have only 90 ± 12 pA (27% of control, and without cell-cell contacts incubated with 1.8 mM Ca^{2+} (Subconfl + Ca^{2+}) have 104 ± 21 pA (31% of control).

This demonstration that the expression of K^+ channels depends on Ca-activated cell-attaching molecules suggests that a molecule of the type of uvomorulin is involved.

Key words: Ion channels, epithelial channels, K^+ channels, biosynthesis of ion channels, cell-cell contacts, Ca^{2+} .

papel relevante en neuronas y células musculares. De hecho, no todos los autores están de acuerdo acerca de la razón que lleva a algunas células a gastar más de la mitad del ATP que producen, en mantener una alta concentración de potasio y una baja de sodio en su citoplasma. Sin embargo, la

*Centro de Investigación y Estudios Avanzados.

Correspondencia y solicitudes sobre: Dr. Marcelino Cerejido Centro de Investigación y Estudios Avanzados. Apartado postal 14-740. México, D.F. Teléfono 747 7000 extensiones 5116 y 5183. Fax: 747 7105.

introducción de las técnicas llamadas de "patch clamp" y de "whole cell clamp" que aquí traduciremos como "fijación de voltaje en microárea" (FVM) y por "fijación de voltaje en toda la célula" (FVC) respectivamente, ha cambiado drásticamente dicho panorama.

Por comenzar, permitieron estudiar los potenciales de células pequeñas, detectar los canales responsables de las diversas permeabilidades (a Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , etc.) y abrieron el camino para su secuenciación y control genético. Pero además llevaron a varias conclusiones asombrosas: ¹ todas las células estudiadas hasta ahora, desde las bacterias hasta las neuronas, tienen canales únicos de membrana; ² prácticamente no hay función biológicamente importante, desde la contracción muscular hasta la olfacción, y desde el control de la glucemia hasta la reacción inmunológica, que no incluya directa o indirectamente la participación de algún canal iónico; ³ consecuentemente, hoy se están encontrando que ciertos cuadros clínicos conocidos desde la antigüedad, se deben a la falla de algún canal, en células que no son necesariamente excitables.

Nuestro equipo está interesado en los canales iónicos de las células epiteliales y dentro de este campo a la síntesis y distribución polarizada de canales de potasio. En este trabajo en particular, ¹ partimos de nuestra observación ³ de que cuando una célula MDCK (epitelial de riñen renal) se recoge de los frascos de cultivo con tripsina EDTA, pierde el 90% de sus canales iónicos de K^+ y reduce su superficie de membrana a la mitad, pero que cuando se la resiembramos, recupera ambos atributos en alrededor de 15 horas, y ² demostramos que para que las células puedan recuperar de ese modo tanto sus canales de K^+ como su superficie de membrana, es necesario que se coloquen mediante contactos dependientes de Ca^{2+} .

Material y métodos

Cultivo celular

Las células MDCK fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (MDCK, CCL-34). Utilizamos células entre los pasajes 60 y 90. Previamente fueron crecidas a 36.5 °C en botellas de

plástico desechables (Costar 3150, Cambridge, Mass) con una atmósfera de aire y 5% de CO_2 (incubadora 417, VIP CO_2 , Lab. Line Instruments, Inc. New Brunswick, NY) en 20 ml de medio basal de Eagle, modificado por Dulbecco (Dmem, Grand Island Biological Co. -GIBCO-430-1600, Grand Island, NY) con 100 U/ml de penicilina, 100 g/ml de estreptomocina (In vitro S. A., México D. F.), 0.08 U/ml de insulina (Eli Lilly, México D. F.), y 10% suero fetal de bovino (Flow Laboratories, McLean, Virginia); este medio completo es denominado CDMEM.

Cada 3 a 4 días las subcultivamos para fines experimentales y de producción. Para esto lavamos la monocapa 3 veces con solución salina de Dulbecco amortiguada con fosfatos y libre de calcio y magnesio (PBS sin calcio, GIBCO, 450-1300) y luego despegamos las células con una mezcla de 0.05% de tripsina y 0.05% de EDTA (GIBCO 610-5300). Después de 10 a 20 minutos las suspendemos en 16 a 18 de CDMEM y una parte de esta fracción la repartimos en cajas de petri desechables (sobre las cuales han sido previamente depositados cubre objetos de vidrio estériles).

Microelectrodos

Usamos tubos de yoduro de borosilicato (Corning, D. I. 1.1 * 1.2 mm) con el protocolo de dos pasos de estiramiento descrito por Hamill et al (1981), en un estirador de pipetas (David Kopf Instruments 7000; Tujunga, Ca). La superficie en la punta se redondea en una microforja y los electrodos tienen una resistencia de 2 y 3 MW, las micropipetas se llenan con soluciones filtradas (Millex-GS, Millipore, Ma: 0.22 mm) antes de montarse en el contenedor de micropipetas (DAGAN, CA).

Sistema de estímulo y registro

Los cubreobjetos con las células son transferidos a una cámara translúcida, y ésta a su vez, se monta en la platina de un microscopio invertido Diavert (Leitz, Wetzlar) equipado con óptica de Hoffmann. El contenedor de pipetas se conecta a un cabezal de prueba, que está sujeto a un micromanipulador hidráulico (Narishige MF83, Tokyo, Japan), con el cual se controla la posición de la micropipeta. La señal de

corriente se preamplifica y convierte en voltaje en el cabezal después se amplía con un Dagan 8900 (Dagan CA), se filtra (Pasabajos tipo Bessel, Frequency Devices Inc) y se observa en un osciloscopio Tektronix 2211 (Beaverton Oregon). Durante el desarrollo del gigasello se comanda un protocolo de estimulación que se produce con el DAGAN 8900. Una vez que se logra un sello superior a 1 Gigaohms, la estimulación se controla por la computadora a través del conversor digital-analógico usando el programa CLAMPEX (Axon Instruments PCLAMP versión 5.51). Para analizar los registros se utilizan los programas CIAMPAN y CLAMPFIT (Figura 1).

un transitorio en la corriente, que se muestra en la parte media de la figura. El área debajo de esta curva permite medir la capacidad, y calcular con ella la superficie de la membrana, usando una relación de 1 mF/cm^2 .

Luego la computadora cambia a una velocidad de muestreo mas lenta; y va fijando el potencial de membrana a los diversos valores y por el tiempo que se muestra en la parte superior derecha de la figura 2, regresando cada una al potencial de mantenimiento de -80 . Estos potenciales provocan corrientes de membrana que se observan en la parte media a la derecha en la figura 2.

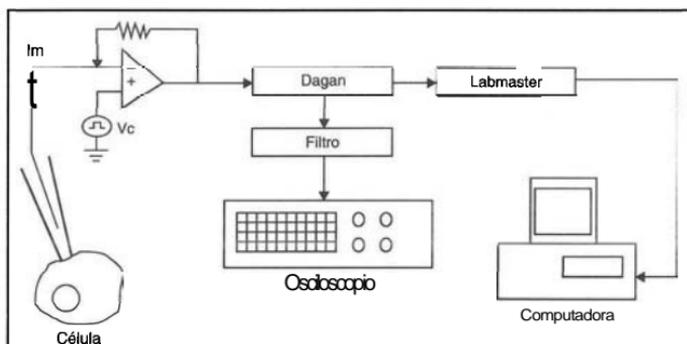


Figura 1 Esquema de procesamiento para medir las corrientes de K^+ . La célula se vincula con un microelectrodo de vidrio que sirve tanto para fijar el potencial a la membrana como para registrar las corrientes que se generan. Las señales de amplificación Dagan son luego filtradas y analizadas por una computadora. El procedimiento es monitoreado en un osciloscopio.

Resultados y discusión

Puesto que trabajamos en ausencia de aniones permeables, las curvas de corrientes observadas se deben exclusivamente a cationes. Por otra parte, como la solución empleada no contiene sodio, las corrientes catiónicas observadas se atribuyen a K^+ . Estas suposiciones están, como se verá más abajo, ampliamente corroboradas por la dirección y signo de la corriente, así como a las cinéticas observadas.

La figura 2 muestra en su parte superior el protocolo de pulsos pasados por la computadora, consistente en un potencial de mantenimiento de -80 mV que de pronto se cambia a -75 . Este cambio produce

La figura 3 muestra la relación entre los potenciales de fijación y las corrientes observadas. En primer lugar se constata que las células MDCK sembradas a confluencia e incubadas en un medio con concentración de calcio normal ($1.8 \mu\text{M}$) tienen una curva I/V consistente en dos tramos. En primer lugar, a potenciales negativos y hasta alrededor de $100 \mu\text{V}$ muestran una relación lineal, pero luego, al llegar a este valor, las curvas incrementan significativamente su pendiente, debido, como demostraron^{4,2 y 3} a la activación de canales voltaje dependientes. En el presente trabajo comunicamos el valor de la corriente específica para K^+ , que se obtiene como diferencia entre la parte empinada (a más de 100 mV) y la parte casi-horizontal a 150 mV .

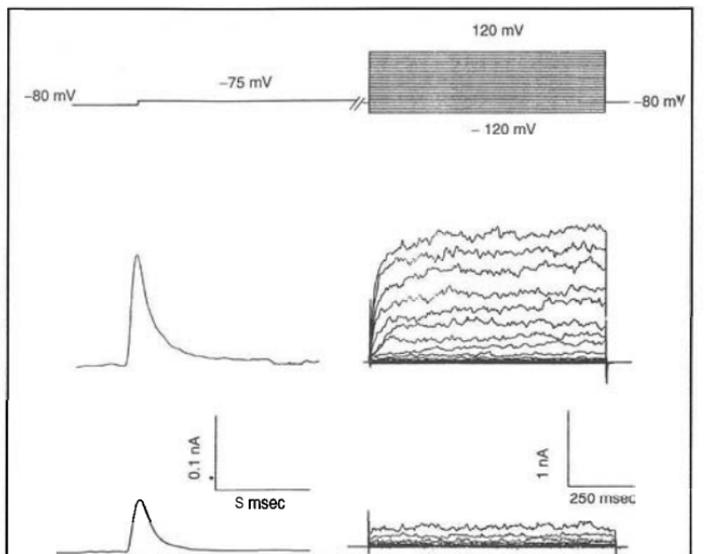


Figura 2 (Parte superior) protocolo de pulsos. Advértase que una vez pasada a la primera porción que determina la capacitancia de a célula a la computadora pasa a una velocidad 200 veces menor, y comienza a pasar un protocolo de -120 a +120 mV para estudiar las corrientes de membrana. (Parte inferior izquierda) a sembrada 20 horas antes a confluencia e incubada con 1.8 mM Ca^{2+} en el medio, a que muestra a la izquierda el transitorio o capacitivo y a la derecha a serie de corrientes sostenidas. (Parte inferior derecha) la trypsinada apenas 30 min antes que muestra la drástica reducción de superficie (función del área bajo la curva del transitorio) y de canales (evidenciada por la escasez de corrientes).

La figura 2 también muestra en su parte inferior y a manera de ejemplo, los registros obtenidos con una célula recién tripsinada.

El área bajo la curva es obviamente menor, debido a una reducción de la superficie de membrana. Esto se debe a que, al suspender las células, éstas adquieren una forma esférica con la consiguiente disminución de la relación área/volumen; esta disminución provoca a su vez la formación de pliegues profusos. Debido a este exceso, la célula reacciona encogiendo casi la mitad de su membrana celular.⁵ Esa misma figura también muestra que las curvas de corriente virtualmente han desaparecido, hecho que se puede atribuir a la hidrólisis que provoca la tripsina de las proteínas que constituyen los canales de K^{+} . A este componente, se agrega también un buen número de canales que desaparecen de la membrana por estar situados en la porción de membrana celular endocitada.

Al resembrarse las células se recuperan tanto la membrana celular como sus canales de K^{+} . Como explicamos más arriba, los círculos de la figura 3 muestran un ejemplo de la relación I/V en una célula, que se sembró e incubó, a confluencia y con una concentración de Ca^{2+} normal. Los triángulos vacíos muestran en cambio el ejemplo de una célula sembrada e incubada con una concentración de Ca^{2+} normal, pero a subconfluencia, y resulta obvio que el contacto célula-célula resulta indispensable para el restablecimiento de los canales. Finalmente, la figura 3 muestra en triángulos llenos el ejemplo de una célula que, si bien pertenece a un cultivo a confluencia ha sido incubada a bajas concentraciones de Ca^{2+} (1-5 μM en lugar de 1.8 μM), indicando que el contacto célula-célula, por sí solo, no puede desencadenar los procesos de reestructuración de canales.

El cuadro I resume los resultados obtenidos en experimentos como los que se ilustraron en la figura 3, y demuestra cuantitativamente que el contacto entre las células y la presencia de calcio son imprescindibles para la restitución de los canales, pues sólo se alcanza un área de 8941 127 μm^2 y una corriente de potasio de 343 \pm 82 pA cuando las células se siembran a confluencia y se incuban en presencia de Ca^{2+} .

Cuadro I. Resumen de las superficies y corrientes de membrana observadas en las tres condiciones experimentales que se mencionan, en experimentos similares a los que se ilustran en las figuras 2 y 3. Cada valor corresponde a la media \pm error estándar, y n corresponde al número de observaciones.

Condición		Superficie de Membrana (μm^2)		Conductancia n Potasio (pA)	
Confluencia	Ca^{2+}				
+	+	894	+ 127	343	+ 82 15
+	-	436	+ 68	90	+ 12 15
-	+	452	+ 49	104	+ 21 14

Las células epiteliales MDCK requieren también de contactos intercelulares y de la presencia de Ca^{2+} . Para ensamblar y sellar uniones oclusoras con sus vecinas^{5,6,7,8,9} han encontrado que las MDCK, como está bien el caso de otras células epiteliales, tienen en sus membranas laterales, es decir, en las que contactan con sus vecinas, moléculas de ovomulina altamente glicosiladas que dependen de Ca^{2+} , y que si se bloquean estas ovomulinas con anticuerpos monoclonales específicos, no se desarrollan las uniones estrechas. Es lícito suponer entonces que el papel del Ca^{2+} puede consistir en la activación de estas ovomulinas.

Análogamente, nuestra demostración de que la reinstalación de canales de K^+ requiere del contacto célula-célula y de la presencia de Ca^{2+} , sugiere que la misma ovomulina puede desencadenar ambos procesos: la formación de la unión oclusora y la expresión de canales de K^+ . La información desde esta molécula hasta el interior celular sería mediada por moléculas de proteína-G, una fosfolipasa C y una proteína quinasa C.¹⁰

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con el apoyo económico del CONACYT de México.

Referencias

1. Ponce A, Cerejido M. Polarized distribution of cation channels in epithelial cells (MDCK). *Cell Physiol and Biochem*. 1991;1:13-23.
2. Ponce A, Bolívar JJ, Vega J, Cerejido M. Synthesis of plasma membrane and potassium channels in epithelial cells (MDCK). *Cell Physiol and Biochem*. 1991;1:195-205.
3. Ponce A, Contreras G, Cerejido M. Polarized distribution of anion channels in epithelial cells (MDCK). *Cell Physiol and Biochem* 1991;1:160-169.
4. Bolívar JJ, Cerejido M. Voltage and Ca^{2+} activated K^+ channel in cultured epithelial cells (MDCK). *J Membr Biol* 1991;91:43-51.
5. González-Mariscal L, Chávez de Ramírez B, Lazaro A, Cerejido M. Establishment of tight junction between cells from different animal species and different sealing capacities. *J Membr Biol* 1989;107:943-56.
6. González-Mariscal L, Chávez de Ramírez B, Cerejido M. Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *J Membr Biol* 1985;86:113-125.
7. González-Mariscal L, Contreras RG, Bolívar JJ, Ponce A, Chávez de Ramírez H, Cerejido M. The role of calcium in tight junction formation between epithelial cells. *Amer J Physiol* 259 (Cell Physiol 28) 1990;C978-C986.

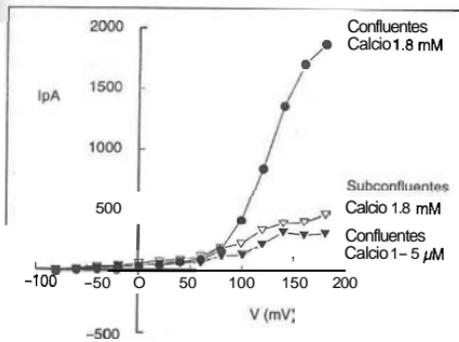


Figura 3: Curvas representativas de corriente y voltaje obtenidas como se muestra en la figura 2. Las tres curvas corresponden a células cultivadas por 20 horas. La de círculos llenos fue cultivada a confluencia y con una concentración de Ca^{2+} normal (1,8 mM), la de triángulos vacíos se sembró con calcio normal, pero a subconfluencia y la de triángulos llenos a confluencia pero en medio normal mentalidre de Ca^{2+} (en realidad tiene 0,001 a 0,005 mM). Hacia la derecha de 100 mV la curva control de círculos muestra un marcado cambio de pendiente, debido a la activación de canales de K^+ voltaje sensibles. En cambio, las incubadas a subconfluencia o en ausencia de Ca^{2+} casi no expresan canales de potasio.

8. **Contreras RG, Miller JH, Zamora M, González-Mariscal L, Cereijido M.** Interaction of calcium with plasma membrane of epithelial (MDCK) cells during junction formation. *Amer J Physiol* 263 Cell Physiol 1992;32:C313-C318.
9. **Gumbiner B, Simons K.** The role of uvomorulin in the formation of epithelial occluding junctions. In: *Junctional complexes of epithelial cells*. J Wiley, Chichester, 1987 p. 168
- Ponce A, Cereijido M.** Polarized Distribution of cation channels in epithelial cells (MDCK). *Cell Physiol and Biochem* 1991;1:13-23 .
10. **Balda MS, González-Mariscal L, Contreras RG, Cereijido M.** Participation of a G Protein modulation system in the assembly and sealing of tight junctions. *J Membr Biol* 1991;122:193-202.