



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias  
División de Estudios de Posgrado

EFFECTO DE LA DEXAME TASONA EN LA  
EXPRESION, SINTESIS Y ACTIVIDAD DE LA  
ATPASA DE SODIO Y POTASIO EN CELULAS  
DEL EPITELIO ALVEOLAR PULMONAR TIPO 2

T E S I S

Que para obtener el Grado Académico de  
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

p r e s e n t a

NORA PATRICIA BARQUIN ALVAREZ

Director de Tesis: Dr. Moisés Selman



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

262872

1998



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a los miembros de mi comite tutorial: Dra. Annie Pardo, Dr. Ruy Pérez-Tamayo, Dr. Moisés Selman y al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, todo el apoyo que me brindaron para la realización de este trabajo.

## INDICE

Introducción	2
Objetivos	23
Hipótesis	23
Material y métodos	24
Resultados	35
Discusión	44
Referencias	52
Resúmenes	65

## INTRODUCCION

Durante la década pasada, los conceptos relacionados con los mecanismos que mantienen a los alveolos libres de líquido en los pulmones adultos han sido completamente re-evaluados. En la actualidad, se considera que las células del epitelio alveolar desempeñan un papel prominente en esta función, y numerosas evidencias experimentales muestran claramente que el epitelio es muy activo en el transporte de iones y líquidos. La contribución de fuerzas pasivas en la regulación del movimiento de fluidos es probablemente mucho menos importante de lo que se pensó originalmente (1). Estos nuevos conceptos han surgido de observaciones realizadas tanto *in vivo* como en cultivo de células epiteliales alveolares (2-4).

El epitelio alveolar forma una capa continua de células que recubren el alveolo. La superficie epitelial está separada de la fase gaseosa por una capa delgada de líquido sobre la que yace el surfactante, un complejo macromolecular lipoproteico que sirve para reducir tensión superficial en la interfase aire-líquido (5). Diferentes evidencias señalan que el epitelio alveolar es el primer factor en mantener el volumen y la composición en el líquido que recubre el epitelio.

El epitelio alveolar está compuesto de dos tipos de células, los neumocitos tipo 1, que representan de 35 - 50 % de la población epitelial del parénquima pulmonar y los neumocitos tipo 2 (6). Las células tipo 1 son muy alargadas (5000 - 7000  $\mu\text{m}^2$ ) aplanadas y delgadas, y cubren el 95% de la pared alveolar. Estas células desempeñan un papel fundamental en el intercambio gaseoso y probablemente se originan a partir de las células tipo 2, que proliferan después del daño (7, 8). Los neumocitos tipo 2 son más pequeños (100 - 200  $\mu\text{m}^2$ ), tienen forma cuboidal y se encuentran en las

esquinas de los alveolos. Estas células han sido muy estudiadas porque secretan el surfactante pulmonar y diversas citocinas.

### **METODOS USADOS PARA EXPLORAR EL TRANSPORTE ALVEOLAR**

Los estudios experimentales para analizar el transporte de iones y líquidos en el pulmón no han sido fáciles dada la compleja estructura pulmonar. Se han realizado experimentos usando tres diferentes metodologías y cada una presenta ventajas y desventajas; pero con la integración de los datos obtenidos por los distintos enfoques se ha podido obtener información sobre los posibles mecanismos de transporte. La primera técnica que se usó fue la perfusión de líquidos *in vivo*, posteriormente se hicieron estudios en pulmón aislado y finalmente en cultivos de células tipo 2 aisladas de pulmón. Los experimentos de perfusión, ya sea *in vivo* o en el pulmón aislado, consisten en llenar el órgano de líquido y determinar el tiempo en que el agua y los solutos entran y salen a través del epitelio alveolar y aparecen de nuevo en el líquido perfundido (9, 10). Las limitaciones del modelo son varias, entre otras, que la composición del líquido instilado es arbitraria y la función normal del epitelio puede ser alterada. Asimismo, la molécula que se desea estudiar debe atravesar diversos compartimentos que incluyen a las células epiteliales, el intersticio pulmonar, y las células endoteliales antes de regresar al líquido perfundido y ser eliminadas. Otros problemas técnicos adicionales son: que los pulmones pueden haber sido llenados de forma incompleta o el líquido perfundido no haber sido distribuido de manera uniforme; además, el transporte del epitelio puede ser diferente de un lugar a otro (11).

Bajo estas condiciones es difícil saber con precisión cual es la fracción del epitelio que contribuye al transporte, que células están involucradas y cual es la magnitud del transporte

transepitelial neto. Asimismo, variaciones sutiles en el transporte activo no se pueden demostrar fácilmente.

Por otro lado, aunque los modelos *in vivo* tienen como ventaja, el estar más cercanos a las condiciones normales, ya que la perfusión bronquial y el drenaje linfático se mantienen, presentan el inconveniente de que el uso de drogas como la ouabaina, que es muy importante para el estudio del transporte, no se puede llevar a cabo por su toxicidad.

En este contexto, y con objeto de resolver los problemas en la interpretación de resultados que presentan los experimentos de perfusión, se ha estudiado el transporte epitelial en cultivo de células de pulmón, principalmente células tipo 2. Los mecanismos de transporte también se han analizado en membranas plasmáticas aisladas de estas células (3, 4).

### TRANSPORTE TRANSEPITELIAL

Históricamente los fisiólogos han aplicado la ley de Starling para describir el movimiento de fluidos en el pulmón. Esta se basa en las fuerzas oncóticas e hidrostáticas y en el coeficiente de reflexión de las macromoléculas. Sin embargo, este enfoque ha derivado principalmente del estudio de líquidos a través de los capilares en la circulación sistémica, sin incluir al transporte activo. En este sentido, no es satisfactorio para describir el transporte a través del alveolo y los capilares pulmonares.

El epitelio alveolar transporta activamente  $\text{Na}^+$ , y el agua fluye pasivamente del alveolo al intersticio. La regulación del volumen de líquidos en el alveolo es muy importante para el intercambio de gases; normalmente, el volumen del líquido alveolar es muy bajo y el intercambio de gases muy eficiente; no obstante, cuando el alveolo se inunda como ocurre por ejemplo en el

edema pulmonar agudo, el intercambio gaseoso se ve muy comprometido, y los pacientes con esta afección sufren de una grave y muchas veces letal insuficiencia respiratoria (12).

Se ha sugerido que el epitelio es la barrera más importante y crucial para prevenir esta inundación alveolar (13). Sin embargo, varios aspectos del transporte alveolar transepitelial no se conocen con precisión, por ejemplo, cuales son las células involucradas, cual es la magnitud del transporte transepitelial neto en condiciones normales y patológicas, y finalmente, cual es el transporte neto de macromoléculas como las proteínas.

Los primeros estudios que sugirieron la existencia de un transporte transepitelial neto fueron las observaciones de la formación de domos en cultivos primarios de células tipo 2 (3, 4). La formación de domos refleja el transporte neto de iones, aunque el número de domos no sólo se relaciona con el transporte por la monocapa sino que involucra a otros factores como la adherencia al sustrato donde se cultivan. De hecho, los domos no son el sitio donde se efectúa el transporte sino la ruta de escape del líquido que se encuentra atrapado debajo de la monocapa (14).

Lo importante de los domos es que se forman dentro de los tres primeros días de cultivo cuando las células tipo 2 retienen a sus característicos cuerpos lamelares.

Durante períodos más largos (5-14 días) las células tipo 2 se pueden mantener en filtros recubiertos de colágena y colocados en cámaras donde se pueden medir sus propiedades bioeléctricas como la corriente de corto circuito, resistencia transepitelial y diferencias de potencial de circuito abierto a través de las monocapas. Bajo estas condiciones la diferencia de potencial del circuito abierto a través de la monocapa es de 1 mV, con la parte apical negativa con respecto a la basolateral (15).

El lado apical negativo implica transporte activo del catión de la parte apical a la superficie basal, o de secreción activa de un anión de la superficie basal a la apical. Con experimentos de sustitución de iones y con el uso de inhibidores específicos como el amiloride, se ha llegado a la conclusión de que hay un transporte neto de  $\text{Na}^+$  de la parte apical a la basal y no hay evidencias de secreción de aniones como el cloro (16).

Los mecanismos involucrados en el transporte basolateral y apical han sido elucidados parcialmente y en este sentido se ha demostrado que la ATPasa de  $\text{Na}^+$  y K desempeña un papel en el transporte de sodio y en el de fluidos. Las evidencias que sugirieron que esta enzima es la responsable del transporte activo de iones, derivaron de experimentos de inhibición con ouabaina, así como por la detección de la enzima en la membrana plasmática basolateral de células tipo 2 y no de los neumocitos tipo I por medio del uso de técnicas inmunohistoquímicas (17).

En los experimentos con ouabaina por ejemplo, se observó que ésta disminuye la formación de domos y las diferencias de potencial eléctrico en las monocapas de células crecidas en filtros; además, disminuye la absorción de fluidos del alveolo cuando se agrega al líquido de perfusión en preparaciones de pulmón aislados de ratas (3, 18).

La absorción del líquido (el movimiento de la parte apical a la basolateral) sigue al transporte de sodio. Los iones de  $\text{Na}^+$  que entran a las células epiteliales en la membrana apical son bombeados afuera de la célula en la membrana basolateral por la ATPasa de  $\text{Na}^+$  y K. El  $\text{Na}^+$  fluye a favor del gradiente químico, mientras que el transporte basolateral requiere de energía porque mueve a los iones en contra del gradiente. Por la actividad de la bomba, el gradiente electroquímico del K es mayor en el interior de la célula, el potasio sale por la membrana basolateral y después se recicla por la actividad de la ATPasa de  $\text{Na}^+$  y K (19, 20) (Figura 1).

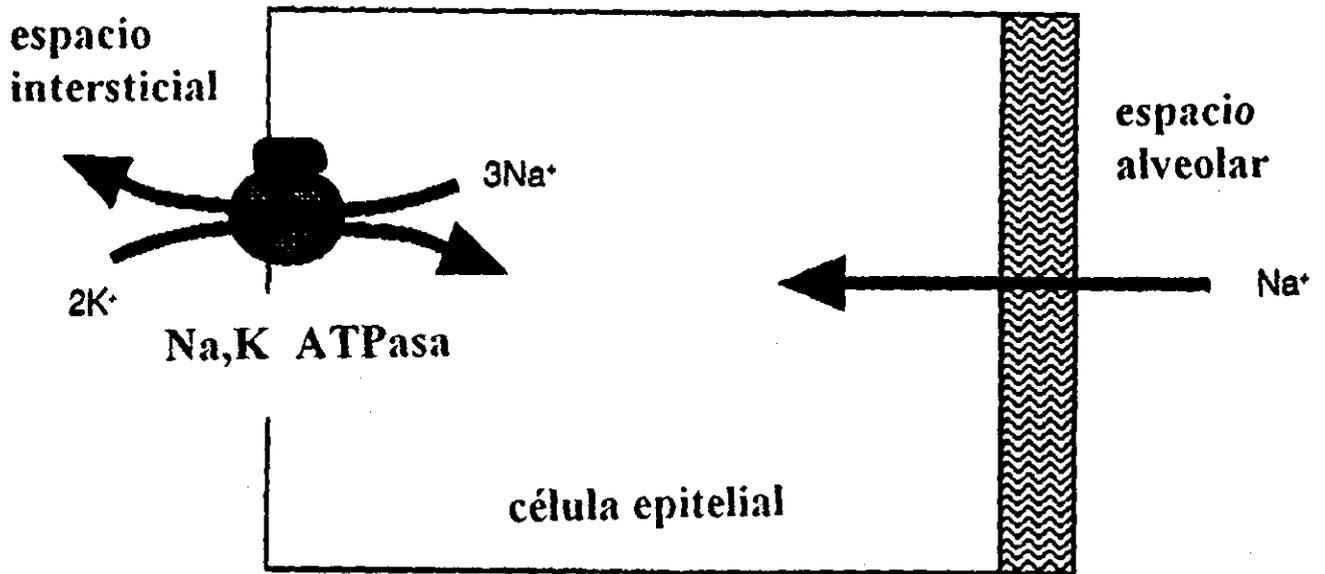


Figura 1

### ATPASA DE NA Y K

La ATPasa de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  es una proteína integral de membrana que se encuentra en las células de todos los eucariotes superiores y es responsable del transporte de los iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de la membrana celular usando el ATP como fuente de energía (21).

Por cada tres sodios que bombea hacia afuera, dos iones potasio son bombeados hacia adentro. Esto produce un gradiente químico y eléctrico a través de la membrana celular. El gradiente eléctrico es esencial para mantener el potencial de reposo de las células en general, y la

excitabilidad de las células musculares y nerviosas. El gradiente de sodio es usado para numerosos procesos de transporte, incluyendo la translocación de glucosa, aminoácidos y otros nutrientes dentro de la célula, así como para la reabsorción de agua (22, 23).

Fisiológicamente la ATPasa de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  desempeña un papel fundamental en órganos como el intestino y los riñones que regulan la reabsorción de fluidos y el movimiento de electrolitos estableciendo un gradiente a través de la membrana del epitelio (24).

Se calcula que alrededor del 23% del ATP consumido en humanos en reposo es utilizado en la bomba de sodio. La ATPasa de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  es específicamente inhibida por glicósidos cardíacos, como la ouabaina y la digoxina, lo cual ha facilitado el estudio de sus mecanismos (25).

La ATPasa de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  consiste de dos subunidades, la  $\alpha$  que es la catalítica y la  $\beta$  que es una glicoproteína multifuncional. La subunidad  $\alpha$  (112 kDa) es una proteína integral de membrana que contiene de 6 a 10 dominios que la atraviesan (Figura 2); esta subunidad presenta el sitio de unión para  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , ATP y  $\text{P}_i$  y para la ouabaina. El DNA que codifica para las tres isoformas conocidas a la fecha:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ , han sido clonados y éstas parecen ser el producto de tres genes diferentes (26-28) (Figura 3).

El transcrito de la subunidad  $\alpha_1$  es de 3.7 kb. En el cerebro, el músculo esquelético y el músculo liso vascular hay dos transcritos de  $\alpha_2$ , de 5.3 y 3.4 kb respectivamente, que son producidos por poliadenilación diferencial. En el corazón fetal los transcritos de la subunidad  $\alpha_2$  son de 4.5 kb. Para  $\alpha_3$  se genera un transcrito de 4.5 kb en la mayoría de los tejidos y de 6kb en el cerebro fetal y en el corazón del adulto (29-31).

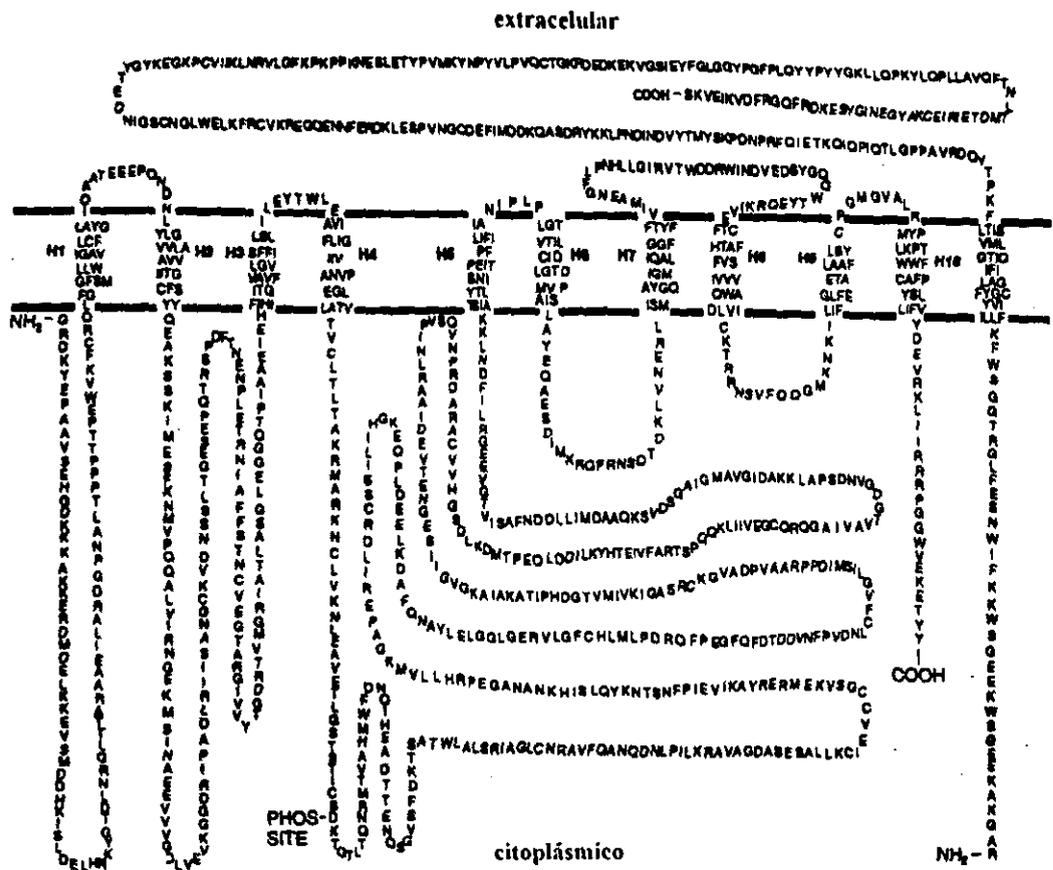


Figura 2

La existencia de diferentes isoformas de la subunidad  $\alpha$  sugiere que tienen diversas propiedades cinéticas. En roedores, la subunidad  $\alpha$  presenta menor sensibilidad a la ouabaina en comparación con las isoformas  $\alpha 2$  ó  $\alpha 3$ , pero esto no sucede en primates (32). Experimentos en donde se han hecho transfecciones de subunidades específicas en células HeLa, han permitido determinar las afinidades específicas para los iones de cada isoforma. Las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  tienen una afinidad similar por el  $K^+$  extracelular, la cual es alrededor de 2.5 veces menor que la de la  $\alpha 3$ . Asimismo, las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  tienen una afinidad similar por el  $Na^+$  intracelular, que es aproximadamente 3 veces mayor que la de  $\alpha 3$  (33).

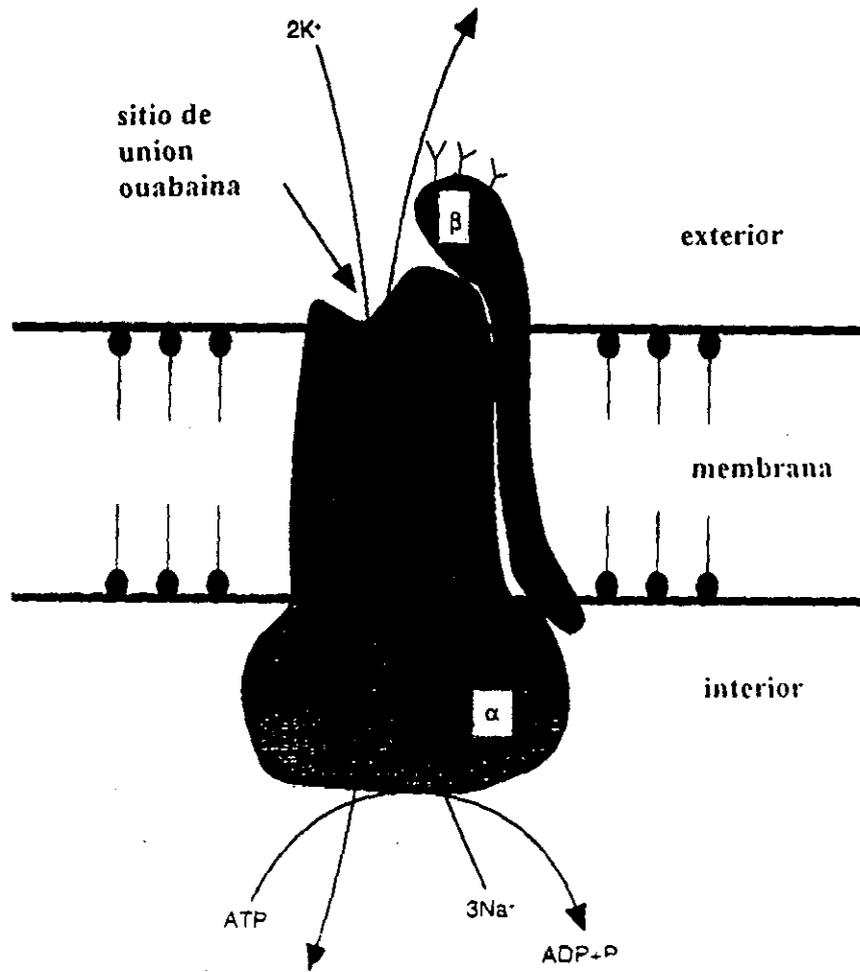


Figura 3

Las diferentes propiedades cinéticas de las isoformas  $\alpha$  sugieren que la expresión de más de una de estas isoformas en células como las del músculo, corazón y células nerviosas no es redundante, sino que posiblemente sea la base de una regulación fina de la actividad de la bomba en estos tejidos.

La subunidad  $\beta$  atraviesa la membrana citoplásmica solo una vez y contiene un dominio extracelular altamente glicosilado. El grado de glicosilación es específico de cada tejido. El peso molecular de la subunidad  $\beta$ , calculado por la movilidad en electroforesis en geles de acrilamida, oscila entre 42 a 55 kDa cuando está completamente glicosilada, pero la parte proteica es de 32 kDa. A la fecha, 3 isoformas de la subunidad  $\beta$  han sido identificadas:  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  (34).

La subunidad  $\beta 1$  está ampliamente distribuida en el organismo, y existe en la mayoría de los tipos celulares. La subunidad  $\beta 2$  fue clonada de cerebro de rata y la subunidad  $\beta 3$  fue clonada del sistema nervioso de anfibios (34, 35).

El tamaño de los transcritos para los genes  $\beta 1$  y  $\beta 3$  es variable lo que proviene de múltiples sitios de iniciación; en cambio, para el gen  $\beta 2$  se ha encontrado un solo transcrito (34, 36).

Las interacciones entre las subunidades  $\beta$  y  $\alpha$  parecen involucrar el dominio extracelular del polipéptido  $\beta$  y la asa extracelular que se encuentra entre los dominios 7 y 8 de la subunidad  $\alpha$ . Existen evidencias de que el dominio transmembranal de la subunidad  $\beta$  se asocia a la subunidad  $\alpha$  y que esta asociación es necesaria para el ensamblaje eficiente de las bombas funcionales (37).

Diversos estudios apoyan el concepto de que por medio de la asociación de las subunidades  $\alpha$  recién sintetizadas con las subunidades  $\beta$ , se facilita la formación de complejos  $\alpha\beta$  activos y se regula el nivel de la enzima que es transportado a la membrana plasmática (38-40). Otras posibles funciones propuestas para la subunidad  $\beta$  es la de estabilizar el complejo  $\alpha\beta$ . (41).

Para la subunidad  $\beta 2$  se ha descrito una actividad adicional que es la de funcionar como molécula de adhesión en células gliales, en donde se encuentra fuertemente unida a la subunidad  $\alpha 2$ . De esta manera, su función como molécula de adhesión puede también relacionarse con la funcionalidad de la bomba. Se ha sugerido que la subunidad  $\beta 2$  puede interactuar con receptores de las células adyacentes, restringiendo la posición de las bombas a una parte específica de la membrana plasmática, lo que resultaría en la polaridad que se observa en las membranas. Es posible que la subunidad  $\beta 2$  pueda funcionar como molécula de adhesión de manera independiente de la subunidad  $\alpha$  (42, 43).

#### **EXPRESION TISULAR DE LA ATPasa DE Na y K+**

El número de bombas en las diferentes células varía en un rango que oscila entre  $8 \times 10^5$  sitios/célula en el páncreas de cobayo,  $5 \times 10^6$  sitios/célula en miocitos de pollo en cultivo, y  $3 \times 10^7$  sitios/célula en las glándulas saladas del pato (44, 45).

Como ya se mencionó, los tejidos también presentan diferencias en las isoformas que contienen. Así por ejemplo, la subunidad  $\alpha 2$  está presente en músculo, corazón, tejido adiposo y cerebro, la subunidad  $\alpha 3$  en corazón y cerebro, y la subunidad  $\alpha 1$  se encuentra en la mayoría de las células.

La isoforma  $\beta 1$  está distribuida de forma muy uniforme, pero está ausente en ciertos astrocitos y células vestibulares del oído (46, 47).

En neumocitos tipo 2 se ha descrito la presencia de las isoformas  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  y en homogenados completos de pulmón se ha encontrado además la subunidad  $\alpha 2$  aunque su origen celular se desconoce (48-50).

Por otro lado, con el uso de sondas específicas y por medio del análisis de northern blot, se ha podido elucidar la cantidad de transcritos que existe en cada tejido. El riñón es el más rico en mRNA de  $\alpha 1$ , el músculo en mRNA de  $\alpha 2$  y el cerebro en mRNA de  $\alpha 3$ . El hígado tiene poco mRNA  $\alpha 1$  y no expresa otra isoforma (51). Sin embargo, la abundancia del mRNA no tiene una relación precisa con la expresión de la proteína, porque la concentración de ésta puede ser modificada por eventos traduccionales y postraduccionales.

En varios tejidos, como por ejemplo en músculo, cerebro, corazón y tejido adiposo, pueden coexistir más de una isoforma en la misma célula. El significado fisiológico de esta aparente duplicación no se ha establecido, pero puede estar relacionado con el mecanismo de regulación que cada una de las isoformas presenta.

La formación del dímero  $\alpha\beta$  ha sido bien documentada, y estudios en levaduras, en donde se han expresado las subunidades de manera selectiva, sugieren que la estabilidad del complejo y la interacción de la proteína con el  $K^+$  difieren dependiendo de las combinaciones de isoformas que se realizaron (41).

En las células, la enzima está sujeta a cambios constantes en su actividad basal y en este contexto se encuentra continuamente regulada por múltiples mecanismos, que van desde las afinidades por el sustrato a su respuesta a una variedad de estímulos fisiológicos hormonales. Por ejemplo, aunque tanto el hígado y el riñón sólo presentan las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ , la ATPasa de  $Na$  y  $K^+$  en estos tejidos presenta diferentes constantes de afinidad. La enzima del hígado tiene una afinidad 50% mayor por los sustratos (52).

## REGULACION DE LA ATPasa DE Na y K+ POR DIFERENTES HORMONAS

La ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> es regulada por varias hormonas (53). Aunque los mecanismos por los cuales las hormonas regulan a la ATPasa no se conocen con precisión, se ha descrito que existen dos tipos de respuesta: a) cambios rápidos y b) cambios sostenidos.

Cuando se necesita un cambio rápido en la actividad de la bomba, por ejemplo cuando se incrementa la ingesta de sal, o en caso de stress o ejercicio, hormonas como la aldosterona y la adrenalina producen respuestas rápidas en los tejidos blanco.

Cuando se requieren cambios sostenidos de actividad, por ejemplo en períodos de crecimiento y reparación de tejidos, hormonas como la tiroidea y algunos factores de crecimiento ejercen este tipo de cambios en la expresión de las subunidades. Es conveniente señalar también que existen hormonas como la insulina y la aldosterona que producen ambos tipos de respuestas.

La aldosterona, que está involucrada en la excreción y reabsorción de sodio en células renales y que produce un estímulo positivo ya sea rápido o sostenido, actúa a través de dos mecanismos de acción: 1) la activación directa de la expresión del gen y 2) a través del incremento del Na<sup>+</sup> intracelular (54, 55).

La insulina regula la homeostasis del potasio a través de la bomba, removiendo el K<sup>+</sup> recapturado en el músculo durante el período postprandial y al mismo tiempo estimulando la recaptura de la glucosa. Con este mecanismo, tanto el ión como la glucosa se almacenan en el tejido muscular. Se han propuesto 4 posibles mecanismos para explicar la acción de la insulina: a) aumento en el Na<sup>+</sup> intracelular, b) aumento en la afinidad por el sodio, c) traslocación de la bomba y d) desfosforilación de la enzima (56, 57).

La hormona tiroidea tiene también un efecto regulatorio sobre la ATPasa Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> incrementando el número de bombas en las células. El tratamiento con hormona tiroidea no parece alterar las propiedades catalíticas de la enzima sino que actúa a nivel de transcripción, estabilidad del mensajero y transporte de los transcritos del núcleo al citoplasma (58, 59).

En contraste con la acción de estas hormonas que es sostenida, las catecolaminas proveen una regulación fina de la enzima provocando respuestas rápidas a modificaciones repentinas del medio ambiente iónico. La dopamina, que reduce la reabsorción tubular renal de Na<sup>+</sup>, ejerce esta acción disminuyendo la actividad de la ATPasa Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> basolateral (60).

### **REGULACION DE LA ATPasa Na y K+ POR GLUCOCORTICOIDES**

Los glucocorticoides (GC) inducen la expresión de ciertas proteínas fetales y de la infancia incluyendo la ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. Se ha descrito que dentro de las numerosas células que presentan receptores para GC se encuentran las células del epitelio alveolar de tipo 2 (61-64).

Una sola inyección de GC incrementa la concentración del mRNA de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  en pulmón, riñón, corazón e intestino delgado de ratas recién nacidas. El efecto de los GC es dependiente de la dosis y ocurre a concentraciones fisiológicas (65, 66).

El corto tiempo que existe entre la inyección de GC y su efecto indica que éstos activan directamente la transcripción del gen sin ninguna proteína intermediaria. Este fenómeno se ha demostrado en ensayos de elongación de cadenas nacientes (nuclear RUN-ON) (67).

La estimulación producida por GC es también dependiente de la edad; en los pulmones la máxima estimulación ocurre alrededor del nacimiento, mientras que en el riñón se observa alrededor del destete (65).

Estudios de hibridización *in situ* en la nefrona han demostrado que la adrenalectomía reduce la abundancia del mRNA de la subunidad  $\alpha 1$ , pero no la de la  $\beta 1$ ; esto ocurre en los segmentos que son sensibles a los mineralocorticoides como es el túbulo distal y el conducto colector cortical. En la corteza renal del adulto los GC no parecen afectar la transcripción, por lo que la adrenalectomía no disminuye la concentración de mRNA; sin embargo, la actividad de la enzima se reduce después de la adrenalectomía, posiblemente como consecuencia de una regulación post-transcripcional mediada por los GC. Se han propuesto dos mecanismos a este nivel, la constitución de una poza intracelular y/o su activación (68-70).

Por otro lado, estas hormonas son importantes en la regulación transcripcional de la ATPasa de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  durante períodos críticos de la maduración cuando la reabsorción de líquidos debe ser aumentada rápidamente. Ya que la disponibilidad de receptores no parece ser un evento importante en la regulación de la ATPasa de  $\text{Na}$  y  $\text{K}^+$ , probablemente los GC interactúen con factores de transcripción que son regulados durante el desarrollo (71).

La maduración del pulmón fetal es regulada por la secreción de cortisol. En el período prenatal, existe un incremento en los GC circulantes que coincide con un aumento concomitante en el mRNA y la actividad de la ATPasa de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , así como en el transporte de fluidos en el pulmón. Probablemente, el aumento de la hormona ayuda a mejorar la función pulmonar del neonato estimulando la maduración de la ATPasa la que a su vez promueve el drenaje del líquido de los alveolos para permitir la entrada del aire. En este sentido, se ha demostrado que el tratamiento de las madres con GC reduce la incidencia del daño pulmonar agudo en niños prematuros (65).

## HORMONAS ADRENOCORTICALES Y SU MECANISMO DE ACCION

Las hormonas adrenocorticales son moléculas de esteroides producidas y liberadas en la corteza adrenal y controladas por la hormona pituitaria ACTH.

Las hormonas esteroidales se clasifican en:

- a) glucocorticoides, que tienen efectos importantes en el metabolismo intermediario.
- b) mineralocorticoides, que presentan como actividad principal la retención de sodio.
- c) esteroides con actividad androgénica o estrogénica.

En los humanos el glucocorticoide más importante es el cortisol, que es sintetizado a partir del colesterol. En ratas la corticosterona es el glucocorticoide más importante (72).

Los corticoesteroides se pueden sintetizar a partir del ácido cólico, modificando el grupo esteroide. Actualmente se producen muchos esteroides sintéticos que son muy importantes desde el punto de vista farmacológico y terapéutico, por ejemplo la hidrocortisona, prednisolona, prednisona, dexametasona, betametasona, etc.(72).

Del mecanismo de acción de los glucocorticoides se sabe lo siguiente: después de entrar a los tejidos se difunden a través de la membrana celular, uniéndose al complejo citoplásmico formado por el receptor y una proteína de choque (HSP90). La proteína de choque es liberada y el complejo hormona-receptor es transportado al núcleo, donde interactúa con los elementos respondedores a glucocorticoides que se encuentran en el DNA, lo que a su vez se traduce en la estimulación o inhibición de la expresión de genes específicos. La modulación de la transcripción cambia la poza de RNA mensajero, y como consecuencia, la síntesis de proteínas es inducida o reprimida. Los genes que codifican para la ATPasa Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> presentan en la región promotora elementos respondedores a GC (64, 73).

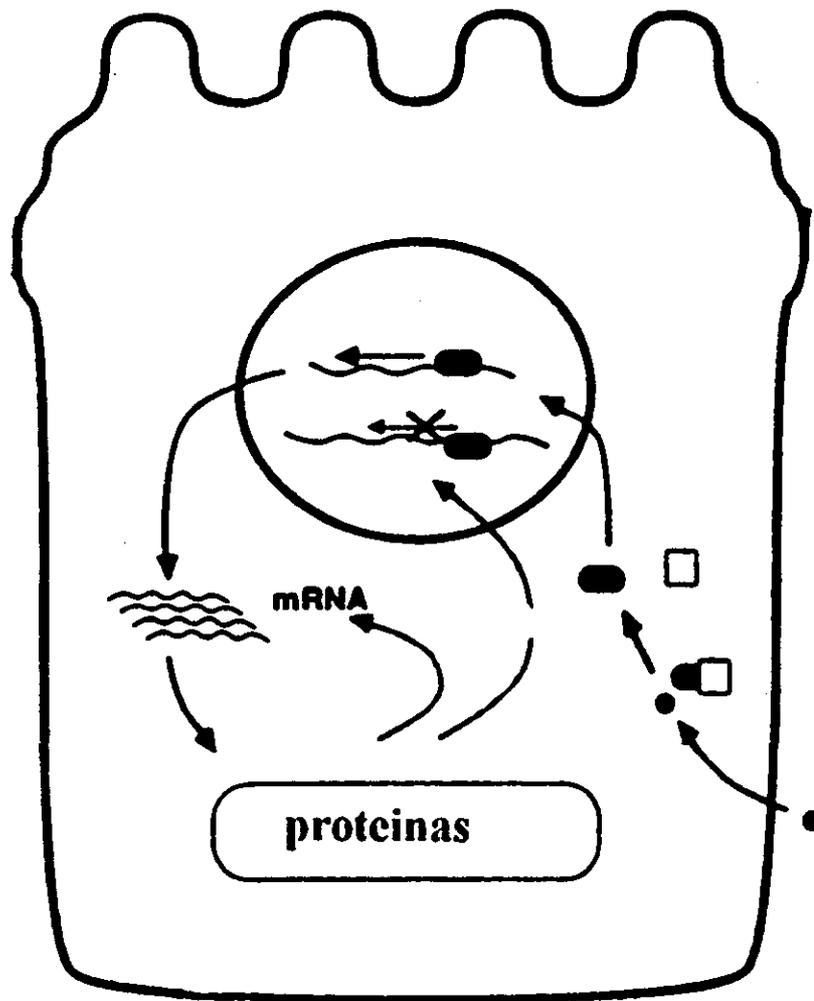


Figura 4

## SINDROME DE INSUFICIENCIA RESPIRATORIA PROGRESIVA DEL ADULTO

El síndrome de insuficiencia respiratoria progresiva del adulto (SIRPA) constituye un proceso patológico dinámico y explosivo que presenta una mortalidad del 50%. Los criterios de diagnóstico para este síndrome son los de daño pulmonar agudo que incluya 5 elementos (74).

- a) Hipoxemia refractaria al uso suplementario de altas concentraciones de oxígeno.
- b) Radiografía de tórax con infiltrados pulmonares difusos.
- c) Distensibilidad pulmonar disminuida.
- d) Antecedente de un evento clínico de alto riesgo.
- e) Ausencia de falla pulmonar congestiva.

El SIRPA es un síndrome multifactorial y las causas se pueden dividir en:

- a) Trauma no torácico, embolismo graso, shock debido a cualquier causa.
- b) Infecciones: septicemia por bacterias gram-negativas, otras infecciones bacterianas, infecciones virales.
- c) Aspiración: aspiración de contenido gástrico, ahogamiento.
- d) Drogas y agentes terapéuticos: heroína, radiación, oxígeno a altas concentraciones, agentes citotóxicos, paraquat.

*La patogénesis del SIRPA ha sido estudiado en pacientes y en modelos animales. El evento temprano más importante es el infiltrado neutrofilico de los capilares en el parénquima pulmonar, con la pérdida de las uniones intercelulares del endotelio (Figura 5). En esta etapa aún no existe falla respiratoria. A las 24 o 48 horas posteriores a la agresión inicial, ocurre una fase exudativa con edema pulmonar agudo e hipoxemia. La siguiente etapa consiste en daño alveolar*

difuso con necrosis de células epiteliales tipo 1 y la formación de membranas hialinas en los espacios aéreos. En la fase proliferativa existe hiperplasia de células tipo 2 las cuales recubren los alveolos y se aprecia un infiltrado inflamatorio de células mononucleares acompañado por la proliferación de fibroblastos y depósito de colágenas intersticiales. Todas estas condiciones se presentan de 4 a 7 días después de la agresión y el paciente muere de insuficiencia respiratoria grave. Si el enfermo sobrevive, las lesiones pueden curar con reabsorción del exudado alveolar y de las membranas hialinas y restitución del epitelio alveolar. Los fibroblastos dejan de proliferar y la colágena depositada en exceso es metabolizada. En estos casos, los pacientes presentan a largo plazo una función pulmonar normal. Otros pacientes que sobreviven al cuadro agudo progresan hacia la fibrosis intersticial difusa, con la aparición de insuficiencia respiratoria crónica (75- 77).

La patogénesis del SIRPA no ha sido claramente establecida; diversos estudios sugieren una importante participación del complemento que facilita el secuestro de neutrófilos del pool marginal. Sólo una pequeña proporción, tal vez una tercera parte de los neutrófilos, circulan activamente en el pulmón. Normalmente estas células no causan daño, pero después de ser activados por el complemento, liberan radicales de oxígeno y diversas enzimas hidrolíticas que dañan el endotelio y los capilares del pulmón. Estudios clínicos han demostrado que un reducido número de neutrófilos en la sangre de pacientes con factores de riesgo para SIRPA es un indicador de que el síndrome se va a desarrollar ya que este hallazgo sugiere que un gran número de neutrófilos se encuentran secuestrados en los capilares del pulmón (78).

En el SIRPA el daño se produce principalmente en la superficie del epitelio alveolar. Las uniones entre las células epiteliales son muy estrechas y el daño en el epitelio se traduce en el paso de un exudado de líquido y proteínas del espacio intersticial al espacio alveolar (79).

Los mecanismos responsables de la reabsorción del edema en el SIRPA en aquellos pacientes que curan no se conocen con certeza. Algunos estudios han sugerido que existe un transporte activo a través del epitelio. Así por ejemplo, experimentos desarrollados en borregos, llenando los pulmones *in vivo* con suero autólogo, han demostrado que el agua se remueve mucho mas rápido que las proteínas y que la concentración de proteínas en los espacios aéreos se incrementa como consecuencia del agua que se ha eliminado. En estos experimentos, la absorción de líquido continúa por varias horas (9, 79). Por otro lado, se sabe que este mecanismo de transporte activo de iones y líquido contribuye a la reabsorción del material intraalveolar que existe en los pulmones al nacer. En este proceso fisiológico, el papel de las células epiteliales tipo 2 como responsables de la remoción de líquidos esta bien determinada, pero no se sabe si presentan las mismas funciones en el pulmón adulto y si éstas pueden ser estimuladas farmacológicamente.

En este contexto, y dadas las implicaciones del transporte transepitelial de fluidos en el pulmón adulto normal y la importancia del transporte activo en el aclaramiento del edema intraalveolar, son necesarios el desarrollo de estudios que permitan entender la naturaleza de este transporte así como desarrollar nuevos tratamientos farmacológicos para aclarar el edema y restaurar el intercambio gaseoso que ocurre después de que el alveolo ha sido inundado.

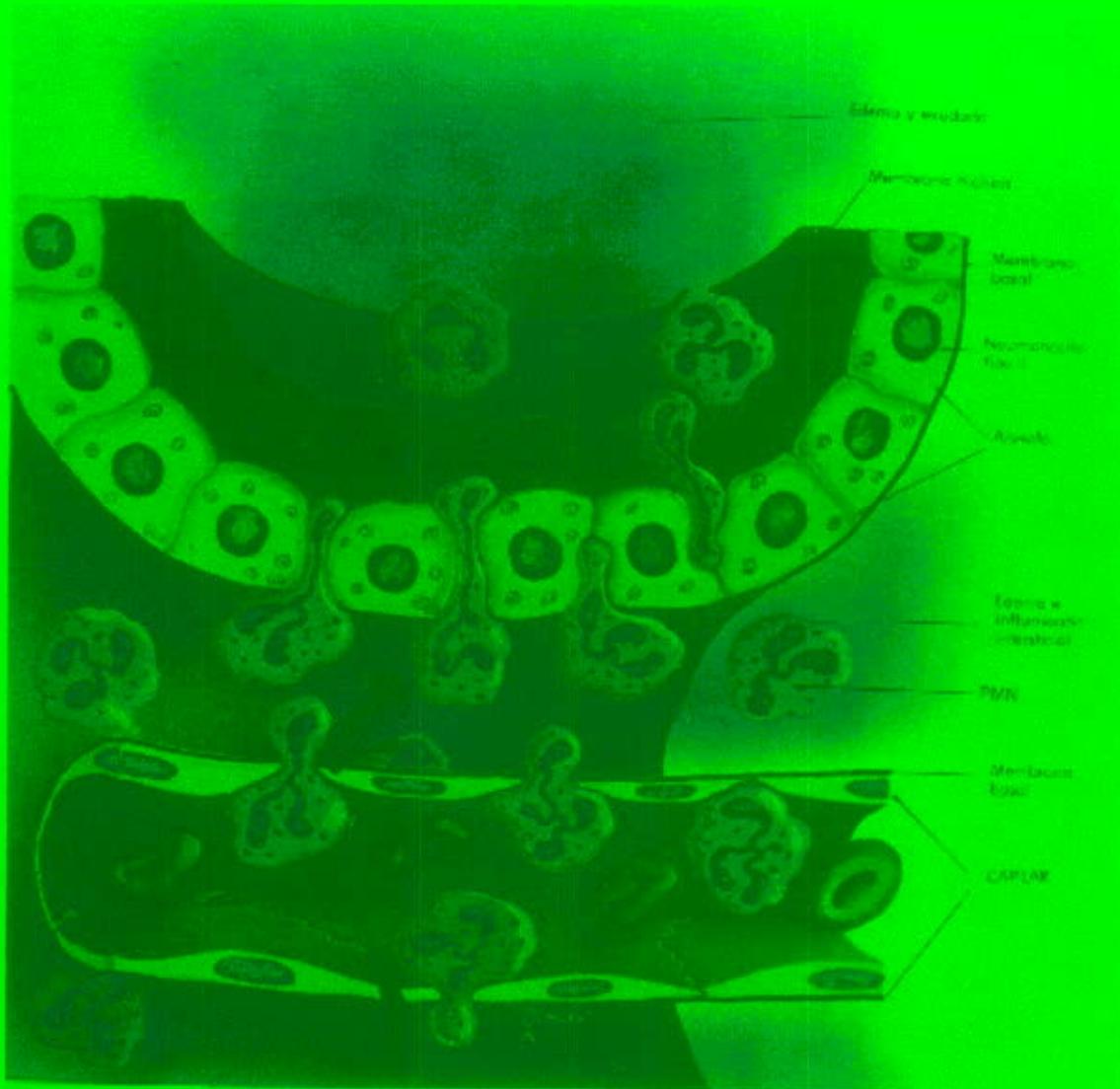


Figura 5

## **OBJETIVOS**

- 1) Desarrollar el modelo *in vitro* para el estudio de la expresión y actividad de la ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, así como del transporte de iones en células epiteliales alveolares tipo 2.
- 2) Analizar el efecto de un glucocorticoide, la dexametasona, sobre ésta enzima y el transporte activo de iones en células epiteliales alveolares tipo 2.

## **HIPOTESIS**

La dexametasona estimula la expresión y síntesis de la ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> y el transporte activo de iones.

## OBJETIVOS

- 1) Desarrollar el modelo *in vitro* para el estudio de la expresión y actividad de la ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, así como del transporte de iones en células epiteliales alveolares tipo 2.
- 2) Analizar el efecto de un glucocorticoide, la dexametasona, sobre ésta enzima y el transporte activo de iones en células epiteliales alveolares tipo 2.

## HIPOTESIS

La dexametasona estimula la expresión y síntesis de la ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> y el transporte activo de iones.

## MATERIAL Y METODOS

### Aislamiento y cultivo de neumocitos tipo 2 (NT-2)

Se aislaron NT-2 de pulmón de ratas macho Sprague-Dawley (200-225 gm), libres de patógenos de acuerdo a la técnica descrita por Dobbs y cols (80) modificada (81). Las ratas se anestesiaron y heparinizaron por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (65 mg/kg) y heparina (1,000 U); posteriormente se realizó una traqueostomía y los pulmones se removieron y perfundieron a través de la arteria pulmonar para remover células sanguíneas con 30 ml de la solución II que contiene HEPES 10mM, glucosa 5.6mM CaCl<sub>2</sub> y MgSO<sub>4</sub> 1.3 mM, pH 7.4. Los pulmones fueron lavados con 8 ml de la solución I que es idéntica a la solución II pero sin el CaCl<sub>2</sub> y MgSO<sub>4</sub>, y posteriormente se llenaron con 30 U/ml de una solución de elastasa de páncreas; (Worthington Biochemicals, Freehold, NJ) e incubaron por 20 minutos a 37° C. Después de la digestión enzimática, los pulmones se fragmentaron en presencia de 250 µg/ml de DNasa y se filtraron. La suspensión celular se centrifugó a 400 xg por 10 minutos, el botón celular se resuspendió en medio DMEM (Sigma Chemical Company, St. Louis MO) y las células se sembraron en cajas de Petri previamente recubiertas con IgG e incubaron durante 1 h a 37° C. Los NT-2 se aislaron al recuperar las células no adheridas. Las células se sembraron por 24 h a 37° C en medio DMEM (Irvine Scientific; Irvine, CA) con 10,000 U/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomina (Sigma Chemical; St Louis, MO) más suero fetal de ternera al 10% adsorbido con carbón activado (Hyclone; Logan, VT). La eficiencia de adhesión fue de 40%. Después de 24 hs, el medio de cultivo se sustituyó por medio fresco DMEM-Ham's F-12 libre de suero y

complementado con: ácido linoleico-albumina bovina (2 mg/ml), ácido selénico (10 ng/ml), transferrina (5 µg/ml) y glutamina 2mM (Sigma Chemical Company; St Louis MO). Las células se cultivaron por 3, 6, 12 y 24 hs a 37° C en 5% de CO<sub>2</sub> con y sin dexametasona (Sigma Chemical Company; St Louis MO) 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-8</sup> M previamente disueltas en etanol al 100%).

#### Aislamiento de membranas.

Las células se resuspendieron en solución amortiguadora con inhibidores (histidina-imidazol 5mM, EDTA 2mM, PMSF 1mM, leupeptina 1 µg/ml e inhibidor de tripsina 60 µg/ml, pH 7.4) a 4° C (10 x 10<sup>6</sup> células/ml). Se homogenizaron en frío con un homogenizador Potter-Elvehjem durante 15 segundos dos veces. Posteriormente, se centrifugaron a 6000 x g por 10 minutos para eliminar restos celulares, núcleos y membranas mitocondriales; el sobrenadante se centrifugó a 60,000 x g durante 60 min. a 4° C y el botón microsomal se resuspendió en 100 µl de solución amortiguadora con inhibidores (82, 83).

#### Determinación de Proteínas.

En la medición de proteínas se utilizó un estuche comercial para micrométodo basado en la técnica de Lowry (84) (Sigma Chemical Company, St Louis, MO). Para efectuar la curva de calibración, se diluyó la proteína estándar (albúmina sérica bovina) a una concentración de 1000 µg/ml. Se prepararon por duplicado 5 diluciones de 0-100 µg/ml en un volumen final de 200 µl, y tubos con 25 µl de las soluciones problema se aforaron a 200 µl con la misma solución amortiguadora y se prepararon también por duplicado. A cada tubo se añadió 2.2 ml de reactivo de Biuret, se mezclaron e incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente a cada tubo se le agregó 100 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu, y se agitaron e incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Se determinó la densidad óptica a 600 nm usando los

tubos con 0  $\mu\text{g/ml}$  para calibrar el espectrofotómetro. Se graficaron las unidades de densidad óptica contra la concentración de proteínas, y posteriormente se calculó la concentración de las muestras problema extrapolando los valores en la curva obtenida.

Determinación de la liberación de fosfato inorgánico (82, 85).

Para la determinación del fosfato inorgánico se prepararon:

- 1.- Suspensión de enzimas 5 mg/ml
- 2.- Solución de iones constituida por NaCl 390 mM, KCl 60mM, MgCl<sub>2</sub> 12mM, imidazol 30mM pH 7.4.
- 3.- ATP 9mM (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO).
- 4.- Solución estandar de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 mM
- 5.- Ouabaina 30mM (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)
- 6.- NaCl 0.9%

El diseño experimental se efectuó como se menciona en la siguiente tabla:

Tubo	membranas	sol. iones	ATP	fosfatos	ouabaina	NaCl
	$\mu\text{l}$	$\mu\text{l}$	$\mu\text{l}$	$\mu\text{l}$	$\mu\text{l}$	$\mu\text{l}$
Blanco	0	100	0	0	0	230
Estándar 1	0	100	0	100	0	130
Estándar 2	0	100	0	200	0	30
Muestra	100	100	100	0	30	0
Muestra	100	100	100	0	0	30

- 1.- Se pipetearon las soluciones en el orden mencionado en la tabla anterior.
- 2.- Se mezclaron.
- 3.- Se incubaron a 37° C durante 30 minutos.
- 4.- Se transfirieron a un baño de hielo y la reacción se detuvo con ácido tricloroacético 1%.
- 5.- Se agregó 1 ml de molibdato-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con reactivo de Fiske.
- 6.- Se mantuvieron a temperatura ambiente por 30 minutos.
- 7.- Se transfirieron a celdas de espectrofotómetro y se leyó la absorbancia a 690 nm usando el tubo blanco para ajustar a cero el aparato.
- 8.- La actividad de la ATPasa de Na y K<sup>+</sup> se determinó como el índice de liberación de fosfato inorgánico en presencia y ausencia de ouabaina 3mM. La actividad de la enzima se expresó como nmol Pi/mg proteína/h.

#### Técnicas generales de ácidos nucleicos (86).

El DNA o RNA se precipitó con etanol de la siguiente manera: se agregó 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M, (pH 6), y 2 volúmenes (DNA) o 2.5 volúmenes (RNA) de etanol absoluto, y las muestras se precipitaron a -20° C durante dos horas. Las precipitaciones con isopropanol para DNA o RNA se efectuaron de la misma manera, pero con 1 volumen de isopropanol. Los ácidos nucleicos precipitados se centrifugaron a 12,000 x g por 20 minutos a 4° C y se disolvieron en solución amortiguadora Tris-EDTA (TE).

Los ácidos nucleicos se cuantificaron y su pureza se determinó por medio de la absorbancia espectrofotométrica. Una unidad de absorbancia corresponde a concentraciones de 40 µg/ml de RNA y 50 µg/ml de DNA respectivamente. La relación entre las lecturas a 260 y 280

nm (A260/A280) debe ser de 1.8 a 2.0 para que se considere que la preparación tiene una pureza aceptable y se encuentra libre de contaminación con proteínas.

Las extracciones con fenol y cloroformo (F/C) se hicieron de la siguiente forma: se mezcló 1 volumen de solución de ácidos nucleicos con un volumen de una mezcla 1:1 de cloroformo y fenol y 0.1 volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2, se incubó 10 minutos a 4° C y se centrifugó por 15 minutos a 12,000 x g a 4° C.

#### Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Las muestras de DNA se fraccionaron de acuerdo al peso molecular en geles de formaldehído-agarosa al 1% en solución amortiguadora tris-boratos-EDTA (TBA) y el gel se corrió en la misma solución TBA a 100 volts durante 2 horas. Como marcadores de peso molecular se utilizó DNA de lamda digerido con Hind II. Después de teñir el gel con una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/ml durante 30 minutos, se destiñó con agua, y el DNA se visualizó con luz ultra violeta a 310 nm.

#### Digestión de plásmidos con enzimas de restricción

Las digestiones con enzimas de restricción se efectuaron en las correspondientes soluciones amortiguadoras. Una reacción esta constituida de los siguientes reactivos en el orden correspondiente: DNA (1-5µg) en un volumen variable de TE, un volumen de agua necesario para llevar la reacción a un volumen total de 20 µl, 2 µl de solución amortiguadora 10x y 2U de cada enzima por cada µg de DNA usado. Las reacciones enzimáticas se incubaron durante 2 horas a 37° C y se pararon con EDTA 0.5 M; los productos digeridos se sometieron a electroforesis con geles de agarosa.

### Cultivo de bacterias y aislamiento de plásmidos.

Los cultivos bacterianos se mantuvieron y propagaron con métodos generales usados en bacteriología. Las bacterias fueron crecidas a 37° C en medio líquido Luria-Bertani (LB) o en cajas de Petri con agar al 1.5% conteniendo ampicilina 50 µg/ml. Se utilizaron 2 tipos de preparaciones: a gran escala y mini-preparaciones. Las preparaciones en gran escala se hicieron creciendo bacterias en 500 ml de medio LB y posteriormente realizando una lisis alcalina la que se sometió a cromatografía en columna. Las mini-preparaciones se realizaron de la misma manera, en 5 ml de medio.

### Reactivos y soluciones para aislar RNA.

Todos los reactivos y las soluciones se prepararon y manejaron para minimizar el riesgo de contaminación con RNAsas. Se utilizó preferentemente material de plástico desechable y cuando se usó material de vidrio, éste se horneó a 250° C durante 4 horas. El agua y las soluciones fueron tratadas con dietil-pirocarbonato (DEPEC) con excepción del Tris-HCl, el tiocianato de guanidina y el cloruro de guanidina. Las soluciones que contienen Tris-HCl o cloridrato de guanidina se prepararon usando agua tratada con DEPEC.

### Aislamiento de RNA de células en cultivo (87).

El RNA total se aisló de células cultivadas en placas de cultivo de 6 pozos. La capa de neumocitos tipo 2 que crece adherida al fondo se lisó agregando 0.5 ml de GuSCN, se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.6 ml y se agitó en el vortex por 5 minutos; se agregó 0.5 ml de una solución de fenol-cloroformo y 0.1 ml de acetato de sodio 1M pH 4.0, y se mezcló e incubó en un baño de hielo por 15 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12,000 x g por 20 minutos a 4° C y la fase acuosa se transfirió a otro tubo al que se le agregó otro volumen de isopropanol, se

mezclaron e incubaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Se centrifugó a  $12,000 \times g$  por 20 minutos y el precipitado se resuspendió en 0.5 ml de GuSCN precipitándose nuevamente con isopropanol como se mencionó anteriormente; el precipitado se lavó con etanol al 75% frío y se resuspendió en TE calentándose a  $68^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos para facilitar su resuspensión. Una alícuota de  $50 \mu\text{l}$  se utilizó para cuantificarlo y checar la pureza.

#### Análisis de Northern blot.

Las muestras de RNA se reconstituyeron en una solución amortiguadora (MOPS 50mM, acetato de sodio 0.1M, EDTA 1mM, formaldehído 2.2M, formamida 50%, glicerol 5% y azul de bromofenol 0.05% pH 7.0.

Cinco  $\mu\text{g}$  de RNA se fraccionaron en agarosa al 1% y formaldehído 2.2 M, y se corrieron a 20 volts en una solución amortiguadora de MOPS 50mM, acetato de sodio 0.1M y EDTA 1mM. El gel se tiñó con bromuro de etidio con objeto de visualizar las bandas correspondientes al rRNA 18s y 28s con luz ultravioleta. El RNA fraccionado se transfirió en membranas de nylon usando una cámara de electrotransferencia (2205 Transfor; LKB, Gaithersburg, MD) en una solución amortiguadora de Tris-HCl 10mM, acetato de sodio 5mM y EDTA 0.5mM pH 7.6, la cual se corrió por 6 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las membranas se fijaron, exponiéndolas a luz ultravioleta a 310nm por 5 minutos y posteriormente se hornearon dos horas a  $80^{\circ}\text{C}$ .

#### Preparación de sondas.

Las sondas antisentido de RNAm de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  se generaron por transcripción *in vitro* usando la polimerasa SP6 a partir del DNA complementario subclonado en el vector pGEM3Z usando un sistema comercial de Promega (88). La transcripción se realizó en un volumen de  $20 \mu\text{l}$  usando la polimerasa SP6. Se agregaron en forma secuencial, 2

µl de solución amortiguadora de transcripción, (Tris-HCl 200mM pH 7.5) MgCl<sub>2</sub> 30mM, y NaCl 50mM, 0.5 µl de DTT 400mM, 3 µl de una mezcla de NTP (ATP 3mM, GTP 3mM, UTP 3mM y CTP 83 µM), <sup>32</sup>P-CTP aproximadamente 30 pmoles, 3000 Ci/mmol), 1 µl RNAsin (40U) y 0.5 µl de polimerasa SP6 (10U). Las preparaciones se incubaron durante 2 horas a 37° C y la reacción se terminó agregando 0.5 µl de 0.5M EDTA (pH 8.0).

### Hibridizaciones

Las hibridaciones de los Northern blots se realizaron a una concentración de aproximadamente 10ng/ml que dá rendimientos de aproximadamente 10<sup>6</sup> dpm/ml de solución hibridizadora. La solución de prehibridación e hibridación consisten de: formamida 50%, sulfato de dextrán 10%, 0.5% de leche en polvo, SDS al 1%, DNA de esperma de salmón 250 µg/ml, tRNA de levadura 250 µg/ml en 6xSSC (donde 1xSSC consiste en NaCl 0.15M, citrato trisódico 0.015M, p 7.0).

Las membranas se prehibridizaron por tres horas y luego se incubaron toda la noche en solución de hibridación que contenía la sonda respectiva. La temperatura de incubación fué de 57° C; al término de la incubación las membranas fueron enjuagadas 3 veces en solución 2xSSC-1% SDS a temperatura ambiente, y después lavadas 3 veces durante 30 minutos en 2xSSC-1% SDS y finalmente en 0.1xSSC-1% 3 veces por 30 minutos. La temperatura de los lavados fué de 65° C. Las autoradiografías se realizaron a -80° C con y sin pantallas amplificadoras (89).

### Cuantificación de la expresión del mRNA.

La intensidad de la señal para las subunidades de la ATPasa y del rRNA 28s se cuantificaron por densitometría y el área de los picos se determinó por medio de un programa de

computadora. La expresión del mRNA de las distintas subunidades se dividió entre los valores correspondientes al 28s para cada tiempo.

#### Transporte de $^{86}\text{Rb}$ (90).

Se sembraron  $1 \times 10^6$  células por pozo en cajas de 24 pozos y se trataron con dexametasona  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M durante 3, 6, 12, y 24 horas. Posteriormente se incubaron con y sin ouabaina 1mM y después de cinco minutos de incubación el medio se reemplazó por medio que contenía 1  $\mu\text{Ci}$  de  $^{86}\text{Rb}$ . El transporte se termina a los 5 minutos aspirando el medio y lavando las placas con  $\text{MgCl}_2$ . Las cajas se dejaron secar al aire y las células se solubilizaron en NaOH 1N. El transporte de  $^{86}\text{Rb}$  se cuantificó en alícuotas del material solubilizado con NaOH por medio de un contador de centelleo líquido; la proteína se cuantificó en las mismas alícuotas usando un estuche de Bio-Rad para microdeterminación de proteínas, siguiendo las instrucciones del fabricante y usando albumina bovina como estandar.

El transporte de  $^{86}\text{Rb}$  se determinó como la diferencia en la entrada de  $^{86}\text{Rb}$  en presencia y ausencia de ouabaina. La actividad se expresó en nmol de K/minuto/mg proteína.

#### Análisis por Western blot

La concentración relativa de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  se determinó por medio de un análisis semicuantitativo por Western blot. Los NT-2 se sembraron durante 24 horas y se cultivaron sin y con dexametasona  $10^{-8\text{M}}$  durante 0, 6, 12, y 24 horas. Posteriormente se extrajeron membranas celulares de la manera anteriormente mencionada, con la excepción de que la primera centrifugación fué a 10,000 x g por 10 minutos, a 4° C y posteriormente el sobrenadante se centrifugó a 100,000 x g por 1 hora a 4° C.

Las membranas se fraccionaron en electroforesis en geles de poliacrilamida. Para detectar la subunidad  $\alpha 1$  se cargaron 5 $\mu$ g de proteína en un gel que contenía SDS/acrilamida al 10% y para detectar  $\beta 1$  se utilizaron 50  $\mu$ g de proteína en geles de SDS/acrilamida al 7.5%. Los geles se corrieron en condiciones reductoras en una minicámara de electroforesis Bio-Rad durante 1 hora a 4° C y 200 mV.

Los geles se transfirieron a membranas de nylon en una cámara de electrotransferencia, durante 1 hora a 4° C y 100 mV, en una solución amortiguadora (Tris 20mM, glicina 150mM y metanol al 30% pH 8) (91, 92).

#### Detección de la proteína.

La membrana se sumergió en 40 ml de una solución bloqueadora, que consiste 5% de leche en polvo disuelta en PBS con Tween 20 al 0.05% (PBS-T) durante 12 horas a 4° C en agitación constante; posteriormente las membranas se enjuagaron con PBS-T en dos ocasiones y se lavaron 3 veces por 10 minutos; se agregó el anticuerpo primario disuelto en solución bloqueadora y se incubó a 4° C durante 12 horas y en agitación. La subunidad  $\alpha 1$  se detectó con un anticuerpo monoclonal ( anti-rata C464-6B, donado por M. Caplan) a una dilución de 1:50. La subunidad  $\beta 1$  se reveló con un anticuerpo policlonal a una dilución de 1:500 (anti-rata FP $\beta 1$  donado por Alicia Mc Donough). Después de la incubación se las membranas se enjuagaron 2 veces, y se lavaron 3 veces por 10 minutos con PBS-T. Se incubaron 1 hora a temperatura ambiente y en agitación en presencia del segundo anticuerpo, anti-ratón en el caso de los monoclonales, y anti-conejo en el caso del policlonal. El anticuerpo secundario estaba acoplado a peroxidasa y la dilución a la que se usó fue de 1:3000. Los lavados se realizaron como en el caso del primer anticuerpo.

Para detectar la quimioluminiscencia se siguieron las instrucciones de la compañía proveedora (Amersham), que consistieron en mezclar el reactivo A y el B en partes iguales y cubrir la membrana durante 1 minuto con la mezcla; se removió el fluido sacudiendo la membrana, se cubrió con plástico, se expuso en la oscuridad a un film de rayos x durante 1 minuto, y se reveló convencionalmente en una máquina de revelado automático (93).

#### Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados usando el método ANOVA y la prueba  $t$  para comparación de grupos. Para comparar los diferentes grupos experimentales se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan. Se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

### Efecto de la dexametasona sobre la expresión de ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> por neumocitos tipo 2.

Los niveles de RNA mensajero para las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  se determinaron por análisis de Northern blot y se semicuantificaron por medio de densitometría, como se detalló en Métodos.

Los valores del RNA mensajero se encuentran expresados en unidades arbitrarias (abundancia relativa) las cuales se obtuvieron dividiendo en cada tiempo los valores experimentales sobre los controles. En la figura 6 se pueden observar las concentraciones relativas del RNA mensajero de la subunidad  $\alpha 1$  en un experimento realizado a 0, 3, 6 y 12 horas. La dexametasona se utilizó en dosis de  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M. Los valores correspondientes a cada punto representan la media  $\pm$  el error estandar de dos experimentos realizados en triplicado.

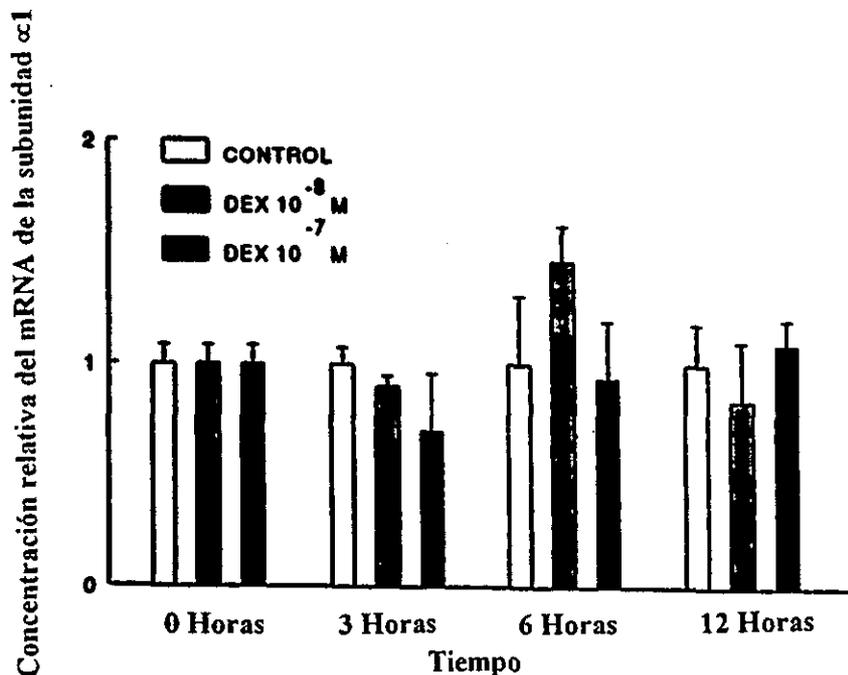


Figura 6

Como se puede apreciar en esta figura, ninguna de las dosis de dexametasona produjo un cambio significativo en la expresión de la subunidad  $\alpha 1$  de la ATPasa  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

En contraste, la dexametasona, a una dosis de  $10^{-8}$  M indujo un incremento significativo en la expresión de la subunidad  $\beta 1$ , que se observó desde las 6 horas y se mantuvo hasta las 24 horas. Estos resultados se ilustran en la figura 7, donde comparados con el control, los niveles basales del transcrito  $\beta 1$  aumentan de manera significativa en los tiempos mencionados ( $p < 0.05$ ), en donde el pico máximo de estimulación se observó a las 12 horas, seguido de una disminución posterior.

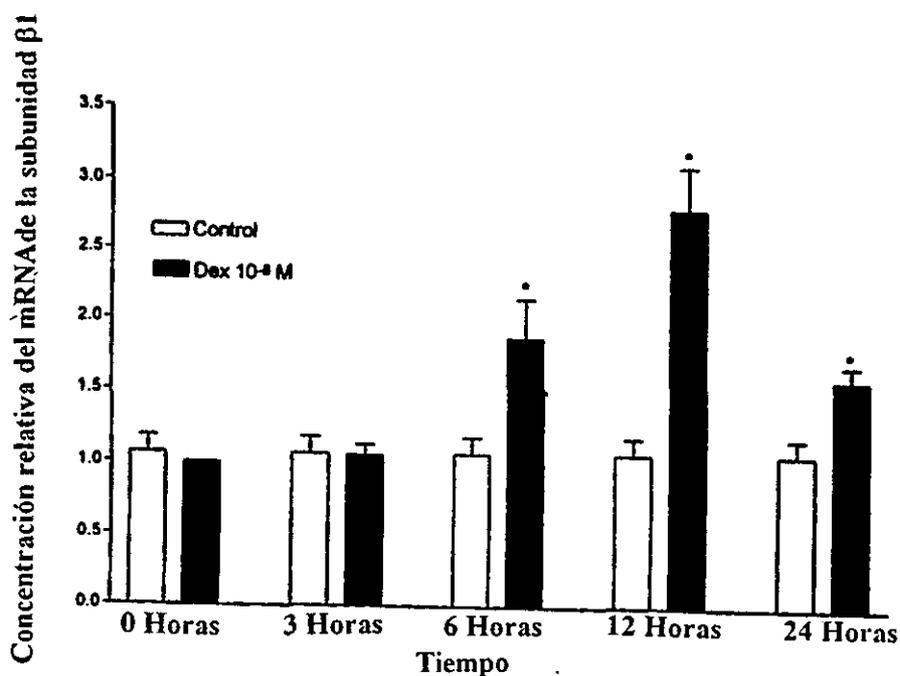


Figura 7

Un ejemplo de la inducción provocada con dexametasona se muestra en la figura 8 donde se aprecia un northern blot correspondiente a 0 y 24 horas de incubación con y sin dexametasona, en un experimento realizado por triplicado. Después de 24 horas de cultivo, existe un aumento espontáneo de los transcritos correspondientes a la subunidad  $\beta 1$ , pero éste se incrementa de manera más notoria en presencia del esteroide.

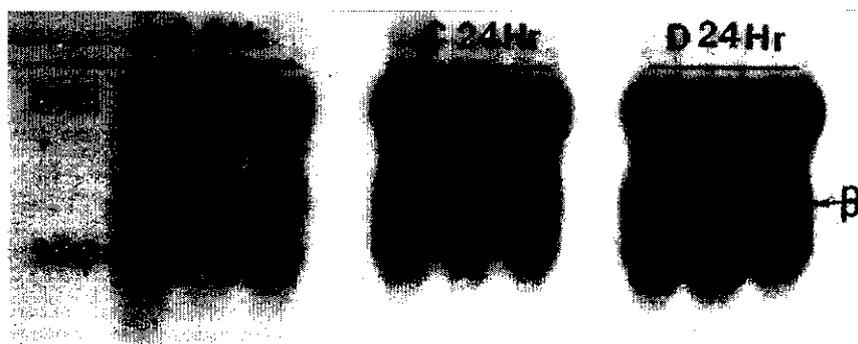


Figura 8

Efecto de la dexametasona sobre la síntesis de ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> por neumocitos tipo 2.

La producción de la enzima se estudió a través de un western blot. Los neumocitos tipo 2 fueron incubados en presencia de dexametasona  $10^{-8}$  M durante 0, 6, 12, y 24 horas y posteriormente se realizaron preparaciones de membranas celulares las cuales se fraccionaron por electroforesis SDS-acrilamida y posteriormente se transfirieron a membranas de nylon las cuales se incubaron con un anticuerpo monoclonal específico para  $\alpha 1$  y un policlonal para  $\beta 1$ . La figura 9 ilustra un Western blot representativo de uno de estos experimentos. Se puede observar que la subunidad  $\alpha 1$  migra como una banda de ~96 kDa. La proteína se incrementa en las células que se expusieron 6 y 12 horas la dexametasona. Un homogenado de riñón fue usado como control (carril izquierdo) y el peso molecular se determinó al comparar con marcadores de peso molecular.

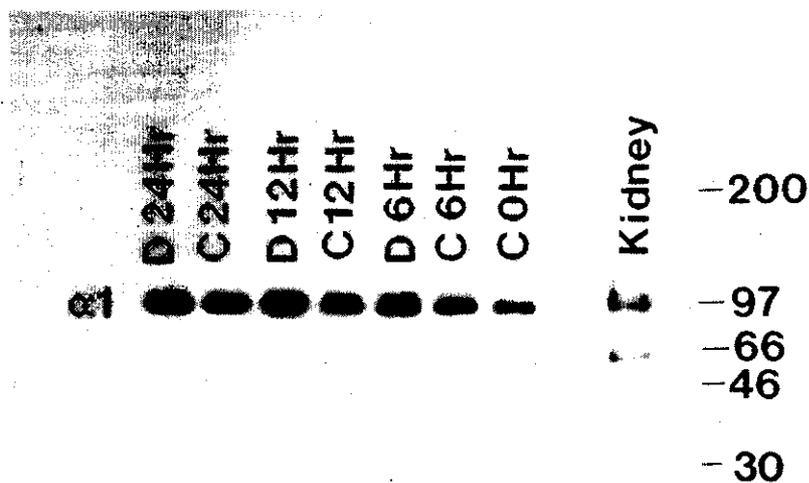


Figura 9

En la figura 10 se muestra la concentración relativa de la subunidad  $\alpha 1$  semicuantificada por un análisis densitométrico del Western blot. Cada columna representa la media y el error estándar de 2 experimentos realizados en triplicado. Se le asignó el valor de 1 al control de cada tiempo y la expresión de la proteína de las células tratadas con dexametasona se normalizó por este valor. Como se puede observar en esta figura a las 6 horas, la concentración de la subunidad  $\alpha 1$  se incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ).

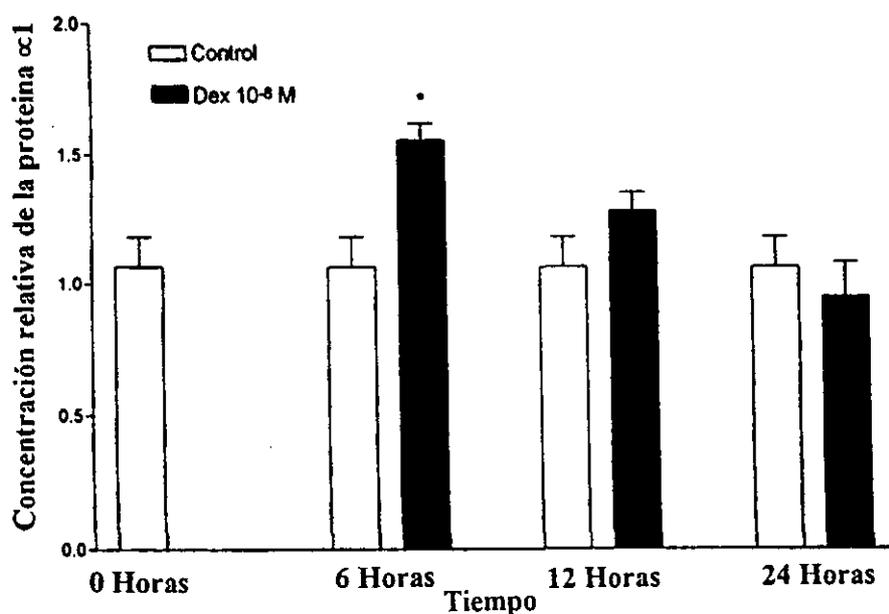


Figura 10

En relación a la subunidad  $\beta 1$ , ésta se incrementó en los NT-2 incubados con dexametasona desde las 6 horas, alcanzó su pico de incremento a las 12 horas, y se mantuvo significativamente elevada hasta las 24 horas. Estos resultados se muestran en la figura 11, donde las columnas representan la media de 2 experimentos en triplicado y sus correspondientes errores estándar. A las 12 horas, el incremento de la subunidad  $\beta 1$  en comparación con el control fue de aproximadamente 1.7 veces.

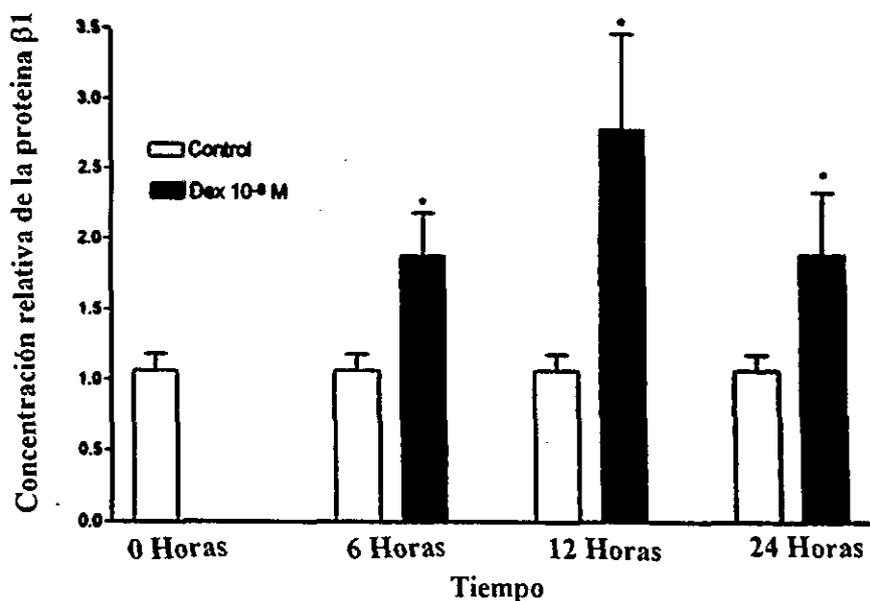


Figura 11

En la figura 12 se ilustra un western blot representativo de estos experimentos. La subunidad  $\beta 1$  aparece como una banda de aproximadamente 46 kDa, que corresponde al peso estimado de esta proteína. Debido a que se trata de un anticuerpo policlonal, se visualizan otras bandas adicionales, una de las cuales podría corresponder a un dímero de esta subunidad. Como control para saber cual banda era la que correspondía a la subunidad  $\beta 1$  de la ATPasa se usó un panel de tejidos y se observó que cerebro que contiene menor cantidad de esta subunidad, presentaba una pequeña banda, y el riñón que es el tejido que la tiene más abundante, mostraba la banda de mayor intensidad.

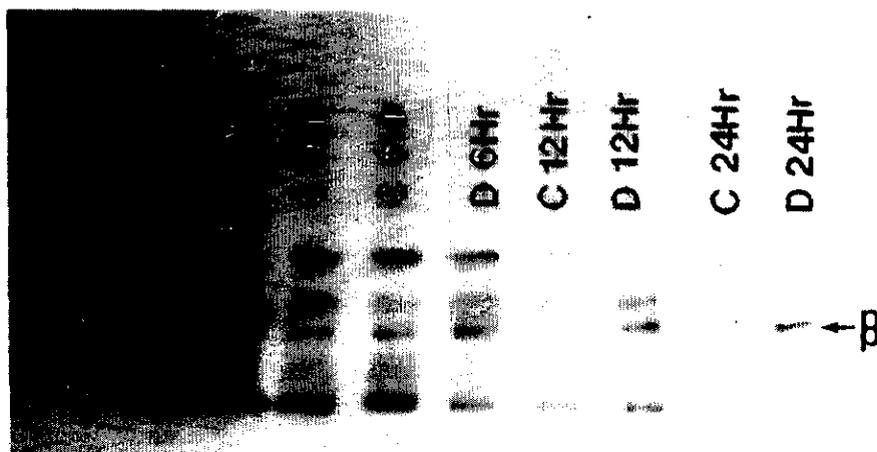


Figura 12

Efecto de la dexametasona sobre la actividad de la ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en neumocitos tipo 2.

La actividad de la enzima se evaluó con dos diferentes métodos. En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos con el transporte de Rb<sup>86</sup>. En estos experimentos se utilizaron dos dosis de dexametasona, 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-8</sup> M a las 3, 6, 12 y 24 horas. Se puede observar que existe un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) con ambas dosis a las 12 horas. El efecto con dexametasona 10<sup>-8</sup> M es mucho mayor que con la dosis mayor. El incremento observado con dexametasona 10<sup>-7</sup> M es de aproximadamente 1.8 veces sobre el control. En cambio con 10<sup>-8</sup> M, el transporte del Rb<sup>86</sup> aumenta 3.6 veces. En la gráfica, cada punto representa la media y error estándar de 3 experimentos realizados por duplicado.

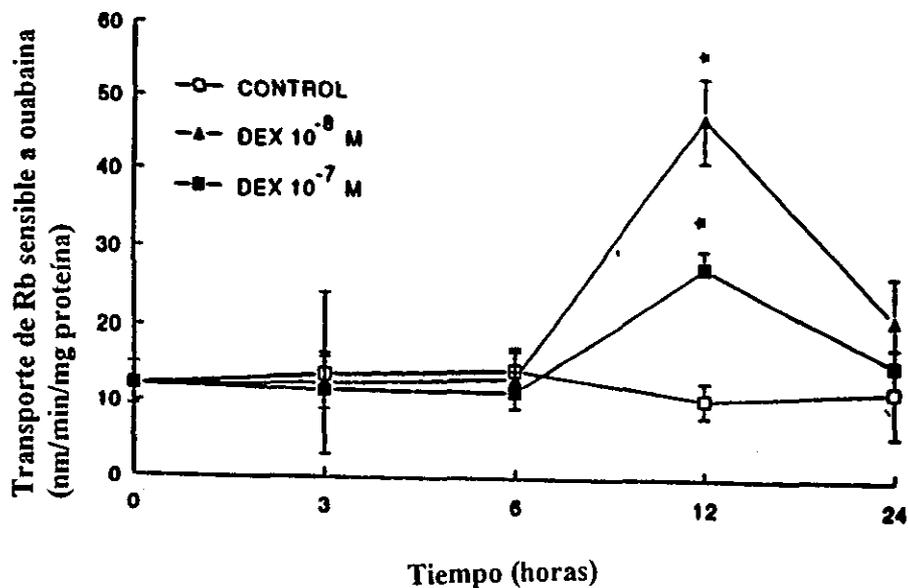


Figura 13

El otro método utilizado para evaluar la actividad de la ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> consistió en un conjunto de experimentos que evaluaron la hidrólisis del ATP. Los neumocitos tipo 2 se incubaron con y sin dexametasona 10<sup>-8</sup> M durante 3, 6, 12, y 24 horas. Posteriormente, se aislaron membranas celulares y se determinó la actividad de la enzima. En la figura 14 se puede observar que existe un aumento significativo en la actividad de la enzima a las 12 y 24 horas. En esta gráfica cada punto representa la media y el error estándar de 3 experimentos realizados en duplicado. A las 12 horas el incremento de la hidrólisis fué de 90 nanomoles de Pi/mg de proteína en los controles a 240 nmol Pi/mg de proteína en el caso de las células tratadas con dexametasona (p < 0.05). Igualmente, a las 24 horas el aumento fué de 100 nmoles Pi/mg de proteína en el grupo control a 250 nmoles Pi/mg de proteína en el grupo experimental (p < 0.05).

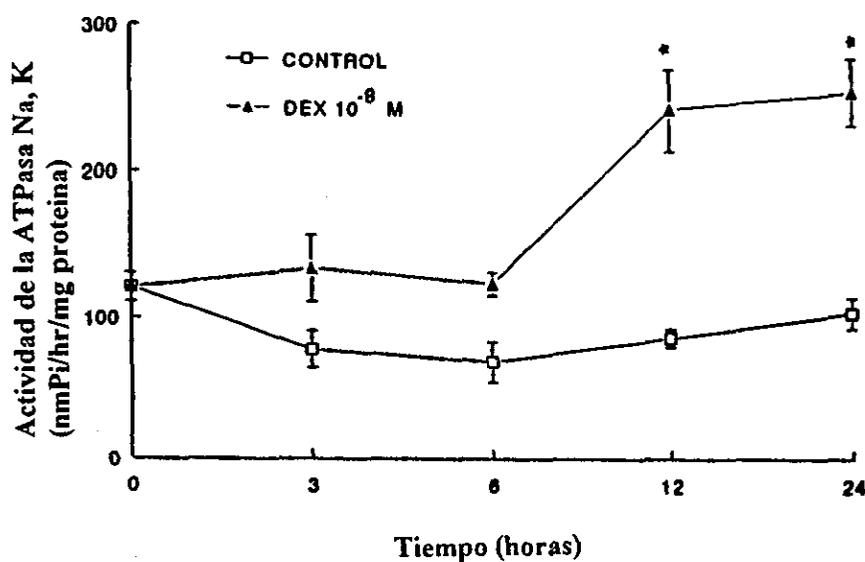


Figura 14

## DISCUSION.

En diversas investigaciones realizadas tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha demostrado que los corticoides regulan a la ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en diferentes órganos, siendo el más estudiado a la fecha el riñón de rata. Por ejemplo, en el asa ascendente de Henle, en el riñón de la rata en desarrollo, el incremento de la corticoesterona en suero se asoció con un aumento significativo en la actividad de la ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> y concomitantemente, con un incremento en la capacidad de concentrar el Na<sup>+</sup> (94).

En esta misma línea experimental, se ha demostrado que la dexametasona es capaz de restaurar la actividad de la ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en el asa ascendente de Henle de ratas adrenalectomizadas, efecto que es inhibido con ciclohexamida y atinomicina D lo que indica la participación de mecanismos de transcripción y traducción de la enzima (95). Asimismo, en un modelo similar de ratas adrenalectomizadas la corticoesterona incrementó en riñón los transcritos del mRNA de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  así como la actividad de la ATPasa (96).

Recientemente, en un modelo de transección de neuronas de médula espinal, se ha demostrado también el efecto regulatorio de los corticoides sobre la ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. En este modelo, la lesión neuronal provoca una disminución significativa en la expresión del RNAm de la subunidad  $\alpha 3$ , la cual es revertida con el tratamiento con dexametasona (97).

Asimismo, en células de músculo liso vascular de aorta de rata, tanto la dexametasona como la aldosterona inducen la expresión del RNA mensajero de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de una manera dependiente del tiempo de exposición y de la dosis utilizada. La inducción mediada por dexametasona depende del receptor para glucocorticoides y es independiente de la entrada de sodio (98).

En el pulmón, se ha demostrado que los glucocorticoides modulan el desarrollo y la maduración del pulmón fetal y previenen el síndrome de insuficiencia respiratoria en niños prematuros (99). En este síndrome, la inmadurez pulmonar, que entre otros aspectos se traduce en una disminución de la capacidad funcional de las células epiteliales tipo 2, origina graves trastornos patológicos en el parénquima pulmonar caracterizados por edema, atelectasias, e infiltrado inflamatorio.

Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado el efecto estimulador de los GC en el desarrollo morfológico, bioquímico y funcional del pulmón en diversas especies incluyendo el humano (100, 101). Así, tanto los GC naturales como sintéticos promueven la diferenciación de las células epiteliales tipo 2, efecto que incluye el incremento del número y tamaño de los cuerpos lamelares.

En este contexto, se ha demostrado que los glucocorticoides tienen un efecto terapéutico porque estimulan la síntesis y secreción del surfactante, lo cual lo hacen al menos de dos maneras, por un lado actuando directamente sobre las células del epitelio pulmonar, y por otro, modulando el efecto estimulador que los fibroblastos ejercen sobre los neumocitos tipo 2 para la producción de este complejo (102).

Sin embargo, el efecto positivo de los GC para la prevención o tratamiento del síndrome de insuficiencia respiratoria de los prematuros no parece relacionarse sólo con su capacidad para incrementar los niveles de surfactante pulmonar. Por ejemplo, Orlowski y colaboradores (103) han documentado un rápido incremento de los niveles de transcritos del mRNA de  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de la ATPasa de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en las ratas durante la etapa neonatal el que continua hasta dos días después del nacimiento, para posteriormente disminuir a niveles basales. Estos cambios

posiblemente correspondan a la necesidad del pulmón de limpiar el fluido intraalveolar durante la etapa neonatal, para mantener las estructuras alveolo-capilares en condiciones adecuadas para el intercambio de gases.

Es importante señalar, que el estado basal de los transcritos del mRNA de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  así como la expresión y la actividad de la proteína de la ATPasa de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  se incrementan también en dos modelos diferentes de daño pulmonar inducidos por hiperoxia, paralelamente con un aumento en el aclaramiento del edema alveolar (104, 105). En otras palabras, un aumento en la expresión, síntesis y/o actividad de esta enzima parece asociarse con un importante mecanismo de defensa que se relaciona con el mantener secos los alveolos, para la llegada del aire y la realización del intercambio gaseoso. También en el daño pulmonar inducido en lechones con altas concentraciones de oxígeno, se ha observado que los GC ejercen también un efecto protector y disminuyen la lesión tisular (106).

Estudios realizados para averiguar que células pulmonares tienen receptores para glucocorticoides han demostrado que éstos existen por lo menos en fibroblastos fetales, células endoteliales y células epiteliales, lo que sugiere que ambos tipos celulares son blancos potenciales de estas hormonas (107).

Es importante señalar, que el efecto de los glucocorticoides sobre las células epiteliales pulmonares ha sido evaluado principalmente en fetos y recién nacidos, pero su posible acción sobre células alveolares del adulto, específicamente en relación a la estimulación de la ATPasa de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , no se habían desarrollado.

Para la realización de nuestro trabajo especulamos que un efecto positivo de los GC sobre la actividad de esta enzima podría significar un avance en la comprensión y el tratamiento de

enfermedades respiratorias del adulto caracterizadas por presentar edema pulmonar como es por ejemplo el caso del síndrome de insuficiencia progresiva del adulto.

Con la hipótesis señalada se diseñó el presente estudio en el cual demostramos que la dexametasona incrementa significativamente el estado basal del transcrito del mRNA de la subunidad  $\beta 1$  de la ATPasa de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Este aumento alcanzó una magnitud de aproximadamente 100 a 200% después de que los neumocitos tipo 2 obtenidos de ratas adultas fueron incubados 6 y 12 horas en presencia de esta hormona. De manera interesante, no se observó ningún cambio en los niveles basales del transcrito de la subunidad  $\alpha 1$ .

En términos generales, estos resultados son consistentes con aquellos reportados en estudios previos en el hígado de ratas adrenalectomizadas, donde después de un estímulo con dexametasona, se observó un incremento del RNA mensajero de la subunidad  $\beta 1$  sin modificaciones en la expresión de la correspondiente subunidad  $\alpha$  (108).

Otro ejemplo similar de regulación diferencial de los mRNA de ambas subunidades se ha demostrado en células LLC-PK1/C14 (109). Cuando esta línea celular proveniente de riñón de cerdo se incubaba durante 6 horas con concentraciones bajas de  $\text{K}^+$ , solamente el transcrito del mRNA de la subunidad  $\beta 1$  de la ATPasa de  $\text{Na}$  y  $\text{K}^+$  se incrementa en aproximadamente 2 veces sobre el control. Esto a su vez resulta en un aumento de 2 veces en las proteínas de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  y un aumento concomitante de la actividad hidrolítica de la enzima. Así, estos estudios al igual que el nuestro sugieren que la subunidad  $\beta$  puede ser un factor limitante para el ensamblaje del heterodímero de la ATPasa de  $\text{Na}$  y  $\text{K}^+$ .

Otros estudios adicionales también apoyan la hipótesis de que la subunidad  $\beta 1$  es crítica para el transporte intracelular de la bomba recién sintetizada a la membrana plasmática y que la

subunidad  $\beta 1$  desempeña un papel importante en el ensamblaje correcto de la subunidad  $\alpha$  a la membrana para formar dímeros de la ATPasa de Na y  $K^+$  con funciones y propiedades normales (110-112). De esta manera, como la subunidad  $\beta$  es necesaria para el transporte eficiente de la subunidad  $\alpha$  fuera del retículo endoplásmico, un exceso en la producción de la subunidad  $\beta$  aseguraría que siempre hubiera estas subunidades para la formación del heterodímero  $\alpha/\beta$ .

La regulación inducida por la dexametasona del mRNA de la subunidad  $\beta 1$  de la ATPasa que se observó en este estudio sobre células alveolares epiteliales tipo 2, es compatible con investigaciones previas en otros tipos celulares y se podría deber a un incremento en la transcripción como se demostró en el riñón de ratas infantiles donde los glucocorticoides estimulan directamente la transcripción de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de la ATPasa (113).

Concomitantemente con el incremento en la expresión del RNA mensajero de la subunidad  $\beta 1$ , se observó un aumento de la proteína de la isoforma  $\alpha 1$ , cuando las células AT-2 se incubaron con dexametasona por 6 horas, y la de la proteína de la subunidad  $\beta 1$  a las 6, 12 y 24 horas. Como se mencionó previamente, el incremento de la proteína  $\alpha 1$  no se asoció con un aumento de los niveles del RNA mensajero correspondiente, lo que sugiere que eventos post-transcripcionales pueden estar involucrados en la regulación de la ATPasa de Na y  $K^+$  en este modelo.

La dinámica de los eventos que ocurren en la síntesis y posterior transporte de la ATPasa de Na y  $K^+$  a la membrana celular ha sido explorada por diversos autores. Después de ser sintetizadas en los polisomas que se encuentran unidos a la membrana del retículo endoplásmico rugoso, las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son transportadas a través de una red de compartimentos membranales a su sitio funcional de la superficie celular. Tamkum y cols. (114) en experimentos

de "pulso y caza" realizados en cultivos de neuronas de pollo encontró que este proceso se lleva a cabo en aproximadamente 50 minutos. El transporte de la ATPasa recién sintetizada continua por varias horas, y aproximadamente 20% de la enzima que ha sido marcada es retenida intracelularmente.

La síntesis de proteínas analizada por Western blot en las membranas obtenidas de células AT-2 se realizó sin fraccionamiento celular y por lo tanto no obtuvimos por separado la membrana plasmática y las intracelulares. En este sentido, nuestro estudio cuenta con la limitación de no haber identificado si hubo o no translocación de las mismas (56, 115).

Probablemente el incremento de la proteína de la isoforma  $\alpha 1$  observada en este trabajo se pueda deber a movilizaciones de la proteína de pozas intracelulares a la membrana plasmática por medio de translocación o por otros eventos post-traduccionales (56).

Por otro lado, y como ya se mencionó, nuestro estudio mostró que el aumento en la expresión del mRNA de la subunidad  $\beta 1$  se correspondió con un incremento concomitante de la síntesis de la proteína de esta subunidad en los mismos tiempos. Por el contrario, el mRNA de la subunidad  $\alpha 1$  no se modificó cuando las células se incubaron en presencia de dexametasona, aunque la abundancia de la proteína se incrementó significativamente a las 6 horas.

En base a estos resultados, sugerimos que la dexametasona pudo haber incrementado la función de la ATPasa de Na y  $K^+$  en las células del epitelio alveolar tipo 2, como resultado de una combinación de eventos transcripcionales, traduccionales y post-traduccionales, como se ilustra en las figuras 10 y 11.

El transporte de rubidio en células AT-2 se incrementó después de 12 horas de exposición a dexametasona en comparación con los controles y disminuyó a valores basales a las 24 horas

de exposición. En contraste, el aumento de la actividad hidrolítica de la enzima se sostuvo hasta las 24 horas de exposición. Las diferencias observadas entre estos dos ensayos se pueden explicar porque miden dos aspectos diferentes de la actividad de la enzima. El  $Rb^{86}$  evalúa el transporte a través de las células AT-2, mientras que la actividad hidrolítica mide la liberación del fósforo inorgánico bajo condiciones de velocidad máxima en microsomas aislados de estas células.

El incremento en la actividad de la ATPasa de  $Na^+$  y  $K^+$  inducida por dexametasona en células epiteliales alveolares de rata puede ser explicado a través de dos posibles mecanismos: como un aumento en la eficiencia del transporte o como un incremento en el número de bombas activas en la superficie de la célula. En este contexto, el grupo de Bland (116, 117) demostraron que el transporte del catión en las células epiteliales de conejos cambia al nacer; así, el transporte de rubidio marcado sensible a ouabaina es mucho mayor en células epiteliales obtenidas en conejos recién nacidos que en los fetos. A los 30 días posteriores al nacimiento se observa un incremento de este transporte que alcanza los valores del adulto. Los autores calcularon el grado de recambio de la ATPasa de  $Na^+$  y  $K^+$  y concluyeron que éste aumenta al nacer, mientras que después del nacimiento lo que se incrementa es el número de bombas.

En resumen, en nuestro estudio demostramos que la exposición de células AT-2 de rata en cultivo a la dexametasona resulta en un incremento en el estado basal del mRNA de la subunidad  $\beta 1$  de la ATPasa de  $Na^+$  y  $K^+$ , con un aumento de los niveles de proteína de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  que se asocia con un incremento en la actividad medida por dos ensayos funcionales.

De esta manera, estos hallazgos sugieren que los glucocorticoides podrían ser usados como una estrategia para regular la ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en el epitelio alveolar, en aquellas condiciones patológicas que se asocien con edema alveolar difuso.

## REFERENCIAS

- 1.- GUYTON AC, MOFFAT DS, ADAIR TH. Role of alveolar surface tension in transepithelial movement of fluid, In: Pulmonary Surfactant, edited by R. Robertson, L.M. Van Golde, and J.S. Battenburg. Amsterdam: Elsevier, chap. 5, pp 11-185, 1984.
- 2.-MATTHAY MA, LANDOLT CC, STAUB NC. Differential liquid and protein clearance from alveoli of anesthetized sheep. *J Appl Physiol* 53: 96-104, 1982.
- 3.-MASON RJ, WILLIAMS MC, WIDDICOMBE JH, ET AL. Transepithelial transport by pulmonary alveolar type 2 cells in primary culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:6033-6037, 1982.
- 4.-GOODMAN BE, CRANDALL ED. Dome formation in primary cultured monolayers of alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 243: C96-C100, 1982.
- 5.-WEIBEL ER, GIL J. Electron microscopic demonstration of an extra cellular duplex lining layer of alveoli. *Respir Physiol* 4: 42-57, 1968.
- 6.-CRAPO JD, YOUNG SL, FRAM E<sup>K</sup>, ET AL. Morphometric characteristics of cells of the alveolar region of mammalian lungs. *Am Rev Respir Dis* 128: S42-S46, 1983.
- 7.- EVANS MJ, CABRAL MS, STEPHENS RJ, FREEMAN G. Transformation of alveolar type II cells to type I cells following exposure to nitrogen dioxide. *Exp Mol Pathol* 22: 142-150, 1975.
- 8.-ADAMSON IYR, BOYDEN DH. The type II as progenitor of alveolar epithelial regeneration. *Lab Invest* 30: 35-42, 1974.
- 9.-MATTHAY MA, LANDOLT CC, STAUB NC. Differential liquid and protein clearance from the alveoli of anesthetized sheep. *J Appl Physiol* 53: 96-104, 1982.

- 10.-RUTSCHMAN DH, OLIVERA W, SZNAJDER JI. Active transport and passive liquid movement in isolated perfused rat lungs. *J Appl Physiol* 75:1574-1580, 1993.
- 11.-BALLARD SI, GATZY JT. Volume flow across the alveolar epithelium of adult rat lung. *J Appl Physiol* 70: 1665-1676, 1991.
- 12.-BASSET G, CRONE C, SAUMON G. significance of active ion transport in transalveolar water absorption: a study on isolated rat lung. *J Physiol (London)* 384:311-324, 1987.
- 13.-BASSET G, CRONE C, SAUMON G. Fluid absorption by rat lung in situ: pathways for sodium entry in the luminal membrane of alveolar epithelium. *J Physiol (London)* 384: 325-345, 1987.
- 14.-SUGAHARA K, CALDWELL JH, MASON RJ. Electrical currents flow out of domes formed by cultured epithelial cells. *J Cell Biol* 99: 1541-1546, 1984.
- 15.-COTT GR, SUGAHARA K, MASON RJ. Stimulation of net active ion transport across alveolar type II cell monolayers. *Am J Physiol* 250: C222-C227, 1986.
- 16.- HALLMAN MM, EPSTEIN BL, GLUCK. L. Analysis of labeling and clearance of lung surfactant phospholipids in rabbit. *J Clin Invest* 68: 742-751, 1981.
- 17.- SCHNEEBERGER EE, McCARTHY KM. Cytochemical localization of Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase in rat type II pneumocytes. *J Appl Physiol* 60: 1584-1589, 1986.
- 18.-CHEEK JM, KIM KJ, CRANDALL ED. Tight monolayers of rat alveolar epithelial cells: bioelectric properties and active sodium transport. *Am J Physiol* 256: C688-C693, 1989.
- 19.-JONES GS, MILES RR, LANTZ RC, HINTON DE, CASTRANOVA V. Ionic content and regulation of cellular volume in rat alveolar type II cells. *J Appl Physiol* 53: 258-266, 1982.

- 20.-GOODMAN BE, FLEISCHER RS, CRANDALL ED. Evidence for active Na<sup>+</sup> transport by cultured monolayers of pulmonary alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 245: C78-C83, 1983.
- 21.- HORISBERGER J, LEMAS V, KRAEHENBUHL JP, ROSSIER BC. Structure-function relationship of Na,K-ATPase. *Annu Rev Physiol* 53:565-584, 1991.
- 22.- JORGENSEN PL. Structure, function, and regulation of Na-K-ATPase in the kidney. *Kidney Int* 9:10-20, 1986.
- 23.- SWEADNER KJ, GOLDIN SM. Active transport of sodium and potassium ions. *N. Engl. J. Med.* 14:777-783, 1980.
- 24.- KATZ AI. Renal Na-K ATPase: its role in tubular sodium and potassium transport. *Am J Physiol* 242:F207-F219, 1982.
- 25.- LINGREL JB, KUNTZWEILER T. Na, K-ATPase. *J Biol Chem* 269:19659-19662, 1994.
- 26.- LINGREL JB, VAN HUYSSSE J, O'BRIEN W, ET AL. Structure-function studies of Na, K, ATPase. *Kidney Int* 45 (suppl 44): S32-S39, 1994.
- 27.- YOON KL, GUIDOTTI G. Studies of the membrane topology of the Na K ATPase. *J Biol Chem* 269:28249-28258, 1994.
- 28.- SWEADNER KJ. Overview: Subunit diversity in the Na,K-ATPase. In: *The Sodium Pump: Structure, mechanism, and Regulation*, The Rockefeller University Press, 1991, p. 64-76.
- 29.- TAKAYESU K, RENAUD KJ, TAORNINO J, ET AL. Differential subunit and isoform expression in both in regulation of sodium pump in skeletal muscle. *Curr Top Membr Transp* 34:143-165, 1989.
- 30.- YOUNG RM, LINGREL JB. Tissue distribution of mRNAs encoding the  $\alpha$  isoforms and  $\beta$  subunits of rat Na-K ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 145:52-58, 1987.

- 31.- HERRERA VLM, EMMANUEL JR, RUÍZ-OPAZO N, LEVENSON R, NADAL-GINARD B. Three differentially expressed Na,K-ATPase  $\alpha$  subunit isoforms: Structural and functional implications. *J Cell Biol* 105:1855-1865, 1987.
- 32.- FALLOWS D, KENT D, NELSON L, ET AL. Chromosome-mediated transfer of the murine Na-K ATPase  $\alpha$  subunit confers ouabain resistance. *Mol Cell Physiol* 7:2985-2987, 1987.
- 33.- MUNZER JS, DALY SE, JEWELL-MOTZ EA, LINGREL JB, BLOSTEIN R. Tissue and isoform specific kinetic behavior of the Na K ATPase. *J Biol Chem* 269:16668-16676, 1994.
- 34.- MARTIN-VASALLO P, DACKOWSKI W, EMANUEL JR, LEVENSON R. Identification of a putative isoform of the Na-K ATPase  $\beta$  subunit: primary structure and tissue specific expression. *J Biol Chem* 264:4613-4618, 1989.
- 35.- GOOD PJ, RICHTER K, DAWID IB. A nervous system-specific isotype of the  $\beta$  subunit of the Na-K ATPase expressed during early development of *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9088-9992, 1990.
- 36.- LINGREL JB, ORLOWSKI J, SHULL MM, PRICE E. Molecular genetics of the Na,K-ATPase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 38:37-89, 1990.
- 37.- FAMBROUGH DM, LEMAS MV, HAMRICK M, ET AL. Analysis of subunits assembly of the Na K ATPase. *Am J Physiol* 266:C579-C589, 1994.
- 38.- GEERING K. Subunit assembly and functional maturation of Na-K ATPase. *J Membr Biol* 115:109-121, 1990.
- 39.- McDONOUGH AA, GEERING K, FARLEY RA. The sodium pump needs its  $\beta$  subunit. *FASEB J* 4:1598-1605, 1990.

- 40.- NOGUCHI S, HIGASHI K, KAWAMURA M. Assembly of the  $\alpha$ -subunit Torpedo californica Na-K ATPase with its pre-existing  $\beta$  subunit in *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta* 1023:247-253, 1990.
- 41.- EAKLE KA, KIM KS, KABALIN MA, FARLEY RA. High-affinity ouabain binding by yeast cells expressing Na-K ATPase  $\alpha$  subunits and the gastric  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase  $\beta$  subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2834-2838, 1992.
- 42.- GLOOR S, ANTONICEK H, SWEADNER KJ ET AL. The adhesion molecule of glia (AMOG) is a homologue of the  $\beta$  subunit of the Na-K ATPase. *J Cell Biol* 110:165-174, 1990.
- 43.- SCHMALZING GS, KRONER S, SCHACHNER M, GLOOR S. The adhesion molecule of glia (AMOG/ $\beta$ 2) and  $\alpha$ 1 subunits assemble to functional sodium pumps in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 267:20212-20216, 1991.
- 44.- HOOTMAN SR, ERNST SA. Estimation of the Na-K pump numbers and turnover in intact cells with [3H] ouabain. *Methods Enzymol* 156:213-229, 1988.
- 45.- LOBAUGH LA, LEIBERMAN M. Na-K pump site density and ouabain binding affinity in culture chick heart cells. *Am J Physiol* 253:C731-C743, 1987.
- 46.- CAMERON R, KLEIN L, SHYJAN AW, RAKIC P, LEVENSON R. Neurons and astroglia express distinct subsets of Na-K ATPase  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. *Mol Brain Res* 21:333-343, 1994.
- 47.- MCGUIRT JP, SCHULTE BA. Distribution of immunoreactive  $\alpha$  and  $\beta$  subunits isoforms of Na-K ATPase in the gerbil inner ear. *J Histochem Cytochem* 42:843-853, 1994.
- 48.- SHYJAN AW, LEVENSON R. Antisera specific for the  $\alpha$  1, and  $\beta$  subunits of the Na,K-ATPase: Differential expression of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in rat tissue membranes. *Biochemistry* 28:4531-4535, 1989.

- 49.- SUZUKI S, ZUEGE D, BERTHIAUME Y. Sodium independent modulation of Na-K ATPase activity by  $\beta$  adrenergic agonists in alveolar type 2 cells. *Am J Physiol* 268: L983-L990, 1995.
- 50.- O'BRODOVICH H, STAUB O, ROSSIER BC, GEERIG K, KRAEHENBUHL JP. Ontogeny of  $\alpha$ -1 and  $\beta$ -1 isoforms of Na,K-ATPase in fetal distal rat lung epithelium. *Am J Physiol* 264:C1137-1143, 1993.
- 51.- GICK GG, HATALA MA, CHON D, ISMAIL-BEIGI F. Na-K ATPase in several tissues of the rat: tissue specific expression of subunits mRNAs and enzyme activity. *Membr Biol* 131:229-236, 1993.
- 52.- SUN Y, BALL WJ. Determination of Na-K ATPase  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms and kinetics properties in mammalian liver. *Am J Physiol* 262:C1491-C1499, 1992.
- 53.- FUNDER JW. Regulation of transepithelial Na<sup>+</sup> transport by steroid and peptide hormones. *Semin Nephrol* 12:6-11, 1992.
- 54.- HORISBERGER J, ROSSIER BC. Aldosterone regulation of gene transcription leading to control of ion transport. *Hypertension Dallas* 19:221-227, 1992.
- 55.- SHAHEDI M, LABORDE K, BUSSIERES L, SACHS C. Acute and early effects of aldosterone on Na-K ATPase activity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Am J Physiol* 264:F1021-F1026, 1993.
- 56.- HUNDAL HS, MARETTE A, MITSUMOTO Y, BLOSTEIN R, KLIP A. Insulin induces translocation of the  $\alpha$ -2 and  $\beta$ -1 subunits of the Na,K-ATPase from intracellular compartments to plasma membrane in mammalian skeletal muscle. *J Biol Chem* 267(8):5040-5043, 1992.

- 57.- ROSIC NK, STANDAERT ML, POLLET RJ. The mechanism of insulin stimulation of Na K ATPase transport activity in muscles. *J Biol Chem* 260:6206-6212, 1985.
- 58.- ORLOWSKI J, LINGREL JB. Thyroid and glucocorticoid hormones regulate the expression of multiple Na,K-ATPase genes in cultured neonatal myocytes. *J Biol Chem* 25:3462-3470, 1990.
- 59.- HOROWITZ BC, HENSLEY CB, QUINTERO M, ET AL. Differential regulation of Na-K ATPase  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2, and  $\beta$  subunits mRNA and protein levels by thyroid hormone. *J Biol Chem* 265:14308-14314, 1990.
- 60.- APERIA A, BERTORELLO A, SERI I. Dopamine causes inhibition of Na-K ATPase activity in rat proximal convoluted tubule segment. *Am J Physiol* 252:F39-F45, 1987.
- 61.- HENNING S. Postnatal development: coordination of feeding, digestion and metabolism. *Am J Physiol* 241:G199-G214, 1981.
- 62.- GREENGARD O. Effects of hormones on development of fetal enzymes. *Clin Pharmacol Ther* 14:721-726, 1973.
- 63.- APERIA A, LARSSON L, ZETTERSTROM R. Hormonal inductions of Na-K ATPase in developing proximal tubular cells. *Am J Physiol* 241:F356-F360, 1981.
- 64.- VENKATESH VC, BALLARD PL. Glucocorticoids and gene expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4:301-303, 1991.
- 65.- CELSI G, WANG ZM, AKUSJARVI G, APERIA A. Sensitive periods for glucocorticoids regulation of Na-K ATPase mRNA in developing lung and kidney. *Pediatr Res* 33:5-9, 1993.
- 66.- WANG ZM, CELSI G. Glucocorticoid hormones differentially regulate the mRNA for Na-K ATPase isoforms in infant heart. *Pediatr Res* 33:1-4, 1993.

- 67.- WANG ZM, APERIA A, CELSI G. The regulation of Na-K ATPase gene transcription is age dependent (abst). *J Am Soc Nephrol* 3:481, 1992.
- 68.- FARMAN N, COUNTRY N, LOGVINENKO N, ET AL. Adrenalectomy reduces a1 and b1 Na-K ATPase mRNA expression in rat distal nephron. *Am J Physiol* 263:C810-C817, 1992.
- 69.- CELSI G, STALH J, WANG ZM, NISHI A. Adreno-corticoid regulation of Na-K ATPase in adult rat kidney:effects of posttranslational processing and mRNA abundance. *Acta Physiol Scan* 145:85-91, 1992.
- 70.- BARLET-BASS C, KHADOURI C, MARSY S, DOUCET A. Enhanced intracellular sodium concentration in kidney cells recruits a latent pool of Na-K ATPase whose size is modulated by corticosteroids. *J Biol Chem* 265:7799-7803, 1990.
- 71.- CELSI G, MING WANG Z. Regulation of Na-K ATP ase gene expression: a model to study terminal differentiation. *Pediatr Nephrol* 7:630-634, 1993.
- 72.- GOLDFIEN A. Adrenocorticosteroids and Adrenocortical antagonists. En: Basic & Clinical Pharmacology, 6th ed. Katzung BG editor. Appleton & Lange, pp. 592-607, 1994.
- 73.- VERREY F. Regulation of gene expression by aldosterone in tight epithelia. *Semin Nephrol* 10:410-420, 1990.
- 74.- MATTHEY MA. The adult respiratory distress syndrome: definition and prognosis. *Clin Chest Med* 11:575-580, 1990.
- 75.- METZ C, SIBBALD WJ. Antiinflammatory therapy for acute lung injury: a review of animal and clinical studies. *Chest* 100:1110-1119, 1991.
- 76.- BACHOFEN M, WEIBEL ER. Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 3:35-56, 1982.

- 77.- MARINELLI WA, HENKE C, HARMOND KR ET AL. Mechanisms of alveolar fibrosis after acute lung injury. *Clin Chest Med* 11:657-672, 1990.
- 78.- HASLETON PS. Adult respiratory distress syndrome: A review. *Histopathology* 7:307-332, 1983.
- 79.- MATTHAY MA, WIENER-KRONISH JP. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema. *Am Rev Respir Dis* 142:1250-1257, 1990.
- 80.- DOBBS LG. Isolation and culture of alveolar type II cells. *Am J Physiol* 258:L134-L147, 1990.
- 81.- OLIVERA W, RIDGE K, WOOD LDH, SZNAJDER JI. Active sodium transport and alveolar epithelial Na,K-ATPase increases during subacute hyperoxia in rats. *Am J Physiol* 266:1577-1584, 1994.
- 82.- GONZALEZ-FLECHA B, EVELSON P, RIDGE K, SZNAJDER JI. Hydrogen peroxide increases Na/K ATPase function in alveolar type 2 cells. *Biochem Biophys Acta* 1290:46-52, 1996.
- 83.- JORGENSEN PL. Isolation of (Na+K)-ATPase. *Methods Enzymol* 32:277-290, 1984.
- 84.- LOWRY OH, ROSENBOUGH NJ, FARR AK, RANDALL RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951.
- 85.- FISKE CH, SUBBAROW Y. The colorimetric determination of phosphorous. *J Biol Chem* 66:375-400, 1975.
- 86.- SAMBROOCK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

- 87.- CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single step method of RNA isolation by guanidine thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987.
- 88.- EMANUEL JR, GARETZ S, STONE L, LEVENSON R. Differential expression of Na-K ATPase alpha and beta subunit mRNAs in rat tissues and cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9030-9034, 1987.
- 89.- BARRIOS R, PARDO A, RAMOS C, ET AL. Upregulation of acidic fibroblast growth factor (FGF-1) during the development of experimental lung fibrosis. *Am J Physiol* 273: 451-458, 1997.
- 90.- RIDGE K, RUTSCHMAN DH, FACTOR P ET AL. Differential expression of Na/K-ATPase isoforms in rat alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 273: 246-255, 1997.
- 91.- LAEMMLI UK. Ceavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970.
- 92.- MEDINA L, PÉREZ J, RAMÍREZ R, SELMAN M, PARDO A. Leukotriene C4 upregulates collagenase expression and synthesis in human lung fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1224:168-174, 1994.
- 93.- BRONSTEIN IJC, VOYTA OJ, MURPHY L, BRESNICK, KRICKA LJ. Improved chemiluminescent western blotting procedure. *BioTechniques* 12:748:753, 1992.
- 94.- RANE S, APERIA A. Ontogeny of Na-K-ATPase activity in thick ascending limb and of concentrating capacity. *Am J Physiol* 249:F723-F728, 1985.
- 95.- DOUCET A, KATZ AI, MOREL F. Determination of Na-K-ATPase activity in single segments of the mammalian nephron. *Am J Physiol* 237:F105-F113, 1979.

- 96.- KLEIN LE, LO CS. Regulation of rat renal (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-adenosine triphosphatase mRNA levels by corticosterone. *Experientia* 48:768-773, 1992.
97. GONZÁLEZ S, GRILLO C, GONZÁLEZ M, ET AL. Dexamethasone upregulates mRNA for Na, K, ATPase in some spinal cord neurones after cord transection. *NeuroReport* 7:1041-1044, 1996.
98. MUTO S, NEMOTO J, OHTAKA A, ET AL. Differential regulation of Na-K-ATPase gene expression by corticosteroids in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 270 (Cell Physiol 39): 731-739, 1996.
- 99.- BALLARD PL. Hormonal regulation of pulmonary surfactant. *Endocr Rev* 10:165-176, 1989.
- 100.- BALLARD PL. Mode of action of glucocorticoids on lung maturation. *Curr Probl Clin Biochem* 13:33-46, 1983.
- 101.- ROONEY SA. The surfactant system and lung phospholipids biochemistry. *Am Rev Respir Dis* 131:439-460, 1985.
- 102.- FLOROS J, POST M, SMITH BT. Glucocorticoids affect the synthesis of pulmonary fibroblast-pneumonocyte factor at a pretranslational level. *J Biol Chem* 260:2265-2267, 1985.
- 103.- ORLOWSKI J, LINGREL JB. Tissue-specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic  $\alpha$  isoform and  $\beta$  subunit mRNAs. *J Biol Chem* 263:10436-10442, 1988.
- 104.- SZNAJDER JI, RUTSCHMAN DH, RIDGE KM, OLIVERA W. Mechanisms of lung liquid clearance during subacute hyperoxia in isolated rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 151:1519-1525, 1995.

- 105.- NICI L, DOWIN R, GILMORE-HEBERT M, JAMIESON JD, INGBAR DH. Upregulation of rat lung Na,K-ATPase during hyperoxic injury. *Am J Physiol* 261:L307-314, 1991.
- 106.- DAVIS JM, WHITIN J. Prophylactic effects of dexamethasone in lung injury caused by hyperoxia and hyperventilation. *J Appl Physiol* 72:1320-1325. 1992.
- 107.- GONZALEZ LW, BALLARD PL. Hormones and their receptors. In: Lung Cell Biology, edited by D. Massaro. New York: Marcel-Dekker, Inc., 1989, p. 539-589.
- 108.- BHUTADA A, WASSYNGER WW, ISMAIL-BEIGI F. Dexamethasone markedly induces Na,K-ATPase mRNA<sup>B1</sup> in a rat liver cell line. *J Biol Chem* 266:10859-10866, 1991.
- 109.- LESCALE-MATYS L, HENSLEY CB, CRNKOVIC-MARKOVIC R, PUTNAM DS, MCDONOUGH AA. Low K<sup>+</sup> increases Na,K-ATPase abundance in LLC-PK<sub>1</sub>/Cl<sub>4</sub> cells by differentially increasing  $\beta$ , and not  $\alpha$ -subunit mRNA. *J Biol Chem* 265:17935-17940, 1990.
- 110.- LESCALE-MATYS L, PUTNAM DS, MCDONOUGH AA. Na-K-ATPase  $\alpha$ 1 and  $\beta$ 1 subunits degradation: evidence for multiple subunit specific rates. *Am J Physiol* 264: 583-590, 1993.
- 111.- NOGUCHI S, HIGASHI K, KAWAMURA M. A possible role of the  $\beta$ -subunit of (Na,K)-ATPase in facilitating correct assembly of the  $\alpha$ -subunit into the membrane. *J Biol Chem* 265:15991-15995, 1990.
- 112.- ACKERMANN U, GEERING K. Mutual dependence of Na,K-ATPase  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits for correct posttranslational processing and intracellular transport. *FEBS Lett* 269:105-108, 1990.

- 113.- WANG ZM, YASUI WM, CELSI G. Glucocorticoids regulate the transcription of Na,K-ATPase genes in the infant rat kidney. *Am J Physiol* 267:C450-C455, 1994.
- 114.- TAMKUN MM, FAMBROUGH DM. The Na,K-ATPase of chick sensory neurons. Studies on biosynthesis and intracellular transport. *J Biol Chem* 261:1009-1019, 1986.
- 115.- MIRCHEFF AF, BOWEN JW, YIU SM, MCDONOUGH A. Synthesis and translocation of Na,K-ATPase  $\alpha$  and  $\beta$  subunits to plasma membrane in MDCK cells. *Am J Physiol* 262:C470-483, 1992.
- 116.- CHAPMAN DL, WIDDICOMBE JH, BLAND R. Developmental differences in rabbit lung epithelial cell Na,K-ATPase. *Am J Physiol* 259:L481-487, 1991.
- 117.- BLAND RD, BOYD CAR. Cation transport in lung epithelial cells derived from fetal, newborn, and adult rabbits. *J Appl Physiol* 61:507-515, 1986.

## RESUMEN

La ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> es una proteína integral de membrana que se encuentra en las células de todos los eucariontes superiores y es responsable del transporte de los iones de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> a través de la membrana celular usando el ATP como fuente de energía. Fisiológicamente la ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> desempeña un papel fundamental en órganos como el intestino y los riñones que regulan la reabsorción de fluidos y el movimiento de electrolitos estableciendo un gradiente a través de la membrana del epitelio. La ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> consiste de dos subunidades; la  $\alpha$  que es la subunidad catalítica, con un peso molecular de alrededor de 112 kDa, con el sitio intracelular donde se une el ATP, un sitio de fosforilación y el sitio donde se une la ouabaina y la subunidad  $\beta$  que es una glicoproteína multifuncional de un peso molecular que oscila entre los 42 a 55 kDa. Se han descrito tres isoformas para ambas subunidades. Estudios previos en riñón, corazón e hígado han demostrado que la dexametasona regula la expresión de la ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. En el pulmón la ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> se ha descrito en las células epiteliales alveolares tipo 2 (NT2) y se piensa que participa en el transporte activo de Na<sup>+</sup> y en el aclaramiento del edema pulmonar. El objetivo de este estudio fue determinar si la dexametasona regula a la ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en cultivos de células epiteliales alveolares tipo 2. El estudio de los mecanismos de regulación de la ATPasa de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> mediados por la dexametasona contribuiría a entender mejor el papel que desempeña esta enzima en el transporte activo de Na<sup>+</sup> y el aclaramiento de edema. Se aislaron del pulmón de rata células alveolares tipo 2, se cultivaron con dexametasona 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-8</sup> M, las células se cosecharon en periodos de 3, 6, 12 y 24 horas después de la exposición a dexametasona y se determinaron los niveles de RNA mensajero de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , aislando el RNA mensajero y realizando análisis de Northern blot. La expresión de la proteína se determinó por medio del análisis de Western blot y la función de la enzima se realizó por medio de dos ensayos; el de hidrólisis de ATP en membranas aisladas de las células epiteliales alveolares tipo 2 y el transporte de <sup>86</sup>Rb sensible a ouabaina en las células *in vivo*. Los niveles basales del RNA mensajero transcrito de la subunidad  $\beta$ 1 aumentaron de manera significativa

( $p < 0.05$ ) a las 6, 12 y 24 horas de exposición a la dexametasona. Los niveles del RNA mensajero transcrito de la subunidad  $\alpha 1$  permanecieron sin cambio. La expresión de la proteína de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  aumentó en las NT2 expuestas a dexametasona en comparación con los controles y en asociación con un incremento temporal de la función de la ATPasa de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  después de la exposición a dexametasona. Estos resultados sugieren que probablemente la dexametasona regula a la ATPasa de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en células epiteliales alveolares tipo 2 por medio de mecanismos transcripcionales, traduccionales y post-traduccionales.

## ABSTRACT

The Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase is a transmembrane protein that has been found in all eucaryotic cells. It transports Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> ions through the membrane using energy derived from ATP hydrolysis. The Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-ATPase plays a very important role in the physiology of organs, such as the kidney and the intestine, that transport fluids and maintains Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> gradients across the plasma membrane. The Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase consists of two subunits, The  $\alpha$ -subunit is the catalytic subunit with a molecular weight of approximately 112 kDa, presents the intracellular ATP binding site, a phosphorylation site and a ouabain binding site, the  $\beta$ -subunit is a multifunctional protein with a molecular weight ranging from 42 to 55 kDa. Three isoforms of each one of the subunits have been described. Previous studies in kidney, heart and liver cells have demonstrated that dexamethasone regulates the expression of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. In the lungs, Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase has been reported in alveolar epithelial type 2 cells (AT2) and is thought to participate in active Na<sup>+</sup> transport and lung edema clearance. The aim of this study was to determine whether Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase would be regulated by dexamethasone in cultured rat AT2 cells. Regulation of the Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase by dexamethasone could lead to a greater understanding of its role in active sodium transport and lung edema clearance. Rat AT2 cells were isolated, plated for 24 hours, and exposed to 10<sup>-7</sup> M and 10<sup>-8</sup> M dexamethasone. These cells were harvested at 0, 3, 6, 12 and 24 hours post-dexamethasone exposure steady-state Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase mRNA transcript levels from  $\alpha$  and  $\beta$ subunits were determined after RNA isolation and Northern blot analysis, abundance of the subunits was determined by Western blot analysis and the Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activity was determined by the hydrolysis of ATP in membrane fractions of alveolar epithelial cells and by the measurement of the ouabain sensitive <sup>86</sup>Rb uptake in alveolar epithelial cells *in vivo*. The steady-

state Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase  $\beta_1$  mRNA transcript levels increased in AT2 cells 6, 12 and 24 hour's post-dexamethasone exposure ( $p < 0.05$ ). However, the steady-state  $\alpha_1$  RNA transcript levels were unchanged. The protein expression for  $\alpha_1$  and  $\beta_1$  subunits increased in AT2 cells exposed to dexamethasone compared to controls in association with a temporal increase in Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase function post-dexamethasone exposure. These results suggest that dexamethasone regulates Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase in AT2 cells possibly by transcriptional, translational and post-translational mechanisms.