

074830

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE POLARIZACION  
DE LAS CELULAS EPITELIALES EN CULTIVO.

TESIS QUE PRESENTA MARIA DEL ROSARIO LOPEZ VANCELL,  
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL  
CON ÁREA DE CONCENTRACIÓN EN FISILOGÍA.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA.  
MÉXICO D. F. DICIEMBRE DE 1983.

*Luzes. Abril. 88*

*A Erik, con todo mi amor.*

074830

*A mis padres,  
Emma y Rafael, con cariño, admiración y gratitud.*

*A tía Carmen.*

*A mis hermanos: Oscar, Emma y Dolores.*

*A los enanos: Juan Pablo e Ignacio.*

Agradezco al Dr. Marcelino Cereijido su generosa ayuda en mi formación, y el haberme dado la oportunidad de trabajar bajo su dirección en su laboratorio.

Quiero agradecer a la Dra. Graciela Beaty, maestra inolvidable a la que debo el despertar de mi vocación científica, su paciente ayuda en la realización de este trabajo.

Asimismo, deseo agradecer la colaboración de los doctores Enrique Rodríguez-Boulán y Enrico Stefani, en este trabajo.

*Esta tesis fue realizada en el Departamento de Fisiología y Biofísica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., siendo dirigida por los doctores Marcelino Cerejido (Tutor), Graciela Beaty y Sergio Estrada-O. (Asesores); contando con la eficaz asistencia técnica de los señores Amparo Lázaro, Roberto Carmona y Raúl Guevara, así como la valiosa ayuda de Josefina Quiroga en la elaboración mecanográfica.*

*How can we be so wilfully blind  
as to look for causes in nature  
when nature herself is an effect.*

*Joseph Marie de Maistre*

## PRÓLOGO

Los epitelios se caracterizan por su capacidad de transportar sustancias a su través vectorialmente. Los rasgos estructurales que le permiten cumplir con esta función son: 1) las uniones oclusoras o estrechas que sellan los espacios intercelulares, y 2) la polarización de los componentes proteicos de la membrana plasmática en dos dominios, el apical y el basolateral. Así, los canales, acarreadores, bombas y receptores presentes en el lado basolateral, son esencialmente distintos de aquéllos que se encuentran en la región apical. Ambos dominios están separados por las uniones estrechas, que parecen prevenir la mezcla de estos componentes. En la actualidad se desconocen los procesos y mecanismos responsables de la polarización. Sin embargo, en los últimos años se ha abierto la posibilidad de llevar a cabo estudios a este respecto en base al hallazgo de: 1) algunas líneas celulares forman uniones estrechas *in vitro* y se polarizan en unas cuantas horas, 2) que los RNA-virus con cubierta geman asimétricamente en las monocapas epiteliales en cultivo, y 3) que la gemación viral polarizada es consecuencia de la inserción asimétrica de sus proteínas de cubierta en la membrana.

El objetivo de esta tesis es examinar el papel de algu--

nas estructuras celulares, la unión estrecha y el citoesqueleto de actina, en la distribución polarizada de las proteínas de membrana. Asimismo, estudiar el estado de la permeabilidad de membrana en el momento en que las proteínas virales --son insertadas en el dominio apical o basolateral de la membrana de las células epiteliales. Para ello se trabaja con una preparación semi-artificial de células epiteliales en cultivo, infectadas con un RNA-virus que gema por membrana apical (Influenza) y otro que gema por la basolateral (Estomatitis Vesicular) en estas células.

## INDICE GENERAL

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN. ....	1
CAPÍTULO II. MÉTODOS. ....	54
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ...	93
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES. ....	143
CAPÍTULO V. BIBLIOGRAFÍA. ....	148

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.

EL TEJIDO EPITELIAL: SUS CARACTERÍSTICAS. ....	3
1) <i>Las Uniones Estrechas.</i> .....	4
2) <i>La Polaridad Epitelial.</i> .....	8
LA LINEA CELULAR MDCK COMO MODELO DE MONOCAPA EPITELIAL. ....	13
GLICOPROTEINAS VIRALES COMO MODELO DE PROTEÍNAS INTEGRALES DE MEMBRANA PLASMÁTICA EPITELIAL. ....	22
1) <i>RNA-virus con Cubierta.</i> .....	22
2) <i>Gemación Viral Polarizada de Líneas     Celulares Epiteliales.</i> .....	24
3) <i>Justificación de Este Modelo.</i> .....	26
AVANCES EN EL ESTUDIO DE LA POLARIDAD EPITELIAL. ....	29
1) <i>La Glicosilación de Proteínas y la     Polaridad Epitelial.</i> .....	29
2) <i>Lípidos Presentes en Algunas Glicoproteínas     Virales.</i> .....	33
3) <i>El Complejo de Golgi y la Polaridad     Epitelial.</i> .....	34
4) <i>Papel de las Uniones Estrechas y de las     Interacciones Célula-Sustrato o     Célula-Célula en la Polaridad.</i> .....	36
5) <i>Relación Entre los Cambios de Permeabilidad     Iónica de Membrana y la Polaridad.</i> .....	41
6) <i>Estudios de la Vía Intracelular de las     Proteínas Apicales y Basolaterales.</i> .....	43
7) <i>Reversibilidad de la Polaridad Epitelial.</i> .....	44

OBJETIVOS DE ESTA TESIS. ....	46
1) <i>Objetivos.</i> .....	47
2) <i>Justificación.</i> .....	48

## EL TEJIDO EPITELIAL: SUS CARACTERISTICAS.

El intercambio de materia entre los organismos superiores y el medio se lleva a cabo a nivel de membranas epiteliales constituidas por una o más capas de células, en una de las cuales, la más externa, las células están unidas entre sí por uniones estrechas de permeabilidad variable. El tejido epitelial no sólo es continente de los líquidos que se producen en los organismos vivos (orina, bilis, sangre, humor acuoso, lágrimas, sudor, líquido cefalorraquídeo, saliva, leche, jugo pancreático, etc.) sino además, y fundamentalmente, regula la composición de esos líquidos. Es decir, que las células además de controlar su composición citoplasmática mediante bombas, acarreadores, canales, etc., como lo hace cualquier otra célula del organismo, regulan también la composición del compartimiento que limitan, puesto que estos líquidos tienen una composición distinta a la del medio interno.

Los epitelios son tejidos que se caracterizan precisamente por la existencia de las uniones estrechas (un tipo de complejo de unión entre las células epiteliales) que transforman a la capa epitelial en una verdadera barrera a la difusión de solutos, y porque presentan una sorprendente polaridad estructural y funcional, responsables de sus funciones vectoriales.

### 1) Las Uniones Estrechas.

Como se señaló anteriormente, una de las características de los epitelios es la formación de las uniones estrechas. Ussing desarrolló un modelo para explicar el fenómeno de transporte en los epitelios (Ussing, 1949; Ussing y Zerahn, 1951; Koefoed-Johnsen *et al.*, 1952; Koefoed-Johnsen y Ussing, 1953; Andersen y Ussing, 1957; Koefoed-Johnsen y Ussing, 1958; Ussing *et al.*, 1960). La suposición tácita en éste es que la ruta fundamental de los iones es transcelular, es decir, que las uniones estrechas son realmente herméticas. Este modelo explica el comportamiento de la mayoría de los epitelios; sin embargo, algunos como la vesícula y el riñón no se comportan según esta teoría.

Un aporte fundamental para entender el comportamiento de los diferentes epitelios fueron las investigaciones sobre la ultraestructura de las uniones estrechas: las células se mantienen juntas por medio de estructuras especializadas, - las uniones estrechas que aparecen en el borde apical (Fig. 1) (Farquhar y Palade, 1963; Gilula, 1974; Martínez-Palomo y Eriij, 1975). Hoy se sabe que en algunos casos estas uniones son tan permeables que el espacio intercelular constituye la ruta principal del flujo transepitelial de sustancias. Por consiguiente, los solutos que atraviesan la membrana -- epitelial en uno u otro sentido tienen dos caminos alternativos: i) a través de las dos membranas en serie de las cé-

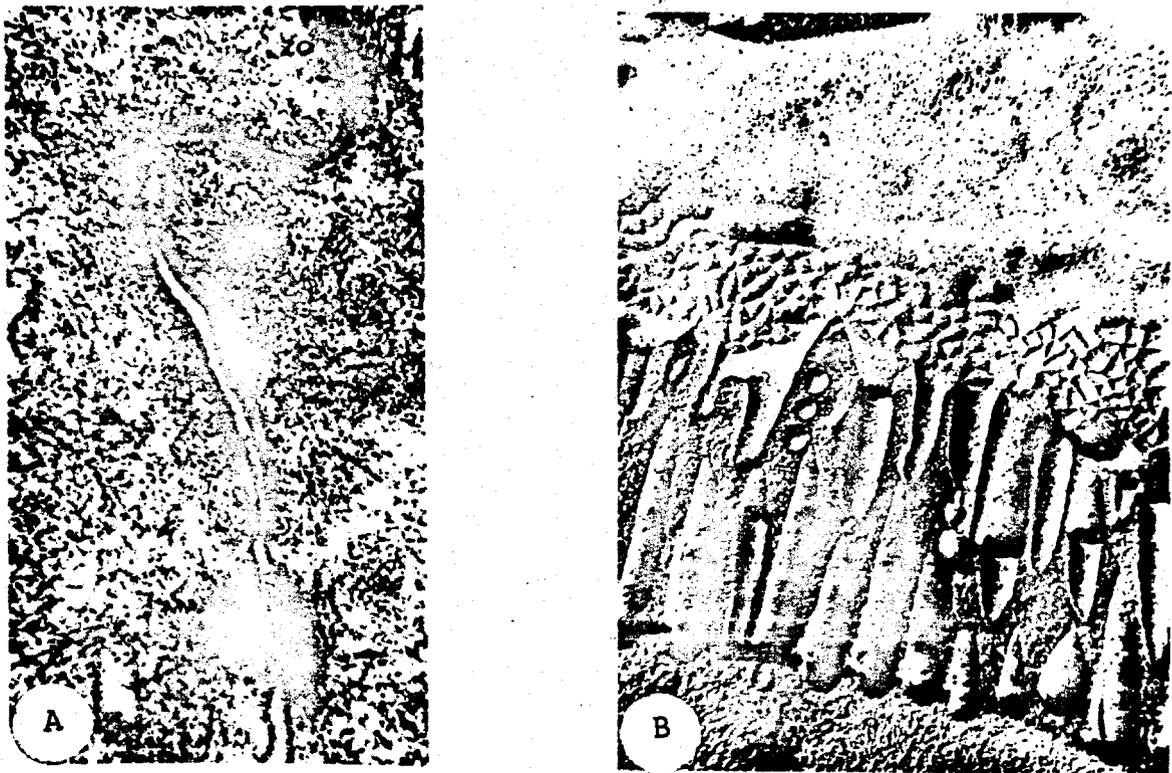


Figura 1. A. Complejo de unión entre dos células epiteliales del intestino delgado de rata. Las membranas plasmáticas laterales se funden en la región lateral para formar la unión estrecha (ZO).

Los elementos de tipo desmosomal del complejo de unión, la zonula adhaerens (ZA) y la macula adhaerens (MA), o desmosoma, se ven debajo de la unión estrecha. Magnificación: 119000X.

B. Criofractura de la unión estrecha entre células epiteliales del intestino delgado de rata. La unión estrecha está formada por una red de cordones (cara PF) y canales (cara EF).

Los cordones y canales representan los sitios de verdadera fusión membranal. Este cinturón, o zonula, de membranas fusionadas constituyen una barrera de permeabilidad a la difusión de macromoléculas desde el lado luminal al basal de estas células. Magnificación: 70000X.

(Tomada de Gilula, 1974).

lulas epiteliales (ruta transcelular), o bien, ii) vía estructuras intercelulares, las uniones estrechas (ruta paracelular). Los trabajos de Fromter (1972), Fromter y Diamond (1972) y Boulpaep (1971) consolidaron la hipótesis que gran parte de las variaciones en las propiedades de los epitelios surge de la variación en la relación entre la conductancia a través de las uniones intercelulares y la conductancia de la ruta transcelular. Consecuentemente se postuló una clasificación de los epitelios en dos categorías: i) los llamados permeables, es decir, aquéllos en los que los solutos atraviesan el epitelio por una ruta paracelular controlada por las uniones estrechas, y ii) los herméticos, donde la ruta de los solutos es intracelular.

Claude y Goodenough (1973) intentaron una clasificación de los epitelios en función de su resistencia epitelial (Tabla I). Estos autores encontraron una correlación directa entre el número de fibrillas de la unión estrecha y la permeabilidad paracelular. Sin embargo, otros investigadores (Martínez-Palomo y Eriij, 1975) hallaron que esta correlación no existe: así, por ejemplo, el ileo de conejo y la vejiga urinaria del sapo tienen una red de fibrillas muy semejante. No obstante, mientras que el primero es permeable a lantano y tiene todas las características de un epitelio permeable, el segundo es impermeable a lantano y posee propiedades de un epitelio hermético.

TABLA I.\* Algunos Epitelios Simples Clasificados de Acuerdo a su Resistencia Transepitelial. Medidas de la Morfología de la Unión.

TEJIDO	Resistencia Transepitelial ( $\Omega\text{cm}^2$ )	Morfología de la Unión				N
		No. de Fibrillas Gama	Fibrillas Promedio $\pm$ ES	Profundidad ( $\mu\text{m}$ ) Gama	Profundidad Promedio $\pm$ ES	
<u>Muy Permeable:</u> túbulo contorneado proximal de mamífero.						
Perro	6	-	-	-	-	-
Rata						
Ratón	-	1-2	1.19 $\pm$ 0.12	+	+	48
<u>Permeable:</u> túbulo contorneado proximal de Necturus	70	1-6	3.30 $\pm$ 0.15	0.1-0.8	0.46 $\pm$ 0.02	59
Vesícula de conejo.	30	2-6	4.10 $\pm$ 0.11	0.1-1.0	0.41 $\pm$ 0.02	90
<u>Intermedio:</u> vesícula de Necturus	300	4-8	6.20 $\pm$ 0.21	0.5-1.4	1.00 $\pm$ 0.05	23
Yeyuno de rata	>300	-	-	-	-	-
Yeyuno de ratón	-	4-7	5.30 $\pm$ 0.17	0.3-0.8	0.39 $\pm$ 0.03	34
<u>Intermedios a Herméticos:</u> túbulo contorneado distal	300-600					
Necturus		2-7	4.80 $\pm$ 0.36	0.1-1.0	0.38 $\pm$ 0.06	17
Ratón		4-7	5.80 $\pm$ 0.20	0.1-0.2	0.14 $\pm$ 0.006	18
<u>Muy Herméticos:</u> Estómago de ratón		4-11	8.10 $\pm$ 0.34	0.3-0.9	0.63 $\pm$ 0.03	25
Vejiga urinaria de anfibios	1000-2000	-	-	-	-	-
Sapo		5-11	8.10 $\pm$ 0.94	0.3-0.5	0.36 $\pm$ 0.03	7
Rana		5-14	7.90 $\pm$ 0.38	0.3-1.1	0.58 $\pm$ 0.03	34

\*Tomada de Claude y Goodenough (1973).

+En la mayoría de los lugares la profundidad de la unión era igual al ancho de una sola fibrilla.

N = número de determinaciones. ES = error estándar.

## 2) La Polaridad Epitelial.

Desde el punto de vista anatómico se observa una -- marcada asimetría; así, las células epiteliales de la cara externa pueden estar desnudas o cubiertas de glucocálix, en tanto que las de la interna están cubiertas por tejido co-- nectivo. Además, los organelos celulares no se disponen al azar, sino que aparecen orientados; la mitad o el tercio ba-- sal de la célula contiene al núcleo, con el complejo de Gol-- gi situado arriba de éste. Las mitocondrias se alinean en el lado basolateral o contraluminal, región con grandes re-- querimientos de ATP como es el caso de células de túbulo de riñón (en esta zona se lleva a cabo transporte transepite-- lial de  $\text{Na}^+$  por una  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -ATPasa) o de las células secretoras (esta zona es rica en retículo endoplásmico rugoso, encarga-- do de la síntesis de proteínas). Las regiones libres de la membrana plasmática de las células epiteliales por lo gene-- ral están asociadas con actividad secretoria y pinocítica, y por consiguiente el citoplasma contiene cantidades varia-- bles de vesículas y vacuolas, gránulos de secreción y liso-- somas (Berridge y Oschman, 1972). En los epitelios cuya -- principal función es la absorción, esta región, la apical o luminal, presenta numerosas microvellosidades. Los comple-- jos de unión intercelulares (zonulas ocludentes o uniones estrechas, nexus o uniones comunicantes y maculas adhaeren--

tes o desmosomas) se encuentran invariablemente en el extremo apical.

Desde el punto de vista funcional, las células epiteliales presentan una polarización de su membrana plasmática distinguiéndose dos dominios: i) apical o luminal y ii) basolateral o contraluminal. La segregación de diferentes enzimas y sistemas de transporte entre estos dos dominios es responsable de las funciones vectoriales de los epitelios, tales como el transporte unidireccional de fluido, electrolitos y nutrientes y la secreción de productos celulares específicos hacia uno de los dos espacios extracelulares que el epitelio separa. Por ejemplo, en túbulo distal de riñón de mamífero la membrana apical de una célula epitelial es muy permeable al  $\text{Na}^+$  y muy poco permeable al  $\text{K}^+$ , en tanto que la membrana contraluminal tiene una alta permeabilidad al  $\text{K}^+$  y es impermeable al  $\text{Na}^+$ ; en esta membrana existe un mecanismo de transporte activo que saca iones  $\text{Na}^+$  de las células, intercambiándolas por iones  $\text{K}^+$ ; en cambio, la membrana luminal carece de bombas (Koefoed-Johnsen y Ussing, 1958). Esta asimetría se manifiesta en el riñón al probar el efecto de hormonas y drogas: la hormona antidiurética, que estimula el transporte de  $\text{Na}^+$ , y el glucósido cardíaco ouabaína, que lo bloquea, son activos solamente cuando se añaden al medio -- que baña la superficie serosa; en cambio, la amilorida, que

reduce la permeabilidad pasiva al  $\text{Na}^+$ , sólo es activa cuando se añade por la superficie mucosa del epitelio (Beber, 1971; Aceves y Erlij, 1971; Beber *et al.*, 1972).

Desde el punto de vista bioquímico, la célula epitelial se caracteriza por una distribución polarizada de las macromoléculas, en particular proteínas, en la membrana plasmática luminal y contraluminal. Se han realizado estudios en diversos epitelios: túbulo proximal de rata (Hiedrick *et al.*, 1972), ducto colector bovino (Schwartz *et al.*, 1974), intestino delgado de rata (Murer *et al.*, 1974) y vejiga urinaria de tortuga (Brodsky *et al.*, 1976), en los que la membrana luminal y contraluminal de las células fueron separadas por electroforesis de flujo libre; el resultado de éstos y otros estudios ha sido la caracterización de proteínas presentes exclusivamente en membrana apical o contraluminal y que por esto son consideradas y pueden utilizarse como "marcadores intrínsecos" de la membrana en que se localizan (Tabla II).

Es importante a este respecto el hecho de que la mayoría de los sistemas distribuidos asimétricamente en la membrana plasmática de la célula epitelial, también se encuentran en las membranas plasmáticas de células no polarizadas. Una excepción a esto es el sistema de transporte de monosacáridos dependiente de  $\text{Na}^+$ , que parece exclusivo de las mem-

TABLA II.\* Marcadores de Superficie Apical y Basolateral. Resume los hallazgos de proteínas marcadoras de membrana apical y basolateral en distintos epitelios naturales.

MARCADORES	EPITELIO
<u>Superficie Apical.</u>	
Fosfatasa alcalina	I K L
Leucina aminopeptidasa	I K
Oligo- y disacaridasas (sacarasa-isomaltasa, trehalasa, lactasa, maltasa, glucoamilasa)	I
Proteína cinasa dependiente de AMPc	K
Transporte Na <sup>+</sup> -dependiente de hexosas, amino ácidos, dipéptidos, protones, sulfato, fosfato	I K
Cl <sup>-</sup> , lactato, ascorbato, ácidos bÍlicos	
Transporte Na <sup>+</sup> -independiente de fructosa, P-aminohipurato, Cl <sup>-</sup>	I K
Transporte ATP-dependiente de H <sup>+</sup> y CO <sub>3</sub> H <sup>-</sup>	I K
Componente secretor, receptores a IgG	I
<u>Superficie Basolateral.</u>	
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPasa	STE
Ca <sup>++</sup> -ATPasa	I K
AntÍgenos de histocompatibilidad (H <sub>2</sub> )	
Receptor asialoglicoproteÍna	
Componente secretor, receptores a IgG	I EG
Receptores a acetilcolina	EG
Receptores de hormona polipeptÍdica	EG I K
Adenilato ciclasa	K
SÍtios de unÍon de colÁgeno y laminina	C
Transporte Na <sup>+</sup> -dependiente de aminoÁcidos, Ca <sup>++</sup> , Cl <sup>-</sup>	I K
Transporte Na <sup>+</sup> independiente de aminoÁcidos neutros, glÚcosa, lactato	I K

\* Tomada de Rodríguez-Boulán (1983a)

I = intestino; L = hÍgado; K = riñón; STE = epitelios transportadores de sodio; EG = glÁndulas exócrinas; C = epitelio de la córnea.

branas lumbales de la célula polarizada. En vista de este hecho, se podría considerar a la membrana luminal como la parte más diferenciada de la membrana plasmática de la célula epitelial (Kinne y Kinne-Saffran, 1978).

Además de su diferente composición de proteínas, se ha propuesto (Maylie-Pfenninger y Jamieson, 1979; Muresan y Jamieson, 1980) que el dominio apical y basolateral de la membrana plasmática difieren considerablemente en su complemento de azúcares y lípidos. Semenza (1976) encontró que en células de túbulo renal el ácido siálico está ausente en varias enzimas apicales, pero está presente en proteínas basolaterales como la  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ .

Por otra parte, se ha reportado que la fracción apical de la membrana plasmática de células de intestino de mamífero presenta menor contenido lipídico y es más rica en colesterol y glicolípidos, aunque más pobre en fosfolípidos que la fracción de membrana basolateral (Forstner *et al.*, 1968; Douglas *et al.*, 1972; Kawai *et al.*, 1974; Lewis *et al.*, 1975). Esto indica que las células epiteliales no solamente poseen mecanismos para orientar proteínas, sino también lípidos.

En la actualidad se dispone de una información bastante extensa acerca de los sistemas de transporte de la célula epitelial, de sus mecanismos de funcionamiento, localiza

ción y estructura, pero quedan aún por resolverse preguntas básicas como ¿por qué el contacto intercelular lleva a la formación de uniones estrechas que transforman a la monocapa celular en una barrera para la difusión?, ¿qué es lo que dispara la diferenciación de la célula hasta convertirla en una unidad de transporte polarizada?, ¿cuál es el proceso por el cual proteínas integrales de membrana que han sido sintetizadas por la misma maquinaria celular son insertadas en uno u otro dominio de la membrana de la célula epitelial? En este trabajo tratamos de resolver algunos aspectos de esta última pregunta.

El establecimiento de una variedad de líneas celulares de origen epitelial ha hecho posible el estudio de las propiedades de las células epiteliales bajo condiciones más sencillas y versátiles que en epitelios naturales.

#### LA LINEA CELULAR MDCK COMO MODELO DE MONOCAPA EPITELIAL.

Una preparación *in vitro* que presenta las propiedades de los epitelios transportadores naturales fue desarrollada recientemente por Misfeldt (1976) y por el grupo de Cereiido (1978). Se trata de una monocapa de células epiteliales que se obtiene al cultivar la línea celular de origen renal MDCK sobre un soporte permeable y transparente.

La línea celular MDCK fue derivada de un riñón de perro Cocker Spaniel, adulto, aparentemente normal. El cultivo primario fue hecho en 1958 por Madin y Darby, y caracterizado por Gausch y colaboradores (1966). Esta línea celular tiene propiedades de epitelio de túbulo contorneado distal de riñón y de adenocarcinoma papilar (Leighton *et al.*, 1969). Las células MDCK en cultivo son citológicamente malignas, con núcleos grandes, nucleolos múltiples y figuras mitóticas anormales. La oncogenicidad de las MDCK se probó *in vivo* por inyección intravenosa de suspensión de células aisladas en embriones de pollo. Una semana después se diagnosticaron múltiples focos de adenocarcinomas metastásicos en el cerebro de los animales inoculados (Leighton *et al.*, 1970). Leighton y colaboradores demostraron además que cuando las células MDCK crecen sobre un soporte impermeable forman ampollas o domos que parecen resultar del transporte vectorial de agua desde el medio hacia el soporte (Fig. 2). La formación de estas ampollas es inhibida por ouabaina (Abaza *et al.*, 1979). Como este glucósido cardíaco actúa muy específicamente sobre el mecanismo de bombeo de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , se piensa que el flujo neto de agua es un fenómeno secundario acoplado al transporte de sodio. La producción de este tipo de ampollas multicelulares parece ser una propiedad común a una gran variedad de células epiteliales en cultivo: célu-

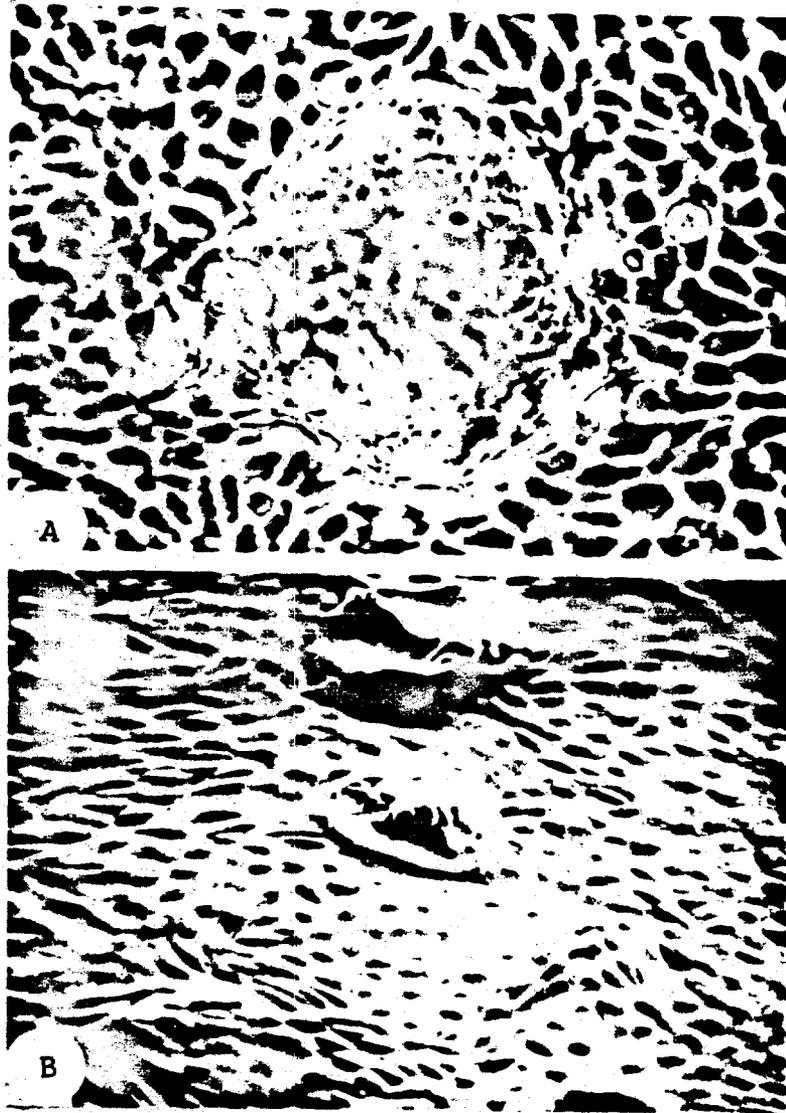


Figura 2. A. Fotomicrografía de fase mostrando un domo o ampolla (encima del plano focal) en una monocapa de células MDCK cultivadas sobre un soporte impermeable. Magnificación: 700X.

B. Micrografía electrónica de barrido de una monocapa de células MDCK cultivada en una caja de Petri de plástico. Se ven ampollas, algunas parcialmente colapsadas durante el procesamiento. Magnificación: 242X.

(Tomada de Cereijido *et al.*, 1978).

las mamarias (McGrath, 1971, Pickett, 1975), riñón de perro (Knauff y Fromter, 1970), tiroides (Lissitzky, 1971), células cervicales humanas (Auersperg, 1969).

En 1978, Cereijido y colaboradores desarrollaron una nueva preparación con la línea MDCK. Este grupo sembró células MDCK aisladas sobre discos de nylon recubiertos de colágeno que actúan como un soporte permeable y transparente. En estas condiciones se forma una monocapa que crece como un tapiz liso con la protrusión ocasional de aglunas células redondeadas (Fig. 3). Las MDCK cultivadas sobre colágeno no forman ampollas ya que el agua no se acumula entre la monocapa y el soporte permeable. El hecho que se forme una monocapa indica que las células están polarizadas estructuralmente ya que, mientras la cara basal es capaz de adherirse a un sustrato, la cara libre no puede pegarse a otra célula. Esta asimetría se manifiesta también por la presencia de algunos cilios y microvellosidades regularmente espaciados en la cara libre, en tanto que estas estructuras no aparecen en la cara que está en contacto con el colágeno. Además, la membrana lateral de las células presenta numerosas interdigitaciones, dejando un espacio intercelular de ancho variable. Este espacio está cerrado en el extremo apical de la monocapa por complejos de unión formados por escasos desmosomas y por uniones estrechas (Fig. 4).

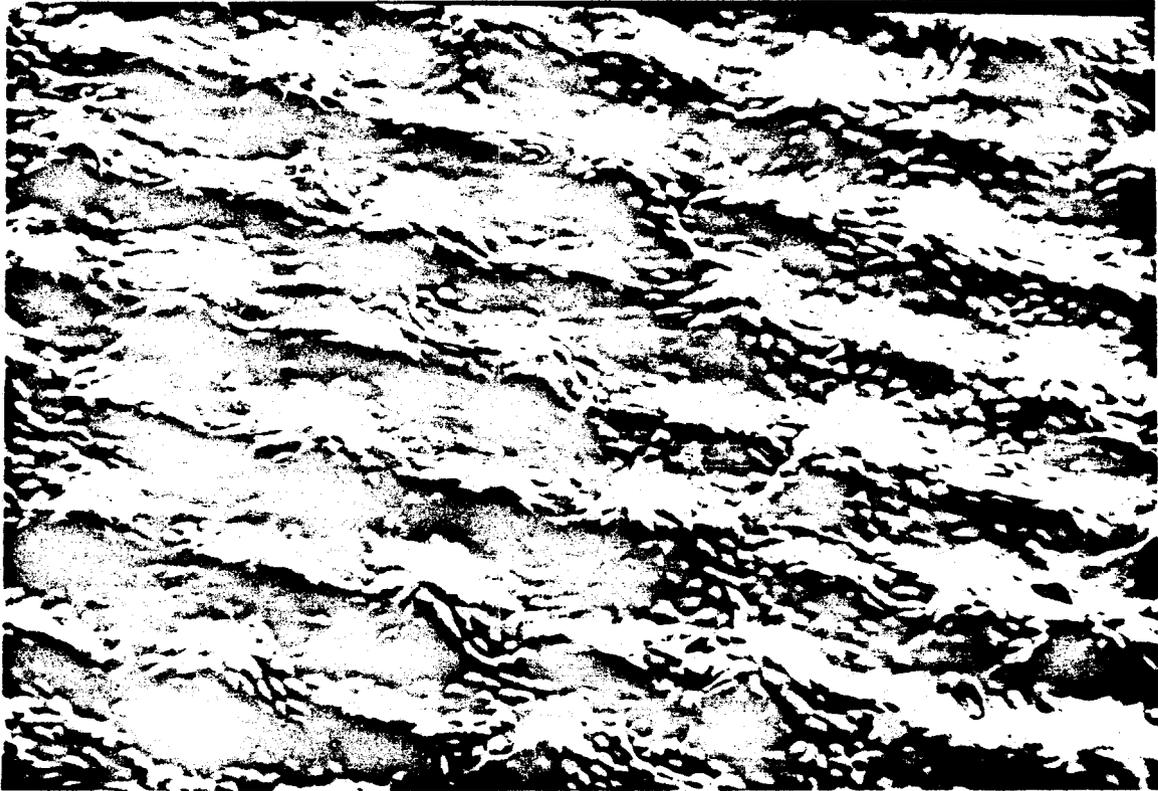


Figura 3. Micrografía electrónica de barrido de una monocapa de células MDCK cultivada sobre una malla de nylon cubierta de colágeno. No se observan domos. Las prominencias corresponden al entrecruzamiento de los hilos de la malla y se encuentran cubiertas por colágeno y células. Se ven algunas células redondeadas que probablemente están en mitosis o bien que están adheridas al soporte pero no tienen espacio para extenderse. Magnificación: 97.5X.  
(Tomada de Cereijido *et al.*, 1978).



Figura 4. Porciones de tres células de una monocapa confluyente de MDCK. La superficie apical muestra microvellosidades cortas e irregulares. Los espacios laterales están sellados en el extremo apical -- por complejos de unión constituidos por uniones estrechas (flechas) y desmosomas. Nótese la presencia del aparato de Golgi (G) cerca de la membrana lateral y de gotas de lípidos (LD). En la parte basal se observa una capa de microexudado que se tiñe de oscuro (entre las líneas paralelas) y que separa al colágeno (C) de la monocapa que probablemente la fabricó. Magnificación: 11250X.  
(Tomada de Cereijido *et al.*, 1978).

La unión aparece en réplicas de criofractura como un conjunto de 1 a 7 fibrillas interpuestas entre el lumen y el espacio intercelular que forman una red de cordones en la cara PF y de canales en la cara EF. En el curso de unos pocos nanómetros el patrón de complejidad puede variar de 7 a 2 fibrillas paralelas tal y como ocurre en los túbulos proximal y distal de los epitelios naturales (Pricam *et al.*, 1974). La unión estrecha de la monocapa no es permeable a trazadores macromoleculares tales como la peroxidasa y el lantano (Cereijido *et al.*, 1978a).

La posición de los complejos de unión hacia la superficie libre de las células y la aparición de microvellosidades y cilios en la cara libre indican que ésta corresponde al lado luminal de los epitelios naturales. Cereijido y colaboradores (1978 a, b) han estudiado el desarrollo de la unión estrecha en células MDCK sembradas a alta densidad sobre discos de nylon recubiertos de colágeno siguiendo el desarrollo de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) en función del tiempo. La resistencia empieza a desarrollarse aproximadamente a las tres horas, alcanza un máximo de  $340\Omega\text{cm}^2$  a las 20-24 horas y a las 48 horas se estabiliza en alrededor de  $100\Omega\text{cm}^2$ . El desarrollo de la RET fue correlacionado con la aparición de uniones estrechas en las réplicas de criofractura. El desarrollo de la permeabilidad se--

lectiva a  $\text{Na}^+ > \text{Cl}^-$ , típica de monocapas confluentes, presenta un curso temporal más lento, alcanzando su valor máximo a los 2 ó 3 días después de sembradas, lo que indica que estas dos propiedades de la unión estrecha son independientes.

Funcionalmente, la monocapa de células MDCK también se comporta como un epitelio en el sentido de que desarrolla, además de la resistencia eléctrica transepitelial, un potencial eléctrico transepitelial (de aproximadamente 1 mV, positivo en el lado basal) y permselectividad catiónica (10 veces más permeable al  $\text{Na}^+$  que al  $\text{Cl}^-$ ) (Misfeldt *et al.*, -- 1976; Cereijido *et al.*, 1978; Cereijido *et al.*, 1980).

La distribución polarizada de las proteínas en la membrana plasmática de las células MDCK ha sido demostrada por la iodización selectiva de las proteínas accesibles a lactoperoxidasa agregada por el lado basal o apical de células crecidas sobre filtros de Millipore (Richardson y Simmons, 1979). Más específicamente, utilizando inmunofluorescencia, Louvard (1980) localizó una leucina aminopeptidasa como proteína marcadora de la membrana apical y la  $\text{Na}^+ \text{--} \text{K}^+ \text{--} \text{ATPasa}$  en la membrana basolateral. Este autor observó, además, que -- las proteínas destinadas a la superficie apical son insertadas en la membrana plasmática en una región adyacente a la unión estrecha.

Así pues, esta preparación presenta propiedades de ---

transporte (formación de domos) y barreras a la difusión -- (uniones estrechas no permeables a trazadores macromoleculares). Si se le compara con los epitelios naturales, tiene por lo menos cuatro claras ventajas experimentales: i) se le puede colocar intacta entre dos cámaras a fin de realizar estudios de flujo y eléctricos; ii) permite comparar los cursos temporales de la adquisición de determinadas características químicas y estructurales con la aparición de propiedades específicas de transporte y permeabilidad; iii) permite manipular muchos de los factores que influyen en el crecimiento y la diferenciación; iv) puede observarse su estado y desarrollo por simple microscopía de fase y así seleccionar el momento adecuado para probar sus propiedades.

Este sistema ha permitido estudiar las características y cinéticas con que se instalan una serie de sistemas polarizados en la célula epitelial. Por ejemplo, la cinética de instalación de las uniones estrechas y su modulación experimental (Martínez-Palomo *et al.*, 1980), las características de los flujos, complejos de unión y ampollas cuando las monocapas crecen en presencia de calcio (Cerejido *et al.*, 1981); la heterogeneidad estructural y funcional de las uniones estrechas (Cerejido *et al.*, 1980), la relación entre el citoesqueleto y las uniones estrechas (Meza *et al.*, 1980); la modulación de la permeabilidad transepitelial por el citoesqueleto (Meza *et al.*, 1981).

Por último una propiedad sorprendente descrita recientemente por Rodríguez-Boulán y Sabatini (1978) es la gemación polarizada de los RNA-virus con cubierta en las células MDCK. Esta propiedad ha permitido el desarrollo de un sistema modelo para el estudio de los mecanismos de polarización de proteínas de membrana plasmática en las células epiteliales. El sistema involucra la infección de la línea celular MDCK con RNA-virus con cubierta. Dado que es precisamente en este sistema modelo en el que se realizó este trabajo, el mismo se describe en la siguiente sección.

#### GLICOPROTEINAS VIRALES COMO MODELO DE PROTEINAS INTEGRALES DE MEMBRANA PLASMÁTICA EPITELIAL.

##### 1) *RNA-virus con Cubierta.*

Los virus de las clases rhabdo-, paramyxo-, myxo-, toga-, y retroviridae poseen, como rasgo típico, un genoma de RNA de una sola cadena, segmentado en el caso de los myxovirus, que codifica un máximo de 8 a 9 proteínas, incluyendo de 1 a 3 glicoproteínas de la cubierta, una o más nucleoproteínas, y transcriptasas dependientes de RNA (ausentes en el caso de los togavirus). La progenie de los viriones es ensamblada por la convergencia de las nucleocápsides y áreas de la membrana celular que contienen proteínas de membrana codificadas viralmente. Una característica de es--

tos virus es que adquieren sus envolturas por un proceso de gemación de las membranas celulares, por lo general la membrana plasmática (Rifkin y Quigley, 1974; Lenard y Compans, 1974).

Las glicoproteínas virales de la envoltura se consideran como un modelo de proteínas de membrana plasmática y se han llevado a cabo estudios extensos sobre su biogénesis (Lenard, 1978). Estas proteínas se sintetizan en polisomas unidos a las membranas de retículo endoplásmico rugoso (RER) (Hay, 1974; Atkinson, 1978), vía las secuencias "señal" del N-terminal (Lingappa *et al.*, 1978), lo que resulta en la inserción de las proteínas en la membrana del RER (Katz *et al.*, 1977; Katz y Lodish, 1979). Son glicosiladas cotraduccionalmente vía donadores de oligosacáridos-lípidos (Katz *et al.*, 1977; Moyer *et al.*, 1976; Nakamura y Compans, 1979) y subsecuentemente migran hacia las membranas de retículo endoplásmico liso. Durante esta migración sus residuos de oligosacáridos son procesados por enzimas celulares (Hunt *et al.*, 1978; Robertson *et al.*, 1978; Tabas y Kornfeld, 1978). La glicosilación terminal tiene lugar en el complejo de Golgi (Schachter, 1974), después de la cual las glicoproteínas virales aparecen en la membrana plasmática y participan en la gemación de los viriones. En el caso del virus de la estomatitis vesicular

(VSV), un rhabdovirus, se ha sugerido que las vesículas recubiertas de clatrina transportan la proteína G madura en dos etapas intracelulares diferentes (Rothman y Fine, 1980; Tabas y Kornfeld, 1978).

2) *Gemación Viral Polarizada de Líneas Celulares Epiteliales.*

La infección con RNA-virus con cubierta de líneas celulares epiteliales como MDCK o MDBK (una línea de riñón bovino) genera gemación asimétrica de los viriones en regiones celulares opuestas de la membrana plasmática (Rodríguez-Boulán y Sabatini, 1978). Un myxovirus (FLU) y dos paramyxovirus (Sendai, Simian 5 (SV 5)) geman exclusivamente de la membrana apical, mientras que el VSV es ensamblado en la región basolateral de estas células (Fig. 5). La infección de las células no polarizadas, tales como fibroblastos de embrión de pollo, resulta en una gemación no polarizada (Rodríguez-Boulán y Sabatini, 1978). En algunos casos se ha descrito la gemación polarizada en epitelios naturales (Murphy y Bang, 1952; Bang, 1953; Hess, 1977). La dirección de la gemación parece ser una propiedad específica de cada virus en particular, diferentes virus expresan polaridades opuestas en un mismo tipo celular y cada virus retiene la misma polaridad en diferentes líneas celulares epiteliales (Rodríguez-Boulán y Sabatini, 1978).

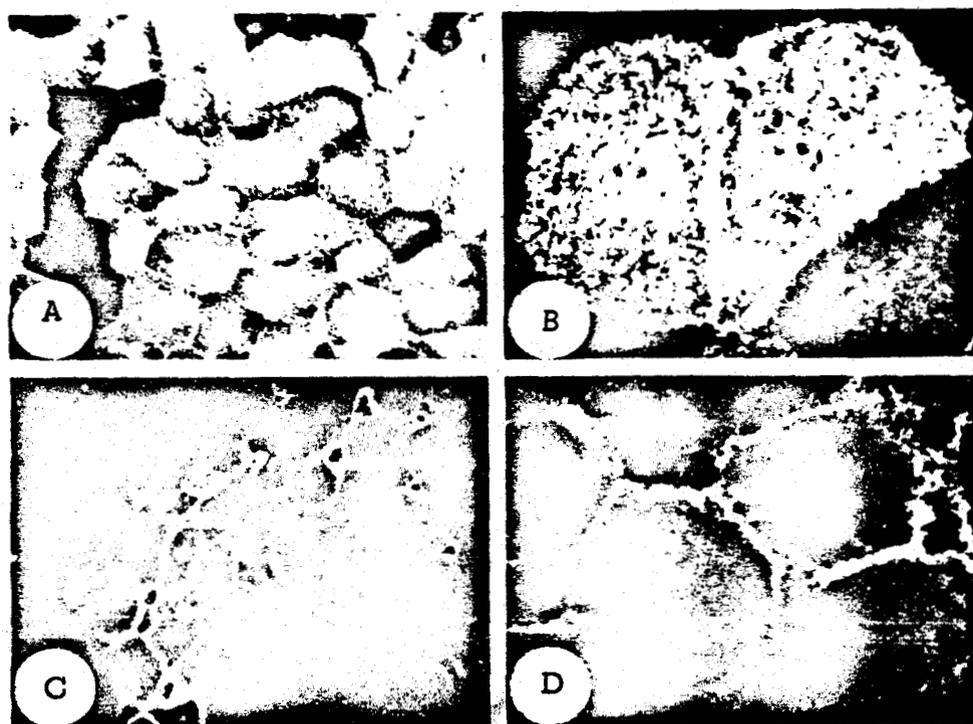


Figura 5. Localización por inmunofluorescencia de los virus de la influenza (FLU) y de la estomatitis vesicular (VSV) en monocapas de células MDCK infectadas. Las células MDCK se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio. A diferentes tiempos postinfección (6 horas en el caso del FLU y 4.5 en el caso del VSV), las monocapas se trataron con EGTA 2 mM durante tres minutos a 37°C y se fijaron con paraformaldehído 4% en PBS antes del tratamiento para inmunofluorescencia indirecta (anticuerpo de conejo antiFLU y anticuerpo de chivo anticonejo rodaminado en el caso del FLU; anticuerpo de conejo antiG y anticuerpo de chivo anticonejo fluoresceinado en el caso del VSV).

A y B: localización del FLU. La fluorescencia aparece en la parte apical de la célula donde se fijaron los anticuerpos contra el virus. En A (izquierda) algunas células no aparecen teñidas. En B se observan dos células con superficie apical totalmente teñida. Magnificación 80X y 275X, respectivamente. C y D: localización del VSV. Se observa la fluorescencia en forma de anillo rodeando la célula debido a que los anticuerpos contra la proteína G del virus se fijaron en la superficie basolateral de las células. En C los puntos difusos de fluorescencia que aparecen en el centro de las células corresponden a la tinción de la parte basal de éstas. En D pueden verse claramente la fluorescencia en los interespacios celulares. Magnificación: 80X y 275X, respectivamente.

(Tomada de Rodríguez-Boulán, 1980).

### 3) *Justificación de Este Modelo.*

Empleando inmunofluorescencia e inmunoelectromicroscopía con ferritina, Rodríguez-Boulán y Pendergast (1980) - mostraron que la gemación polarizada es precedida por la -- orientación de las proteínas virales de la cubierta en la -- región de la membrana plasmática por la cual los viriones -- geman más tarde. Esto parece ser determinante en el proceso de la gemación polarizada. Por otra parte, las nucleocápsides virales no parecen jugar un papel importante en la gema-- ción asimétrica, ya que, al menos en el caso de la infec-- ción de células MDCK con Sendai, se pueden encontrar las -- nucleocápsides en el citosol (Rodríguez-Boulán y Pendergast, 1980).

Estos resultados indican que las glicoproteínas vira-- les comparten con las proteínas de membrana plasmática de -- las células epiteliales no solamente mecanismos biogenéti-- cos, sino también rasgos informacionales que determinan su compartamentalización en dominios específicos de la membra-- na plasmática. Esto implica que durante algún punto de su biogénesis la proteína G del VSV es reconocida por los me-- canismos propios de las células epiteliales como una protef-- na basolateral, y es por esto dirigida a ese dominio. Simi-- laramente, las glicoproteínas del FLU, Sendai y SV 5 deben -- ser reconocidas por las células como proteínas de membrana plasmática apical.

La información que determina la distribución polarizada se presenta como un rasgo estructural permanente en la proteína, más que en un péptido transiente, como es el caso de la señal para la inserción cotraduccional de las proteínas de secreción en el retículo endoplásmico, ya que muchas proteínas de membrana plasmática parecen ser capaces de reciclar en el interior celular y volver a la membrana plasmática (Morre *et al.*, 1979).

Las ventajas experimentales que presentan estos virus en el estudio de la biogénesis de la membrana plasmática -- han sido expuestas por varios autores (Lodish *et al.*, 1980; Lenard y Compans, 1974; Lenard, 1978), y pueden resumirse brevemente en los siguientes puntos:

- El genoma limitado de estos virus, que codifica solamente unas cuantas proteínas, garantiza que éstos -- utilizarán los mecanismos celulares para su replicación, lo que los convierte en herramientas muy útiles en el estudio de dichos mecanismos.
- La infección con algunos de estos virus apaga la síntesis de proteínas celulares. Así, la célula fabrica solamente proteínas codificadas por el virus, -- siendo 1 ó 2 de ellas proteínas integrales de membrana plasmática. Esto simplifica la situación, ya que entonces un 20 a 30% de la actividad biosintética ce

lular está dirigida a la biogénesis de membrana plasmática.

- Las glicoproteínas virales pueden purificarse fácilmente por electroforesis bidimensional, de hecho ya se conoce la secuencia aminoacídica de algunas de ellas (Rose, 1980; Garoff, 1981; Garoff *et al.*, 1980; Minjou *et al.*, 1980). La clonación de sus mRNAs es más sencilla que la de las proteínas celulares. Por último, se pueden generar con relativa facilidad mutantes sensibles a temperaturas, en que la migración de proteínas hacia la membrana está bloqueada por falla en algún paso del procesamiento de las proteínas en su camino orientado a su acomodo final en la membrana, lo que hace a estas mutantes muy valiosas para el estudio de ese procesamiento.

Hemos descrito pues el sistema en el que se estudian en este trabajo algunos aspectos de los posibles mecanismos de polarización de las proteínas de membrana en las células epiteliales.

Presentaremos ahora los principales avances realizados en este campo, así como algunos antecedentes relacionados con el planteamiento de los objetivos de esta tesis.

## AVANCES EN EL ESTUDIO DE LA POLARIDAD EPITELIAL.

A la luz de los modelos actuales de la biogénesis de membranas y organelos (Blobel, 1980; Sabatini *et al.*, 1982) es lógico suponer que las proteínas integrales de membrana de la superficie apical y basolateral en los epitelios poseen rasgos estructurales (señales) que permiten a la célula identificarlas como correspondientes a una u otra subespecie de la membrana plasmática. Más aun, las células epiteliales deben poseer mecanismos que codifiquen esta información estructural para asegurar el destino correcto. Actualmente existen en la bibliografía algunos antecedentes orientadores respecto a las posibles señales involucradas en esta distribución polarizada, así como la participación de organelos y los posibles mecanismos celulares para el mantenimiento de ésta.

### 1) *La Glicosilación de Proteínas y la Polaridad Epitelial.*

Las glicoproteínas virales y muchas glicoproteínas de membrana y secretoras contienen una o más cadenas de carbohidratos unidas a residuos de asparagina en el polipéptido por medio de enlaces N-glucosídicos (Lodish *et al.*, 1980; Parodi y Leloir, 1979; Lennarz, 1981; Lenard y Compans, 1974; Lenard, 1978). Los oligosacáridos típicamente son de

dos tipos: simples y complejos. El primer tipo está compuesto por 8 a 9 residuos de manosa y 2 de N-acetilglucosamina. Las cadenas complejas presentan una cadena central, que -- consiste de 3 a 5 residuos de manosa y de 2 N-acetilglucosamina y además 2 ó 3 ramificaciones del trisacárido N-acetilglucosamina-galactosa-ácido siálico. En algunos casos la fucosa puede encontrarse pegada a una de las N-acetilglucosaminas de la cadena central. Recientemente se ha mostrado que la biosíntesis de estas terminaciones glicosídicas es -- un proceso multienzimático complejo que se inicia por la -- transferencia de un oligosacárido (que consiste en 2 residuos de N-acetilglucosamina, 9 de manosa y 3 de glucosa). Este oligosacárido pierde algunos residuos de glucosa o manosa, o alternativamente pierde sólo los residuos de glucosa. Las ramificaciones son añadidas secuencialmente por transferasas específicas. La transferasa de la cadena principal y algunas enzimas que adicionan residuos de glucosa se localizan en el retículo endoplásmico, mientras que las enzimas -- que adicionan residuos de manosa y las transferasas de los azúcares de las ramificaciones se localizan en el aparato -- de Golgi (Parodi y Leloir, 1979; Lennarz, 1981).

El papel funcional de la glicosilación en el transporte intracelular de las proteínas secretoras y de membrana -- está muy controvertido. La migración de algunas proteínas

parece ser muy sensible a la adición de inhibidores de la - glucosilación; sin embargo, otras no parecen ser afectadas (Strous y Lodish, 1980; Gibson *et al.*, 1978; Gibson *et al.*, 1979).

Se había observado (Rodríguez-Boulán y Sabatini, 1978) que las glicoproteínas de algunos virus que geman apicalmente, así como algunas glicoproteínas apicales de epitelios naturales carecen de ácido siálico en su composición, mientras que en contraste las proteínas basolaterales como la proteína G del VSV y la  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$  presentan ácido siálico en sus cadenas de carbohidratos (Kyte, 1972). Debido a esta correlación tan sugestiva, el grupo de Rodríguez-Boulán investigó el papel de los carbohidratos en la determinación de la distribución polarizada de las glucoproteínas, atacando el problema de tres formas distintas (Green *et al.*, 1981): i) el desarrollo de mutantes de células MDCK, resistentes a lectinas con síntesis defectuosa de glicoproteínas (Meiss *et al.*, 1982); ii) el uso de tunicamicina, un antibiótico que bloquea la glicosilación de las glicoproteínas virales (Takatsuki *et al.*, 1975); y iii) el uso de una mutante del virus de la influenza sensible a temperatura (ts), la cual a temperatura no permisiva (39°C), retiene el ácido siálico debido a una neuraminidasa viral defectuosa (Palese *et al.*, 1974).

Las glicoproteínas del VSV o FLU, sintetizadas en mutantes de células MDCK resistentes a niveles tóxicos de canavalina A (Con A<sup>R</sup>) o Ricina (RCA<sup>R</sup>) para las células de tipo silvestre, mostraban un aumento en la movilidad electroforética. El defecto genético en las células mutantes probablemente trae como consecuencia la ausencia de di- o trisacáridos terminales, y al infectarlas con VSV no se observó incorporación de galactosa tritiada en la proteína G (Meis *et al.*, 1982). A pesar de tener alteraciones en sus terminaciones glicosídicas, las líneas celulares mutantes retenían la polaridad estructural y funcional, como lo indica su habilidad para desarrollar uniones estrechas y la formación de ampollas al desarrollarse sobre soportes no permeables (Quaroni *et al.*, 1979). Más aun, la polaridad en la gemación viral se preserva y las glicoproteínas virales se distribuyen de la misma manera que en las células de tipo silvestre: asimétricamente en la superficie, manteniendo la orientación correcta: las glicoproteínas del FLU en membrana apical y la proteína G del VSV en las regiones basolaterales de la membrana plasmática (Green *et al.*, 1981).

Asimismo, la completa inhibición de la glicosilación por el tratamiento con tunicamicina o la retención del ácido siálico por la hemaglutinina en las mutantes sensibles a temperatura del FLU no afectan la distribución polarizada -

de las glicoproteínas virales o la gemación viral asimétrica (Green *et al.*, 1981). Roth y colaboradores (1979) encontraron también que la tunicamicina no afecta la gemación viral polarizada en las células MDCK. Por consiguiente puede concluirse que los carbohidratos no son componentes de las "señales" de distribución que dirigen las glicoproteínas virales (y posiblemente proteínas celulares) a las regiones específicas en la membrana plasmática de las células epiteliales.

2) *Lípidos Presentes en Algunas Glicoproteínas Virales.*

Además de ser glucosiladas, algunas proteínas virales que se utilizan como modelo de proteínas de membrana plasmática, pueden sufrir la adición covalente de ácidos grasos (Lenard y Compans, 1974; Lenard, 1978), esto plantea la posibilidad de que la adición de ácidos grasos sea la señal de direccionamiento. Schmidt y Schlesinger (1979, 1980) demostraron que la incorporación de ácidos grasos a la proteína G del VSV en fibroblastos de embrión de pollo es un evento postraduccionaI que ocurre poco antes que la glicoproteína adquiera sus residuos hidrocarbonados complejos. Sin embargo, estos estudios no han sido realizados en células polarizadas, además, se ha observado (Lenard y Compans,

1974; Lenard, 1978) que los lípidos virales son exactamente iguales a los que componen la membrana de la célula infectada, lo que hace pensar que sean residuos inespecíficos de la membrana celular.

### 3) *El Complejo de Golgi y la Polaridad Epitelial.*

Durante los últimos años se han acumulado evidencias de que existe un complejo tráfico intracelular de vesículas, que media el transporte de macromoléculas entre la superficie celular y los compartimentos intracelulares, -- y entre diferentes compartimentos de la célula. El complejo de Golgi está localizado en la vía de este tráfico de vesículas y juega un papel muy importante en su regulación (Farquhar, 1978; Tartakoff, 1980; Rothman, 1981). Se ha explorado la posibilidad de que exista una correlación entre este organelo y la polaridad. Existen dos líneas de evidencia que sugieren esta correlación:

1) Etchinson y colaboradores (1977), Schwarz y colaboradores (1977) y Hakamura y Compans (1979) han demostrado que los glicopéptidos obtenidos a partir de las proteínas capsulares de los virus que geman tanto por la membrana apical como por la basolateral en células polarizadas, poseen azúcares como la galactosa y la fucosa, que son incorpora-

das a nivel del complejo de Golgi. Ada y Gottschalk (1956), Klenk y colaboradores (1977), McSharry y Wagner (1971) y -- Etchinson y Holland (1974) encontraron que la diferencia fundamental entre los dos grupos virales es la ausencia de ácido siálico en la cápsula de los virus que geman por la apical, hecho que puede atribuirse a la existencia de una neuraminidasa viral (Klenk y Choppin, 1970; Klenk *et al.*, 1970).

ii) Cuando los virus crecen en una monocapa de MDCK, las glicoproteínas de los virus que geman por la cara apical y la basolateral se sulfatan (Compans y Pinter, 1975; Pinter y Compans, 1975). El sulfato se incorpora al entorno hidrocarbonado de las glicoproteínas por medio de enzimas que se localizan a nivel de membranas lisas, presumiblemente el complejo de Golgi (Young, 1973; Nakamura y Compans, 1977).

Dada la naturaleza polarizada del complejo de Golgi -- (Beams y Kessel, 1973; Whaley y Dauwalder, 1979; Morre, 1977) y su distribución asimétrica en diferentes tipos de células (Cajal, 1914; Kirkman y Severinghaus, 1938), éste parece idealmente diseñado para ser el sitio en que las proteínas de membrana sean distribuidas hacia uno u otro dominio. En este sentido es interesante mencionar la observación de Farquhar (1966) de que en leucocitos los gránulos azuró-

filos y neutrófilos maduran a partir de superficies opuestas del complejo de Golgi.

4) *Papel de las Uniones Estrechas y de las Interacciones Célula-Sustrato o Célula-Célula en la Polaridad.*

La localización estratégica de las uniones estrechas sugiere la posibilidad de que éstas jueguen un papel importante en el mantenimiento de la separación de los componentes apicales y basolaterales. Pisam y Ripoche (1976) han observado la redistribución de marcadores apicales en toda la superficie celular en células epiteliales disociadas. En apoyo a las observaciones de Pisam y Ripoche, Zio- meck y colaboradores (1980) encontraron que algunas enzimas del borde en cepillo (leucina-aminopeptidasa y fosfatasa al- calina) se localizan en toda la superficie celular cuando las células intestinales están aisladas.

En un intento por comprender la relación entre las uniones estrechas, la adhesión al sustrato y la polaridad epitelial, Rodríguez-Boulán y colaboradores (1983a) realizaron experimentos en los que células MDCK disociadas fueron infectadas con algunos virus con cubierta. Después de su colección con tripsina-EDTA, las células MDCK se cultivaron en suspensión durante una noche para permitir la resíntesis de proteínas de superficie. Los resultados obtenidos por -

este grupo pueden resumirse en los siguientes puntos:

- Las células aisladas en suspensión presentaron gemación viral en toda la superficie celular, indicando esto la pérdida de polaridad.
- Las células adheridas, aunque aisladas, presentaron una polaridad correcta en la gemación del VSV y el FLU.
- Los agrupamientos celulares en suspensión, sin interacción con sustrato, mostraron la polaridad correcta en la gemación de ambos virus.

Estos resultados claramente demuestran que la interacción de la superficie celular con el sustrato, así como con otras células juega un papel importante en el establecimiento de la polaridad epitelial.

Se ha especulado que la interacción con el sustrato resulta en el abastecimiento de un grupo de sitios de adhesión tales como los que se han descrito en algunas líneas celulares epiteliales y fibroblásticas (Damsky *et al.*, 1981; Knudsen *et al.*, 1981), y que este proceso es el que dispara la segregación de proteínas hacia uno u otro dominio. Sugrue y Hay (1981) han propuesto la existencia de receptores a colágeno en la superficie basolateral de células de epitelio de córnea. Sin embargo, Goldberg (1979) ha descrito la presencia de dichos receptores en fibroblastos, pero no en células epiteliales.

La monocapa confluyente de células MDCK, al igual que el epitelio intestinal, presenta una gran concentración de actina y actinina en las regiones cercanas a la unión estrecha, ésta en experimentos de localización con inmunofluorescencia aparece en forma de anillo (Louvard, 1980; Meza *et al.*, 1980) (Fig. 6A). Se ha propuesto (Ojakian, 1981; Martínez-Palomo *et al.*, 1980) que la incubación en un medio sin  $\text{Ca}^{+2}$  o en presencia de promotores de tumores provoca un aumento en la conductividad transepitelial debida al desensamblaje de las uniones estrechas. Meza y colaboradores (1980) encontraron que la incubación de la monocapa confluyente de MDCK en presencia de citocalasina B (pero no colchicina) provoca una caída de la RET (Fig. 6B), que se acompaña de la fragmentación del anillo de actina, siendo reversibles ambos procesos. Por otra parte, Ojakian (1981) observó el mismo efecto de la citocalasina B sobre la monocapa MDCK, pero en contraste a Meza y colaboradores (1980), observó un efecto inhibitorio significativo de la colchicina y vinblastina. En investigaciones recientes, Griep y colaboradores (1981) encontraron que la citocalasina B bloquea el desarrollo de la RET pero no disminuye la conductividad de las monocapas confluentes de células MDCK. A pesar de estos resultados contradictorios, los datos obtenidos en estudios inmunocitológicos, de ultraestructura y electrofisiológicos en

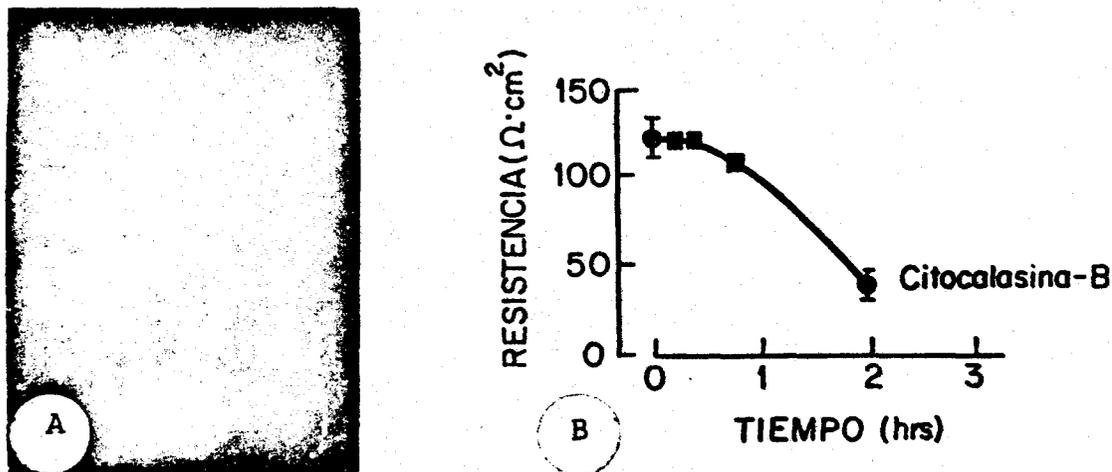


Figura 6A. Patrón de distribución de los microfilamentos de actina en la monocapa de células MDCK. Las células fueron tratadas con Tritón X-100, 0.5% en TGMC durante cinco minutos para permitir el paso de los anticuerpos específicos contra actina (primer anticuerpo) y anticuerpos fluoresceinados (segundo anticuerpo). Los microfilamentos aparecen como una red muy fina que se extiende hacia el borde de la célula y forma un anillo continuo a lo largo de la superficie lateral. Magnificación: 1300X. (Tomada de Cerejido *et al.*, 1980b).

Figura 6B. Efecto de la citocalasina B sobre la resistencia transepitelial de la monocapa de células MDCK. Las monocapas de células MDCK crecidas sobre discos de nylon recubiertos de colágeno, se colocaron entre dos cámaras de lucita (área expuesta:  $0.2 \text{ cm}^2$ ) y la resistencia se midió al pasar pulsos de corriente de  $20 \mu\text{A}$ . La resistencia del soporte y el medio fueron sustraídas. Los círculos llenos representan el promedio de más de cuatro monocapas; los cuadrados representan el promedio de dos a cuatro monocapas. La concentración de citocalasina B fue de  $5 \mu\text{g/ml}$ . La droga se agregó al tiempo 0.

Se observa una caída temporal de la resistencia transepitelial de manera que para la segunda hora de tratamiento con la droga, la resistencia ha disminuido el 80% aproximadamente. (Tomada de Meza *et al.*, 1980).

conjunto, sugieren que los microfilamentos de actina están involucrados en la formación de las uniones estrechas en -- las células epiteliales.

En relación al papel de la unión estrecha en el establecimiento de la polaridad epitelial, Hoi Sang y colaboradores (1980), utilizando algunas drogas que afectan la agregación de las células MDCK, como la citocalasina B, encontraron que la formación de la unión estrecha está muy relacionada al establecimiento de la polaridad en la distribución de partículas intramembranales (IMPs) en membrana luminal y basolateral. A diferencia de este grupo, Rodríguez-Boulán y colaboradores (1983a) han reportado que la formación de -- las uniones intercelulares no es esencial en el establecimiento de la polaridad, más aun, este autor propone que las uniones estrechas representan una consecuencia del establecimiento de la polaridad y de la interacción célula-célula, más que su causa.

Aún no se sabe por qué las uniones estrechas se localizan justamente en el límite entre las superficies epiteliales apical y lateral. Es factible que esta localización refleje la existencia de movimientos direccionales de material de membrana en la superficie de la célula epitelial. - Louvard (1980) ha mostrado que la aminopeptidasa puede ser internalizada en las células MDCK (una vez que las células

han sido tratadas con anticuerpos específicos) y posteriormente es reinsertada en la superficie, con la subsecuente redistribución en la superficie apical de la célula.

5) *Relación Entre los Cambios de Permeabilidad Iónica de Membrana y la Polaridad.*

Desde hace dos décadas se sabe que los virus producen cambios en la permeabilidad de las células animales que infectan (Klemperer, 1960). Existen en la literatura numerosas propuestas respecto a las alteraciones en los flujos de agua, iones, azúcares y aminoácidos que son provocadas por los virus (Hatanaka *et al.*, 1969; Isselbacher, 1972; Kalkar *et al.*, 1973; Weber, 1973; Venuta y Rubin, 1973; Fuchs y Gilberman, 1973; Negreanu *et al.*, 1974; Okada *et al.*, 1975; Pasternak y Micklem, 1973, 1974a, b; Imprain *et al.*, 1980). Más aun, se ha propuesto que a través de estos cambios en la permeabilidad, y las modificaciones en la composición iónica del citoplasma de la célula infectada, que resultan de dichos cambios, los virus pueden forzar la maquinaria de la célula a la síntesis exclusiva de componentes virales (Carrasco *et al.*, 1976, 1978, 1980; Fernández-Puentes, 1980).

Por otra parte, Tartakoff y Vasalli (1977, 1978) y Uchida -- (1978) han reportado que la secreción de inmunoglobulinas de célula

las plasmáticas, así como la de proteínas de fibroblastos y macrófagos se bloquea por el tratamiento de las células con concentraciones bajas de los ionóforos monensina y A23187.- Estudios de ultraestructura han mostrado que el tratamiento con monensina causa una rápida dilatación del complejo de Golgi y bloquea el transporte de las proteínas secretadas al espacio extracelular; el A23187 presenta efectos similares sobre el transporte intracelular. Estos antecedentes condujeron a Schlesinger (1980) por una parte, y a Kääriäinen (1980) a estudiar el efecto de estos ionóforos sobre la gemación viral. Ambos investigadores encontraron resultados similares: tanto el A23187 como la monensina, bloquean la gemación del VSV; sin embargo, ninguno inhibe la síntesis de la proteína G. Por otra parte, Alonso (1981) estudió los efectos del tratamiento con monensina en células infectadas con VSV o FLU, encontrando que el tratamiento inhibe la gemación del VSV, pero no la del FLU. Ya hemos mencionado que los estudios de Carrasco demuestran que la entrada de algunos virus a la célula huésped modifica la permeabilidad de membrana a  $\text{Na}^+$  y a  $\text{K}^+$ , y ésta es la responsable del apagamiento de síntesis de proteínas celulares, con la subsecuente síntesis preferencial de proteínas virales. Teniendo en cuenta estas dos líneas de investigación, es inevitable plantear la posibilidad de que sean los cambios de

permeabilidad a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  los responsables del efecto observado con los ionóforos, y que las modificaciones del aparato de Golgi no sean más que un efecto osmótico secundario. También es posible que la señal para la distribución asimétrica de las proteínas virales esté relacionada con los gradientes iónicos o de pH transcelulares o entre el citoplasma y algunos organelos o vesículas.

6) *Estudios de la Vía Intracelular de las Proteínas Apicales y Basolaterales.*

Tratando de conocer los mecanismos de polaridad, algunos grupos de investigación han optado por estudiar la trayectoria intracelular de uno u otro tipo de proteínas. Así, empleando el sistema modelo de las monocapas epiteliales viralmente infectadas, Rindler y colaboradores (1982), coinfectaron monocapas MDCK con virus de gemación polarizada opuesta, por medio de inmunoelectromicroscopía y criofractura localizaron simultáneamente la trayectoria intracelular de las glicoproteínas de cubierta viral de ambos virus. Los resultados parecen indicar que ambos tipos de proteínas comparten la misma vía intracelular hasta el complejo de Golgi. La trayectoria de estas proteínas post-Golgi es incierta; sin embargo, dada la gran cantidad de evidencia sobre la participación del aparato de Golgi en la distribución de algunas proteínas organelares (Farquhar, 1978;

Tartakoff, 1980) es factible que se generen diferentes vesículas por este organelo con la capacidad de reconocer la región apical o basolateral de la membrana plasmática, aunque esto por ahora es mera especulación.

Un enfoque diferente a este problema es el de Blobel y Dobberstein (1975), quienes han tratado de reconstruir *in vitro* pasos individuales en el trayecto intracelular de las proteínas, tales como la transferencia de las proteínas secretorias al lumen del retículo endoplásmico.

#### 7) Reversibilidad de la Polaridad Epitelial.

Una vez que la monocapa epitelial se ha formado -- ¿qué tan estable es ésta? ¿puede revertirse la polaridad? A este respecto Chambard y colaboradores (1981) y Mauchamp y colaboradores (1979) mostraron que las células epiteliales de tiroides pueden cambiar su polaridad de acuerdo a las -- condiciones del cultivo. Cuando se cultiva en concentraciones bajas de suero (0.5%), las células forman monocapas en cajas de Petri o estructuras císticas cuando se les cultiva en suspensión; estos quistes o vesículas presentan una -- orientación opuesta a la que se observa en el epitelio foliular natural; esto es, la superficie apical (con las uniones estrechas) da hacia el medio externo. El complejo de Golgi se localiza entre el núcleo y la superficie apical. -

~~Además, si otros tipos de células epiteliales mostraran una~~

La adición de estimulantes de la tiroides, o la incrustación en un gel de colágeno hace que las células se reorienten y formen folículos con la misma polaridad que presentan en el epitelio natural. Aún no está claro, sin embargo, si otros tipos de células epiteliales muestran esta capacidad de revertir su polaridad. Ni siquiera las células de tiroides *in vivo* muestran dicha capacidad (Gillman, 1979).

Sin embargo, algunos organelos citoplásmicos pueden cambiar su posición sin invertir los rasgos de la polaridad superficial. Por ejemplo, durante dos períodos distintos en el desarrollo del epitelio de córnea de pollo, los que se relacionan con el depósito de matriz extracelular por debajo del epitelio, el complejo de Golgi cambia su posición de supra a infranuclear en la monocapa celular basal (Hay y Revel, 1969; Trelstad, 1970). Similarmente, los ameloblastos excretan esmalte de su polo basal, sólo cuando el complejo de Golgi ha cambiado de su posición apical a la basal (Beams y King, 1933). Los centriolos junto con los microtúbulos asociados a ellos cambian su posición intracelular junto con el complejo de Golgi (Trelstad, 1970).

#### OBJETIVOS DE ESTA TESIS.

Hemos mencionado a lo largo de esta Introducción que las membranas epiteliales se caracterizan por su capacidad de generar gradientes de concentración de nutrientes y electrolitos entre el medio externo y el interno corporal. Esta capacidad tiene una base molecular en la distribución - asimétrica de enzimas y sistemas de transporte en los dos dominios de membrana de la célula epitelial: apical, que se relaciona con el medio externo, y basolateral, continuo con el medio interno y la sangre, y por consiguiente sujeto a modulación por medio de hormonas y otros factores reguladores. Además, tiene una base estructural en la presencia de las uniones estrechas.

El establecimiento de líneas celulares epiteliales -- que preservan en cultivo la polaridad y las uniones estrechas de los epitelios naturales ha permitido grandes avances en el estudio de estos tejidos. Más aun, el hallazgo de un sistema modelo para el estudio de las proteínas integrales de membrana epitelial, que involucra la infección - con RNA-virus con cubierta de algunas líneas celulares epiteliales, ha abierto la puerta al estudio de la polaridad epitelial con un enfoque biológico celular.

A fin de contribuir al esclarecimiento del fenómeno - de distribución polarizada de proteínas en la membrana de

las células epiteliales, empleando el sistema modelo de las células MDCK infectadas con VSV (Virus de la Estomatitis Vesicular) o con FLU (Virus de la Influenza), nos propusimos los siguientes:

1) *Objetivos.*

- a. Determinar si la entrada y/o salida de los RNA-Virus modifica la permeabilidad de la membrana -- plasmática de las células MDCK.
- b. Determinar si el VSV, que gema por la cara basolateral de las células MDCK, altera específicamente a los sistemas de transporte polarizados que se localizan en este dominio ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$ ).
- c. Determinar si el FLU, que gema por la cara apical de las células MDCK, altera específicamente a los sistemas de transporte polarizados que se localizan en este dominio (Canal de  $\text{Na}^+$ ).
- d. Determinar si los microfilamentos están directamente involucrados en la gemación asimétrica de los RNA-virus.

e. Determinar si las uniones estrechas están directamente involucradas en la gemación asimétrica de los RNA-virus.

## 2) Justificación.

### a. ¿Por qué estudiar la permeabilidad celular?

Ya hemos mencionado que algunos virus producen cambios en la permeabilidad de las células que infectan --- (Klemperer, 1960), incluso hay bastante información acerca de las alteraciones específicas que producen estos virus en los flujos de algunos compuestos (Hatanaka *et al.*, 1969; Isselbacher, 1972; Kalkar *et al.*, 1973; Weber, 1973; Venuta y Rubin, 1973; Fuchs y Gilberman, 1973; Negreanu *et al.*, 1974; Okada *et al.*, 1975; Pasternak y Micklem, 1973, 1974a, b; Imprain *et al.*, 1980). Se ha propuesto que a través de estos cambios en permeabilidad y las consiguientes modificaciones de la composición iónica del citoplasma, los virus pueden forzar la maquinaria celular a la síntesis exclusiva de componentes virales (Carrasco *et al.*, 1976, 197, 1980; Fernández-Puentes, 1980). Por otra parte, algunos autores han descrito que la secreción de algunas proteínas, como inmunoglobulinas o glicoproteínas virales, se ve bloqueada por el -- tratamiento con ionóforos como la monensina y el A23187 (Tartakoff y Vasalli 1977, 1978; y Uchida, 1979; Johnson y ---

Schlesinger, 1980; Kääriäinen *et al.*, 1980). Estos datos - en conjunto hacen pensar en la posibilidad de que la distribución asimétrica de las proteínas de membrana (en nuestro modelo proteínas virales) esté dirigida por gradientes iónicos transmembranales. Asimismo, en la célula infectada se producen cantidades masivas de proteínas de cubierta viral que al insertarse en un dominio específico de la membrana celular forman múltiples parches de los que están excluidas las proteínas propias de la membrana celular, esta constricción creciente de los sistemas de transporte necesariamente debe perturbar los flujos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Esta alteración debería ser particularmente marcada en la región de la membrana por donde está gemando el virus.

Para llevar a cabo el objetivo (a) se examinaron los siguientes puntos: la formación de ampollas, resistencia -- transepitelial de la monocapa, el potencial y la resistencia eléctrica a través de membrana en monocapas de células MDCK infectadas con FLU (un virus que gema por la membrana apical de estas células) o VSV (un virus que gema por la -- membrana basolateral de las células MDCK). Si estos virus modificaran la permeabilidad celular, estos estudios en conjunto nos permitirían determinar si los efectos observados se deben a cambios de permeabilidad en la membrana celular o a la capacidad de sellado de las uniones estrechas.

b. ¿Por qué estudiar las permeabilidades específicas a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en las células infectadas con FLU o con VSV?

En túbulo distal de riñón de mamífero, la membrana luminal (apical) de una célula epitelial es muy permeable al  $\text{Na}^+$  y muy poco permeable al  $\text{K}^+$ , en tanto que la contraluminal (basolateral) tiene una alta permeabilidad al  $\text{K}^+$  y es impermeable al  $\text{Na}^+$ ; en esta membrana existe un mecanismo de transporte activo que extruye iones  $\text{Na}^+$  de las células, intercambiándolos por iones  $\text{K}^+$ ; en cambio, la membrana luminal carece de bombas (Koefoed-Johnsen y Ussing, 1958). La línea celular MDCK tiene estas mismas propiedades, es decir, que los mecanismos de transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  están distribuidos asimétricamente en la membrana plasmática de estas células (Cereijido *et al.*, 1980a). Esto nos hizo preguntarnos si el FLU, que gema por membrana apical en las células MDCK, modifica exclusivamente la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  (ya que el canal de  $\text{Na}^+$  se localiza justamente en esa membrana) y el VSV, que gema por la membrana basolateral modifica exclusivamente la permeabilidad al  $\text{K}^+$  (puesto que la bomba de  $\text{K}^+$  se localiza específicamente en dicha membrana). Sería posible, pensamos, que al modificarse específicamente la permeabilidad a uno de estos iones por la infección con un virus de gemación apical o uno de gemación basolateral, dicho cambio fuera el "distintivo" que trajera como consecuencia

la inserción de las proteínas virales asimétricamente en la membrana. Además es interesante analizar si la inserción de una proteína viral en un determinado dominio constriñe a los componentes ya presentes en éste, de tal manera que su funcionamiento se vea alterado.

Para llevar a cabo los objetivos (b) y (c), examinamos los flujos unidireccionales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en monocapas de células MDCK infectadas con FLU o VSV, una hora después de la infección y cinco horas postinfección (tiempo en el que la gemación de estos virus se lleva a cabo).

c. ¿Por qué estudiar el papel de los microfilamentos en la gemación basolateral del VSV?

El citoesqueleto, en particular el sistema de microtúbulos/microfilamentos parece ser responsable de un gran número de fenómenos de superficie celular asociados con la distribución topográfica de los componentes de membrana (Nicolson, 1976). Así lo prueban los hallazgos de varios autores: Albertini y Clark (1975) encontraron que existe una relación entre microtúbulos y receptores de superficie a concaivalina A en cultivos primarios de células de granulosa de ovario de conejo; Gabbiani (1977) demostró que la unión de concaivalina A a la superficie de células neoplásicas y embrionarias produce disociación de los filamentos de actina y que los receptores de concaivalina A se acumulan al -

igual que la actina en un polo de la célula; Koch (1978) -- evidenció que una exoproteína, el antígeno H-2 de histocompatibilidad, está asociada a actina. Algunos autores han sugerido también que los microfilamentos son necesarios en el ensamblaje o gemación de los virus con envoltura; en apoyo a esto, Damsky y colaboradores (1977) y Wang y colaboradores (1977), han encontrado actina asociada al virus del tumor mamario de ratón. Sin embargo, Griffin y Compans (1979) encontraron que la citocalasina B no perjudica el ensamblaje de las proteínas del virus de la influenza. Por último, Lenk y colaboradores (1977) y Lenk y Penman (1979), han descrito que la mayoría de los polisomas activos, estructuras en las que se sintetizan las proteínas, se encuentran asociados a microfilamentos. Toda esta información hace pensar que los microfilamentos pueden jugar un papel importante en la ubicación asimétrica de las proteínas integrales en la membrana plasmática de las células epiteliales.

Para cumplir con el objetivo (d) examinamos si la gemación asimétrica del VSV en las células MDCK se modificaba cuando las células eran tratadas con una droga que inhibe la polimerización de la actina, la citocalasina B.

las MDCK, como la citocalasina B, encontraron que la forma

d. ¿Por qué estudiar el papel de la unión estrecha en la gemación asimétrica del VSV?

El papel de la unión estrecha en el establecimiento de la polaridad epitelial ya ha sido estudiada por varios grupos de trabajo; sin embargo, los datos que se han descrito son contradictorios: Hoi Sang y colaboradores (1980), utilizando algunas drogas que afectan la agregación de las células MDCK, como la citocalasina B, encontraron que la formación de la unión estrecha está muy relacionada al establecimiento de la polaridad en la distribución de partículas intramembranales (IMPs) en membrana luminal y contraluminal. A diferencia de este grupo, Rodríguez-Boulán y colaboradores (1983a) han descrito que la presencia de uniones estrechas íntegras no es esencial para la expresión de la polaridad epitelial. Aún no se sabe por qué las uniones estrechas se localizan justamente en el límite entre las superficies apical y lateral, nos preguntamos si la unión estrecha es la responsable del mantenimiento de la polaridad epitelial.

Para cumplir con el último objetivo (e), analizamos si la gemación basolateral del VSV en las células MDCK se altera por el tratamiento con una droga que abre las uniones estrechas, el EGTA.

## CAPÍTULO II: MÉTODOS.

CULTIVO CELULAR. ....	56
1) Cultivo Masivo de Células MDCK. ....	56
2) La Monocapa de Células MDCK Desarrollada Sobre un Soporte Permeable y Translúcido. ....	56
3) La Monocapa Desarrollada Sobre un Soporte No Permeable. ....	58
4) Cultivo de Células Vero. ....	61
CULTIVO VIRAL. ....	61
1) Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV). ....	61
2) Virus de la Influenza (FLU). ....	62
3) Titulación de Virus. ....	63
INFECCION VIRAL. ....	68
LOCALIZACION DE PROTEINAS DE SUPERFICIE POR INMUNOFLOURESCENCIA. ....	68
1) Tratamiento y Tinción de la Monocapa. ....	68
2) Microscopía y Fotografía de las Monocapas Teñidas. ....	70
MEDICIONES ELECTRICAS. ....	71
1) Medición de la Resistencia Transepitelial de la Monocapa Infeccionada. ....	71
2) Medición de las Propiedades Eléctricas Intracelulares con Microelectrodos. ....	73
MEDICION DE FLUJOS IONICOS EN MONOCAPAS INFECCIONADAS. ..	75
1) Estudio del Eflujo de $Na^+$ . ....	76
2) Estudio del Influjo de $K^+$ . ....	82

ANALISIS DE LAS AMPOLLAS Y EL CONTENIDO IONICO EN MONOCAPAS INFECTADAS. ....	86
1) <i>Análisis de las Ampollas.</i> ....	86
2) <i>Estudio del Contenido Iónico en Monocapas Infectadas a la Quinta Hora Postinfección.</i> ....	87
3) <i>Análisis de Resultados.</i> ....	87
ESTADISTICA. ....	88
MEDIOS Y SOLUCIONES. ....	89
1) <i>Para Cultivo Celular y en General.</i> ....	89
2) <i>Para Cultivo y Titulación Viral.</i> ....	89
3) <i>Para Mediciones con Isótopos.</i> ....	89

CULTIVO CELULAR.

1) *Cultivo Masivo de Células MDCK.*

La línea celular MDCK que se utiliza fue obtenida inicialmente de la American Type Culture Collection (MDCK, CCL-34, Madin & Darby, 1958). En la mayoría de los experimentos las células se encontraban entre los pasajes 75-79. Las células se hicieron crecer a 37°C en 100 ml de Medio -- Esencial Mínimo Completo de Eagle (DMEM) con sales de Dulbecco, suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomocina, 1 U/ml de insulina y 10% de suero de ternera (CDMEM) en botellas roladoras de 490 cm<sup>2</sup> (Corning Tissue Culture Roller Flask 25130) en una atmósfera de aire 5% CO<sub>2</sub>. Se colectaron con tripsina-EDTA y el medio conteniendo las células de la monocapa se centrifugó a 500 g durante 1-2 minutos; la pastilla (las células) se resuspendió en CDMEM -- hasta la densidad deseada y se contaron en una cámara de -- Neubauer. A menos que se indique lo contrario, las células fueron sembradas a confluencia.

2) *La Monocapa de Células MDCK Desarrollada Sobre un Soporte Permeable y Translúcido.*

a. Preparación del Soporte.- Se cortan discos de -- 1 a 1.4 cm de diámetro de una tela de nylon con una abertura de 103 µm. Estos discos se lavan sonicándolos primera--

mente en acetona durante 5-10 minutos y colocándolos después en agua destilada en ebullición 5 minutos; se dejan en etanol al 96% antes de ser recubiertos con colágeno, durante 40 minutos. El colágeno se prepara según una modificación del método de Bornstein (1973), brevemente, los tendones de la cola de rata se disectan, se enjuagan en una solución salina, se cortan en pedazos y se dejan disolver en solución de ácido acético al 2% a 4°C. La solución de colágeno se centrifuga a 2 000 g durante una hora para retirar el material insoluble. El sobrenadante se dializa contra agua destilada a 4°C y se diluye a preparar una solución de concentración aproximada de 5-10 mg/ml. La solución de colágeno así preparada puede guardarse en el refrigerador a 4°C - hasta tres meses. Los discos se barnizan con esta solución de colágeno, se exponen a vapores de amonio por 4 minutos y se colocan en una solución de glutaraldehído al 4% durante 1-3 horas, lo que promueve el entrecruzamiento de las fibras. Después de lavar enérgicamente en solución salina -- (PBS) estéril, los discos se esterilizan por exposición a U.V. durante 1.5-3 horas y se almacenan en solución salina a 4°C hasta que se necesiten.

Estos discos son permeables, flexibles y translúcidos, lo que facilita el manejo y montaje de la preparación para estudios eléctricos y mediciones de flujos, y para seguir -

la formación de la monocapa celular por microscopía de fase para determinar su continuidad, además de que permite la -- inyección de corriente eléctrica para el estudio de la re-- sistencia membranal (Fig. 7).

b. Desarrollo de la Monocapa Sobre este Soporte.- Cada disco se colocó en un pozo de 16 mm de diámetro de una multicámara de plástico de 24 pozos (Limbro Chemical, New Haven, Conn., USA). A cada disco en cada pozo se adicionó 1 ml de una suspensión de células MDCK en CDMEM a una densidad aproximada de  $2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. Después de incubar durante 90 minutos a 37°C en una atmósfera de aire-5% CO<sub>2</sub>, -- con humedad constante para permitir la adhesión de las células al soporte, los discos entonces se transfirieron a otra multicámara conteniendo CDMEM fresco.

### 3) *La Monocapa Desarrollada Sobre un Soporte No Permeable.*

a. La Monocapa Desarrollada Sobre un Soporte de Vidrio.- Para los experimentos de inmunofluorescencia, las células ya en suspensión a la densidad deseada, colectadas como se indicó anteriormente (Pág. 56), se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro (Propper, Bloomfield, N.J.) que habían sido previamente esterilizados en el autoclave. Para el o, los cubreobjetos estériles se colocaron cada uno en un pozo de una multicámara de 24. A ca-

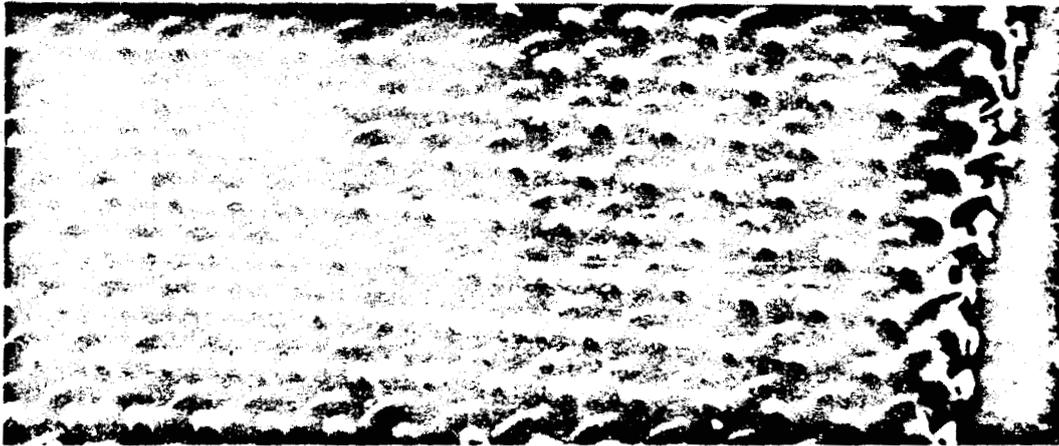


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido de un disco de nylon cubierto por colágeno del tipo utilizado como soporte sólido para las monocapas de células en cultivo. La malla tiene ventanas cuadradas de  $105 \mu$  por lado. Magnificación 46X.  
(Cortesía del Dr. Marcelino Cereijido).

da pozo se agregó 1 ml de la suspensión de células y se incubó la multicámara a 37°C en una atmósfera de aire-5% CO<sub>2</sub> con humedad constante durante 90 minutos. Pasado este tiempo, los cubreobjetos se transfirieron a otra multicámara -- con CDMEM fresco, con objeto de que las células que no se habían adherido quedaran en la primera, la cual se desecha.

Para los experimentos de mediciones eléctricas con microelectrodos, las células se crecieron sobre cubreobjetos de vidrio estériles recubiertos de colágeno, tal como se -- describió para los discos de nylon (Pág. 56) con el fin de que al penetrar en las células el microelectrodo, éste no -- se rompiera si acaso tocara la superficie del soporte.

b.- La Monocapa Desarrollada Sobre un Soporte de Plástico.- Los experimentos de flujos de iones con radioisótopos se realizaron con monocapas desarrolladas en cajas de -- Petri de plástico de 35 mm de diámetro (Limbro Chemical, -- New Haven, Conn., USA). Los de análisis de contenido iónico en multicámaras de 24 pozos (Limbro Chemical, New Haven, Conn., USA) y el análisis de la formación de ampollas en monocapas infectadas en multicámaras de 96 pozos con fondo -- plano (Limbro Chemical, New Haven, Conn., USA). En todos es -- tos casos, las células en suspensión a la densidad deseada (10<sup>5</sup> cel/cm<sup>2</sup>) se dejaron adherir al soporte durante 90 minutos, pasado este tiempo, se retiró el medio y se sustituyó por medio fresco.

4) *Cultivo de Células Vero.*

La línea celular Vero (African Green Monkey Kidney Cells) fue obtenida de la American Type Culture Collection (Vero, ATCC, CCL 81), se utilizó tanto en la producción como en la titulación por ensayo de placa del virus de la Estomatitis Vesicular (VSV). Aunque dicho virus se desarrolla bien en las células MDCK, la infectividad del VSV en las células Vero es mayor, por lo que se utilizaron éstas. Estas células se cultivan y cosechan de la misma forma descrita para las MDCK (Pág. 56).

CULTIVO VIRAL.

Toda manipulación viral se llevó a cabo bajo las condiciones normales de esterilidad usuales para el cultivo de tejidos. El material contaminado desechado se colocó en recipientes separados y fue autoclaveado. (Los virus fueron inicialmente proporcionados por el Dr. E. Rodríguez-Boulán, Department of Pathology, State University of New York, Brooklyn, New York).

1) *Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV).*

Monocapas confluentes de células Vero crecidas en botellas Falcon de plástico de 75 cm<sup>2</sup> (T-75) o 150 cm<sup>2</sup>

(T-150) se inocularon con VSV suspendido en 2 ml (T-75) o en 5 ml (T-150) de DMEM conteniendo 2% de suero fetal de ternera (FCS) (GIBCO G-29), a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.01-0.1 unidades formadoras de placa/célula (PFU/CEL). Las botellas así inoculadas se incuban a 37°C una hora, durante este tiempo de incubación se agitan ligeramente cada 15 minutos, maximizando así la adsorción viral a la monocapa. En las botellas inoculadas se reemplaza entonces el medio por DMEM-2% FCS fresco (10 ml para la botella T-75 y 20 ml para la T-150) y los cultivos se incuban nuevamente hasta que el efecto citopático viral inducido es máximo (por lo general a las 24-36 horas). El medio se colecta, retirando los restos celulares por centrifugación a 2 000 rpm durante 15 minutos en una centrífuga clínica, la suspensión viral se fracciona en alícuotas de 50 a 100 µl, las que se almacenan a -70°C. Posteriormente, se determina el título viral por ensayo de placa, previa descongelación de una alícuota del virus almacenado.

## 2) *Virus de la Influenza (FLU).*

El procedimiento es esencialmente igual al descrito para el VSV, excepto por el uso de células MDCK, que sostienen el crecimiento de este virus mucho mejor que las células Vero, y por la sustitución de albúmina sérica bovina --

(BSA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) al 0.2% en DMEM, en lugar del FCS en el medio de inoculación e incubación.

### 3) *Titulación de Virus.*

a. Hemaglutinación.- El virus de la influenza, dado que posee una hemaglutinina, puede ser titulado por el ensayo de hemaglutinación, el cual aunque no es tan cuantitativo como los ensayos de infectividad, provee una estimación rápida de la cantidad de la producción viral.

Para llevar a cabo este ensayo, se empleó sangre humana tipo "O" Rh+. Los eritrocitos se preparan agregando a la sangre extraída citrato de Na al 3.8% (previamente filtrado: una parte por cada nueve de sangre), lavándolos tres veces con amortiguador de fosfato salino (PBS) (GIBCO K-13), centrifugando cada vez durante 15 minutos a 500 rpm. Al término de los lavados, los eritrocitos se suspenden al 2% en PBS a 4°C. Por otra parte, se preparan por duplicado diluciones seriales 1:2 de la muestra viral en PBS a 4°C en una multicámara de 96 pozos con fondo en "U" (Limbro Chemical Co., New Haven, Conn.), utilizando 50 µl/pozo, dejando sin virus el primer pozo como control. A cada pozo se agregan 50 µl de la suspensión de eritrocitos y la multicámara se incuba a 4°C durante 90 minutos. El título de hemaglutinación es la dilución viral más alta que da hemaglutinación -

positiva; los pozos con hemaglutinación positiva aparecen homogéneamente rosados y los negativos presentan un botón característico en el fondo (Fig. 8).

El título de hemaglutinación se expresa como unidades hemaglutinantes/ml (HAU/ml) al multiplicar el inverso de la dilución positiva más alta por el factor volumétrico 20 (1 000  $\mu$ l/50  $\mu$ l). Las monocapas MDCK infectadas con FLU dieron por lo general, títulos por arriba de 1:256 (5 120 HAU/ml); cuando la muestra viral daba este título, se hacía un ensayo de placa; si era menor, se le descartaba.

b. Ensayo de Placa. Este ensayo se lleva a cabo sobre monocapas de células MDCK en el caso de la titulación de virus de la influenza, o sobre monocapas de células Vero para titular VSV crecidas sobre cajas de Petri de 60 mm de diámetro (Limbro Chemical Co., New Haven, Conn.). Se preparan diluciones 1:10 de la muestra viral hasta la de  $10^{-8}$  en DMEM suplementado con 2% FCS y 100  $\mu$ g/ml DEAE-Dextrán (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo.) (si se titula VSV) o 0.2% BSA (FLU) y se inoculan las monocapas (por duplicado) con 0.4 ml de cada dilución ( $10^{-4}$  en  $10^{-6}$  es un rango adecuado, aunque, desde luego, depende de la cantidad de virus). Las monocapas se incuban con el inóculo durante una hora a 37°C con ligera agitación cada 15 minutos. Al término de la incubación, a cada monocapa se agregan 5 ml de DMEM-Agar 1% -

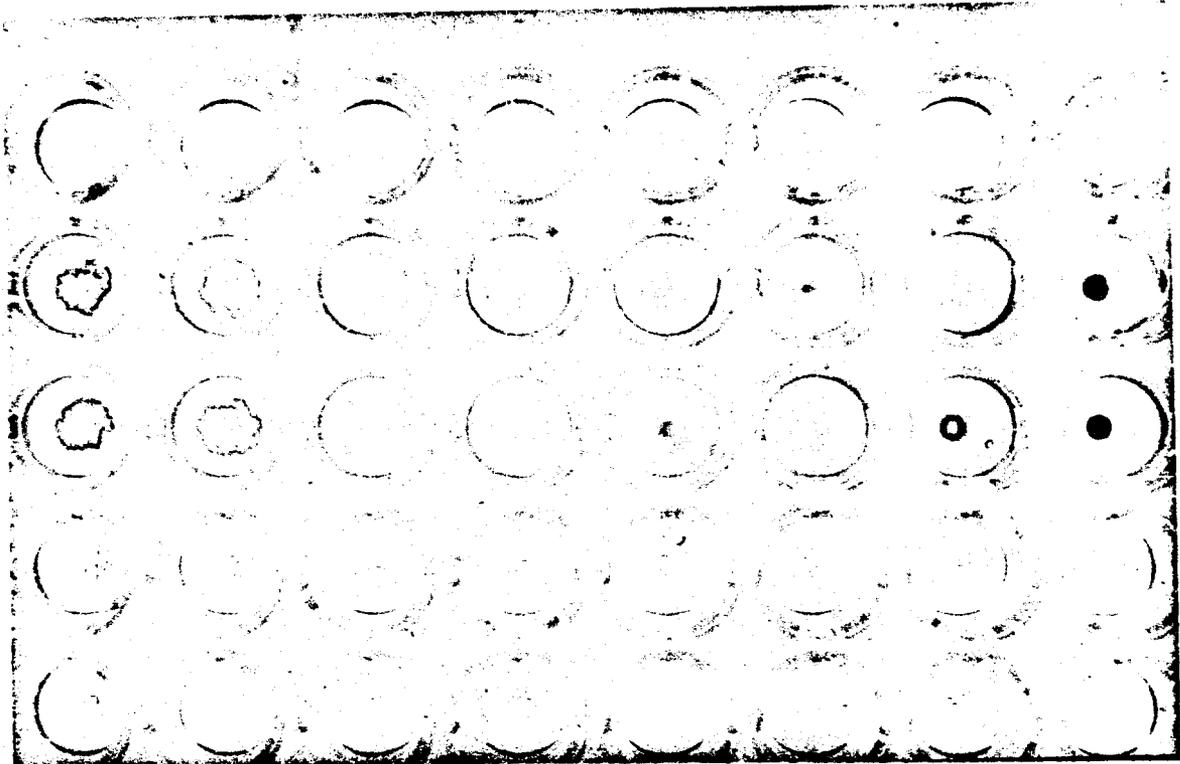


Figura 8. Titulación del virus de la influenza por hemaglutinación. La titulación se muestra por duplicado. En doce pozos se ponen diluciones progresivas del virus a titular y se observa hasta qué dilución hubo hemaglutinación. Puede verse que en el octavo pozo (dilución 1:256) aún no se observa el botón característico de la ausencia de hemaglutinación, mismo botón que se observa en el siguiente pozo. El título fue de 5120 HAU/ml, este valor hace recomendable el ensayo de placa de este caso.

(Noble Agar, Difco Laboratories, Detroit, Michigan) suplementado con 2% de suero fetal de ternera en el caso del VSV y DMEM-Agar 1% suplementado con 10 µg/ml de tripsina (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo.) y 100 µg/ml de DEAE-Dextrán en el caso del virus de la influenza. El agar se deja solidificar a temperatura ambiente (en el interior de la campana para evitar contaminación) y entonces las cajas se invierten sobre una charola y se incuban a 37°C. Dos días después, por lo general, las placas se han formado en uno u otro caso (VSV o FLU). Las monocapas se fijan con formaldehído -- 3.7% + NaCl 0.8% en PBS, durante 10 a 15 minutos y el agar se desprende cuidadosamente con una espátula para teñir las monocapas con violeta cristal (Merck) al 1% en etanol al 20%. Las placas se cuentan en la dilución viral que da de 20 a 100 placas por caja de Petri; este número, multiplicado por 2.5 (factor volumétrico que resulta de 1 ml/0.4 ml), y por la dilución se da el título viral en unidades formadoras de placa/ml (PFU/ml). Por ejemplo, si al titular VSV, en la dilución  $10^{-6}$  (por duplicado) se contaron 69 y 71 placas, se habría obtenido un título de  $1.7 \times 10^8$  PFU/ml (Fig. 9).

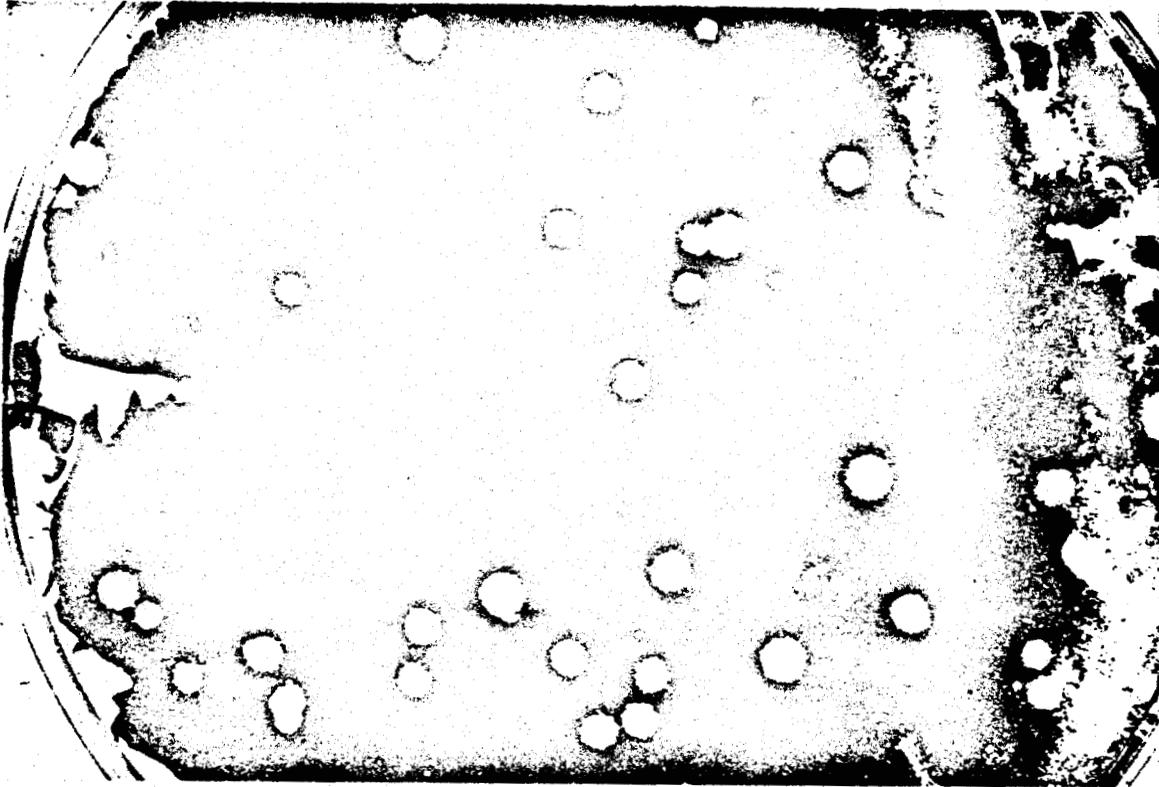


Figura 9. Ensayo de placa del VSV. La infectividad del VSV se tituló --  
en monocapas de células VERO. Se muestra el ensayo a los --  
dos días de infección con una dilución  $10^{-5}$ . Las células se fijaron --  
con formaldehído 3.7% y tiñeron con violeta cristal. Se contaron 57 --  
placas, lo que corresponde a un título de  $1.4 \times 10^7$  PFU/ml.

#### INFECCION VIRAL.

Las monocapas confluentes de células MDCK se inoculan con una MOI de 10 a 20 PFU/cel durante 1 hora a 37°C, en -- DMEM conteniendo 100 µg/ml de DEAE-Dextrán (VSV) o simple-- mente DMEM (FLU). Se utiliza el volumen mínimo para cubrir la monocapa (0.05, 0.2 ó 0.4 ml, respectivamente, para po-- zos de 7 mm, 15 mm y cajas de 35 mm de diámetro). La adi-- ción de DEAE-Dextrán aumenta la infectividad del VSV en las células MDCK (por lo general de 10 a 100 veces más bajo que en las células Vero) a niveles ligeramente inferiores (2 a 5 veces) que los obtenidos en células Vero. Después de la inoculación, se reemplazó el inóculo por DMEM con 2% FCS -- (VSV), o por DMEM con 0.2% BSA (FLU). En cualquiera de los casos, las monocapas permanecieron con estos medios a 37°C el tiempo especificado en cada experimento.

#### LOCALIZACION DE PROTEINAS DE SUPERFICIE POR INMUNOFLUORESCENCIA.

##### *1) Tratamiento y Tinción de la Monocapa.*

Las células MDCK fueron sembradas sobre cubreobje-- tos de vidrio de 12 mm de diámetro (previamente esteriliza-- dos) colocados en los pozos de una multicámara de 24, a una densidad de  $10^5$  células/cm<sup>2</sup>. A los 2 ó 3 días de sembradas

las células se infectó con VSV a una MOI de 10 PFU/cel (Ver Infección Viral, pág. 68). La monocapa se mantuvo en 1 ml de medio (DMEM + FCS 2%) con citocalasina B (Sigma) 5 µg/ml a 37°C durante 1, 1.5 ó 2 horas. Justo antes de ser fijada, la monocapa se lavó dos veces con PBS-Ca y se incubó con 1 ml de EGTA 2 mM en PBS durante tres minutos a temperatura ambiente, con el fin de hacer accesibles a los anticuerpos aquellas proteínas localizadas en la superficie basolateral. Pasados los tres minutos de incubación, la monocapa se lavó nuevamente dos veces en PBS-Ca y se fijó inmediatamente con 1 ml de formaldehído 3.7% en PBS-Ca a 4°C durante 10 minutos. Una vez fijadas, las monocapas fueron trasladadas cuidadosamente con unas pinzas a otra multicámara que tenía 1 ml de PBS-Ca/pozo, donde permanecieron durante una noche en refrigeración a 4°C. Al día siguiente, las monocapas se lavaron tres veces con PBS-Ca frío y se incubaron con NH<sub>4</sub>Cl - 50 mM en PBS, durante 10 minutos, con el fin de disminuir los grupos aldehído que hubiesen quedado libres. Las monocapas se lavaron entonces con PBS-Ca conteniendo 0.2% gelatina (PBS-Ca G) a 4°C, dos veces, durante cinco minutos cada vez. Los cubreobjetos se colocaron invertidos, es decir, quedando la monocapa en contacto con 50 µl del primer anticuerpo (Sheep anti VSV) (Este anticuerpo fue proporcionado amablemente por el Dr. Enrique Rodríguez-Boulán, Department

of Pathology, State University of New York, Brooklyn, N.Y.) a una concentración de 50 a 100  $\mu\text{g/ml}$  en PBS-Ca G. Se utilizó IgG normal de carnero para las muestras control. Las monocapas se incubaron con el respectivo anticuerpo durante 30 a 45 minutos a temperatura ambiente en ambiente húmedo. Los cubreobjetos se pusieron nuevamente en una multicámara y se lavaron con PBS-Ca G cuatro veces durante cinco minutos. Las monocapas se incubaron entonces con el segundo anticuerpo (Rabbit anti Sheep, fluoresceinado) (Cappel Laboratories, Cochranville, Pa.) diluido 1:25-1:50, como se describió para el primer anticuerpo. A partir de este momento, en adelante se evitó la exposición de las monocapas a la luz. Las monocapas se lavaron con PBS-Ca G cuatro veces durante cinco minutos y una vez con PBS. Por último, cada cubreobjeto fue tomado cuidadosamente con las pinzas y sumergido varias veces en agua destilada y se montó en glicerol-PBS 9:1. Las preparaciones se sellaron con barniz de uñas y se les dejó a 4°C hasta su observación al día siguiente en el microscopio de fluorescencia.

## 2) *Microscopía y Fotografía de las Monocapas Teñidas.*

Las monocapas fueron observadas en un microscopio Zeiss de fluorescencia, bajo luz U.V., con el objetivo de inmersión 63/1.4, utilizando un filtro para epifluorescen-

cia (490-520 nm). Las imágenes observadas en el microscopio fueron grabadas con una cámara de video (MIT Silicon -- Image Intensified Video Camera), conectada a un monitor de televisión (Ikegami Bol W Monitor TV Set) y a una video grabadora (Panasonic Video Recorder, Mod. 8030) (Fig. 10).

Las fotografías fueron tomadas de la pantalla del televisor con una cámara polaroid (CU-5 Land Camera Polaroid -- Corp. Cambridge, Mass.).

#### MEDICIONES ELECTRICAS.

##### 1) *Medición de la Resistencia Transepitelial de la Monocapa Infectada.*

El disco recubierto de colágeno sobre el que se desarrolló la monocapa se coloca como una hoja entre dos cámaras de lucita (con un volumen de 1 ml cada una), siendo el área expuesta de  $0.229 \text{ cm}^2$ . La diferencia de potencial eléctrico entre las dos cámaras se midió con electrodos de  $\text{Ag/AgCl}_2$ , los cuales estaban conectados a un electrómetro (Keithley 6008, Keithley Instruments Inc., Cleveland, Ohio). En estos experimentos la solución en ambas cámaras fue --- CDMEM; la diferencia de potencial entre los electrodos antes de iniciar el experimento era siempre = 0.2 mV, esto se checó rutinariamente, sumergiendo ambos electrodos en una misma cámara a una distancia uno de otro igual a la que se

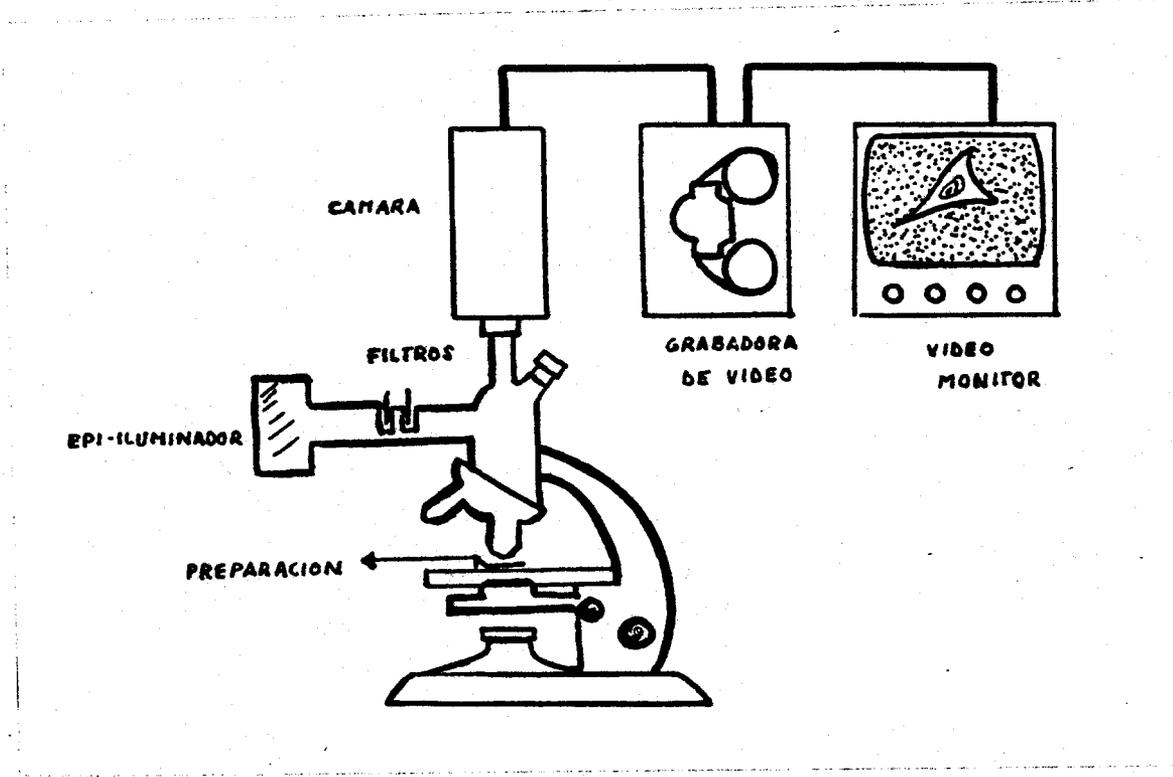


Figura 10. Disposición y conexiones del equipo para las observaciones de inmunofluorescencia.

encontraban en las cámaras de lucita. Se grabó la deflexión de voltaje producida por el paso de una corriente de  $20 \mu\text{A cm}^{-2}$ . En todos los valores de resistencia calculados se substrajo la contribución de los electrodos, la solución y el disco recubierto de colágeno sin la monocapa.

La resistencia se calculó a partir de la Ley de Ohm, - siendo conocidos el potencial transepitelial (V) y la corriente aplicada (I):

$$R = V/I \cdot A$$

donde:

R = resistencia transepitelial (RET)

A = área expuesta

## 2) *Medición de las Propiedades Eléctricas Intracelulares con Microelectrodos.*

Las mediciones con microelectrodos se llevaron a cabo en monocapas desarrolladas sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos de colágeno a la luz de un microscopio de con--traste de fases (Leitz). Las mediciones se hicieron con monocapas infectadas con VSV o FLU una hora postinfección y - cinco horas postinfección. La solución que bañaba a las células era DMEM. Los experimentos se llevaron a cabo a  $37^{\circ}\text{C}$ ; la temperatura del baño se controló electrónicamente y se - monitoreó con una termocopla (YSI Telethermometer) colocada

cerca del cubreobjetos. Para evitar la evaporación, el medio fue cubierto con una fina capa de aceite (Cannon Instruments, Co.). Los microelectrodos fueron fabricados en un estirador de dos etapas (Brown Flaming, Sutter Instruments, Co.) con tubos capilares de fibra de vidrio de borosilicato (Hilgenberg, OD 1.0 mm; ID 0.5 mm), éstos fueron llenados con KCl 3 M o acetato de potasio 4 M. En la mayoría de los casos se utilizaron microelectrodos con resistencia de 100 a 150 M $\Omega$ , los cuales daban penetraciones estables y mostraban poca rectificación con las corrientes que se utilizaron (<0.5  $\mu$ A). Los microelectrodos se conectaron a amplificadores de alta impedancia (WPI KS 700), los cuales permitían registrar el potencial de membrana e inyectar corriente simultáneamente a través de un circuito de puente. La corriente inyectada fue registrada vía un convertidor de corriente-voltaje (Analog Devices 52) con 100 M $\Omega$  en el circuito de retroalimentación negativa, así 1 mV = 0.01 nA. El baño se conectó a tierra vía un alambre de plata, el cual estaba conectado a la entrada negativa del convertidor corriente-voltaje.

Antes de la penetración, el circuito de puente fue --ajustado cuidadosamente, dando pulsos de corriente de 0.1 a 1.0 nA. Los microelectrodos que mostraban gran rectificación fueron descartados en este punto. En algunas ocasio--

nes, cuando la célula era penetrada, se hacía necesario un ligero ajuste del balance y el punto nulo podía determinarse debido a que la constante de tiempo de la membrana era relativamente grande en comparación con la constante de tiempo del circuito de registro. Este procedimiento podía llevarse a cabo óptimamente ajustando la compensación de la capacidad negativa justo antes de la oscilación. Más aún, el punto nulo fue recheado después de la salida del microelectrodo de las células. Se dieron pulsos cuadrados de corriente de amplitudes crecientes para obtener la relación de corriente/voltaje.

#### MEDICION DE FLUJOS IONICOS EN MONOCAPAS INFECTADAS.

Se hizo un análisis de los flujos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en monocapas infectadas con VSV o con FLU, a dos tiempos de la infección, correspondientes a la etapa temprana de entrada viral a la célula (una hora postinfección) y a la etapa tardía de gemación activa del virus (cinco horas postinfección).

Se analizaron tanto el eflujo de  $\text{Na}^+$  como el influjo de  $\text{K}^+$ . A continuación se describe el procedimiento seguido en estos estudios.

1) Estudio del Eflujo de Na.

Estudios de Rindler y colaboradores (1979a,b) y Cerejido y colaboradores (1980 a, b; 1981 a, b) han mostrado -- que el procedimiento de lavado que se describe es suficiente para eliminar el Na de los compartimentos extracelulares, pero no de los intracelulares, por lo que se consideró que era el indicado para medir flujos unidireccionales en monocapas de células MDCK.

a. Estudio del Eflujo de Na Una Hora Postinfección. -- Para estos estudios se utilizaron monocapas MDCK confluentes al tercer día de sembradas sobre cajas de Petri de 35 mm de diámetro. Las monocapas fueron infectadas con 10 -- PFU/cel con uno u otro virus (ver Infección Viral, pág. 68). En este caso el inóculo viral se dejó sobre la monocapa durante 40 minutos, al cabo de los cuales se retiró haciendo rápidamente dos lavados con Ringer Na sin K (ver Soluciones y Medios). Después del lavado se puso 1 ml de Ringer Na -- fresco conteniendo 1  $\mu$ Ci/ml de  $^{22}$ Na y 5 mM de KCl. La monocapa se incubó con esta solución durante 20 minutos a 37°C; aquellas monocapas destinadas al estudio del eflujo pasivo se incubaron con la misma solución conteniendo además  $5 \times 10^{-4}$  M de ouabaina en Ringer Na a la misma temperatura, durante el mismo período de tiempo. Justamente una hora postinfección, las monocapas se lavaron rápidamente cinco veces con

una solución de  $MgCl_2$  0,1 M a 4°C (con el fin de retirar el Na no internalizado y evitar ulterior influjo). Al quinto lavado se les dejó en contacto con esta solución durante dos minutos. El "wash out" (lavado) se continuó incubando la monocapa a 37°C con 1 ml de Ringer Na + 5 mM de KCl. Después de un minuto, el Ringer se colectó y se agregó nuevamente 1 ml de Ringer fresco a la caja de Petri. Este procedimiento se repitió cuatro veces. Al término de la colección de estas cuatro muestras, la monocapa se secó aspirando y se le agregó 1 ml de  $NO_3H$  1 N, en el que permaneció durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las muestras del lavado, así como una alícuota de 100  $\mu$ l del digerido de la monocapa fueron analizados en un contador gama (Nuclear Chicago Auto Gamma Counter, Chicago I-11), durante 10 minutos cada muestra. Las monocapas control tuvieron un tratamiento idéntico al descrito para las infectadas, excepto, desde luego, la presencia del inóculo viral durante 40 minutos.

b. Estudio del Eflujo de Na a la Quinta Hora Postinfección.- Se utilizaron monocapas MDCK confluentes al tercer día de sembradas en cajas de Petri de 35 mm de diámetro. Las monocapas fueron infectadas con 10 PFU/cel con VSV o con FLU. El inóculo viral se dejó sobre la monocapa durante una hora, al cabo de la cual se retiró y sustituyó por un medio adecuado para el desarrollo viral, con el que per-

manejió durante 1.5 horas (Ver Infección Viral, pág. 68). - La incubación de las monocapas con estos medios no altera los flujos (Ver Resultados). Las monocapas fueron incubadas con el Ringer de carga (Ringer Na + 1  $\mu$ Ci/ml  $^{22}$ Na + 5mM KCl) durante 2.5 horas. Al cabo de este período de incubación, siendo exactamente la quinta hora postinfección, se llevó a cabo el "wash out" de la misma forma descrita en el estudio de los flujos de Na en la etapa temprana de la infección. Las monocapas destinadas al estudio del eflujo pasivo estuvieron en contacto con ouabaína  $5 \times 10^{-4}$  M durante 20 minutos antes de efectuarse el "wash out". Las monocapas control, esto es, monocapas sin infectar, tuvieron el mismo tratamiento que las monocapas infectadas, incluyendo o no la incubación con ouabaína.

c. Consideraciones Generales.- Para exponer cómo se efectuó el análisis de los resultados, es necesario presentar algunas definiciones y explicar ciertos requerimientos de los experimentos:

a- La cantidad de sustancia que atraviesa una membrana por unidad de tiempo se llama flujo (J), el que se expresa en  $\text{nmoles} \times \text{cm}^{-2} \times \text{hr}^{-1}$ . Para señalar de dónde a dónde es el flujo se utilizan subíndices con dos números, y para indicar qué sustancia es la que fluye se usa un índice superior con el símbolo quími

co. Así,  $J_{12}^{Na}$ , significa el flujo de sodio del compartimento 1 al compartimento 2.

- b- Entre los diferentes significados que se le dan a la palabra compartimento, el que mejor describe nuestra necesidad es el siguiente: un compartimento es una cantidad dada de sustancia que desde el punto de vista cinético, se comporta homogéneamente.
- c- En estos experimentos, el sistema no debe distinguir entre la molécula marcada radiactivamente y la misma sin marca.
- d- La introducción de un isótopo radiactivo en un sistema no debe modificar su comportamiento.
- e- Los datos utilizados en el análisis compartamental, referidos como cuentas por minuto, actividad específica, etc. están ya corregidos para el decaimiento natural del radioisótopo. La desaparición del trazador de un compartimento es la que resulta de su flujo, y no de su desintegración radiactiva.
- f- La actividad específica ( $p_i^*$ ) de un trazador en el --compartimento i es la cantidad de trazador ( $P_i$ ) en el compartimento dividida entre la cantidad total de sustancia trazada en el compartimento ( $S_i$ ).

$$p_i^* = \frac{P_i}{S_i} \quad (1)$$

$k_{ij}$  es una constante de velocidad que representa la fracción de  $S_i$  que fluye del compartimento  $i$  al  $j$  -- por unidad de tiempo y área.

$$k_{ij} = \frac{J_{ij}}{S_i} \quad (2)$$

g- Se dice que un compartimento está en estado estacionario cuando la sustancia y el volumen del compartimento tienen un valor constante. Esta es una situación muy conveniente, porque generalmente ocurre -- cuando la preparación biológica está en óptimas condiciones de funcionamiento, y también porque simplifica el manejo matemático de los datos.

h- Si el sistema está en estado estacionario y cumple con el requerimiento  $c$ , entonces la fuerza que dirige el movimiento del trazador es el gradiente de actividad específica. El movimiento del trazador seguirá una cinética de primer orden, independientemente del mecanismo de membrana que transloque el trazador.

d. Análisis de Resultados.- a continuación se describe cómo obtener, a partir de las mediciones experimentales, -- los valores de flujos, constantes de velocidad y tamaño\* de los compartimentos.

---

\*Se define cantidad básica en un compartimento como la cantidad de sustancia dada contenida en éste. Algunas veces se utilizan para lo mismo los términos tamaño o contenido.

El método de "wash out" puede resumirse como sigue: -- una vez que las células (compartimento 2) han sido carga-- das con el trazador ( $^{22}\text{Na}$ ) son transferidas a una solución sin trazador (compartimento 1) con una gran cantidad de -- sustancia trazada, lo que hace que la actividad específica del trazador en este nuevo compartimento sea despreciable.

En los experimentos de "wash out" descritos, el cam-- bio temporal de la cantidad de trazador en las células -- ( $dP_2/dt$ ) está dado por la siguiente ecuación de continui-- dad:

$$\frac{dP_2}{dt} = -J_{21} p_2^* + J_{12} p_1^* \quad (3)$$

Puesto que suponemos que el sistema se encuentra en estado estacionario, los flujos  $J_{21}$  y  $J_{12}$  son constantes. Además, puesto que la cantidad de sustancia trazada en la solución del baño es tan grande, el compartimento 1 constituye un -- reservorio de actividad específica despreciable ( $p_1^* \approx 0$ ).-- La ecuación (3) se convierte en:

$$\frac{dP_2}{dt} = -J_{21} p_2^* \quad (4)$$

Reemplazando el valor de  $p_2^*$  por el descrito en la ecuación (1) y reacomodando términos se tiene:

$$\frac{dP_2}{P_2} = - \frac{J_{21}}{S_2} dt \quad (5)$$

donde  $S_2$  es también una constante (en estado estacionario).

Integrando entre  $t = 0$  y  $t = 5$ , obtenemos:

$$\ln \frac{P_{2t}}{P_{20}} = - \frac{J_{21}}{S_2} t \quad (6)$$

Despejando  $\ln P_{2t}$  en esta ecuación, obtenemos:

$$\ln P_{2t} = - \frac{J_{21}}{S_2} t + \ln P_{20} \quad (7)$$

Si graficamos el logaritmo de las cuentas por minuto en -- función del tiempo, en papel semilogarítmico, obtenemos la recta correspondiente a la ecuación (7), cuya pendiente es la constante de velocidad  $k_{21}$  definida por la ecuación (2) (Fig. 11). Si medimos ahora la cantidad de sustancia en -- la célula,  $S_2$  (el contenido de Na intracelular) podemos fá-- cilmente calcular el flujo  $J_{21}$ .

## 2) Estudio del Influjó de K.

a. El Influjó de K Una Hora Postinfección.- Estos estudios se realizaron en monocapas MDCK al tercer día de sembradas a confluencia en cajas de Petri de 35 mm de diá-- metro. Las monocapas fueron infectadas con 10 PFU/cel con VSV o con FLU. El inóculo viral permaneció en contacto -- con la monocapa durante 40 minutos, al cabo de los cuales

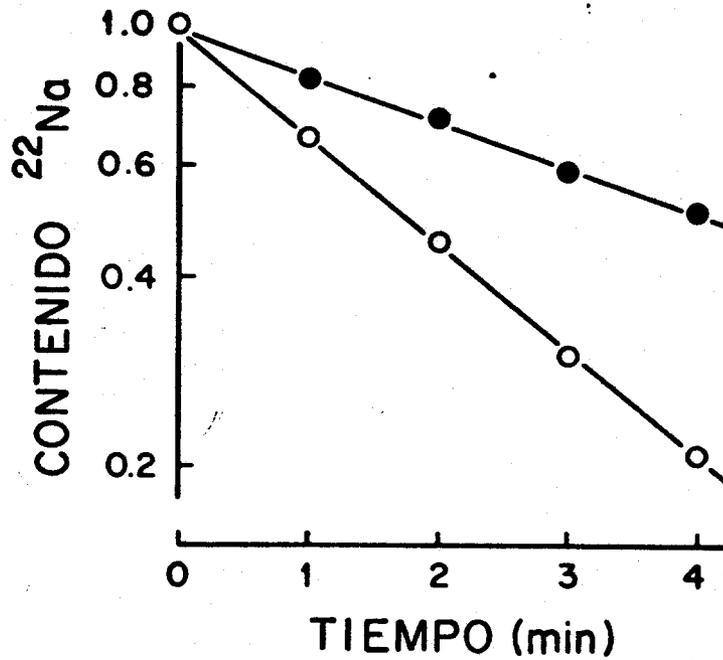


Figura 11. Contenido de sodio en función del tiempo. Al graficar el -- logaritmo de los valores obtenidos en cada lavado de sodio, en función del tiempo se obtiene una línea recta. Se muestra la gráfica obtenida a partir del lavado de una monocapa control (círculos vacíos) y la obtenida a partir de una monocapa control que se incubó con ouabaína  $5 \times 10^{-4}$  durante 20 minutos antes de efectuar el lavado (círculos llenos). La pendiente de la recta es la constante de velocidad de salida total de sodio (círculos vacíos) y la constante de velocidad de salida debida a mecanismos pasivos (círculos negros). Lo que se inhibió con -- ouabaína se toma como medida del bombeo. Es evidente que la constante de velocidad de salida de sodio es menor en la monocapa en la que el -- bombeo se inhibe con ouabaína.

se retiró y se puso 1 ml de Ringer Na sin K. La monocapa se incubó con esta solución durante 20 minutos a 37°C. Justamente una hora postinfección se retiró la solución de -- preincubado y se incubó con 1 ml de Ringer Sacarosa + 5 mM KCl + 1  $\mu$ Ci/ml  $^{86}$ Rb durante un minuto. Pasado este tiempo de incubación, la solución caliente se retiró y la monocapa se lavó cuatro veces con MgCl<sub>2</sub> 0.1 M a 4°C. Al cuarto lavado se le dejó en contacto con esta solución durante -- dos minutos, al término de este período se retiró el MgCl<sub>2</sub> y se agregó a la monocapa 1 ml de NaOH 0.5 N. Después de dos horas de incubación con esta solución a temperatura ambiente, se tomó una alícuota de 500  $\mu$ l del digerido, la -- cual se agregó a 10 ml de Aquasol (New England Nuclear) y se contó en un contador Beta Beckman (Packard Tri-Carb) -- durante cuatro minutos.

Las monocapas destinadas al estudio del influjo pasivo de K estuvieron en contacto con ouabaína  $5 \times 10^{-4}$  M en -- Ringer Na durante 20 minutos antes de la hora postinfección.

b. El Influjo de K a la Quinta Hora Postinfección. -- Las monocapas fueron infectadas con 10 PFU/cel con VSV o -- FLU. En este caso el inóculo viral estuvo en contacto con la monocapa durante una hora, al término de este tiempo se retiró y se sustituyó por un medio óptimo para el desarro-

llo viral, permaneciendo en incubación con éste durante --  
1.5 horas (Ver Infección Viral, pág. 68). La monocapa entonces se incubó con 1 ml de una solución de Ringer Na sin K a 37°C durante 2.5 horas. Al cabo de este período de in cubación, siendo exactamente la quinta hora postinfección, se llevó a cabo la captación de K de la misma forma que se describió en el estudio realizado en la etapa temprana de la infección (una hora postinfección).

Las monocapas en las que se estudió el influjo pasivo de K a la quinta hora postinfección permanecieron con ouabaina  $5 \times 10^{-4}$  M durante 20 minutos antes de llevar a cabo la captación.

Las monocapas control tuvieron el mismo tratamiento - descrito para los estudios de influjo de K una o cinco horas postinfección, siendo la única diferencia la ausencia de inóculo viral en las monocapas control.

c. Consideraciones Generales.- El método de captación así descrito puede resumirse como el caso de una suspensión de células, cuando el trazador se agrega a la solución de baño y el proceso se sigue tomando una muestra de células.

Para estos estudios es necesario considerar las definiciones y suposiciones que se mencionaron en las consideraciones generales del estudio del flujo de Na (Pág. 78 ).

d. Análisis de Resultados.- Como se mencionó en los estudios de flujos de Na, es posible establecer una relación entre el contenido intracelular del trazador en el compartimento hacia el cual se dirige el flujo, y el contenido de sustancia trazada en el mismo, mediante la actividad específica del trazador.

La actividad específica del  $^{86}\text{Rb}$  está dada por la ecuación (1):

$$P_i^* = \frac{P_i}{S_i}$$

Esta puede calcularse a partir de los datos obtenidos para los estándares y el blanco, conociéndose la concentración de K en el Ringer de carga.

Por otra parte, S (el contenido intracelular de  $^{86}\text{Rb}$ ) se obtiene directamente como las cpm en 500  $\mu\text{l}$  del digerido de la monocapa.

#### ANÁLISIS DE LAS AMPOLLAS Y EL CONTENIDO IÓNICO EN MONOCAPAS INFECTADAS.

##### 1) Análisis de las Ampollas.

Para estos estudios se utilizaron monocapas al tercer día de sembradas en multicámaras de 96 pozos con fondo plano. Las monocapas fueron infectadas con VSV o FLU a una MOI de 10 PFU/cel. El análisis consistió en contar ca

da monocapa, haciendo las observaciones con un microscopio de fases.

2) *Estudio del Contenido Iónico en Monocapas Infectadas a la Quinta Hora Postinfección.*

Estos estudios se realizaron en monocapas desarrolladas en multicámaras de 24 pozos. Al tercer día de sembradas se inocularon con VSV o FLU a 10 PFU/cel, durante una hora (Ver Infección Viral, pág. 68), pasado este tiempo, el inóculo se retiró y las monocapas se incubaron durante cuatro horas más con DMEM + 1  $\mu\text{Ci/ml}$   $^{22}\text{Na}$  o DMEM + 1  $\mu\text{Ci/ml}$   $^{86}\text{Rb}$ . Este período de incubación es suficiente para equilibrar la actividad específica del sodio y el potasio en las células con las de las soluciones de baño. -- Las monocapas se lavaron entonces cinco veces con  $\text{MgCl}_2$  0.1 M a 4°C, el último lavado duró dos minutos. Las monocapas fueron digeridas con 1 ml de NaOH 0.5 N (para determinar  $^{86}\text{Rb}$ ) durante dos horas o con 1 ml de  $\text{NO}_3\text{H}$  1 M (para determinar  $^{22}\text{Na}$ ) durante 45 minutos. Se tomó una muestra de 500  $\mu\text{l}$  en ambos casos y se contaron en los contadores Beta (muestras de  $^{86}\text{Rb}$ ) durante cuatro minutos o Gama --- (muestras de  $^{22}\text{Na}$ ) durante 10 minutos.

3) *Análisis de Resultados.*

Los contenidos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en las células se calcula

ron utilizando las actividades específicas de estos trazadores en las soluciones de baño. Para ello se consideró la concentración de ambos iones en el DMEM, siendo éstas 111.5 mM para el  $\text{Na}^+$  y 5.4 mM para el  $\text{K}^+$ .

En ambos casos el estándar fue una muestra de 500  $\mu\text{l}$  de una dilución 1:100 de la solución radiactiva. El cálculo de las actividades específicas del  $^{22}\text{Na}$  y el  $^{86}\text{Rb}$  se hizo considerando estos datos, tal y como se describió anteriormente.

#### ESTADISTICA.

Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  error estándar. El significado estadístico se determinó por medio del Test de Student. Para un dado conjunto de puntos apareados ( $x_i$ ;  $y_i$ ) el coeficiente de correlación se calcula como:

$$r = s_{xy}/s_x \cdot s_y$$

donde  $s_x$  y  $s_y$  son las desviaciones estándar.

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2/n}{n-1}}$$

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum y_i^2 - (\sum y_i)^2/n}{n-1}}$$

y  $s_{xy}$  es la covariancia:

$$s_{xy} = \frac{1}{n-1} (\sum s_i y_i - \frac{1}{n} \sum x_i \sum y_i)$$

#### MEDIOS Y SOLUCIONES.

Todas las soluciones se prepararon con agua bidestilada y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento en que se usaron.

##### 1) *Para Cultivo Celular y en General.*

La composición del medio DMEM y el PBS se da en -- las Tablas III y IV.

##### 2) *Para Cultivo y Titulación Viral.*

Las soluciones que llevan enzimas o proteínas fueron filtradas a través de filtros Millipore de 45  $\mu$ m.

##### 3) *Para Mediciones con Isótopos.*

La composición de los Ringer modificados que se -- emplearon se dan en la Tabla V.

TABLA III

COMPONENTE	MEM-MEDIO DE EAGLE CON SALES DE DULBECCO GIBCO 430-1600 mg/l
<b>SALES INORGANICAS:</b>	
CaCl <sub>2</sub>	200.00
KCl	400.00
Fe (NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	0.10
MgSO <sub>4</sub> (anhidro)	97.67
NaCl	6400.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	125.00
<b>OTROS COMPONENTES:</b>	
Glucosa	1000.00
Rojo de Fenol	15.00
Piruvato de Sodio	110.00
<b>AMINOACIDOS:</b>	
L-Arginina · HCl	84.00
L-Cistina · 2HCl	62.57
L-Glutamina	584.00
Glicina	30.00
L-Histidina HCl · H <sub>2</sub> O	42.00
L-Isoleucina	105.00
L-Leucina	105.00
L-Lisina · HCl	146.00
L-Metionina	30.00
L-Fenilalanina.	66.00
L-Serina	42.00
L-Treonina	95.00
L-Triptofano	16.00
L-Tirosina (sal disódica)	104.20
L-Valina	94.00
<b>VITAMINAS:</b>	
D-Ca Pantotenato	4.00
Cloruro de Colina	4.00
Acido Fólico	4.00
I-Inositol	7.20
Nicotinamida	4.00
Piridoxal · HCl	4.00
Riboflavina	0.40
Tiamina · HCl	4.00

TABLA IV.

COMPONENTE	BUFFER SALINO DE FOSFATOS GIBCO 450-1300 gms/l
KCl	0.20
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.20
$\text{MgCl}_2$	0.047
NaCl	8.00
$\text{NaHPO}_4$	1.15

TABLA V.

COMPONENTE	TIPO DE RINGER	
	RINGER Na	RINGER SACAROSA
NaCl	118 mM	-
NaHCO <sub>3</sub>	22 mM	-
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	1 mM
Glucosa	5 mM	5 mM
Hepes	10 mM	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	1.8 mM	1.8 mM
Sacarosa	-	280 mM
pH	7.4	7.4

### CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

LA PERMEABILIDAD PARACELULAR Y CELULAR DE LA MONOCAPA DE CELULAS MDCK INFECTADA. ....	94
1) <i>Resultados.</i> ....	94
a. Ampollas y Contenidos Iónicos. ....	94
b. Resistencia Eléctrica a Través de la Monocapa. ....	95
c. Fenómenos Eléctricos a Través de la Membrana Plasmática. ....	98
d. Flujos Unidireccionales. ....	103
2) <i>Discusión.</i> ....	115
a. Efecto de la Infección Viral Sobre la Conductancia Transepitelial. ....	115
b. Efectos Sobre la Permeabilidad de la Membrana Celular. ....	118
LOS MICROFILAMENTOS, LA UNION ESTRECHA Y LA GEMACION POLARIZADA DEL VSV EN CELULAS MDCK. ....	123
1) <i>Resultados.</i> ....	123
a. Gemación Polarizada del VSV. ....	123
b. Efecto del Tratamiento con EGTA. ....	128
c. Efecto del Tratamiento con Citocalasina B. ..	131
d. Tratamiento Combinado con Citocalasina B y EGTA. ....	133
2) <i>Discusión.</i> ....	133
a. Gemación Polarizada del VSV. ....	136
b. Efecto del Tratamiento con EGTA. ....	138
c. Efecto de la Citocalasina B. ....	139
d. Efecto del Tratamiento Combinado con Citocalasina B y EGTA. ....	142

LA PERMEABILIDAD PARACELULAR Y CELULAR  
DE LA MONOCAPA DE CELULAS MDCK INFECTADA.

1) Resultados.

a. Ampollas y Contenidos Iónicos.- Las monocapas - MDCK cultivadas sobre un soporte impermeable forman ampollas debido al transporte vectorial desde la zona apical a la basal y la acumulación de fluido bajo la monocapa (Leighton *et al.*, 1969). Una ampolla resulta del compromiso de algunos factores (Cereijido *et al.*, 1981b): i) el transporte vectorial y la acumulación de iones y fluido bajo el lado basal; ii) el sellado de las uniones estrechas; iii) el desprendimiento de la monocapa del sustrato como resultado de la presión ejercida por la acumulación de fluido. Así, - las ampollas en la monocapa de células MDCK son indicadores gruesos del transporte vectorial de iones y agua desde la zona apical a la basal, por esta razón el estudio de las ampollas en las monocapas infectadas constituyó el primer punto en estos estudios. Para llevar a cabo este análisis se infectaron monocapas al tercer día de sembradas con VSV o - FLU. Todas ellas (168 monocapas) tenían ampollas. Cinco horas después de la infección con uno u otro virus las ampollas aún estaban presentes. Para la cuarta o quinta hora - las monocapas infectadas con VSV tenían un gran número de - nuevas ampollas pequeñas. Como se muestra más adelante --

el VSV estimula la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , y en una etapa más tardía produce la apertura de la unión estrecha y desprendimiento de la célula. Podría ser que este aumento en la actividad de formación de ampollas de la monocapa se debiera a un debilitamiento en la adhesión al soporte. Este debilitamiento conducirá finalmente a que las células se vayan despegando, se redondeen y luego se desprendan completamente de la monocapa. En las monocapas control no se observan cambios en tamaño, número o distribución de las ampollas durante este período.

La infección con VSV o FLU no produce modificaciones significativas en el contenido de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en las células (Tabla VI), la composición normal: alto  $\text{K}^+$  y bajo  $\text{Na}^+$  de la célula se preserva.

b. Resistencia Eléctrica a Través de la Monocapa.- Las células MDCK hacen contacto unas con otras para formar las uniones estrechas que confieren a la monocapa epitelial las propiedades de una barrera efectiva de permeabilidad, incluyendo la generación de resistencia eléctrica transepitelial (RET) (Cereiido *et al.*, 1978). La figura 12 muestra que ni el VSV ni el FLU producen un efecto sobre la RET durante las primeras horas de infección. Sin embargo, después de 5 ó 6 horas, las monocapas infectadas con VSV experimentan una brusca caída en la RET, la cual coincide con un ascenso

TABLA VI. Contenido de Electrolitos en Monocapas de Células MDCK Cinco Horas Post-infección con VSV o FLU.

	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
	(nmol.cm <sup>-2</sup> )	
Control	7.09 ± 0.30	56.4 ± 1.9
VSV	8.26 ± 0.13	47.1 ± 2.0
FLU	9.98 ± 0.17	56.7 ± 3.0

n = 8

Las monocapas fueron infectadas con 10 PFU/cel en ambos casos. Las monocapas se incubaron durante cuatro horas antes de su digestión en DMEM + 1 µCi/ml <sup>22</sup>Na o DMEM + 1 µCi/ml <sup>86</sup>Rb. Al término de esta incubación las monocapas fueron digeridas con Na OH 0.5 N (para determinar <sup>86</sup>Rb) o NO<sub>3</sub>H 1 N (para determinar <sup>22</sup>Na).

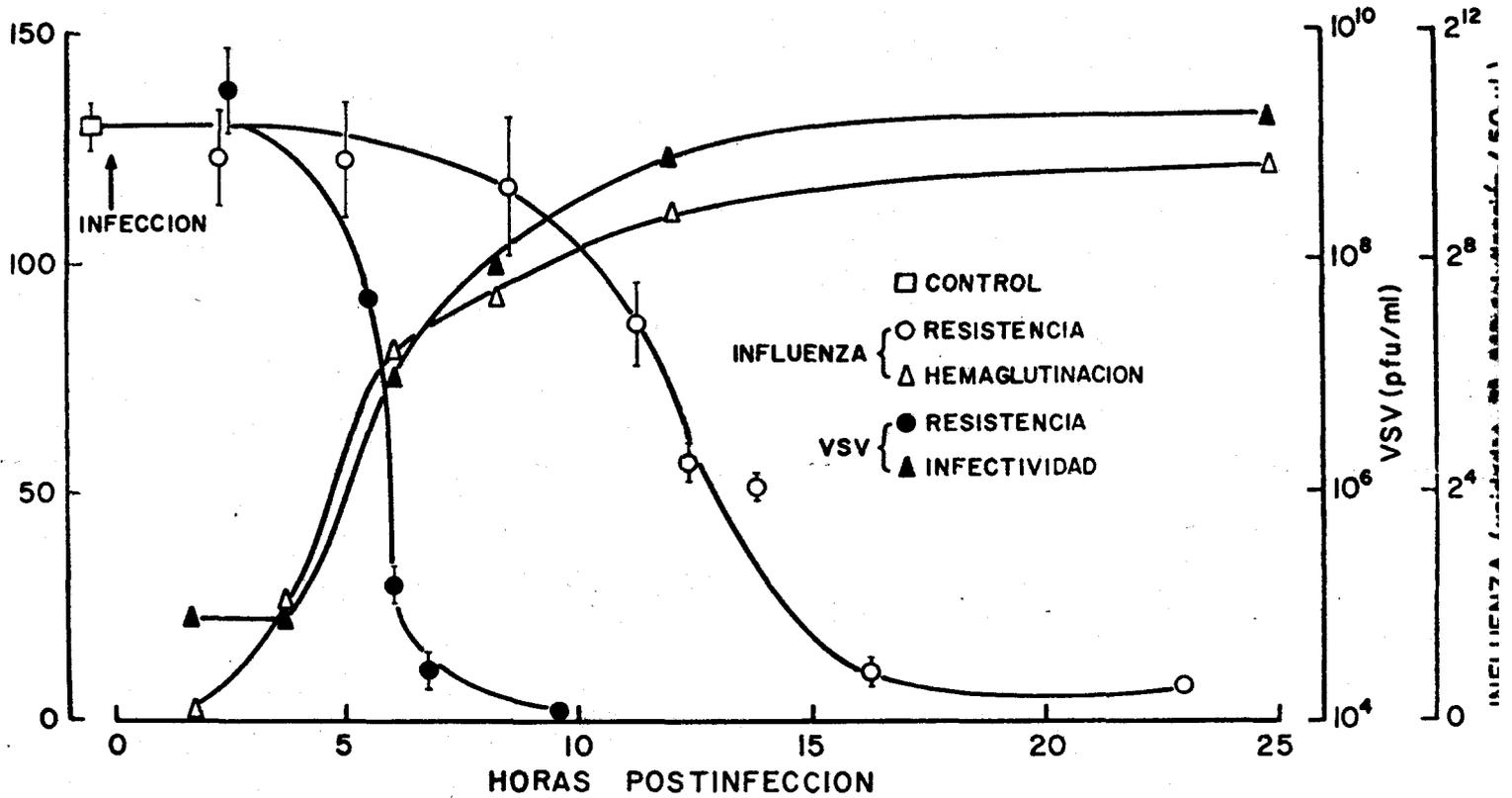


Figura 12. Efecto de los virus VSV y FLU (10 PFU/cel) sobre la resistencia eléctrica a través de la monocapa de células MDCK cultivada sobre discos de nylon recubiertos de colágeno. La resistencia eléctrica fue calculada a partir de la deflexión de voltaje producida por una corriente de  $100 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ . La resistencia del medio y el soporte fueron sustraídas. La producción viral se determinó por hemaglutinación (FLU) y por ensayo de placa (VSV).

La infección con VSV produce la caída de la resistencia con un 1/2 de cinco horas. Esta caída coincide con el aumento en la producción de este virus.

La infección con FLU produce una caída de resistencia con un 1/2 de doce horas, tiempo para el cual la producción de este virus ha alcanzado su máximo.

en la curva de producción de este virus (Fig. 12) y la acumulación de la proteína G de la envoltura viral en la membrana plasmática (Rodríguez-Boulán y Pendergast, 1980). A pesar de mostrar una cinética en la producción similar a la del VSV, el FLU no afecta la RET sino hasta más tarde en la infección (12-14 horas) cuando la gemación viral ya se ha estabilizado. Puesto que las monocapas de células MDCK tienen una ruta de permeabilidad transcelular y paracelular (Cereijido *et al.*, 1980b, 1981a), no es posible, en base a las mediciones transepiteliales por sí solas, discernir entre si la caída de la resistencia eléctrica se debe a un efecto de los virus sobre la membrana celular, o a una apertura de las uniones estrechas (Cereijido *et al.*, 1981a; Martínez-Palomo *et al.*, 1980). Por consiguiente, en los experimentos que se describen en las siguientes secciones medimos los flujos y fenómenos eléctricos que, se sabe, ocurren a través de la membrana plasmática de las células MDCK.

c. Fenómenos Eléctricos a Través de la Membrana Plasmática.- Nuestra primera tarea fue la de seleccionar una intensidad de corriente que permitiera la determinación de la resistencia de membrana en la parte lineal de la curva voltaje/corriente (V/I). La figura 13 muestra las curvas V/I obtenidas con una monocapa control (círculos vacíos) y la misma monocapa después de 10-20 minutos de infección con --

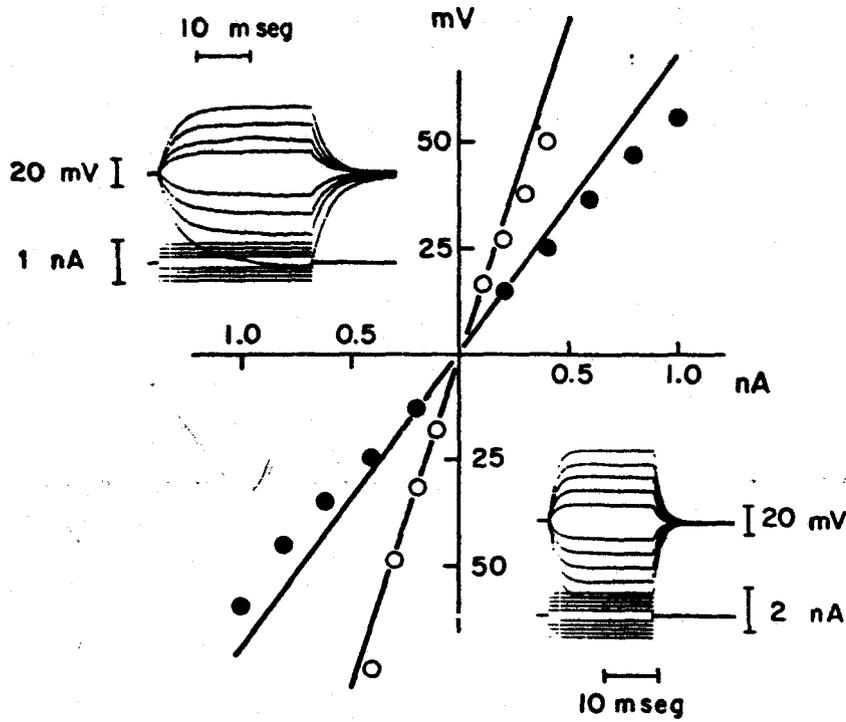


Figura 13. Relación corriente/voltaje obtenida con pulsos de polaridad opuesta e intensidades variadas en monocapas control (recuadro superior izquierdo, círculos vacíos), y monocapas infectadas con --VSV (recuadro inferior derecho, círculos llenos). Se observa la asimetría de la respuesta en el voltaje para pulsos de corriente grandes en la monocapa control. La gráfica muestra la relación corriente/voltaje medida al final de cada pulso. El aumento de la resistencia para pulsos negativos mayores está sobreestimada debido a que las deflecciones de voltaje no han alcanzado el valor del estado estacionario. Resistencia del microelectrodo: 122 M $\Omega$ . Las mediciones se realizaron entre los 10-20 minutos postinfección.

La infección con VSV elimina la asimetría de la curva I/V. - Además, disminuye la resistencia transmembranal.

VSV (círculos llenos). Estas curvas se hicieron con los valores obtenidos al término de los pulsos de corriente reproducidos en la parte superior izquierda e inferior derecha - de la figura, respectivamente. Los registros control muestran la asimetría de la respuesta de voltaje ya descrita -- por Stefani y Cereijido (1983). La infección con el VSV suprime esta asimetría, y disminuye marcadamente la pendiente que es la resistencia de la curva V/I (125 vs. 67 M $\Omega$ ). Las curvas muestran que, para pulsos de corriente de 0.1 nA en las células control, o hasta de 0.5 nA en las células infectadas, la relación voltaje/corriente permanece lineal, de - manera que estas intensidades de corriente se escogieron para medir la resistencia de la membrana durante el resto de los experimentos.

Las figuras 14 y 15 muestran el potencial intracelular y la resistencia eléctrica de membrana antes (barras) y despues (círculos) de la infección con VSV. Ambos parámetros caen como consecuencia de la infección viral; sin embargo, el procedimiento empleado no permite discriminar si el -- aumento en la permeabilidad de membrana ocurre como resultado de la adsorción del virus a la membrana celular, si re-- fleja el proceso de endocitosis viral, o si el cambio observado se debe a un efecto ejercido por los virus sobre la -- membrana celular, una vez que éstos se encuentran en el citoplasma de la célula.

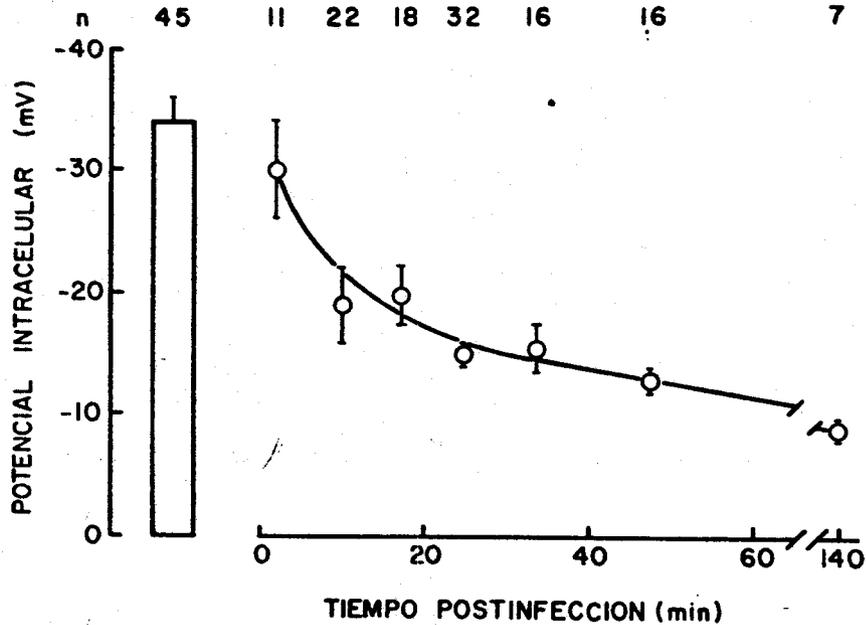


Figura 14. Curso temporal del potencial de reposo intracelular de una monocapa de células MDCK infectada con VSV (10 PFU/cel). La columna representa los valores control en la misma monocapa antes de ser infectada. La resistencia eléctrica promedio de los microelectrodos fue: 150 MΩ. En la parte superior se indica el número de observaciones (n).

Se observa que el potencial de membrana de las células infectadas decae gradualmente con el tiempo.

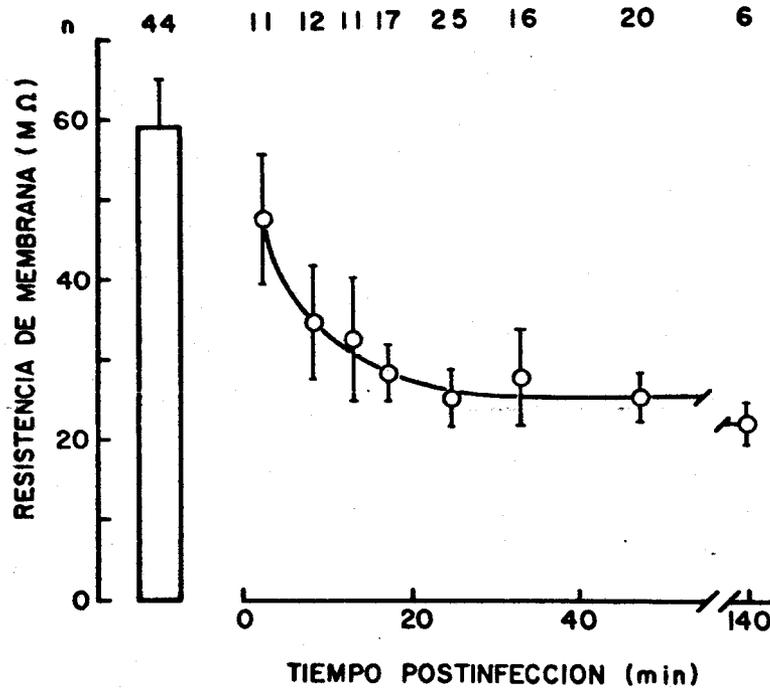


Figura 15. Curso temporal de la resistencia eléctrica de la membrana plasmática de las células MDCK infectadas con VSV (10 PFU/cel). La resistencia se midió punzando la célula con un microelectrodo que inyecta un pulso hiperpolarizante de 0.1 nA y 5 mseg. La columna representa los valores control en la misma monocapa antes de ser infectada. En la parte superior se indica el número de observaciones (n). Se observa que la infección con este virus produce una caída gradual de la resistencia de membrana.

Estudios similares se llevaron a cabo con el virus de la influenza. La figura 16 muestra que este virus produce una disminución en la resistencia de la membrana celular si milar a la producida por el VSV y suprime la asimetría. Sin embargo, el curso temporal de la caída de potencial (Fig. 17) es más complejo que en el caso del VSV: parece haber -- una caída rápida, seguida de un aumento transitorio en el potencial. El efecto del FLU sobre la resistencia eléctrica de la célula MDCK (Fig. 18) es también diferente al producido por el VSV, ya que este parámetro recupera su valor original después de 60 minutos aproximadamente.

La Tabla VII muestra el valor de la resistencia eléctrica a través de la membrana plasmática de células control y células infectadas después de la quinta hora (VSV y FLU) y después de la decima tercer hora (FLU) postinfección. Es interesante mencionar que las células mantienen una resistencia considerablemente alta, a pesar de la gemación viral activa que está teniendo lugar en ese momento en sus membranas.

d. Flujos Unidireccionales.- Los flujos unidireccionales para un ion dado se midieron en monocapas en presencia y ausencia de ouabaína ( $10^{-4}$  M). Se sabe que esta concentración de ouabaína produce una completa inhibición de la bomba, y la diferencia entre el flujo en las células no in-

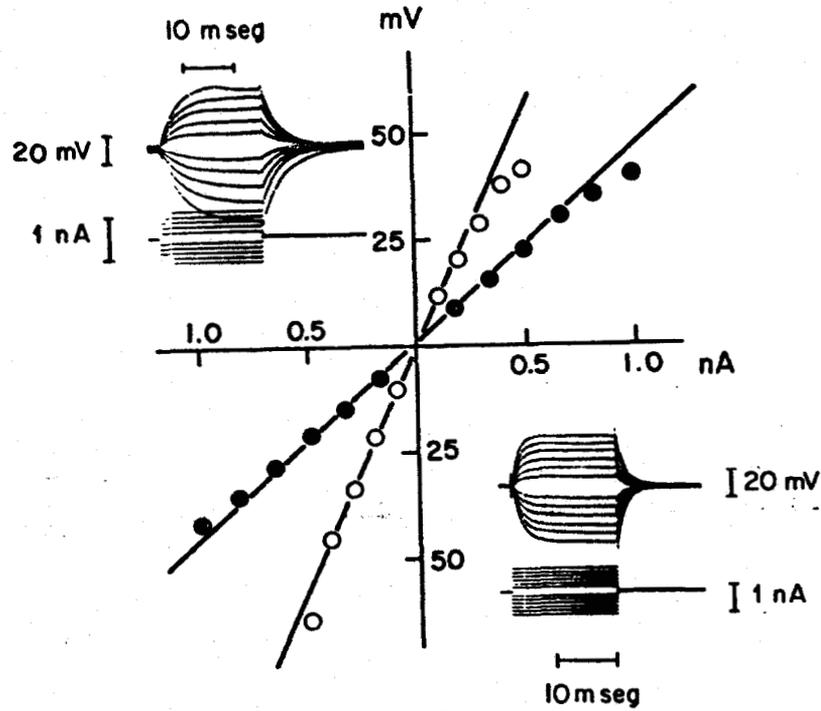


Figura 16. Relación corriente/voltaje obtenida con pulsos de polaridad opuesta e intensidades variadas en monocapas control (recuadro superior izquierdo, círculos vacíos), y monocapas infectadas con FLU (recuadro inferior derecho, círculos llenos). Se observa la asimetría de la respuesta en el voltaje para pulsos grandes de corriente en la monocapa control. La gráfica muestra la relación corriente/voltaje medida al final de cada pulso. Resistencia del microelectrodo:  $130 \text{ M}\Omega$ . Las mediciones se realizaron entre los 10 y 20 minutos postinfección. La infección con FLU elimina la asimetría de la curva I/V y disminuye la resistencia transmembranal.

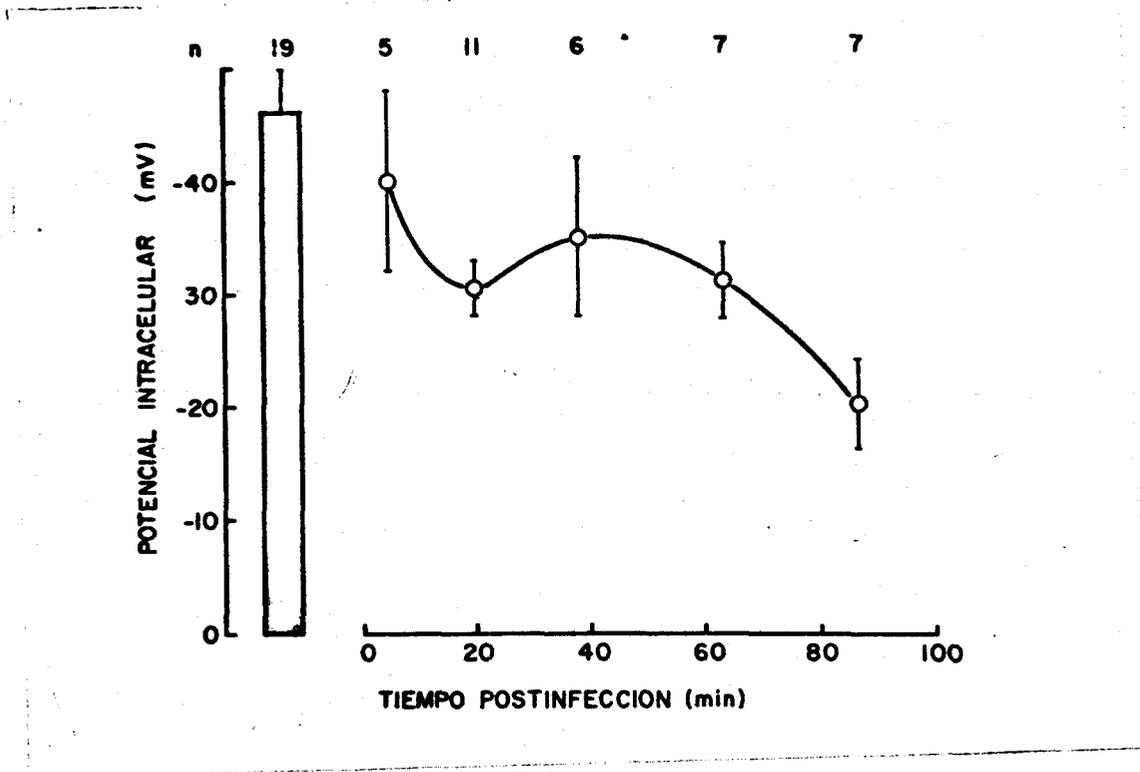


Figura 17. Curso temporal del potencial de reposo intracelular de monocapas de células infectadas con FLU (10 PFU/cel). La columna representa los valores control en la misma monocapa antes de ser infectada. La resistencia eléctrica promedio de los electrodos fue: 150 M $\Omega$ . En la parte superior se indica el número de observaciones (n). El curso temporal del potencial muestra una caída temprana seguida de una recuperación transiente.

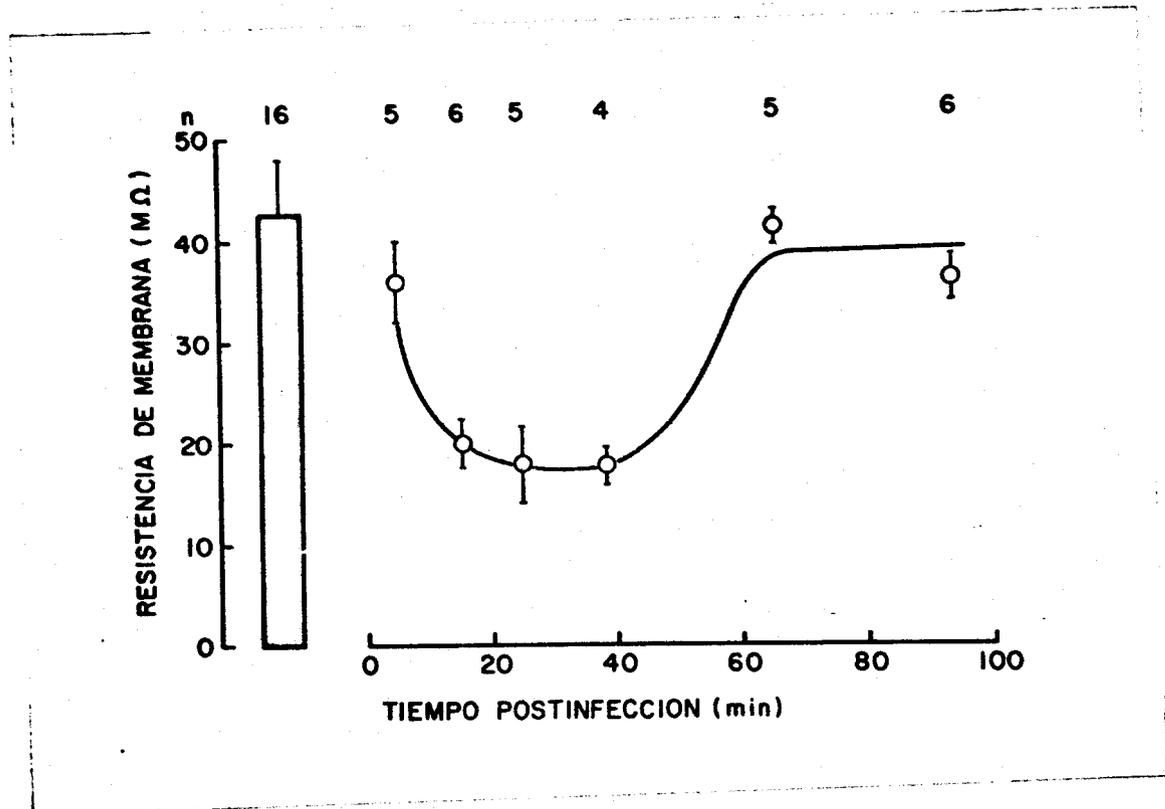


Figura 18. Curso temporal de la resistencia eléctrica de la membrana -- plasmática de las células MDCK infectadas con FLU (10 PF/cel). La resistencia se registró con un microelectrodo pasando un pequeño pulso negativo de corriente de 1 nA y 5 msec. La columna representa los valores control en la misma monocapa antes de ser infectada. En la parte superior se indica el número de observaciones (n). Se observa que la resistencia disminuye gradualmente, pero luego se recupera hasta los valores control.

TABLA VII. Resistencia Eléctrica de Membrana de las Células MDCK Durante la Gemación del VSV o FLU.

	Tiempo Postinfección (horas)	Resistencia de Membrana ( $M\Omega$ )
Control		$57.6 \pm 7.7$ (13)
VSV	5-7	$40.3 \pm 12.1$ ( 9)
FLU	5-7	$49.0 \pm 11.5$ (10)
FLU	13-15	$46.3 \pm 15.4$ ( 6)

La resistencia se midió pasando un pulso cuadrado negativo de corriente de 1 nA 6 40 mseg, y registrando la deflección de voltaje con el mismo electrodo.

hibidas y el de aquellas con ouabaína se considera como el componente activo del flujo (Cereijido *et al.*, 1981b). Estas mediciones se hicieron con 140 mM Na y 5 mM K en el Rin<sup>ger</sup> de lavado, en una etapa temprana en la infección (una hora postinfección) y también durante el ensamblaje viral (cinco horas postinfección).

i) El Influjó de K: Los flujos de potasio se midieron utilizando  $^{86}\text{Rb}$  como trazador. La figura 19 muestra el total y los componentes pasivo y activo de los flujos después de una hora de infección. Las barras blancas son los controles. Las barras grises muestran que el VSV produce un aumento evidente del influjó total de potasio. Este aumento se debe exclusivamente a un aumento del bombeo de K y no existe diferencia entre los componentes pasivos. El FLU no parece producir un efecto detectable sobre los flujos de K.

Los flujos de K medidos después de cinco horas de infección (Fig. 20) muestran una situación diferente: 1) la relación entre los flujos pasivo y activo de K bajo las condiciones control se modifica, debido quizás al período más prolongado de incubación. Puesto que estas condiciones son distintas para los dos tipos de virus, debimos probar que estas no introdujeran diferencias entre ellos (Tabla VIII), de manera que cualquier cambio en la permeabilidad de membrana se pudiera atribuir al virus; 2) el gran aumento en

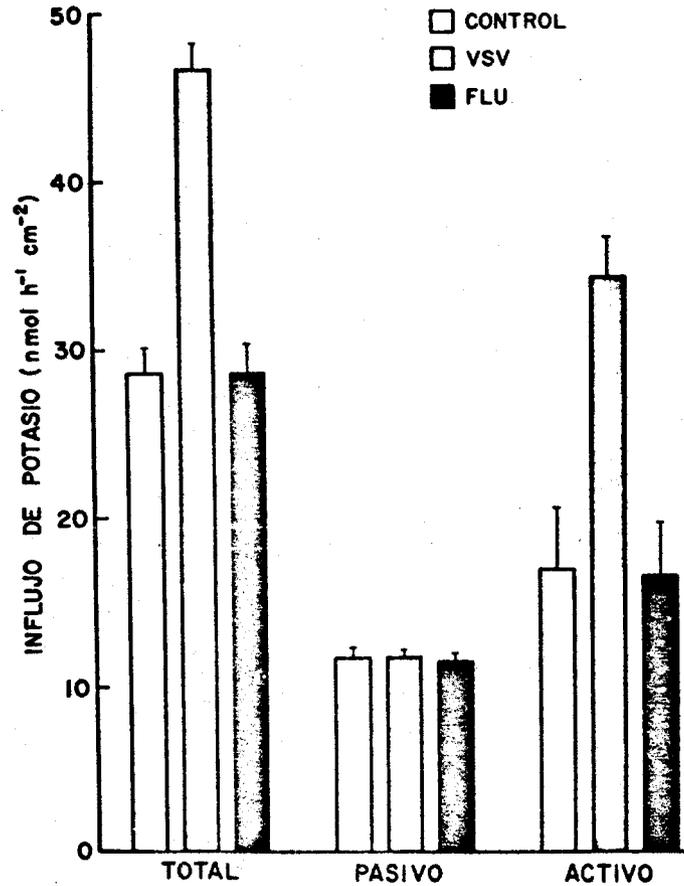


Figura 19. Modificaciones del influjo de K como consecuencia de la infección viral. Influjo de K calculado midiendo la captación de <sup>86</sup>Rb en las monocapas de células MDCK. Las columnas representan los valores obtenidos bajo condiciones control (blanco), una hora postinfección con VSV (gris) y una hora postinfección con FLU (negro). En ambos casos se infectó con 10 PFU/cel. El influjo pasivo es el influjo obtenido en monocapas tratadas con 5x10<sup>-4</sup>M de ouabaína durante 20 minutos antes de efectuarse la captación. El influjo activo es la fracción del influjo total inhibida por ouabaína.

El VSV modifica el influjo total de K<sup>+</sup>, esta modificación se debe exclusivamente a que este virus aumenta el componente activo del influjo. Por otra parte, puede observarse que el FLU no tiene ningún efecto sobre el influjo de K<sup>+</sup> en esta etapa de infección.

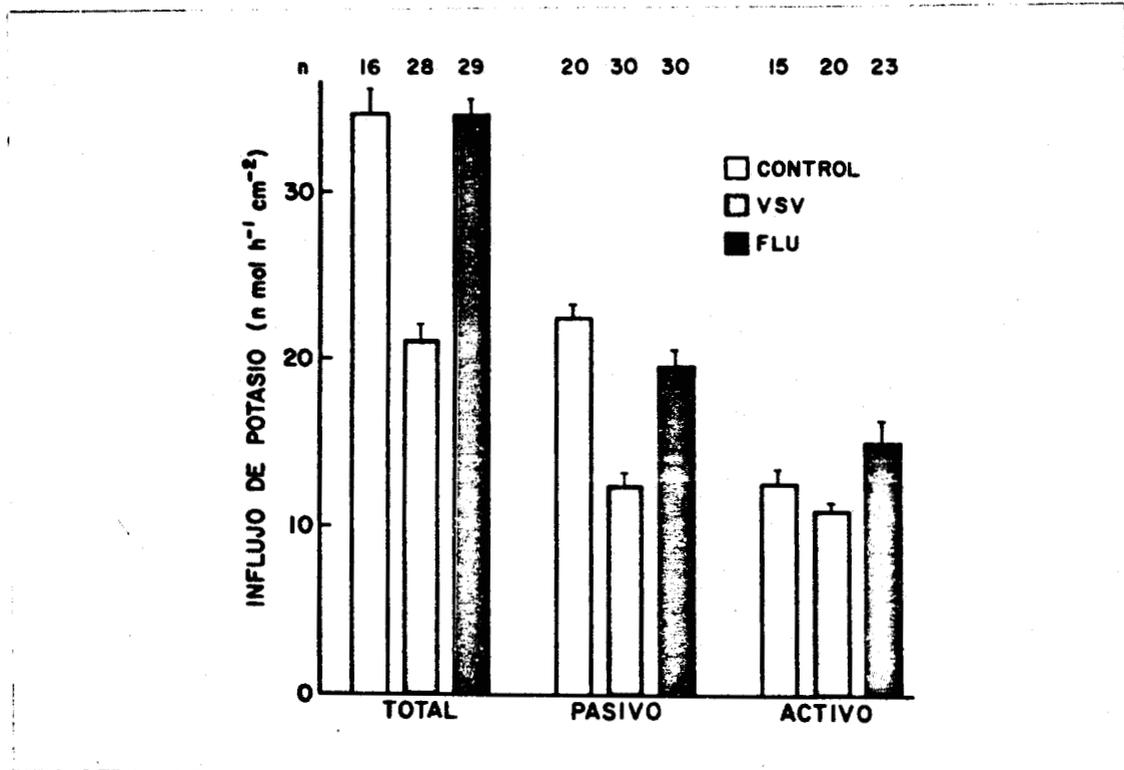


Figura 20. Modificaciones del influjo de  $K^+$  como consecuencia de la infección viral. Se muestra el influjo de  $K^+$  calculado midiendo la captación de  $^{86}\text{Rb}$  en las monocapas de células MDCK. Las columnas representan los valores obtenidos bajo condiciones control (blanco), -- cinco horas postinfección con VSV (gris) y cinco horas postinfección -- con FLU (negro). En ambos casos se infectó con  $10 \text{ PFU/cel}$ . El influjo pasivo es el influjo obtenido en monocapas tratadas con  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$  de ouabaína durante 20 minutos antes de efectuarse la captación. El influjo activo es la fracción del influjo total inhibida por ouabaína.

En esta etapa de la infección, el VSV inhibe el influjo pasivo y activo de  $K^+$ . El FLU disminuye la entrada pasiva de  $K^+$  y aumenta el componente activo.

TABLA VIII. Flujos iónicos a Través de la Membrana Plasmática de las Células MDCK Bajo las Condiciones de Incubación Utilizadas para los Diferentes Virus.

Condiciones de incubación*	Eflujo de Sodio	
	Influjo de Potasio (nmol h <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> )	Pozo de Na <sup>+</sup> (S) Const. Vel. (K) (nmol cm <sup>-2</sup> ) (min <sup>-1</sup> )
DMEM + 10% Suero de Ternera (1)	28.6 ± 1.0	30.9 ± 1.4      0.30 ± 0.03
DMEM + 2% Suero Fetal de Ternera (2)	29.0 ± 2.0	29.1 ± 3.2      0.36 ± 0.02
DMEM + 0.2% Albúmina Sérica Bovina (3)	30.6 ± 1.0	28.6 ± 1.5      0.38 ± 0.01

n = 5

\* Estas son las condiciones utilizadas con las monocapas control (1), infectadas con VSV (2), e infectadas con FLU (3). En los experimentos de esta tabla las monocapas no fueron infectadas sino que se probaron solamente los posibles efectos de las condiciones de incubación. Las monocapas estuvieron en contacto con estos medios durante 1.5 horas, seguidas de la incubación durante 2.5 horas con el Ringer correspondiente. Después de estos períodos, se llevó a cabo el lavado de Na<sup>+</sup> o la captación de K<sup>+</sup> tal como se describió en el Capítulo de Métodos.

el bombeo observado en el período temprano con el VSV desaparece en valor absoluto y en relación con el control; y 3) el funcionamiento de los canales pasivos se ve disminuido. Como en el período temprano, la infección con FLU no tiene como resultado un cambio apreciable en la permeabilidad a K.

ii) Eflujo de Na: Como se describió en el capítulo de Métodos, la medición de los flujos de Na en las células -- MDCK requiere de un período de carga en el que el contenido de Na de la célula se aumenta experimentalmente. Más aun, Cereijido y colaboradores (1981b) han mostrado que no sólo la velocidad de salida de Na, activa y pasiva, varía con el contenido de Na, sino que además siguen patrones diferentes. Por lo tanto, para poder hacer una comparación válida de -- los efectos de los virus, es necesario determinar a qué contenido celular de Na (S) fueron medidos los flujos unidireccionales.

De acuerdo a lo anterior, en la figura 21 se expresan las constantes de velocidad para los movimientos de sodio - total (curvas superiores) y pasivo (curvas inferiores). La diferencia entre las dos curvas corresponde a los flujos activos de Na. En las monocapas no infectadas, es evidente - que las permeabilidades total y pasiva disminuyen marcada-- mente conforme el contenido de Na aumenta. Este efecto ha - sido observado en células de epitelios adultos (Cereijido -

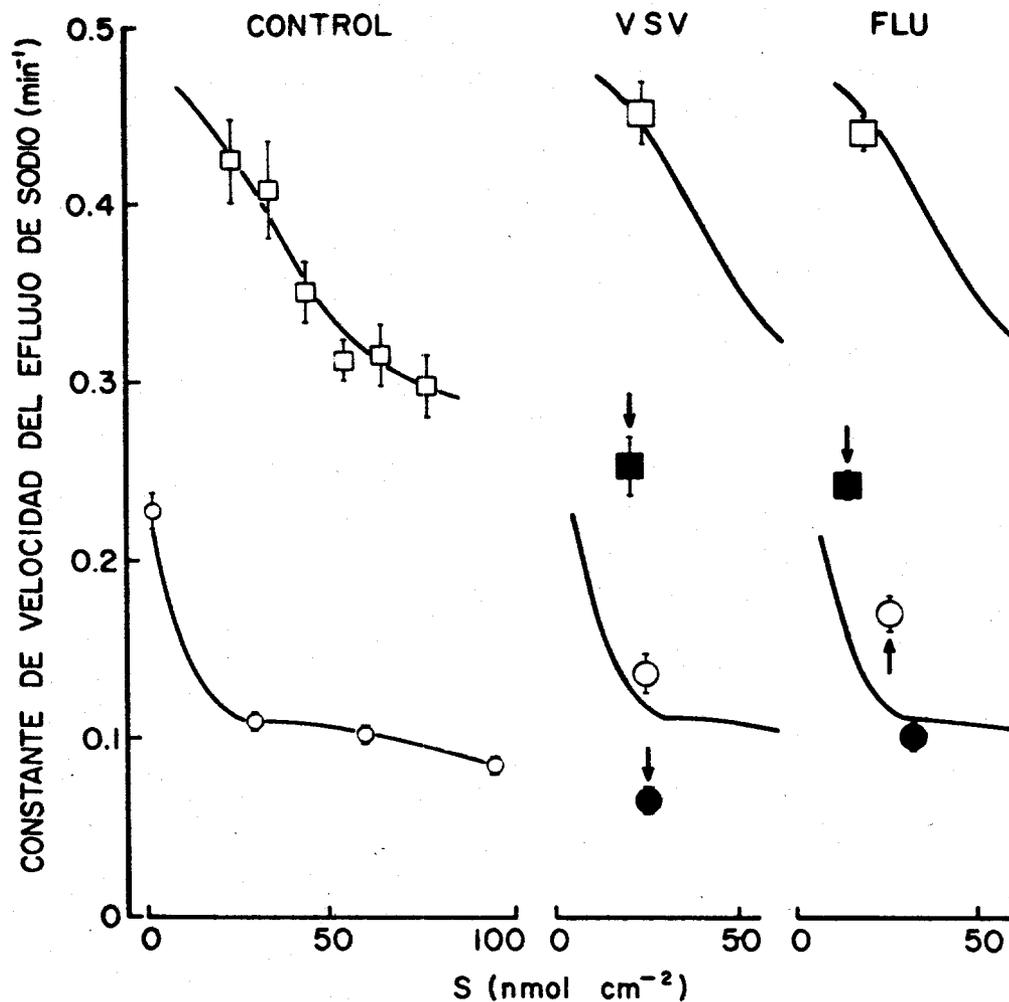


Figura 21. Modificaciones del eflujo de  $\text{Na}^+$  como consecuencia de la infección viral. Se muestra la constante de velocidad del eflujo de sodio calculada a partir del "lavado" de  $^{22}\text{Na}$  en monocapas bajo condiciones control, infectadas con VSV (10 PFU/cel) e infectadas con FLU (10 PFU/cel). Las constantes se representan en función de la poza de  $\text{Na}^+$  en las células ( $S$ ) ya que, como puede verse, en las monocapas control (panel izquierdo), ésta varía con este parámetro. Las curvas fueron trazadas a ojo por los puntos experimentales de las monocapas control (panel izquierdo), éstas se representan nuevamente en el panel central (monocapas infectadas con VSV) y derecho (monocapas infectadas con FLU). En los paneles central y derecho, los símbolos vacíos y llenos corresponden a monocapas una hora y cinco horas postinfección, respectivamente. Los cuadrados representan las constantes de velocidad del eflujo total, mientras que los círculos representan las del eflujo pasivo. Las flechas indican que el punto señalado representa un aumento o disminución respecto de los valores control.

Una hora postinfección el VSV no modifica el eflujo de  $\text{Na}^+$ . Sin embargo, este virus deprime el eflujo de  $\text{Na}^+$  pasivo y activo cinco horas después de la infección.

Una hora después de la infección con FLU, el eflujo total de  $\text{Na}^+$  no se ha modificado; sin embargo, el componente pasivo está ligeramente aumentado. A la quinta hora postinfección con este virus, el eflujo total de  $\text{Na}^+$  se ve disminuido debido a una depresión del componente activo.

*et al.*, 1964). Las curvas se representan nuevamente en los paneles central y derecho para permitir comparaciones con las monocapas infectadas.

Las células MDCK infectadas durante una hora con VSV no muestran una modificación detectable de los flujos total (cuadrados vacíos) ni pasivo (círculos vacíos), ya que sus valores caen sobre la curva control. Por lo tanto, la infección con este virus no modifica las permeabilidades pasivas a K o Na; lo más probable es que disocie la bomba, puesto que el bombeo a K es estimulado (Fig. 19), pero no así el bombeo a Na (Fig. 21).

Cinco horas después de la infección, un tiempo que corresponde a una gemación activa del VSV, este virus produce una marcada inhibición de las permeabilidades total (Fig. 21, cuadrados llenos) y pasiva (círculos llenos). Es importante subrayar que el bombeo de Na (diferencia entre el total y el pasivo) también está disminuido. Esta disminución en la permeabilidad pasiva de Na es similar a la producida por este virus en la permeabilidad a K en este período de infección.

La infección con FLU (Fig. 21, panel derecho) no produce un cambio marcado en la permeabilidad total a Na de las células MDCK (cuadrados vacíos). Sin embargo, hay un aumento en la permeabilidad pasiva (círculos vacíos). Puesto que

consideramos como bombeo activo de Na las diferencias entre la permeabilidad total y la inhibida por ouabaina (pasiva), concluimos que la infección con FLU disminuye el eflujo activo de sodio.

Durante la gemación del FLU, el eflujo pasivo de Na no se ve afectado (Fig. 21, círculos llenos), aunque el eflujo total (cuadrados llenos) se ve marcadamente deprimido a expensas de la inhibición del bombeo. Probablemente este virus también esté disociando la bomba, ya que se observa que la drástica inhibición del eflujo de Na no está acompañado de una modificación correspondiente en el influjo activo de potasio (Fig. 20). Los datos presentados en la Tabla VIII indican que la disminución observada en las permeabilidades se debe a un efecto de los virus por sí mismos y no a las condiciones de incubación, ya que los controles de estas condiciones de hecho producirían un aumento pequeño del flujo.

## 2) *Discusión.*

a. Efecto de la Infección Viral Sobre la Conductancia Transepitelial.- Observamos una diferencia dramática en los efectos del VSV y el FLU en la conductancia transepitelial de las monocapas MDCK. La caída, relativamente temprana en los valores de este parámetro en monocapas infecta

das con VSV (cinco horas postinfección) contrasta con los efectos tardíos provocados por el FLU (12-15 horas postinfección). Genty y Busserau (1980) han reportado similitud entre los cambios morfológicos sufridos por células infectadas con VSV y los encontrados en células tratadas con citocalasina B. Más aun, mostraron que estos cambios eran insignificantes en células infectadas con mutantes sensitivas a temperatura de VSV de los grupos de complementación III y V, a temperaturas no permisivas. Bajo estas condiciones, el transporte de la proteína G a la membrana plasmática está muy disminuido. Por consiguiente, se ha propuesto que la proteína G tiene un efecto despolimerizante de actina. Este efecto explicaría nuestros resultados puesto que se ha mostrado (Meza *et al.*, 1980) que la citocalasina B provoca una caída en la resistencia transepitelial, como resultado de la apertura de las uniones estrechas. La presencia de actina en los virus RNA con envoltura ya ha sido documentada (Wang *et al.*, 1977; Damsky *et al.*, 1977), y las interacciones específicas entre la actina y la proteína M de los Paramyxovirus también ha sido descrita (Giuffre *et al.*, 1982). Sin embargo, estos virus, así como el FLU, geman por la superficie apical de las células MDCK (Rodríguez-Boulán y Sabatini, 1978) y provocan un efecto citopático relativamente pequeño en las células MDCK, a

juzgar por los datos que se presentan en esta tesis. En estudios ulteriores sería interesante obtener información -- acerca de las posibles interacciones entre la proteína G -- del VSV y el citoesqueleto, para llegar a establecer si hay efecto disruptivo de esta proteína sobre el citoesqueleto - asociado a las uniones estrechas.

Recientemente se ha mostrado (Stefani y Cereijido, --- 1983) que el valor mínimo de la resistencia eléctrica a través de la ruta transcelular de una sola célula epitelial -- ( $r_{TC}$ ) está dado por:

$$r_{TC} = \frac{R_m}{F_a - F_a^2} \quad (1)$$

donde  $R_m$  es la resistencia eléctrica a través de la membrana plasmática íntegra, medida con el microelectrodo, y  $F_a$  es la fracción de la membrana plasmática que corresponde a la superficie apical. El mínimo de resistencia transcelu-- lar se da cuando  $F_a = 0.5$ . En este caso la ecuación (1) se reduce a:

$$r_{TC} = 4 R_m \quad (2)$$

Una monocapa de células MDCK confluyente tiene menos de  $5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>, cada una actuando como una resistencia -

en paralelo. Por lo tanto, la resistencia eléctrica a través de la ruta transcelular de un centímetro cuadrado de monocapa tiene una resistencia mínima  $R_{TC}$  dada por:

$$R_{TC} = \frac{4 R_m}{5 \times 10^5} \quad (3)$$

Puesto que la  $R_m$  de una célula infectada durante 5-7 horas con VSV es 40.3 M $\Omega$  (Tabla VII), la ecuación (3) predice que la monocapa tendrá una resistencia de al menos 322  $\Omega\text{cm}^2$ . Un cálculo similar para las células infectadas con FLU durante 13-15 horas da una resistencia de 370  $\Omega\text{cm}^2$ . Esto indica que la supresión de la resistencia a través de la monocapa producida por los virus no se debe a su efecto sobre la membrana plasmática, sino a un efecto sobre la ruta para celular limitada por las uniones estrechas. La apertura de estas uniones, juntamente con el debilitamiento de la adhesión al sustrato, resulta en el redondeamiento y desprendimiento de las células en una etapa subsecuente. Sin embargo, nuestra información se refiere a períodos en los que las células aún forman una monocapa continua. La permeabilidad de las células redondeadas o despegadas no se conoce.

b. Efectos Sobre la Permeabilidad de la Membrana Celular.- Para analizar el posible efecto de los virus sobre -

la permeabilidad de membrana a los iones sodio y potasio se escogieron los flujos unidireccionales de trazadores. Puesto que estos métodos no tienen una resolución temporal adecuada para seguir los efectos tempranos de la penetración viral, recurrimos además a las mediciones eléctricas. Escogimos también estudiar los flujos hasta la quinta hora post infección porque, a pesar del hecho de que para este tiempo la infección ya ha ocurrido y la inserción de las proteínas virales de la cubierta en la membrana plasmática está avanzada, la monocapa aún mantiene su resistencia eléctrica -- (Fig. 12). Estos métodos son los adecuados para analizar el mecanismo de translocación de iones a través de la membrana celular, aunque no dan información respecto a si los mecanismos están situados en el lado apical o basolateral. Sin embargo, la información que se obtiene de los flujos unidireccionales de iones en las células MDCK (Rindler *et al.*, 1979a, b, 1982; Simmons, 1981; Cereijido *et al.*, 1980a, b, 1981a, b, 1982; McRoberts *et al.*, 1982; Aiton *et al.*, 1982), sugiere que: i) la barrera apical tiene un mecanismo pasivo para la translocación de  $\text{Na}^+$  y otro para la translocación de  $\text{Cl}^-$ ; y ii) la barrera basolateral tiene una ATPasa común que bombea  $\text{Na}^+$  intercambiándolo por  $\text{K}^+$ , y un mecanismo de cotransporte pasivo del tipo llamado "sistema  $\text{Na}^+ + \text{K}^+ = 2\text{Cl}^-$ " (Field, 1978; Frizzel *et al.*, 1979).

Durante la inoculación, la resistencia eléctrica de la membrana plasmática y el potencial intracelular de las células infectadas con VSV muestra un decremento claro y rápido. Este pudiera atribuirse al aumento de la permeabilidad a  $K^+$  que se observa por el incremento de bombeo de este ion. Este virus parece desacoplar la bomba de  $Na^+-K^+$ , ya que no se observa un aumento correspondiente en el bombeo de  $Na^+$ . Por consiguiente, la penetración de este virus provoca una estimulación significativa de la permeabilidad de  $K^+$ . La penetración de este ión es lo suficientemente grande como para modificar el potencial de membrana y suprimir la asimetría de la curva I/V. Por otra parte el FLU que había disminuido inicialmente la resistencia eléctrica de membrana, en este período de la infección (una hora) con FLU parece haber recuperado su valor normal, el potencial de membrana está ligeramente disminuido. Aunque en este tiempo postinfección el eflujo total de sodio está dentro de los valores control, hay un pequeño aumento del componente pasivo, y un decremento del bombeo de este ion. Pudiera ser que la disminución del bombeo fuera una consecuencia del aumento en la salida pasiva de sodio; sin embargo, para poder determinar esto sería necesario determinar los contenidos intracelulares de este ion durante la inoculación. Llama la atención que el VSV produzca una alteración exclusiva del siste

ma de transporte localizado en la membrana basolateral de estas células y que el FLU modifique el situado en membrana apical. No obstante, estudios recientes sobre la penetración y el destino de los virus en el interior de la célula, indican que los cambios de pH están involucrados en estos fenómenos (Matlin *et al.*, 1981). Es posible, entonces, que las modificaciones en la conductancia de membrana observados en esta tesis se deban también a movimientos de  $H^+$ .

Durante la gemación viral (quinta hora postinfección), el VSV tiene ya un efecto citopático, a juzgar por el aumento en el número de ampollas en las monocapas y que la resistencia transepitelial comienza a caer. El transporte pasivo de  $K^+$  está considerablemente disminuido; probablemente el aumento en el contenido intracelular de sodio sea una consecuencia de esta disminución. Sin embargo, los cambios en los flujos de estos iones producidos por el VSV no son lo suficientemente drásticos como para explicar la caída en la resistencia de membrana (Tabla VII), de manera que es posible que durante la gemación de este virus el sistema tenga fugas que no se deban ni a sodio ni a potasio.

Durante la gemación viral, el FLU no ha modificado la resistencia transepitelial de la monocapa y tampoco se observan alteraciones en el número o tamaño de las ampollas. Esto pudiera indicar que la infección con este virus no tie

ne mayor efecto citopático en este período de la infección. Por otra parte, la bomba de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  parece desacoplarse, ya que se observa un ligero aumento en el bombeo de K y una -- disminución considerable en el de  $\text{Na}^+$ ; esta disminución --- tiene como consecuencia un aumento en el contenido intracelular de sodio (Tabla VI). Por lo tanto, los resultados del análisis de los flujos no apoyan la noción de que la gema-- ción polarizada del FLU de la membrana apical, y el VSV de la basolateral, afecta los mecanismos de translocación de - iones localizados en estas regiones de la membrana plasmáti ca.

Tanto el VSV como el FLU modifican el movimiento activo de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Aun en el caso de los movimientos activos no se tiene la certeza de que los cambios observados se deban a efectos directos sobre la bomba misma, ya que este mecanismo puede también estar influenciado por el suplemento de ATP, el que a su vez depende de las modificaciones que - los virus pudieran estar causando al metabolismo celular. - No obstante, se observa que los virus producen una disociación del acoplamiento normal  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ , ya que el FLU disminuye el bombeo de sodio sin modificar el de potasio, el VSV - aumenta la velocidad de translocación activa del  $\text{K}^+$  sin provocar un efecto detectable en el bombeo de  $\text{Na}^+$ . Estos efectos de los virus sobre la estequiometría de la bomba deberían ser motivo de estudios futuros.

LOS MICROFILAMENTOS, LA UNIÓN ESTRECHA Y LA  
GEMACIÓN POLARIZADA DEL VSV EN CELULAS MDCK.

1) Resultados.

a. Gemación Polarizada del VSV.- Como se mencionó en la Introducción, estudios de la distribución de glicoproteínas de cubierta viral en monocapas epiteliales utilizando microscopía de inmunofluorescencia e inmunoelectromicroscopía con ferritina, indicaron que la gemación polarizada es precedida por la distribución de las proteínas virales de cubierta en el dominio correspondiente de la membrana plasmática (Rodríguez-Boulán y Pendergast, 1980).

En los estudios que realizamos y que se describen a continuación, se utilizó un anticuerpo de conejo anti-virus que puede reconocer a la proteína de cubierta viral, o al virus íntegro, y un anticuerpo de chivo anti-conejo fluorescente que reconoce al primer anticuerpo. De esta manera, se puede detectar por microscopía de fluorescencia el sitio de la membrana de la célula epitelial donde está gemando el virus. Para estos estudios se eligió el virus de la estomatitis vesicular (VSV), dado que la gemación de éste por la membrana basolateral de las células MDCK infectadas muestra, al ser examinada por microscopía de inmunofluorescencia, un patrón típico de anillo fluorescente alrededor de cada célula al enfocar la superficie apical de la monocapa (Fig. 5).

Este patrón es el resultado de la acumulación de antígenos virales y viriones en los espacios intercelulares y basolaterales de la membrana plasmática (Rodríguez-Boulán y Pendergast, 1980). Si la gemación basolateral del VSV se modificara por el tratamiento con las drogas que se describen, la fluorescencia no se limitaría a los espacios intercelulares y membrana basolateral, sino que estaría presente también en membrana apical en forma de puntos fluorescentes, característica de la gemación de virus que se acumulan en microvellosidades (Fig. 5). El tratamiento con distintas drogas y/o en distintas condiciones, puede modificar cuantitativamente el patrón de fluorescencia en la cara basolateral: los anillos pueden aparecer más o menos homogéneamente teñidos y pueden tener un grosor variable. La interpretación del patrón cualitativo continúa siendo, sin embargo, que la gemación ocurre en la cara basolateral. Así pues, adoptamos como criterio de tinción basolateral el que las células presenten su centro no marcado, y como criterio de tinción apical el que el centro celular aparezca teñido.

El proceso de gemación se siguió con una cámara de televisión conectada a una grabadora de video, tal como se describió en el Capítulo de Métodos. Tratándose de una televisión en blanco y negro, los puntos donde gema el virus aparecen en blanco y el resto en negro. Sin embargo, la in

tensidad de la imagen en la pantalla se puede graduar, de modo que si ésta es máxima, toda la imagen aparecerá blanca, y si es mínima, la imagen en la pantalla aparecerá en negro, a pesar de que hay sitios por donde esté gemando el virus, y además, por otra parte, siempre hay un fondo de fluorescencia (autofluorescencia, marcación inespecífica, etc.). - Esto planteó la necesidad de determinar una única intensidad, fijarla, y utilizarla luego para observar toda la monocapa infectada. La figura 22 ilustra el criterio seguido. Se trata de exactamente la misma área registrada a tres intensidades distintas. En la foto A, la intensidad es excesiva, el fondo es muy luminoso y, a pesar de que se distingue claramente que el centro celular aparece obscuro, la foto carece de nitidez. En la C, la intensidad se ha reducido tanto que, a pesar de que sigue siendo posible distinguir entre los bordes teñidos y los centros oscuros, la imagen aparece demasiado esfumada y vaga. En la fotografía B se ha optimizado en cambio el contraste por lo que se fijó entonces la intensidad a la que conseguimos esta imagen y con esta intensidad se examinaron todas las monocapas, lo que hace que todas las fotografías sean comparables.

En las monocapas control (Fig. 23), esto es, monocapas infectadas pero que no fueron tratadas con las drogas que se utilizaron en este estudio, la inmunofluorescencia obser

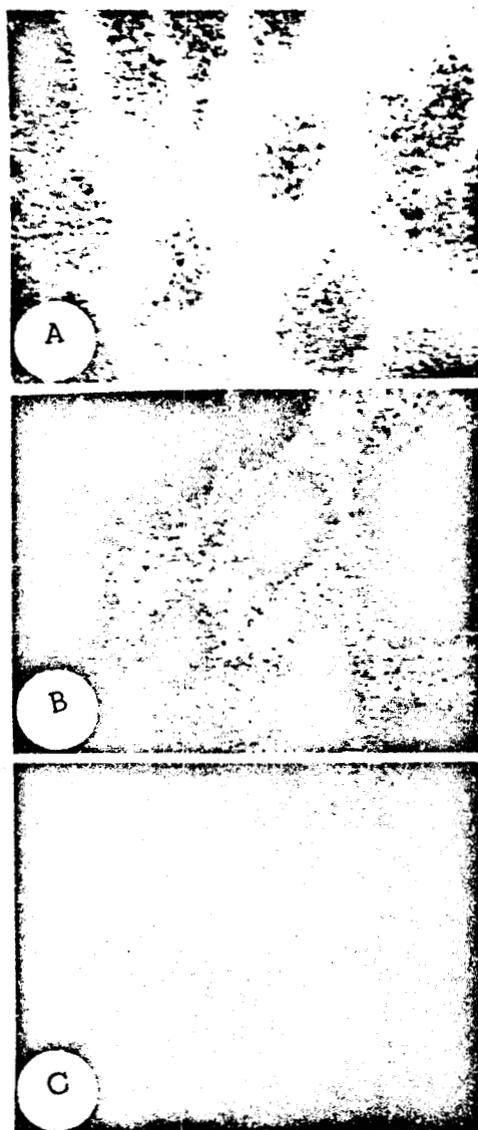


Figura 22. La intensidad de luz en las fotografías. Tres fotografías - de la misma región de una monocapa de células MDCK tomadas a diferentes intensidades para ilustrar el criterio adoptado en el análisis de las imágenes obtenidas en los estudios de inmunofluorescencia. Las fotografías fueron tomadas de la pantalla de un televisor en serie con una cámara de video conectada al microscopio (descrito en Métodos). La intensidad de luz en la pantalla del televisor puede ajustarse hasta lograr imágenes muy iluminadas como la A) o muy oscuras como la C). - Se considera que la fotografía B está correctamente iluminada, de manera que la intensidad de luz del televisor se fijó en este grado, y se utilizó así para analizar 927 células (Tabla IX). Las fotografías se tomaron con una cámara Polaroid.

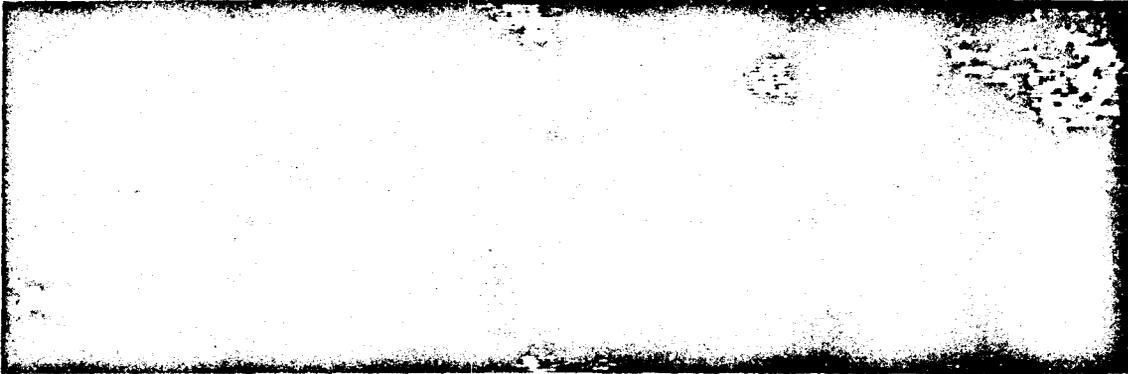


Figura 23. Localización de los viriones de VSV en monocapas de células MDCK. Las monocapas de células MDCK al quinto día de sembradas a confluencia sobre cubreobjetos de vidrio fueron infectadas con VSV (10 PFU/ml). Cinco horas postinfección, las células se fijaron con formaldehído 3.7% en PBS y se trataron primero con un anticuerpo de chivo anti-VSV y después con uno de conejo antichivo fluoresceinado. Las fotografías fueron tomadas como se indica en la figura 22. La inmunofluorescencia aparece distribuida de manera no continua en los espacios intercelulares y no está presente en el centro de las células (región apical de la membrana).

vada cinco horas después de la infección muestra los espacios intercelulares teñidos. Sin embargo, el espacio intercelular no está marcado homogéneamente, sino que aparece como un collar con unos puntos teñidos y otros oscuros. En la fotografía se observan claramente cuatro anillos fluorescentes a mano izquierda; no obstante, el 19% de las células examinadas presentaron su centro teñido (Tabla IX).

b. Efecto del Tratamiento con EGTA.- Con el fin de permitir la penetración de los anticuerpos anti VSV y el fluoresceinado a la región basolateral y como consecuencia obtener una mejor tinción, las monocapas se trataron con EGTA - 2 mM durante dos minutos antes de la quinta hora postinfección a 37°C. Esta penetración es posible porque el tratamiento con EGTA abre las uniones estrechas (Cereijido *et al.*, 1978). El patrón de fluorescencia se observa en la figura 24; A muestra los anillos fluorescentes que delimitan a las células homogéneamente marcados. Dado que la unión estrecha está abierta, los espacios intercelulares se van ensanchando a medida que pasa el tiempo y aumenta el grosor del anillo fluorescente. En la figura 24, B y C, se observa claramente que la región apical no teñida se ha encogido, pero las células no tienen su centro marcado. En algunos casos el centro oscuro se desvanece (Fig. 24 D, dos células a la izquierda): de 118 células examinadas, 22 presen--

TABLA IX. Distribución del Anticuerpo Inmunofluorescente Contra el VSV en Monocapas de Células MDCK Cultivadas Sobre Cubre-objetos de Vidrio.\*

Condiciones	Células Analizadas	Centros Marcados	Porcentaje
Control	26	5	19
EGTA <sup>+</sup>	118	22	19
Cit. B (1.5 hs) <sup>‡</sup>	359	110	31
Cit. B (2 hs)	97	71	73
Cit. B (1 h) EGTA	327	63	38

\*Células del pasaje 76 al tercer día de sembradas.

<sup>+</sup>EGTA 2.0 mM 2 min.

<sup>‡</sup>Citocalasina B 5 µg/ml.

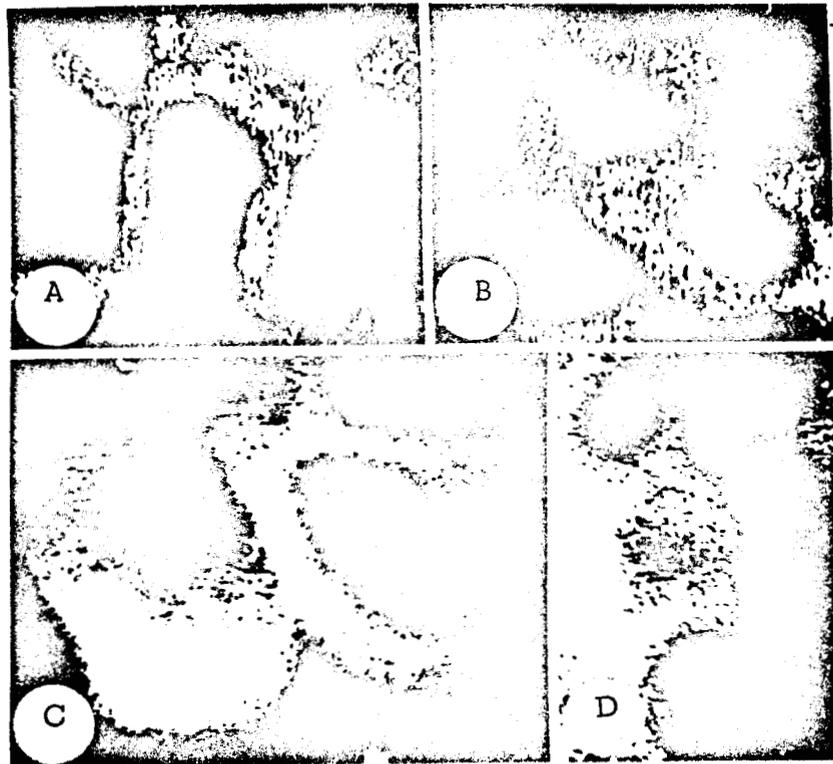


Figura 24. Efecto del tratamiento con EGTA sobre la distribución de los viriones de VSV en monocapas de células MDCK. Las monocapas fueron tratadas en las mismas condiciones que se indican en la figura 23, excepto porque las células fueron tratadas con EGTA 2 mM durante dos minutos antes de ser fijadas a 37°C. En A y en B se observan los anillos fluorescentes que delimitan a por lo menos tres células. El espacio intercelular aparece homogéneamente teñido, en contraste a lo observado en la figura 23 (monocapas control), debido a que el anticuerpo penetra con facilidad a la zona basolateral. En C se observa otra zona de la monoca pa donde el anillo se ha engrosado como consecuencia de la difusión de la marca basolateral sobre el dominio apical. En D la célula central muestra puntos fluorescentes en su centro (membrana apical). El 19% de las células analizadas mostraron su centro marcado (Tabla IX).

tan la región apical completamente invadida por la marca -- fluorescente, lo que constituye el mismo porcentaje que en las células no tratadas (Tabla IX).

c. Efecto del Tratamiento con Citocalasina B.- Uno de los objetivos de este estudio era discernir el papel de los microfilamentos en la gemación polarizada del VSV en células MDCK. Para esto, tratamos a la monocapa infectada con citocalasina B, un metabolito del hongo *Helminthosporium dematisideum*, que inhibe la polimerización de la actina --- (Stossel, 1977). La figura 25 muestra los resultados obtenidos con monocapas MDCK a la quinta hora postinfección con VSV, y que durante la última hora habían estado en contacto con 5 µg/ml de citocalasina B. En este caso, los interespacios aparecen intensamente marcados (Fig. 25 A, C y D). Se observa que la cara apical, aunque reducida y con límites borrosos, es la última zona en teñirse (en la figura 25 A - en la parte inferior y en la E hay tres células con los límites borrosos). En la figura 25 B y E se observa una célula con su centro teñido; de 359 células analizadas, 110 tenían su centro marcado (Tabla IX). A medida que el tratamiento con citocalasina B se prolonga, los anillos fluorescentes se van engrosando hasta que la marca invade el centro de las células. Así, por ejemplo, cuando la monocapa infectada permanece en contacto con citocalasina B (5 µg/ml)

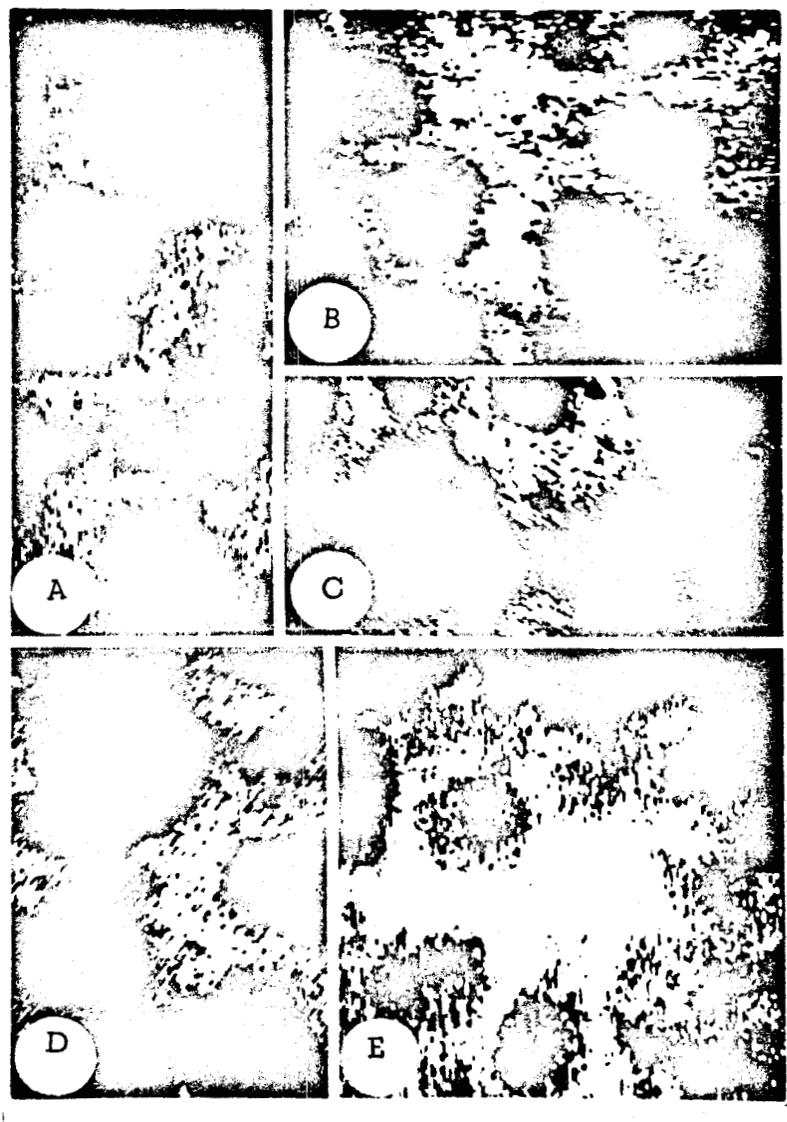


Figura 25. Efecto del tratamiento con citocalasina B sobre la distribución de los viriones de VSV en monocapas de células MDCK. -- Las monocapas fueron tratadas en las mismas condiciones que se indican en la figura 23, excepto porque las células fueron tratadas con citocalasina B 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durante una hora antes de ser fijadas. Al igual que en el tratamiento con EGTA, en este caso los anillos fluorescentes aparecen homogéneamente marcados y su grosor ha aumentado, de manera que parece que éste avanza como frente de onda sobre la membrana apical. En A, C, y D se observan los espacios intercelulares homogéneamente teñidos. En B y E la célula central tiene su centro teñido. De las células analizadas, el 31% presentaron su centro teñido (Tabla IX).

durante las dos últimas horas antes de la quinta hora post-infección, el 73% de las células analizadas tienen su centro homogéneamente marcado (Tabla IX).

d. Tratamiento Combinado con Citocalasina B y EGTA. - -  
Con el fin de observar mejor el efecto producido por el tratamiento con citocalasina B, se trataron las monocapas infectadas con EGTA (2 mM) durante dos minutos para permitir la penetración de los anticuerpos a la zona basolateral. --  
Para ello las monocapas infectadas con VSV fueron tratadas durante una o dos horas con citocalasina B y durante los últimos dos minutos antes de la quinta hora postinfección, -- las uniones estrechas se abrieron con EGTA 2 mM a 37°C. La Tabla IX muestra que el tratamiento combinado no modifica - sustancialmente los resultados obtenidos con citocalasina B sola. La figura 26 (citocalasina B una hora, EGTA dos minutos) muestra el mismo fenómeno de engrosamiento de los anillos descrito en la parte b y c de estos resultados. Si el tratamiento con citocalasina B se prolonga a dos horas, las células se redondean, se separan una de la otra y la gemación polarizada tiende a perderse (Fig. 27).

## 2) *Discusión.*

Como se mencionó en la Introducción, el papel de la unión estrecha y de los microfilamentos en el establecimiento de la polaridad epitelial aún no ha sido elucidado. En -



Figura 26. Efecto del tratamiento con citocalasina B y EGTA sobre la distribución de los viriones de VSV en monocapas de células MDCK. Las monocapas fueron tratadas en las mismas condiciones que se indican en la figura 23, excepto porque las células fueron tratadas con citocalasina B (5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante una hora antes de su fijación y con EGTA (2 mM) los últimos dos minutos. En A y en B el anillo fluorescente aparece engrosado con respecto a las monocapas control; sin embargo, no parece haber efecto aditivo o sinérgico en este tratamiento mixto. Aunque en la fotografía no se muestra ninguna célula con su centro teñido, un 38% de las células analizadas tuvieron tinción apical (Tabla IX).

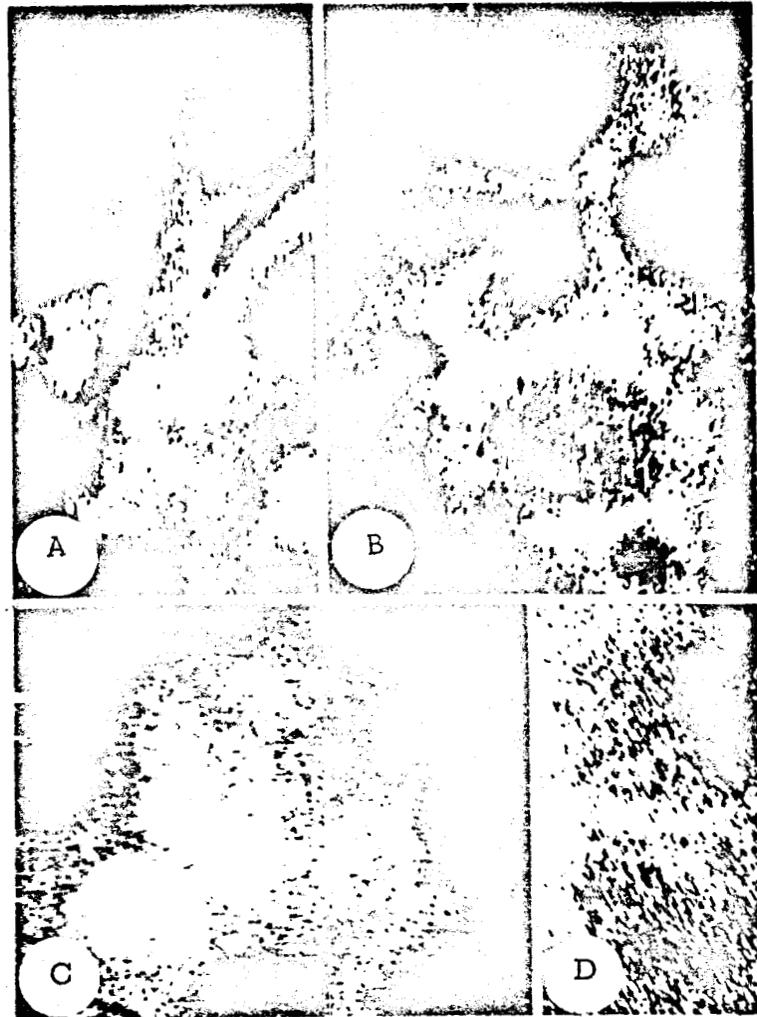


Figura 27. Efecto del tratamiento mixto con citocalasina B y EGTA sobre la distribución de los viriones de VSV en monocapas de células MDCK. Las monocapas fueron tratadas en las mismas condiciones que se indican en la figura 23, excepto porque las células fueron tratadas con citocalasina B (5  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) durante dos horas antes de su fijación y con EGTA (2 mM) los últimos dos minutos. Aunque la mayoría de las células muestran su centro teñido, en B, parte superior, se observa claramente un anillo fluorescente.

los estudios que acabamos de describir, analizamos el papel de dichas estructuras en el mantenimiento de la polaridad - epitelial. Para ello utilizamos dos drogas, una que abre - las uniones estrechas, el EGTA, y otra que previene la poli - merización de los microfilamentos, la citocalasina B, y vi - mos si el tratamiento con éstas modificaba la gemación baso - lateral del VSV.

a, Gemación Polarizada del VSV.- Es probable que el - espacio intercelular entre las células control no esté mar - cado homogéneamente, debido a que la penetración del anti - cuerpo haya sido prevenida por las uniones estrechas. Si la monocapa hubiera sido cultivada sobre un soporte permeable, la resistencia eléctrica sería alta, indicando que las unio - nes estrechas están completamente selladas y el anticuerpo no podría penetrar (Cereijido *et al.*, 1980). Sin embargo, cuando el soporte es impermeable, como es el caso de los -- cubreobjetos utilizados en estos experimentos, muchas de -- las uniones de las regiones sin ampollas están abiertas (Ce - reijido *et al.*, 1981a, b). Esto ha sido atribuido al hecho de que las células MDCK retienen la capacidad para bombear iones y agua del lado apical al basolateral y, consecuen - temente, el fluido acumulado o bien despega la monocapa y for - ma ampollas (Leighton *et al.*, 1969), o bien, la adhesión al soporte prevalece y las uniones estrechas revientan. Esto -

no quiere decir que necesariamente la unión estrecha se abra en todo el perímetro de las células, sino que este perímetro es en cambio una secuencia de fragmentos sellados alternando con zonas de uniones abiertas. Donde hay ampollas las uniones deben estar necesariamente cerradas en todo el perímetro. Así, Dragsten y colaboradores (1981) han mostrado que las proteínas no atraviesan las uniones estrechas entre las células en las regiones en que hay ampollas. Como algunas uniones estrechas están parcialmente abiertas, pero esta apertura no es homogénea y los espacios intercelulares no están ensanchados, la difusión de anticuerpos agregados por la cara apical hacia la basolateral ocurre, aunque no libremente. Como consecuencia, la marcación no es homogénea en todas las células y aun en una célula aparecen zonas teñidas y no teñidas. La observación que un 19% de las células muestran su cara apical fluorescente podría interpretarse de diferentes maneras: i) como que la gemación del VSV por la cara basolateral aunque es preferente, no es excluyente, y ii) en aquellas zonas donde hay una falla en el cierre de la unión estrecha, la proteína G del VSV difunde hacia la membrana apical.

De estas dos posibilidades, la que se considera más viable es la primera, dado que siempre se detectan cantidades variables de proteína G del virus en la superficie api-

cal de las células MDCK infectadas (Rodríguez-Boulán, 1980); por otra parte, se sabe que la enzima intestinal sacarasa - isomaltasa es insertada en la membrana basolateral antes de su aparición definitiva en la superficie apical (Semenza, - 1976; Brunner *et al.*, 1979; Frank *et al.*, 1978; Hauri *et al.*, 1979), y por último, siempre se encuentra una cierta - cantidad de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPasa asociada con el borde en cepillo apical de las células de túbulo renal (Kyte, 1976a, b). Sin embargo, es necesario descartar la segunda posibilidad, para lo cual es importante observar si el tratamiento con -- EGTA, que abre totalmente las uniones estrechas, aumenta la tinción apical.

b. Efecto del Tratamiento con EGTA.- La sustracción de calcio y la adición de EGTA del medio que baña las monoca-- pas MDCK, abre las uniones estrechas y como consecuencia -- abate la resistencia eléctrica (Cereijido *et al.*, 1978; Mar tínez-Palomo *et al.*, 1980). Se sabe que este efecto ocurre también en epitelios naturales (Seder y Fortes, 1964; Meldo lesi *et al.*, 1978). En este estudio se investigó si la --- apertura de las uniones estrechas: i) conduce a una pérdida de la polarización en la gemación viral, ii) provoca una - difusión de la proteína G desde la cara basolateral hacia - la apical, como se sugirió en la parte a de esta discusión, o bien, iii) no tiene influencia sobre el fenómeno en estu-

dio. Dado que el criterio empleado para el análisis de estos estudios fue el considerar a una célula con su centro teñido o no, los resultados indican que no hay diferencia entre las células control y las tratadas con EGTA (19% de las células analizadas presentan el centro teñido en ambos casos). Sin embargo, como se observa en la figura 24, los interespacios teñidos se encuentran considerablemente ensanchados, lo que apoya la opción (ii). Es muy probable que un tratamiento más prolongado con EGTA conduzca a la invasión de la membrana apical por la basolateral.

c. Efecto de la Citocalasina B.- La membrana plasmática no es un organelo celular autónomo sino que su acoplamiento a varias estructuras citoplásmicas y otros organelos es cada vez más evidente, lo que prueba que la superficie celular está bajo estricto control citoplásmico. Eventos complejos tales como la adhesión, "capping", locomoción, endocitosis, etc., parecen requerir comunicación transmembranal y además de uniones estructurales entre la membrana y los componentes del citoesqueleto, en particular con el sistema microfilamentos/microtúbulos, el que parece ser responsable de un gran número de fenómenos de superficie celular asociados con la distribución topográfica de los componentes de membrana (Nicolson, 1976). Así lo prueban varios autores: Albertini y Clark (1975) encontraron que existe

una relación entre microtúbulos y receptores de superficie a concanavalina A en cultivos primarios de células de granulosa de ovario de conejo; Gabbiani (1977) demostró que la unión de concanavalina A a la superficie de células neoplásicas y embrionarias produce disociación de los filamentos de actina y que los receptores de concanavalina A se acumulan al igual que la actina en un polo de la célula; Koch (1978) evidenció que una exoproteína, el antígeno H-2 de histocompatibilidad, está asociada a actina. Algunas líneas de evidencia han sugerido también que los microfilamentos son necesarios en el ensamblaje o gemación de los virus con envoltura (Damsky *et al.*, 1977; Lenk y Penman, 1979).

Por otra parte, Lenk y colaboradores (1977) y Lenk y Penman (1979) han encontrado que la mayoría de los polisomas, estructuras en las que se sintetizan las proteínas, se encuentran asociados al citoesqueleto. No obstante los hallazgos que se acaban de citar, Griffin y Compans (1979) encontraron que la citocalasina B no perjudica el ensamblaje de las proteínas del virus de la influenza. Por consiguiente, era interesante estudiar si la citocalasina B, que aparentemente no impide la gemación, modificaba la polarización de ésta.

Nosotros observamos que los interespacios aparecen intensamente marcados, pero que no hay una tinción de la membrana apical. El que los interespacios aparezcan intensamente marcados apoya la hipótesis que la droga abre las uniones estrechas (Cereijido *et al.*, 1981a, b; Meza *et al.*, 1981) y como consecuencia de esto: i) favorece el paso del anticuerpo hacia la zona basolateral provocando una tinción homogénea de los bordes celulares, ii) ensancha los espacios intercelulares, aumentando el grosor de los anillos, y iii) produce un encogimiento de la región apical tal que al cabo de dos horas de tratamiento, el 73% de las células tienen su centro marcado. Este último efecto puede interpretarse de dos maneras: 1) como una interdifusión entre la región teñida y la no teñida, y 2) como una invaginación de la membrana apical al interior de la célula. La primera posibilidad se ve favorecida por el hecho de que las imágenes de fluorescencia no muestran un anillo con bordes definidos que avancen como un frente de onda en función del tiempo, sino como una mezcla heterogénea de zonas fluorescentes y no fluorescentes. La segunda posibilidad resultaría muy interesante porque sería la primera vez que se describe una invasión de la membrana apical por la basolateral. Existen evidencias en sentido inverso; por ejemplo, los resultados obtenidos por Murer y Kinne (1980), quienes observaron que

durante la preparación de vesículas de membrana apical o basolateral de células epiteliales, la membrana apical desplaza a la basolateral hasta que ésta queda invaginada en el interior de la vesícula.

Estos resultados descartan a la integridad de los microfilamentos como condición *sine qua non* para el mantenimiento de la polaridad. El desensamble de esta estructura no provoca la gemación equivocada del VSV por la cara apical, aunque sí produce la apertura de las uniones estrechas con la consiguiente pérdida de la polaridad. Así, interpretamos que su efecto sobre la polarización es indirecto, vía las uniones ocluseras, y no directo, vía la inserción vectorial de las proteínas de membrana.

d. Efecto del Tratamiento Combinado con Citocalasina B y EGTA.- Cuando la monocapa de células MDCK se trata simultáneamente con una droga que desensambla microfilamentos (citocalasina B) y otra que abre las uniones estrechas (EGTA) los resultados obtenidos son en todo semejantes a los observados con cada una de las drogas actuando separadamente. Se observa una magnificación no significativa de los efectos, pero no hay un efecto aditivo o una modificación de la gemación polarizada de los virus.

#### CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo se señaló que las dos propiedades fundamentales de los epitelios que transportan son: 1) actuar como barreras a la difusión gracias a las uniones estrechas, y 2) tener sus células estructural, bioquímica y fisiológicamente polarizadas. En la actualidad, una de las preguntas más importantes que aún quedan por resolverse en el estudio de los epitelios es: ¿qué es lo que determina la polarización estructural, y por ende funcional, de las células epiteliales? El desarrollo de líneas celulares que preservan en cultivo las propiedades de los epitelios naturales, así como el hallazgo de que la infección con RNA-virus con cubierta de algunas de estas líneas resulta en la gemación polarizada de los virus por una u otra membrana de la célula epitelial, han contribuido a que el campo para el estudio de la polaridad epitelial esté listo para ser abordado.

En esta tesis se investigaron algunos aspectos relacionados con la polaridad estructural de las células epiteliales, utilizando la línea celular MDCK infectada con RNA-virus con cubierta como sistema modelo para estos estudios. Este Capítulo reúne las principales conclusiones a las que

nos condujeron los resultados de: 1) los estudios de la permeabilidad, 2) el papel de la unión estrecha, y 3) el papel de los microfilamentos. A fin de encuadrar mejor la interpretación de dichas conclusiones, se indica en cada caso la información que conduce a cada conclusión.

1) *Los Estudios de la Permeabilidad.*

a) *Una hora postinfección, el VSV y el FLU modifican los sistemas de transporte membranales ubicados en la membrana basolateral y apical, respectivamente.*

Esta conclusión se basa en los siguientes resultados experimentales:

- El VSV desacopla la ATPasa de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , aumentando el influjo activo de  $\text{K}^+$ , sin que se altere el eflujo activo de  $\text{Na}^+$ . Este virus no modifica los movimientos pasivos de  $\text{Na}^+$  ni de  $\text{K}^+$ .

- El FLU aumenta la salida pasiva de  $\text{Na}^+$  por la cara apical e inhibe el funcionamiento de la bomba.

b) *Cinco horas postinfección, el VSV modifica los sistemas de transporte membranal ubicados en la membrana basolateral y aumenta la permeabilidad de manera inespecífica.*

Esta conclusión se basa en los siguientes resultados -  
experimentales:

- La bomba ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -APTasa) está deprimida y el influjo pasivo de  $\text{K}^+$  también, como consecuencia se acumula el  $\text{Na}^+$  y esto frena la entrada pasiva de  $\text{Na}^+$ . La resistencia transmembranal disminuye, indicando que el sistema tiene fugas - no debidas al transporte de  $\text{Na}^+$  ni  $\text{K}^+$ .

*c) Cinco horas postinfección, el FLU no produce cambios importantes en la permeabilidad y parece haberse recuperado de los efectos observados una hora después de la infección.*

Esta conclusión se basa en los siguientes resultados -  
experimentales:

- Los flujos pasivos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  están iguales que el control, la bomba de  $\text{Na}^+$  está desacoplada y como consecuencia el contenido de  $\text{Na}^+$  está aumentando.

*d) El VSV tiene un efecto citopático a tiempos más tempranos que el FLU.*

Esta conclusión se basa en los siguientes resultados -  
experimentales:

- Cinco horas después de la infección con VSV, las monocapas presentan un gran número de ampollas nuevas; además la resistencia transepitelial de la monocapa disminuye drásticamente en este tiempo.

2) *El Papel de la Unión Estrecha.*

- a) *La apertura de las uniones estrechas no modifica la gemación polarizada del VSV.*

Esta conclusión se basa en los siguientes resultados experimentales:

- El anillo fluorescente que delimita a las células -- aparece homogéneamente marcado, su grosor aumenta pero la -- región apical no aparece teñida.

- b) *Las uniones estrechas juegan un papel importante en el mantenimiento de la polaridad de la membrana.*

Esta conclusión se basa en los siguientes resultados experimentales:

- La apertura de las uniones estrechas permite la interdifusión de los componentes de la membrana basolateral y apical.

3) *El Papel de los Microfilamentos.*

- a) *La depolimerización de los microfilamentos no modifica la gemación polarizada del VSV.*

Esta conclusión se basa en los siguientes resultados experimentales:

- El anillo que delimita a las células aparece homogéneamente teñido, aunque engrosado, a medida que se prolonga el tratamiento con la citocalasina B se observa que la zona apical aparece teñida.

b) *La integridad de los microfilamentos tiene un papel importante en el mantenimiento de la polaridad de -- membrana.*

Esta conclusión se basa en los siguientes resultados experimentales:

- La depolimerización de los microfilamentos permite la interdifusión de los componentes de la membrana basolateral y apical.

CAPÍTULO V: BIBLIOGRAFÍA.

Abaza, N.A., Leighton, J. y Schultz, S.G. (1974) Effects of ouabain function and structure of a cell line (MDCK) derived from canine kidney. *In vitro*, 10: 172.

Aceves, J. y Erlij, D. (1971) Sodium transport across the isolated epithelium of the frog skin. *J. Physiol.*, 212: 195.

Ada, G.L. y Gottschalk, A. (1956) The component sugars of the influenza-virus particle. *Biochem. J.*, 62: 686.

Aiton, J.F., Brown, C.D.A., Ogden, P. y Simmons, N.L. (1982)  $K^+$  transport in "tight" epithelial monolayers of MDCK cells. *J. Membr. Biol.*, 65: 99.

Albertini, D. y Clark J. (1975) Membrane microtubule interaction: concanavalin A capping induced redistribution of cytoplasmic microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 4976.

Alonso, V.F. y Compans, R.W. (1981) Differential effect of monensin on enveloped viruses that form at distinct plasma membrane domains. *J. Cell Biol.*, 89: 700.

Atkinson, P.H. (1978) Glycoprotein and protein precursor to plasma membranes in VSV infected HeLa cells. *J. Supramol. Struct.*, 8: 89.

Aversperg, N. (1969) Histogenetic behaviour of tumors. I- Morphologic variation *in vitro* and *in vivo* of two related human carcinoma cell lines. *J. Nat. Cancer Inst.*, 43: 151.

Bang, F. (1953) The development of Newcastle Disease virus in cells of the chorioallantoic membrane as studied by ; thin section. *Bull. John Hopk. Hosp.*, 92: 309.

Beams, H. y Kessel, R. (1973). The Golgi apparatus: Structure and function. *Int. Rev. Cytol.*, 23: 209.

Beams, H.W. y King, R.L. (1933) The Golgi apparatus in the developing tooth with special reference to polarity. *Anat. Rec.*, 57: 29.

Berridge, M.J. y Oschman, J.L. (1972). *En: Transporting Epithelia*. New York and London. Academic Press.

Biber, T. (1971) Effect of changes in transepithelial transport on the uptake of sodium across the outer surface of the frog skin. *J. gen. Physiol.*, 58: 131.

Biber, T., Aceves, J. y Mandel, L.J. (1972) Potassium uptake across serosal surface of isolated frog skin epithelium. *Am. J. Physiol.*, 222: 1366.

Blobel, G. (1980) Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 1496.

Blobel, G. y Dobberstein, B. (1975) Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J. Cell Biol.*, 67: 852.

Bornstein, M.B. (1973) Organotypic mammalian central and peripheral nerve tissue. En: *Tissue Culture*, Kruse, P. F. y Patterson, M.K. Academic Press, N.Y. Capítulo 12: 86.

Boulpaep, E. (1971) Electrophysiological properties of the proximal tubule: importance of cellular and intercellu-

lar transport pathways. En: Electrophysiology of Epithelial Cells. Ed. G. Giebisch. Stuttgart: Schattauer, p. 91.

Brodsky, W., Ehrenspeck, G. y Kinne, R. (1976) Anion and cation-selective paths in turtle bladder membranes. Fed. Proc., 35: 702.

Brunner, J., Hauser, H., Braun, H., Wilson, K.J., Wacker, H., O'Neill, B. y Semenza, G. (1979) The mode of association of the enzyme complex sucrase-isomaltase with the intestinal brush border membrane. J. Biol. Chem., 254: 1821.

Cajal, R. (1914) Algunas variaciones fisiológicas y patológicas del aparato reticular de Golgi. Trab. Lab. Inv. Madrid, 12: 197.

Carrasco, L. (1978) Membrane leakiness after viral infection and a new approach to the development of antiviral agents. Nature, 272: 694.

Carrasco, L. (1980) Selective inhibition of translation in transformed cells. FEBS Lett., 110: 341.

Carrasco, L. y Smith, A. (1976) Sodium ions and the shutt-off of host cell protein synthesis by picornaviruses. *Nature*, 264: 807.

Cereijido, M., Herrera, F.C., Flanigan, W.J. y Curran, P.F. (1964) The influence on Na concentration on Na transport across frog skin. *J. gen. Physiol.*, 47: 879.

Cereijido, M., Rotunno, C.A. Robbins, E.S. y Sabatini, D.D. (1978a) Polarized epithelial membranes produced *in vitro*. En: *Membrane Transport Processes*. Vol. I. p. 433. Ed. Hoffman. Raven Press, New York.

Cereijido, M., Robbins, E.S., Dolan, W.J., Rotunno, C.A. and Sabatini, D.D. (1978b) Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J. Cell Biol.*, 77: 853.

Cereijido, M., Ehrenfeld, J., Meza, I. y Martínez-Palomo, A. (1980a) Structural and functional membrane polarity in cultured monolayers of MDCK cells. *J. Membr. Biol.*, 52: 147.

Cereijido, M., Stefani, E. y Martínez-Palomo, A. (1980b)  
Occluding junctions in a cultured transporting epithelium structural and functional heterogeneity. *J. Membr. Biol.*, 53: 19.

Cereijido, M., Meza, I. y Martínez-Palomo, A. (1981a)  
Occluding junctions in cultured epithelial monolayers. *Amer. J. Physiol.*, 240: 96.

Cereijido, M., Ehrenfeld, J., Fernández-Castelo, S. y Meza, I. (1981b) Fluxes, junctions and blisters in cultured monolayers of epitheloid cell (MDCK). *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 372: 422.

Chambard, M., Gabrion, J. y Mauchamp, J. (1981) Influence of collagen gel on the orientation of epithelial cell polarity: follicle formation from isolated thyroid cells and from preformed monolayers. *J. Cell Biol.*, 91: 157.

Claude, P. y Goodenough, D. (1973) Fracture faces of zonulae occludentes from tight and leaky epithelia. *J. Cell Biol.*, 58: 390.

Compans, R.W. y Pinter, A. (1975) Incorporation of sulphate into influenza virus glycoproteins. *Viol.*, 66: 151.

Damsky, C.H., Knudsen, K.A., Dorio, R.J. y Buck, C.A. (1981) Manipulation of cell-cell and cell-substratum interactions in mouse mammary tumor epithelial cells using broad spectrum antisera. *J. Cell Biol.*, 89: 173.

Damsky, C.H., Sheffield, J.B., Tuszynski, G.P. y Warren, L. (1977) Is there a role for actin in virus budding? *J. Cell Biol.*, 75: 593.

Douglas, A., Kerley, R., y Isselbacher, K. (1972) Preparation and characterization of the lateral and basal plasma membranes of the rat intestinal epithelial cell. *Biochem. J.*, 128: 1329.

Dragsten, P.R., Blumenthal, R. y Handler, J.S. (1981) Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? *Nature*, 294: 718.

Etchinson, J.R. y Holland, J.J. (1974) Carbohydrate compo-

sition of the membrane glycoprotein of vesicular stomatitis virus. *Virology*, 60: 217.

Etchinson, J.R., Robertson, J.S. y Summers, D.F. (1977)  
Partial structural analysis of the oligosaccharide moieties of the vesicular stomatitis virus glycoprotein by sequential chemical and enzymatic degradation. *Virology*, 78: 375.

Farquhar, M.G. y Palade, G.E. (1963) Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.*, 17: 375.

Farquhar, M.G. (1978) Traffic of products and membranes through the Golgi complex. En: Life Sciences Research Report II. Dahlem Konferenzen. Transport of Macromolecules in Cellular Systems. Ed. Silverstein S.C. p. 341.

Farquhar, M. y Palade, G.E. (1966) Adenosine triphosphatase in amphibial epidermis. *J. Cell Biol.* 30: 369.

Fernández-Puentes y Carrasco, L. (1980) Virus infection permeabilizes mammalian cells to protein toxins. *Cell*, 20: 769.

Field, M. (1978) Some speculations on the coupling between sodium and chloride transport processes in mammalian and teleost intestine. Hoffman, J.F., ed. En: Membrane Transport Processes, Vol. I, New York, Raven Press, p. 277.

Forstner, G., Tanaka, K., y Isselbacher, K. (1968) Lipid composition of the isolated rat intestinal microvillus membrane. Biochem. J. 109: 51.

Frank, G., Brunner, J., Hauser, H., Wacker, H., Semenza, G. y Zuber, H. (1978) The hydrophobic anchor of small intestinal sucrase-isomaltase, N-terminal sequence of the isomaltase subunit. FEBS Lett., 96: 183.

Frizzell, R.A., Field, M. y Schultz, S.G. (1979) Sodium-coupled chloride transport by epithelial tissues. Am. J. Physiol., 236: F1.

Fromter, E. (1972) The route of passive ion movement through the epithelium of Necturus gallbladder. J. Membr. Biol. 8: 259.

Fuchs, P. y Giberman, E. (1973) Enhancement of potassium influx, in baby hamster kidney cells and chicken erythrocytes, during adsorption of parainfluenza 1 (Sendai) virus. FEBS Lett., 31: 127.

Fromter, E. y Diamond, J.M. (1972) Route of passive ion permeation in epithelia. Nature New Biol., 235: 9.

Gabbiani, G., Chaponnier, C., Zumber, A. y Vasalli, P. (1977) Actin and tubulin co-cap with surface immunoglobulins in murine B lymphocytes. Nature (Lond.), 269: 695.

Garoff, H. (1981) The spike glycoprotein of semliki forest virus. A model for plasma membrane proteins. En: International Cell Biology 1980-1981. Schweiger, H.G., ed., Berlin: Springer Verlag, p. 572.

Garoff, H., Frischauf, A.M., Simmons, K., Lehrach, H. y Delvis, H. (1980) Nucleotide sequence of cDNA coding for semliki forest virus glycoproteins. Nature, 288: 236.

Gausch, C.R., Hard, W.L. y Smith, T.F. (1966) Characterization of established line of canine kidney cells (MDCK). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 122: 931.

Genty, N. y Bussereau, F. (1980) Is cytoskeleton involved in vesicular stomatitis virus reproduction? J. Virol., 34: 777.

Gibson, R., Leavitt, R., Kornfeld, S. y Schlessinger, S. (1978) Synthesis and infectivity of vesicular stomatitis virus containing nonglycosylated G protein. Cell, 13: 671.

Gibson, R., Schelessinger, S. y Kornfeld, S. (1979) The nonglycosylated glycoprotein of vesicular stomatitis virus is temperature sensitive and undergoes intracellular aggregation at elevated temperatures. J. Biol. Chem., 254: 3600.

Gillman, J. (1934) The cellular cycle, the Golgi apparatus and the phenomenon of reversla in the human thyroid parenchyma. Anat. Rec., 60: 209.

Gilula, N.B. (1974) Junctions between cells. En: Cell Communication. Ed. Rody Cox M.D. A Wiley Biomedical-Health Publication. New York, p. 1.

Giuffre, R.M., Tovell, D.R., Kay, C.M. y Tyrrell, D.L. (1982) Evidence for an interaction between the membrane protein of a paramyxovirus and actin. *J. Virol.*, 42: 963.

Goldberg, B. (1979) Binding of soluble type I collagen molecules to the fibroblast plasma membrane. *Cell*, 16: 265.

Green, R., Meiss, H.K. y Rodríguez-Boulán, E.J. (1981) Glycosylation does not determine segregation of viral envelope proteins in the plasma membrane of epithelial cells. *J. Cell Biol.*, 89: 230.

Griep, E.B., Robbins, E.S., Dolan, W.J. y Sabatini, D.D. (1981) Role of microfilaments in tight junction formation. *J. Cell Biol.*, 91: 118a.

Griffin, J. y Compans, R. (1979) Effect of cytochalasin B on the maturation of enveloped viruses. *J. Exp. Med.*, 150: 379.

Hauri, H.P., Ouaroni, A. y Isselbacher, K.J. (1979) Biogenesis of intestinal plasma membrane posttranslational route and cleavage of sucrase isomaltase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5183.

Hay, A.J. (1974) *Virology* 60: 398.

Hay, E.D. y Revel, J.P. (1969) Fine structure of the developing avian cornea. En: *Monographs in Developmental Biology*, Wolsky, A., Chen, P.S. (Eds.) Basel: Karger, Vol. I.

Hatanaka, M., Huebner, R.J. y Gilden, R.V. (1969) Alterations in the characteristics of sugar uptake by mouse cells infected by murine sarcoma viruses. *J. Natl. Cancer Inst.*, 43: 1091.

Hess, R. y Falcon, L. (1977) Observations on the interaction of baculoviruses with the plasma membrane. *J. Gen. Virol.*, 36: 525.

Hiedrich, H., Kinne, R., Kinne-Saffran, E. y Hannig, K. (1972) The polarity of the proximal tubule cell in rat kidney: different surface charges for the brush-border microvilli and plasma membranes from basal infoldings. *J. Cell Biol.*, 54: 232.

Hunt, L., Etchinson, J. y Summers, D. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 754.

Hoi Sang, V., Saier, M.H. y Ellisman, M.H. (1980) Tight junction is closely linked to the polar redistribution of intramembranous particles in aggregating MDCK epithelia. *Exp. Cell Res.*, 122: 384.

Imprain, C.C., Foster, K.A., Micklem, K.J. y Pasternak, C. A. (1980) Nature of virally mediated changes in membrane permeability to small molecules. *Biochem. J.*, 187: 847.

Isselbacher, K.J. (1972) Increased uptake of amino acids and 2-deoxy-D-glucose by virus. Transformed cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69: 585.

Johnson, D.C. y Schlesinger, M. (1980) Vesicular stomatitis virus and sindbis virus glycoprotein transport to the cell surface is inhibited by ionophores. *Viol.*, 103: 407.

Kääriäinen, L., Hashimoto, K., Saraste, J., Virtanen, I. y Penttinen, K. (1980) Monensin and FCCP inhibit the intracellular transport of alphavirus membrane glycoproteins. *J. Cell Biol.*, 87: 783.

Kalkar, H.M., Ullrey, D., Kijimoto, S. y Hakomori, S. (1973)

Carbohydrate catabolism and the enhancement of uptake of galactose in Hamster cells transformed by Polyoma Virus. Proc. Natl. Acad. Sci., 70: 839.

Katz, F. y Lodish, H. (1979) Transmembrane biogenesis of the vesicular stomatitis virus glycoprotein. J. Cell. Biol., 80: 416.

Katz, F., Rothman, J., Lingappa, V., Blobel, G. y Lodish, H. (1977) Membrane assembly *in vitro*. Synthesis, glycosylation and asymmetric insertion of a transmembrane protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 3278.

Kawai, K., Fujita, M., y Nakao, M. (1974) Lipid components of two different regions of an intestinal epithelial cell membrane of mouse. Biochim. Biophys. Acta, 369: 222.

Kinne, R. y Kinne-Saffran, E. (1978) Differentiation of cell faces in epithelia. En: Biophysics, Vol. 2. Ed. Harward Books, p. 272.

Kirkman, H. y Severinghaus, A.E. (1938) A review of the Golgi apparatus II. Anat. Records., 70: 557.

Klemperer, H.G. (1960) An effect of phloridzin on influenza virus elution and on neuraminidase activity. *Viol.*, 12: 495.

Klenk, H.D. y Choppin, P.W. (1970) Glycosphingolipids of plasma membranes of cultured cells and an enveloped virus (SVS) grown in these cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 66: 57.

Klenk, H.D., Compans, R.W. y Choppin, P.W. (1970) An electron microscopic study of the presence or absence of neuraminic acid in enveloped viruses. *Viol.* 42: 1158.

Klenk, H.D., Schwarz, R.T., Schmidt, M.F.G. y Wollert, W. (1977) The structure and biosynthesis of the carbohydrate moiety of the influenza virus hemagglutinin. En: *Topics in Infectious Disease*. Springer-Verlag, New York Berlin. p. 83.

Knaut, H. y Fromter, E. (1970) Elektrische untersuchungen am hauptaus fuhrungang der speicheldrusen des menschen. *Pflugers Arch. Ges. Physiol.* 316: 259.

Knudsen, K.A., Rao, P.E., Damsky, C.H. y Buck, C.A. (1981)  
Membrane glycoproteins involved in cell substratum adhesion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 6071.

Koch, L.E. and M.J. Smith (1978) An association between actin and the major histocompatibility antigen H-2. Nature (Lond.) 273: 274.

Koefoed-Johnsen, V. y Ussing, H.H. (1958) The nature of the frog skin potential. Acta Physiol. Scand. 42: 298.

Kyte, J. (1976a) Immunoferritin determination of the distribution of  $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase over the plasma membrane of renal convoluted tubules. I. Distal Segment. J. Cell Biol., 68: 287.

Kyte, J. (1976b) Immunoferritin determination of the distribution of  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  ATPase over the plasma membrane of renal convoluted tubules. II. Proximal Segment. J. Cell Biol. 68: 304.

Kyte, J. (1972) Properties of the two polypeptides of sodium and potassium dependent adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem., 247: 7642.

Lenard, J. (1978) Virus envelopes and plasma membranes. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 7: 139.

Lenard, J. y Compans, R.W. (1974) The membrane structure of lipid-containing viruses. *Biochim. Biophys. Acta.* 344:51.

Leighton, J., Brada, Z., Estes, L. y Justh, G. (1969) Secretory activity and oncogenicity of a cell line (MDCK) derived from canine kidney. *Science* 163: 472.

Leighton, J., Estes, L.W., Mansukhani, S. y Brada, Z. (1970) A cell line derived from normal dog kidney (MDCK) exhibiting qualities of papillary adenocarcinoma and renal tubular epithelium. *Cancer*, 26: 1022.

Lenk, R., Ransom, L., Kaufmann, Y. y Penman, Sh. (1977). A cytoskeletal structure with associated polyribosomes obtained from HeLa cells. *Cell* 10: 67

Lenk, R. y Penman, Sh. (1979) The cytoskeletal framework and poliovirus metabolism. *Cell* 16: 289.

Lennarz, W.J. (1981) The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans. New York: Plenum Press, p. 35.

Lewis, B., Gray, G., Coleman, R., y Michell, R. (1975) Differences in the enzymic, polypeptide, glycolipid and phospholipid compositions of plasma membranes from the two surfaces of intestinal epithelial cells. *Biochem. Soc. Transact.* 3: 752.

Lingappa, V., Katz, F., Lodish, H. y Blobel, G. (1978) A signal sequence for the insertion of a transmembrane glycoprotein. Similarities to the signals of secretory proteins in primary structure and function. *J. Biol. Chem.*, 253: 8667.

Lissitzky, S., Fayet, G. y Giraud, A. (1971) Thyrotropin-induced aggregation and reorganization into follicles of isolated porcine thyroid cells. I-Mechanism of action of thyrotrophin and metabolic properties. *Eur. J. Biochem.*, 24: 88.

Lodish, H.F., Braell, W.A., Schwartz, A.L., Strous, G. y Zilberstein, A. (1980) Synthesis and assembly of membrane and organelle proteins. *Int. Rev. Cytol.*, 12: 247.

Louvard, D. (1980) Apical membrane aminopeptidase appears at site of cell-cell contact in cultured kidney epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4132.

Madin, S.H. y Darby, N.B. (1958) Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,  
98: 574.

Martínez-Palomo A. y Erlíj, D. (1975) Structure of tight  
junctions in epithelia with different permeability. Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA, 72: 4487.

Martínez-Palomo, A., Meza, I., Beaty, G. y Cerejido, M.  
(1980) Experimental modulation of occluding junctions in  
a cultured transport epithelium. J. Cell Biol., 87: 736.

Matlin, K.S., Reggio, H., Helenius, A. y Simons, K. (1981)  
Infectious entry pathway of influenza virus in a canine  
kidney cell line. J. Cell Biol., 91: 601.

Mauchamp, J., Gabrion, J. y Bernard, P. (1979) Morpholo-  
gical and electrical polarity of the thyroid epithelium  
reconstructed in culture. Inserm., 85:43.

Maylie-Pfenninger, M.F. y Jamieson, J.D. (1979) Distribu-  
tion of cell surface saccharides on pancreatic cells. J.  
Cell Biol., 80: 77.

McGrath, C.M. (1971) Replication of mammary tumor virus in

tumor cell cultures: dependence on hormone-induced cellular organization. *J. Nat. Cancer Inst.*, 47: 455.

McSharry, J.J. y Wagner, R.R. (1971) Carbohydrate composition of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 7: 412.

McRoberts, J.A., Erlinger, S., Rindler, M.J. y Saier, M.H. (1982) Furosemide sensitive salt transport in the Madin-Darby Canine Kidney Cell-Line: evidence for cotransport of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$ . *J. Biol. Chem.*, 257: 2260.

Meiss, H.K., Green, R. y Rodríguez-Boulán (1982) Lectin resistant mutants of polarized epithelial cells. *Molec. Cell Biol.*, 2: 1287.

Meldolesi, J., Castiglioni, G., Parma, R., Nassivera, N., y De Camilli, P. (1978)  $\text{Ca}^{++}$ -dependent disassembly and reassembly of occluding junctions in guinea pig pancreatic acinar cells. *J. Cell Biol.* 79: 156.

Meza, I., Ibarra, G., Sabanero, M., Martínez-Palomo, A. y Cereijido, M. (1980) Occluding junctions and cytoskeletal components in a cultured transporting epithelium. *J. Cell Biol.*, 87: 746.

Meza, I., Sabanero, M., Stefani, E. y Cereijido, M. (1982) Occluding junctions in MDCK cells. Modulation of trans-epithelial permeability by the cytoskeleton. *J. Supramol.*

Minjou, W., Threlfall, G., Verhoeyen, M., Devos, R., Saman, E., Fang, R., Huylebroek, D., Fiers, W., Barber, C. Carey, N. y Emtage, S. (1980) Complete structure of hemagglutinin gene from human influenza A/Victoria/3/75 (H3N2) strain as determined from cloned DNA. *Cell*, 19: 683.

Misfeldt, D.S., Hamamoto, S.T. y Pitelka, D.R. (1976) Trans-epithelial transport in cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 1212.

Morre, D.J. (1977) The Golgi apparatus and membrane biogenesis. En: *Cell Surface Reviews*. Poste, G., Nicolson, G. L. eds. Amsterdam: Elsevier/North-Holland, p. 1.

Morre, D.J., Kartenbeck, J. y Franke, W.W. (1979) Membrane flow and interconversions among endomembranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 559: 71.

Moyer, S.A., Tsang, J.M., Atkinson, P.H. y Summers, D.F.

(1976) J. Virol., 18: 167.

Murphy, J. y Bang, F. (1952) Observations with the electron

microscope on cells of the chick chorio-allantoic mem-

brane infected with influenza virus. J. Exp. Med., 95:

259.

Murer, H., Hopfer, U., Kinne-Saffran, E. y Kinne, R. (1974)

Glucose transport in isolated brush-border and lateral-

basal plasma-membrane vesicles from intestinal epithe-

lial cells. Biochim. Biophys. Acta, 345: 170.

Murer, H. y Kinne, R. (1980) The use of isolated membrane

vesicles to study epithelial transport processes. J.

Membr. Biol., 55: 81.

Muresan, V. y Jamieson, J.D. (1980) Asymmetric distribution

of sialo-glycoconjugates on the plasmalemma of pancrea-

tic acinar cells. Eur. J. Cell. Biol., 22: 276.

Nakamura, K. y Compan, R. (1979) Biosynthesis of the oligo-

ssacharides of influenza viral glycoproteins. Virol., 93:

31.

Nakamura, K. y Compans, R.W. (1977) The cellular site of sulfation of influenza viral glycoproteins. *Virology*, 79: 381.

Negreanu, Y., Reinhertz, Z. y Kohn, A. (1974) Effects of adsorption of u.v. -inactivated parainfluenza (Sendai) virus on the incorporation of amino acids in animal host cells. *J. Gen. Virology*, 22: 265.

Nicolson, G.L. (1976) Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. I. Cytoplasmic influence over cell surface components. *Biochim. Biophys. Acta*, 457: 57.

Ojakian, G.K. (1981) Tumor promoter-induced changes in the permeability of epithelial cell tight junctions. *Cell*, 23: 95.

Okada, Y., Koseki, I., Kim, J., Maeda, Y., Hashimoto, T., Kanno, Y. y Matsui, Y. (1975) Modification of cell membranes with viral envelopes during fusion of cells with HVJ (Sendai virus) I. Interaction between cell membranes and virus in the early stage. *Exp. Cell Res.*, 93: 368.

Palese, P., Tobita, K., Ueda, M. y Compans, R.W. (1974) Characterization of a temperature sensitive mutant of influenza virus defective in neuraminidase. *Virology*, 61: 397.

Parodi, A.J. y Leloir, L.F. (1979) The role of lipid intermediates in the glycosylation of proteins in the eukaryotic cell. *Biochim. Biophys. Acta*, 559: 1.

Pasternak, C.A. y Micklem, K.J. (1973) Permeability changes during cell fusion. *J. Membr. Biol.*, 14: 293.

Pasternak, C.A. y Micklem, J.J. (1974a) The biochemistry of virus-induced cell fusion. Changes in membrane integrity. *Biochem. J.*, 140: 405.

Pasternak, C.A. y Micklem, K.J. (1974b) Virally mediated membrane changes: inverse effects on transport and diffusion. *Biochem. J.*, 144: 593.

Pickett, P.B., Pitelka, D.P., Hamamoto, S.T. y Misfeldt, D.S. (1975). Occluding junctions and cellular behaviour in primary cultures of normal and neoplastic mammary cells. *J. Cell. Biol.* 66: 316.

Pinter, A. y Compans, R.W. (1975) Sulfated components of enveloped viruses. *J. Virol.*, 16: 859.

Pisam, M. y Ripoché, P. (1976) Redistribution of surface macromolecules in dissociated epithelial cells. *J. Cell Biol.*, 71: 907.

Pricam, C., Humbert, F., Perrelet, A. y Orci, L. (1974) A freeze-etch of tight junctions of the rat kidney tubules. *Laboratory Investigation*, 30: 286.

Quaroni, A., Kirsch, K. y Weiser, M.M. (1979) Synthesis of membrane glycoproteins in rat small intestinal villus cells. Effect of colchicine on the redistribution of L 1, 5, 6-<sup>3</sup>H fucose labeled membrane glycoproteins among Golgi lateral, basal and microvillus membranes. *J. Biochem.*, 1983; 213.

Richardson, J.C. y Simmons, N. (1979) Demonstration of protein asymmetries in the plasma membrane of cultured renal (MDCK) epithelial cells by lactoperoxidase mediated iodination. *FEBS Lett.*, 105:201.

Rindler, M.J., Chuman, L.M., Shaffer, L. y Saier, M.H.

(1979a) Retention of differentiated properties in an established dog kidney epithelial cell line (MDCK) J. Cell Biol., 81: 635.

Rindler, M.J., Ivanov, I.E., Rodríguez-Boulán, E.J. y Sabatini, D.D. (1982) Biogenesis of epithelial cell plasma

membranes. En: Membrane Recycling. CIBA Foundation Symposium Vol. 92. Pitman Books. Ltd., London (en prensa).

Rindler, M.J., McRoberts, J.A. y Saier, M.H. (1982) ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )

-co-transport in the Madin-Darby Canine Kidney Cell Line. Kinetic characterization of the interaction between  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ . J. Biol. Chem., 257: 2254.

Rindler, M.J., Taub, M. y Saier, M.H., Jr. (1979b) Uptake

of  $^{22}\text{Na}^+$  by cultured dog kidney cells (MDCK) J. Biol. Chem., 254: 11431.

Robertson, M., Etchinson, J., Robertson, J. y Summers, D.

(1978) Cell, 13: 515.

Rodríguez-Boulán, E. (1983b) Membrane biogenesis, enveloped

RNA viruses, and epithelial polarity. En: Modern Cell Biology. Alan R. Liss, Inc. New York, p. 119.

Rodríguez-Boulán, E., Paskiet, K.T. y Sabatini, D.D. (1983a) Assembly of enveloped viruses in Madin-Darby Canine kidney cells: Polarized budding from single attached cells and from clusters of cells in suspension. *J. Cell Biol.*, 96: 866.

Rodríguez-Boulán, E. y Pendergast, M. (1980) Polarized distribution of viral envelope glycoproteins in the plasma membrane of infected epithelial cells. *Cell*, 20:45.

Rodríguez-Boulán, E. y Sabatini, D.D. (1978) Asymmetric budding of viruses in epithelial monolayers: A model system for study of epithelial polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 5071.

Rose, J. (1980) Complete intergenic and flanking sequences from the genome of vesicular stomatitis virus. *Cell*, 19: 415.

Roth, M.G., Fitepatrick, J. y Compans, R.W. (1979) Polarity of influenza and vesicular stomatitis virus maturation in MDCK cells. Lack of requirement for glycosylation of viral glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 6430

Rothman, J. y Fine, R. (1980) Coated vesicles transport newly synthesized membrane glycoproteins from endoplasmic reticulum to plasma membrane in two successive stages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 780.

Sabatini, D.D., Kreibich, G., Morimoto, T. y Adesnik, M. (1982) Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles. J. Cell Biol., 92: 1.

Schachter, H. (1974) Advances in Cytopharmacology. Vela. Ceccarelli, B., Clementi, F., y Meldolesi, I., eds. New York, Raven Press, p. 207.

Schmidt, M.F.G. y Schlesinger, M.J. (1979) Fatty acid binding to vesicular stomatitis virus glycoprotein: A new type of post translational modification of the viral glycoprotein. Cell, 17: 813.

Schmidt, M.F.G. y Schlesinger, M.J. (1980) Relation of fatty acid attachment to the translation and maturation of vesicular stomatitis and sindbis virus membrane glycoproteins. J. Biol. Chem., 255: 3334.

Schwarz, R.T., Schmidt, M.F.G., Anwer, U. y Klenk, H.D. (1977) Carbohydrates of influenza virus. I. Glycopeptides

- derived from viral glycoproteins after labeling with radioactive sugars. *J. Virol.*, 23: 217.
- Schwartz, I., Shlitz, L., Kinne-Saffran, E. y Kinne, R. (1974) Target cell polarity and membrane phosphorylation in relation to the mechanism of action of antidiuretic hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 2595.
- Seder, A.W. y Fortes, J.F. (1964) Effects of calcium depletion on the junctional complex between oxyntic cells of gastric glands. *J. Cell Biol.*, 22: 173.
- Semenza, G. (1976) Small intestinal disaccharides: Their properties and role as sugar translocators across natural and artificial membranes. En: *Membrane Transport, Enzymes of Biological Membranes*, Vol. 3 Martonosi, A. (ed.) New York: Plenum, p. 349.
- Simons, N.L. (1981) Ion transport in "tight" epithelial monolayers of MDCK cells. *J. Membr. Biol.*, 59: 105.
- Stefani, E. y Cereijido, M. (1983) Electrical properties of cultured epithelioid cells (MDCK). *J. Membr. Biol.*, 73:177.
- Stossel, T.P. (1977) Contractile proteins in phagocytosis: an examples of surface-to-citoplasm communication. *Fed. Proc.* 36: 2181.

Strous, G.J.A.M. t Lodish, H.F. (1980) Intracellular transport of secretory and membrane proteins in hepatoma cells infected by vesicular stomatitis virus. *Cell*, 22: 709.

Sugrue, S.P. y Hay, E.D. (1981) Response of basal epithelial cell surface and cytoskeleton to solubilized extracellular matrix molecules. *J. Cell Biol.*, 91: 45.

Tabas, I. y Kornfeld, S. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253: 7779.

Takatsuki, A., Khono, K. y Tamura, G. (1975) Inhibition of biosynthesis of polyisoprenol sugars in chick embryo microsomes by tunicamycin. *Agric. Biol. Chem.*, 39:2089.

Tartakoff, A.M. (1980) The Golgi complex: crossroads for vesicular traffic. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 22: 227.

Rothman, J.E. (1981) The Golgi apparatus: two organelles in tandem. *Science*, 213: 1212.

Tartakoff, A.M. y Vasalli, P. (1978) Comparative studies of intracellular transport of secretory proteins. *J. Cell Biol.*, 79: 694.

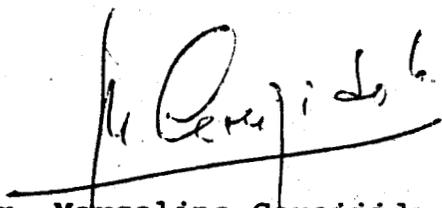
- Tartakoff, A.M. y Vasalli, P. (1977) Plasma cell immunoglobulin secretion. Arrest is accompanied by alterations of the Golgi complex. *J. Exp. Med.*, 146: 1332.
- Trelstad, R.L. (1970) The Golgi apparatus in chick corneal epithelium: Changes in intracellular position during development. *J. Cell Biol.*, 45: 34.
- Uchida, N., Smilowitz, H. y Tanzer, M.L. (1979) Monovalent ionophores inhibit secretion of procollagen and fibronectin from cultured human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 76: 1868.
- Venuta, S. y Rubin, H. (1973) Sugar transport in normal and Rous sarcoma virus-transformed chick-embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 70: 653.
- Wang, E., Wolf, B.A., Lamb, R.A., Choppin, P.W. y Goldbert, A.R. (1976) The presence of actin in enveloped viruses. *En: Cell Motility. Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation*, R. Goodman, T. Pollard y J. Rosenbaum (ed.), Vol. 3, p. 589.
- Weber, M.J. (1973) Hexose transport in normal and in Rous sarcoma virus-transformed cells. *J. Biol. Chem.*, 218:2978.

Whaley, W. y Dauwalder, M. (1979) The Golgi apparatus, the plasma membrane and functional integration. *Int. Rev. Cytol.*, 58: 199.

Young, R.W. (1973) The role of the Golgi complex in sulfate metabolism. *J. Cell Biol.*, 57: 175.

Ziomeck, C.A., Schulman, S. y Edidin, M. (1980) Redistribution of membrane proteins in isolated mouse intestinal cells. *J. Cell Biol.*, 86: 849.

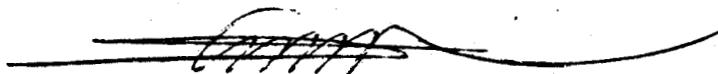
El Jurado designado por el Departamento de Ciencias de la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, aprobó la presente Tesis de Maestría a los quince días del mes de diciembre de mil novecientos ochenta y tres.



Dr. Marcelino Cereijido M.



Dra. Graciela Beaty P.



Dr. Sergio Estrada-O.