



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"IZTACALA"**

130 1282/96
Ej. 2

**IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN O CONEXINAS
EXPRESADAS EN LA GLÁNDULA MAMARIA DE RATA Y RATÓN,
EN DIFERENTES ESTADOS FUNCIONALES.**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

DAGOBERTO TAPIA RAMIREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Esta tesis se realizó bajo la supervisión de

DIRECCIÓN:

Dra. Elia Martha Pérez Armendariz.

La cual se realizó en:

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias,
Centro de Investigación y de estudios Avanzados del IPN.
México, D. F. 07000.

Departamento de Fisiología, Instituto de Investigaciones
Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
México, D. F. 04510.

Department of Neuroscience, Albert Einstein College of
Medicine, Bronx, N. Y. 10461, USA.

Este proyecto fue financiado con fondos de la Dra. E. M. Pérez Armendariz obtenidos de los donativos, NS07512 (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, N. Y.) y DJ38529 (National Institute of Health, Bethesda, M.D.), y fue premiado, haciendose acreedor a un financiado de viaje, para su presentación en la Reunión Internacional de Gap Junctions, celebrado en Hiroshima, Japón, 1993.

DEDICO ESTA TESIS

A mis padres: Lauro Tapia Rojas y Alicia Ramirez Zamora por su cariño y comprensión de toda la vida, por su apoyo en mi educación, y sobre todo, por enseñarme a valorar lo que se tiene en la vida.

A mis hermanos: con quienes he compartido tantos momentos agradables de la vida, sin dejar de apoyarnos en los momentos difíciles.

A mis sobrinos: Espero que esto sea un estímulo más por la vida

A toda mi familia: Por su amistad y afecto.

DEDICO ESTA TESIS

A mi esposa Rosario: Por su amor y confianza, y principalmente por entregarme lo mejor de ella.

A mis hijas: Viris, Zaida y a el o la que viene en camino.

A mi suegro: Agustín Rodríguez por su amistad.

A todas aquellas personas que saben ser importantes en mi vida.

AGRADEZCO

A la Dra. Martha Pérez Armendariz, por su apoyo, amistad y sobre todo por introducirme al mundo de las ciencias.

Al Biól. José Luna, del CINVESTAV-IPN por su ayuda y consejos desde el inicio hasta la terminación de este trabajo.

A la Dra. Carmen Aceves y al Dr. Carlos Valverde, del Instituto de Neurobiología-UNAM, por enseñarme algo de lo mucho que ellos saben.

A la Dra. Galarraga y al Dr. José Bargas del IFC-UNAM por su amistad y aliento para la culminación de esta tesis.

A mis compañeros y amigos que con su cariño y amistad me han alentado siempre a seguir adelante.

Al Dr. Hertzberg del Albert Einstein College of Medicine, por haberme provisto de los anticuerpos principalmente utilizados en este estudio, y al Dr. Bennett del mismo instituto.

A la Dra. Romano, al Dr. H. Arechiga, al Dr. V. Tsutsumi. y al Dr. Cerejido del CINVESTAV-IPN, por haberme facilitado el uso de su equipo e instalaciones.

LISTA DE ABREVIATURAS.

<i>a.a.</i>	<i>Aminoácidos</i>
<i>HEPES</i>	<i>Ácido N-2 etanosulfónico-N'- hidroxietil-piperazina</i>
<i>BSA</i>	<i>Albúmina de suero de bovino</i>
<i>AL</i>	<i>Amarillo lucifer</i>
<i>Ac</i>	<i>Anticuerpo</i>
<i>Ag</i>	<i>Antígeno</i>
<i>CO2</i>	<i>Bióxido de carbono</i>
<i>Cx</i>	<i>Conexina</i>
<i>Da</i>	<i>Dalton</i>
<i>SDS</i>	<i>Duodecil sulfato de sodio</i>
<i>PMSF</i>	<i>Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo</i>
<i>h</i>	<i>Hora</i>
<i>IF</i>	<i>Inmunofluorescencia</i>
<i>Ig</i>	<i>Inmunoglobulina</i>
<i>FITC</i>	<i>Isotiocianato de fluoresceína</i>
<i>nm</i>	<i>Nanómetro</i>
<i>PBS</i>	<i>Solución amortiguadora salina con fosfatos</i>
<i>TBS</i>	<i>Solución amortiguadora salina con Tris-base</i>
<i>UC</i>	<i>Uniones comunicantes</i>

INCICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ABREVIATURAS.....	iv
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
OBJETIVOS.....	16
MATERIALES Y METODOS.....	17
Soluciones.....	17
Animales.....	19
Obtención de muestras.....	19
Dispersión y cultivo de células epiteliales.....	19
Anticuerpos.....	22
Inmunofluorescencia.....	23
Controles.....	25
Immunoblot.....	25
RESULTADOS.....	27
ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS.....	38
BIBLIOGRAFIA.....	44

RESUMEN.

Las uniones comunicantes (UC) están formadas por un conglomerado de canales intercelulares formados por un grupo de proteínas homólogas llamadas conexinas (Cxs). La expresión de las Cxs 26, 32 y 43 se evaluó por inmunofluorescencia (IF) indirecta en secciones congeladas de las glándulas mamarias de ratas vírgenes, gestantes y lactando. Las Cxs 26 y 32 se localizaron en la membrana basal y lateral de las células del epitelio alveolar y en los conductos colectores. El inmunopuntilleo fluorescente fue escaso en las glándulas de animales vírgenes, un poco mayor en los organismos gestantes, y se incrementó significativamente (en número y tamaño) en los animales lactando. La Cx43 también se identificó en todos los estados funcionales. Esta se restringió a la periferia de los alvéolos, hacia el polo basal de las células epiteliales, y el tamaño de las placas inmunofluorescentes se alargaron aparentemente durante la lactancia. Su localización sugiere que las uniones comunicantes entre las células mioepiteliales y/o entre las células epiteliales y mioepiteliales expresan la Cx43. Esta misma conexina se encontró también en el tejido conectivo que rodea e invade cada lóbulo parenquimal en todos los estados funcionales. En este tejido, la Cx43 puede estar acoplado a fibroblastos y/o células adiposas. Los estudios de IF en secciones de ratón lactando mostraron la misma distribución de las conexinas. La especificidad del marcado inmunofluorescente de las Cxs 32 y 43 en las glándulas mamarias se confirmó con el empleo de "Immunoblots". El aumento en la expresión de las conexinas detectado durante la gestación y la lactancia puede tener relevancia en la diferenciación de las células epiteliales y en la función secretora de la glándula mamaria.

1.0 INTRODUCCIÓN.

1.1 UNIONES CELULARES.

Dentro del organismo sólo raras veces las células se encuentran aisladas, como es el caso de las células sanguíneas. En otros casos suelen conservarse juntas para formar membranas de cubierta o revestimiento, como es el caso de los epitelios simples, en cuyo caso únicamente las membranas laterales de las células establecen contacto. En la mayoría de los tejidos, las células se encuentran como agregados que forman capas o estructuras más gruesas, en donde cada célula estará unida con las demás por todas sus superficies (Ham, 1975). En las zonas de aposición membranar, las membranas celulares se especializan y forman las uniones celulares (Cox, 1974; De Mello, 1977).

Las uniones celulares se clasifican en cuatro tipos; desmosomas, uniones adherentes, uniones estrechas y uniones comunicantes. Ellas son usualmente divididas de acuerdo a su función de oclusión (uniones estrechas), de adhesión (uniones adherentes o desmosomas) o de comunicación (uniones comunicantes) (Sáez, 1991).

1.1.1 UNIONES COMUNICANTES.

Las uniones comunicantes (UC), también denominadas como uniones de fisura o de tipo nexo, son regiones especializadas de la membrana plasmática formadas por placas de canales intercelulares (ver fig. 1) que permiten la comunicación directa del citoplasma de dos células vecinas, favoreciendo el paso de iones y moléculas pequeñas (con peso molecular no mayor de 1200 Da. y un

diámetro inferior a los 2 nm) por difusión pasiva (Flagg-Newton et al., 1979; Schwarzmann et al., 1981; Lowenstein, 1981).

A) Morfología:

Robertson realizó un estudio morfológico de lo que llamo disco sináptico, donde observó que en las zonas presinápticas y postsinápticas de las dendritas de las células nerviosas de Mauthner en el bulbo raquídeo del pez dorado, contenían zonas intermembranales formadas por agregados de partículas que se organizaban en estrecha aposición (Robertson, 1963), pero no fue hasta 1966, cuando Revel y Karnovsky tiñen los tejidos epiteliales con un marcador extracelular opaco a los electrones llamado lantano, el cual penetra en las uniones intercelulares que se identifican como una zona de especialización membranal única. En los cortes perpendiculares estas zonas se observan como áreas de aposición membranal y presentan un espacio estrecho de alrededor de 2 nm de espesor entre las dos membranas, el cual se llena con lantano. En los cortes paralelos a la membrana se observa que el lantano rodea y llena el centro de los canales intercelulares. Por medio de esta técnica se pudo precisar que las uniones comunicantes son agregados de canales que forman estructuras hexagonales a manera de panal de abejas, con un espacio de centro a centro de 9-10 nm (Karnovsky y Revel, 1967).

Con el desarrollo de las técnicas de microscopía electrónica, así como el estudio de criofractura (ver Fig. 1), el análisis de difracción de rayos-X y de electrones se pudo ampliar la descripción de Revel y Karnovsky, y de esta manera se precisó que el tamaño del orificio en el centro de la unión comunicante variaba de 1.2 a 2 nm, y que cada canal de la unión estaba formado por 12 subunidades

proteicas llamadas conexinas, donde cada membrana en aposición participa con la mitad de las subunidades y a los que se les denomina hemicanal o conexon (Caspar et al., 1977; Unwin y Zampighi, 1980) (ver fig. 2a).

En los últimos años, por medio de técnicas moleculares se han logrado aislar varias conexinas y posteriormente se han producido anticuerpos contra las mismas, con lo que es posible detectar por IF las placas de UC en una gran variedad de tejidos.

B) Bioquímica:

Con el aislamiento de las uniones comunicantes (Hertzberg y Gilula, 1979) y el análisis de la secuencia de aminoácidos por el método de Kyte y Doolittle se sabe que las conexinas presentan cuatro segmentos transmembranales, donde el primero con el segundo y el tercero con el cuarto se unen por dos cadenas extracelulares, en tanto que el segundo con el tercero se unen por una cadena intracelular (ver fig. 2b), tres de ellos están constituidos predominantemente por aminoácidos (a.a) hidrófobicos y el tercero contiene a.a. hidrofílicos por lo que se cree que forma la línea del canal acuoso. Los segmentos que atraviesan la membrana son altamente conservados como es común en las familias de las proteínas que forman los canales (Catterall, 1988), mientras que los segmentos amino y principalmente carboxilo terminal presentan divergencias. Estas regiones probablemente son muy importantes, ya que pueden determinar la presencia o ausencia de un sitio consenso para la fosforilación, no obstante su significado preciso se desconoce por ahora (Bennett, et al., 1991).

C) Comunicación intercelular:

La existencia de las uniones comunicantes puede identificarse por métodos eléctricos, como es la aplicación de una corriente eléctrica a una célula a través de micropipetas y registrando el voltaje en la membrana de la célula vecina, esto con el fin de saber si ambas están acopladas eléctricamente (comunicadas) (Fushpan y Potter, 1959). Otra manera es por medio de la inyección intracelular de colorantes fluorescentes (Kanno y Lowenstein, 1964), como el amarillo de lucifer (Stewart, 1981), estos tienen la gran ventaja de que no son permeables a la membrana celular y por lo tanto no se escapan de la célula. Cuando se inyecta a una célula el colorante puede pasar a través de las uniones comunicantes a las células vecinas.

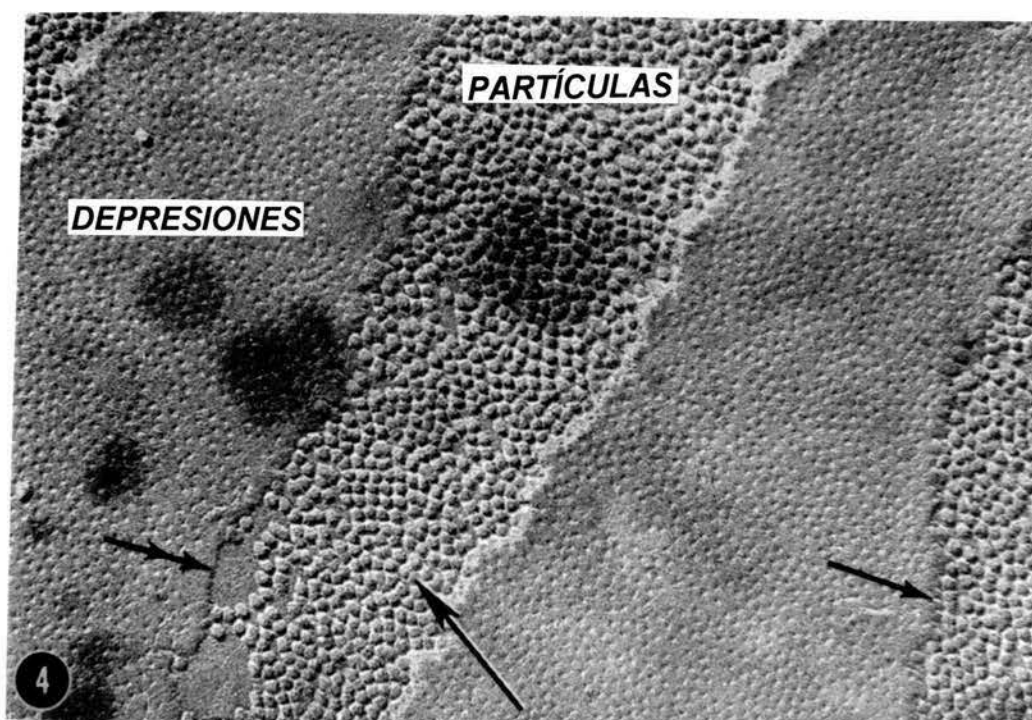


Fig. 1. Micrografía de una replica de criofractura de una unión comunicante entre hepatocitos de hígado de ratón. Las placas de canales intercelulares se encuentran formadas por agregados de partículas que corresponden en su cara complementaria a pequeños orificios o depresiones. Tomado de Goodenough y Revel, 1970.

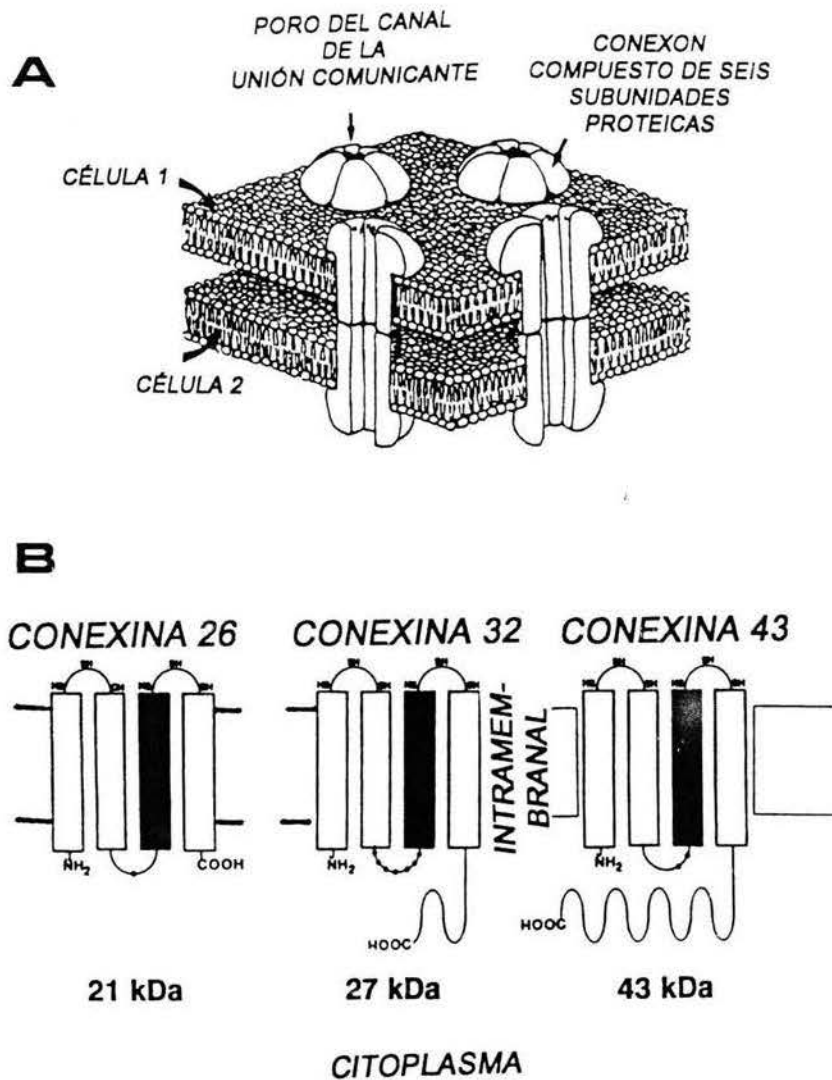


Fig. 2. Representación esquemática de la estructura de los canales de la unión comunicante. A. Cuatro canales atravesando las membranas plasmáticas de 2 células en estrecha aposición (distancia: 2-4 nm). Estos canales comunican el citoplasma de ambas células. Cada canal está compuesto por 6 subunidades proteicas o conexas que se encuentran rodeando el poro del canal acuoso. B. Modelo topológico de diferentes conexas en la membrana celular. Las conexas atraviesan cuatro veces la membrana celular. Los cuatro rectángulos de cada conexina representan las regiones transmembranales compuestas por a.a. hidrofóbicos (cilindros claros) y a.a. hidrofílicos (cilindros negros). De estos últimos se piensa que forman la línea del canal acuoso. La principal diferencia entre las conexas radica en el tamaño de la cadena carboxilo terminal, ya que es donde se dan las principales diferencias con respecto a las secuencias y al número de a.a.

1.2 GLÁNDULA MAMARIA.

La glándula mamaria es un órgano de origen endodérmico que se desarrolla en el embrión a lo largo de las dos líneas mamarias, las cuales se extienden desde la axila hasta la ingle a uno y otro lado de la línea media en la cara ventral del tórax y del abdomen. Pueden originarse en cualquier punto de estas líneas y el número que se forma y su localización varían de acuerdo a la especie. La glándula mamaria es de tipo tubulo alveolar compuesta, que presenta una composición celular heterogénea, formada por dos componentes; el parénquima y el estroma, los cuales muestran cambios estructurales que dependen del estado funcional en el que se encuentre el organismo.

En la glándula inactiva el principal tejido epitelial que se observa es el de los conductos, que se agrupan en los lobulillos. En los conductos menores el epitelio es cúbico simple y existen rudimentos alveolares, mientras que en los conductos principales cambia a uno de dos capas. Entre el epitelio y la lámina basal hay una capa incompleta de células mioepiteliales. El tejido conectivo intralobulillar es denso y abundante, y contiene cantidades variables de tejido adiposo.

La glándula mamaria durante la gestación muestra cambios extensos al prepararse para la lactancia. En la primera mitad de la gestación los conductos intralobulillares proliferan rápidamente y forman yemas que se agrandan para formar los alvéolos. Por la expansión de los lobulillos disminuye la cantidad de grasa y tejido conectivo interlobulillar. También disminuye la cantidad de tejido conectivo intralobulillar. Durante la segunda mitad de la gestación los alvéolos aumentan de volumen y empiezan a sintetizar los productos de secreción, pero es

sólo hasta después del parto que la glándula mamaria empieza a secretar activamente leche rica en grasa, azúcares y proteínas. Muchos alvéolos se dilatan y adquieren aspecto sacular. Están distendidos por la leche y tienen una pared con epitelio bajo. Otros alvéolos están en reposo y tienen un revestimiento epitelial relativamente alto y su luz es pequeña. Las células alveolares individuales que contienen un sistema extenso de retículo endoplasmático granuloso y numerosos ribosomas libres presentan un proceso cíclico de secreción. El proceso secretorio parece ser en parte merocrino y en parte apocrino. Las proteínas de la leche se sintetizan en el retículo endoplasmático granular y se condensan en vacuolas pequeñas en el complejo de Golgi. Los gránulos se desplazan hacia la superficie apical donde son liberados por exocitosis. Este proceso que no incluye la pérdida de citoplasma ni de membrana celular es de tipo merocrino. Los componentes grasos de la leche son elaborados y liberados de manera distinta. En el citoplasma aparecen gotas pequeñas de grasa que después se fusionan para formar glóbulos grandes en el vértice de la célula. Cuando estos glóbulos de grasa son liberados se llevan consigo la membrana celular apical y una envoltura delgada de citoplasma. Esta es una secreción de tipo apocrino. La luz de cada alvéolo está llena de estos dos tipos de productos celulares suspendidos en un líquido acuoso. Hay uniones estrechas que rodean a cada célula secretora para proporcionar adherencia mecánica y limitar la permeabilidad transepitelial. El epitelio alveolar descansa sobre una red de células mioepiteliales y ambas sobre la lámina basal. Las células mioepiteliales son contráctiles y se cree que ayudan a desplazar la leche de los alvéolos a los conductos. (Pitelka, 1977; Imagawa et al., 1990; Fawcett, 1991).

1.3 ANTICUERPOS.

Cuando se introducen a un organismo sustancias ajenas que normalmente no se encuentran en éste, llamadas antígenos, el organismo responde con una respuesta inmunitaria que involucra la producción de anticuerpos. El primer requerimiento básico en cualquier molécula para calificarla de antígeno es que la sustancia sea genéticamente extraña al huésped. Los anticuerpos o inmunoglobulinas son proteínas producidas por las células plasmáticas del sistema inmunológico, que se unen al antígeno específico contra el cual fueron producidos. Los linfocitos B, son los precursores de las células plasmáticas y se producen en el bazo del animal. Los anticuerpos son biomoléculas que son utilizados tanto en la investigación inmunológica como en el diagnóstico clínico.

Estructura de las inmunoglobulinas:

Cada inmunoglobulina o anticuerpo contiene una unidad básica o monómero constituido por dos cadenas pesadas (H) glicosiladas y dos ligeras (L) no glicosiladas. Cada cadena está plegada por enlaces disulfuro en regiones globulares. A la vez las cadenas H están unidas entre si por enlaces disulfuro y cada una de las cadenas L se une a una cadena H también por enlaces disulfuro (ver fig. 3).

Existen cinco tipos de inmunoglobulinas designadas IgG, IgA, IgM, IgD e IgE en donde cada una se encuentra definida por las cadenas pesadas (γ , α , μ , δ , y ϵ respectivamente).

Los genes de los anticuerpos:

La diversidad de los anticuerpos esta controlada a nivel genético. Los anticuerpos son codificados por tres grupos de genes: El locus kappa (K) y el locus lambda (λ) que codifican para las cadenas ligeras, y el locus H que codifica para las cadenas pesadas. Cada locus a su vez se encuentra constituido por diversos segmentos que codifican para las regiones constantes (C) y variables (V) de las inmunoglobulinas. La parte variable de la cadena pesada es codificada por los segmentos V, D y J y las partes constantes (ver Fig. 3) por los segmentos C. Las cadenas ligeras solamente contienen los segmentos V y J.

Se ha estimado que un individuo es capaz de producir una amplia diversidad de anticuerpos (10^8) y cada uno de ellos con cierta especificidad y producidos por una clona de linfocitos B.

Anticuerpos monoclonales:

Típicamente la respuesta inmunológica para un antígeno es heterogénea. Este es el resultado de muchas líneas celulares de linfocitos B, que son los precursores de las células plasmáticas los cuales a su vez producen anticuerpos para el mismo antígeno. En el caso de los anticuerpos monoclonales una población celular originada por una sola célula, conocida como un clon, produce un anticuerpo monoclonal específico contra un solo determinante antigénico. La progenie celular de esa clona de linfocitos B produce anticuerpos idénticos y con una especificidad definida.

Las ventajas de los anticuerpos monoclonales, es que son muy homogéneos y reconocen únicamente un determinante antigénico. En relación a la cantidad de

producción de este tipo de anticuerpo se pueden obtener grandes cantidades con líneas celulares inmortalizadas que incluso pueden congelarse y usarse cuando se deseen. Las limitantes o desventajas para su obtención, es que el procedimiento es extenso y laborioso (se requiere equipo de cultivo). Finalmente el epítotope que reconoce el anticuerpo puede relacionarse con otros antígenos no relacionados con el Ag de interés (Tseng, 1988).

Anticuerpos policlonales:

El término anticuerpo policlonal se define como la población total de anticuerpos presentes en el suero de un animal dirigidos contra un antígeno determinado. Los anticuerpos policlonales son producidos por muchas líneas celulares diferentes o clonas de linfocitos B y reaccionan con diferentes determinantes del mismo antígeno. Esta población contiene diferentes anticuerpos incluidos en las subclases IgG, IgM, IgE, IgA e IgD, en donde cada anticuerpo representa el producto de secreción de un solo linfocito y su progenie clonal (Dunbar, 1990).

Los anticuerpos policlonales pueden desarrollarse fácilmente con la inmunización de animales con la proteína purificada. Las principales desventajas que se encuentran en estos anticuerpos es que; a) Los inmunógenos o antígenos deben ser altamente purificados para obtener la especificidad deseada en la inmunodetección, b) La producción del anticuerpo se limita a la vida del animal inmunizado. Por último c) Cada sangrado del animal se debe analizar individualmente debido a que se presentan cambios en la afinidad, especificidad y subclases de anticuerpos (Dunbar, 1990).

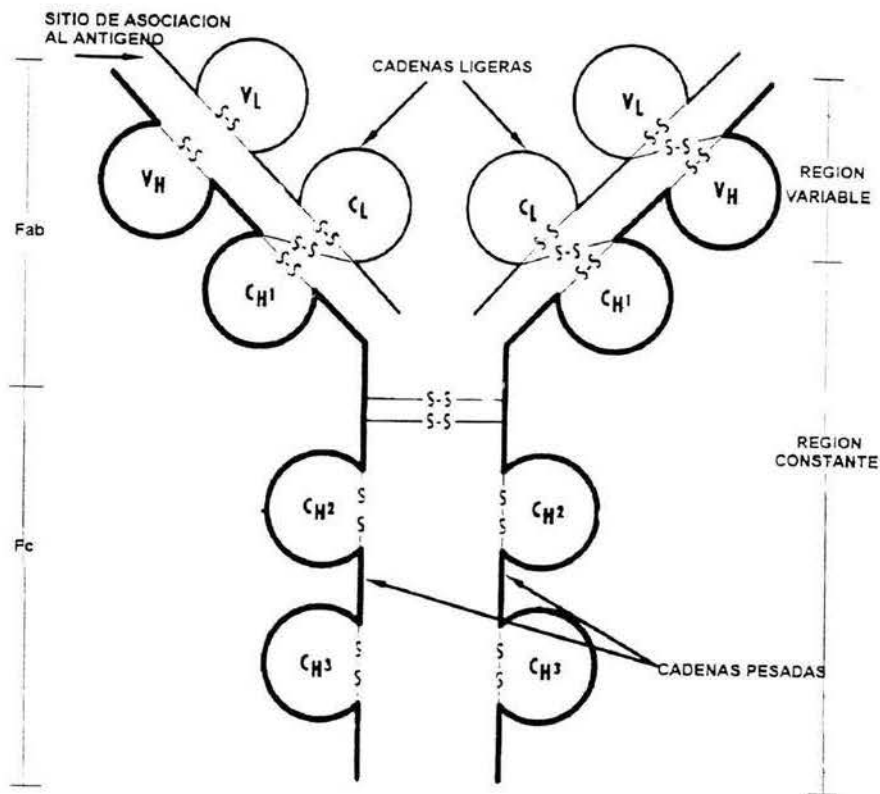


Fig. 3. Estructura de una inmunoglobulina o anticuerpo. Formado por una unidad básica constituido por dos cadenas pesadas (H) y dos cadena ligeras (L). VL (porción variable de las cadenas pesadas), CH1, CH2 y CH3 (porciones constantes de la cadena pesadas). VL (porción variable de la cadena ligera) y CL (porción constante de la cadena ligera). El fragmento Fab esta formado por una cadena ligera y una parte de la cadena pesada, situado en su lado amino terminal. El fragmento Fc esta formado por el resto de la cadena pesada del lado carboxilo terminal de la molécula. Las dos cadenas pesadas y las dos cadenas ligeras se encuentran plegadas y unidas entre si por enlaces disulfuro.

En los últimos años se ha encontrado que las UC están ampliamente distribuidas en todo el cuerpo, faltando sólo en el músculo esquelético y en las células sanguíneas (Leeson, 1987). Entre las posibles funciones de las uniones comunicantes, se ha propuesto que participan en el control del crecimiento y en la diferenciación celular (Lowenstein, 1979; Lowenstein y Rose, 1992; Warner, 1992). En el caso de las glándulas existen evidencias que sugieren que estas pueden participar tanto en su diferenciación (Decker, 1981), como en el proceso de secreción (Meda et al., 1990; Pérez-Armendariz et al., 1991,1994, 1995a, 1995b y 1995c).

En la glándula mamaria in vivo las células epiteliales están intercomunicadas (Berga, 1984) a través de uniones comunicantes (Pitelka, 1973). Se ha sugerido que estas uniones comunicantes pueden participar en el control del crecimiento de este órgano, esto en base a estudios en células epiteliales neoplásicas cultivadas, los cuales han mostrado una correlación inversa entre el grado de comunicación intercelular y el potencial maligno o metastásico (Fentiman et al., 1979; Nicolson et al., 1988; Ren et al., 1990; Lee et al., 1992). Así como también por un estudio donde se encontró que la expresión de la Cx43 en las células neoplásicas de la mama humana esta reducida cuando se compara con un tejido de mama normal (Wilgenbus et al., 1992).

En el siguiente trabajo se utilizó el ciclo natural de proliferación y diferenciación celular que la glándula mamaria presenta durante la gestación y la lactancia, y tiene como objeto el identificar los componentes moleculares de las uniones comunicantes en la rata y el ratón, así como también para estudiar su distribución en los diferentes estados de desarrollo de la glándula. Para esto se

utilizó la técnica de IF empleando anticuerpos específicos contra las diferentes conexinas.

3.0 OBJETIVOS:

1) Identificar los componentes moleculares (conexinas) presentes en las uniones comunicantes de las glándulas mamarias de rata y ratón adultos.

2) Estudiar el patrón de expresión y de localización de las conexinas durante el ciclo de gestación y lactancia (en organismos vírgenes, gestantes y lactando).

4.0 MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 SOLUCIONES.

Para preparar las soluciones, amortiguadores y medios se utilizó agua bidestilada y se esterilizaron por autoclave (A) 22 libras/cm² de presión, a 120° C durante 20 min o por filtración (F) utilizando membranas millipore tipo GS (0.22 µm).

Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS).

Disolver en 800 ml de agua, 8.0 g de Na Cl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na₂ HPO₄ y 0.24 g de KH₂ PO₄. Ajustar el pH a 7.2 (con Na OH o HCl AL 1.0 M) y aforar a 1 litro. (A).

Solución salina amortiguada con Tris-base (TBS).

Disolver en 800 ml de agua, 8.0 g de Na Cl, 0.2 g de KCl y 3.0 g de Tris-base. Ajustar el pH a 8.0 (con Na OH o HCl 1.0 M) y aforar a 1 litro. (A).

Solución de Hank equilibrado en sales (SIGMA).

Disolver el contenido del sobre en un litro de agua y ajustar el pH a 7.4. (con Na OH o H Cl 1.0 M) Contiene Na Cl, 80 g/l; KCl, 4 g/l; glucosa, 10 g/l; KH₂ PO₄, 600 mg/l; Na HPO₄, 475 mg/l y rojo de fenol, 170 mg/l. (F).

Medio 199 (GIBCO).

Disolver el contenido del sobre en 800 ml de agua. Agregar 0.35 g de Na HCO₃, 2.38 g de hepes y ajustar el p H a 7.4 (con Na OH o H Cl 1.0 M). Aforar a un litro. (F).

Colagenasa al 1% (SIGMA).

Se agrega todo el contenido del frasco (1 g) en 50 ml de medio 199, se agita a 37° C durante 15 min. Se centrifuga a 16,000 rpm durante 20 min y se recupera el sobrenadante. Posteriormente se afora a 100 ml con el mismo medio, se filtra y toman alicuotas en frascos pequeños y se guarda en el congelador (-20° C).

Gelatina (DIFCO).

Disolver en 1 litro de agua a 55° C 5.0 g de gelatina y 0.5 g de sulfato de potasio crómico. Ya disueltos completamente los solutos, se sumergen los porta y cubreobjetos de vidrio que se deseen gelatinizar.

4.2 ANIMALES.

Los tejidos mamarios se obtuvieron de ratas Wistar vírgenes (de 3 meses de edad; nulíparas), gestantes (de 18 días), y lactando (de 7-14 días postparto). Los ratones (hembras) lactando fueron de la cepa CD1 (de 7-14 días postparto). Todos los animales fueron anestesiados con 35 mg/kg de pentobarbital y sacrificados por decapitación.

4.3 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.

La glándula mamaria y fragmentos de corazón, hígado y páncreas fueron rápidamente disecados y mantenidos en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) a 4°C y fueron cortados en trozos más pequeños (~5 mm²). Posteriormente fueron congelados en nitrógeno líquido y mantenidos en un Revco (ultracongelador) a -80°C hasta el momento de cortar las rebanadas (4-7 µm) en un criostato (Damon/IEC Division) a -38°C para la glándula mamaria y a -24°C para los otros tejidos.

4.4 DISPERSIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIALES.

Una preparación enriquecida de células epiteliales se obtuvo utilizando los métodos descritos por Richards et al., (1983). Brevemente, una vez disecada la glándula mamaria de la rata, se mantuvo en medio Hank o M-199 sobre hielo. Posteriormente la glándula se peso y corto en trozos

muy finos. Después de esto, se centrifugo 2 min. a 3000 rpm y la pastilla se resuspendió en medio Hank de dispersión (10 ml/g de tejido) que contenía colagenasa al 1% (6 ml/50 ml) y albúmina de suero de bovino (BSA) (500 mg/50 ml). En seguida se coloco en un baño María (37°C) con agitación durante 80 min. Transcurrido este tiempo se hizo un filtrado con gasa doble y se resuspendió y centrifugó dos veces (2 min a 3000 rpm) para quitar la colagenasa. Después, se resuspendió en un gradiente de percol al 16% y se ultracentrifugó a 14,000 rpm durante 1h para posteriormente recuperar la banda de las células epiteliales. Estas células se resuspendieron y centrifugaron dos veces (2 min a 3000 rpm) para lavar el percol y se colocaron en 2 ml de medio de cultivo 199 conteniendo insulina (10 µg/ml), BSA (1 mg/ml), prolactina de ovino (1 µg/ml) y factor de crecimiento epidermal (1 µg/ml). Por último las células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio cubiertos con gelatina y colocados durante 24 h en una incubadora a 37° C con 95% de O₂ y 5% de CO₂, o bien, fueron congeladas en nitrógeno líquido para estudios de "immunoblot" (ver diagrama 1).

DISECAR LA GLÁNDULA MAMARIA

PESAR Y CORTAR EN TROZOS FINOS

LAVAR POR CENTRIFUGACIÓN (2 min. a 3000 rpm)

**DISOCIAR CON COLAGENASA
(80 min. a 37°C con agitación)**

FILTRAR (con gasa doble)

LAVAR (dos veces)

**RESUSPENDER EN UN GRADIENTE
DE PERCOL Y ULTRACENTRIFUGAR
(1 h a 14,000 rpm)**

**OBTENER LA BANDA DE LAS CÉLULAS
EPITELIALES**

LAVAR (dos veces)

**RESUSPENDER EN MEDIO DE CULTIVO
CON INSULINA, BSA, PROLACTINA DE
OVINO Y FACTOR DE CRECIMIENTO
EPIDERMAL**

CULTIVAR (18-24 hrs)

INMUNOFLUORESCENCIA

"IMMUNOBLOT"

Esquema 1. Procedimiento para la dispersión y el cultivo de las células epiteliales de la glándula mamaria de la rata.

4.5 ANTICUERPOS

La inmunolocalización de la Cx26 se hizo con un anticuerpo monoclonal de conejo purificado por afinidad contra el oligopéptido 105-119 de la Cx26 diluido 1:100 en PBS y con un anticuerpo policlonal de conejo contra la Cx26 de ratón purificado por afinidad (Traub et al., 1989) diluido 1:25 en PBS. Para la localización de la Cx32 se usaron dos anticuerpos policlonales de cabra purificados por afinidad contra las uniones comunicantes del hígado de la rata (594 y 893), (Hertzberg & Skibbens, 1984) a una dilución de 1:50 en PBS y un anticuerpo monoclonal R5.21C (Stevenson et al. 1986) sin diluir. Para la localización de la Cx43 se usaron anticuerpos monoclonales de conejo purificados por afinidad contra el oligopéptido 346-360 de la Cx43 (Yamamoto et al., 1990) a una dilución final de 1:100 en PBS.

Los anticuerpos secundarios se utilizaron dependiendo del organismo del cual se habían obtenido los anticuerpos primarios, por ejemplo, si el anticuerpo primario se obtuvo en conejo, el anticuerpo secundario tiene que ser contra conejo. Estos anticuerpos secundarios se utilizaron generalmente a una dilución de 1:100 con excepción del anticuerpo R5.21C cuya dilución fue de 1:50 en PBS.

Para la Cxs 26 y 43 se usaron anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo unido a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (obtenido de Kikergaard and Terry Laboratories Gaithersburgo M. D. USA), y para la Cx32 se uso de cabra anti-IgG de rata unido a FITC y obtenido del mismo laboratorio.

4.6 INMUNOFLUORESCENCIA.

La técnica de Inmunofluorescencia indirecta se adaptó de los métodos inmunoquímicos de R. Dermietzel et al. (1991). Para los estudios de IF se colocaron las rebanadas congeladas sobre cubreobjetos de vidrio cubiertos con gelatina o se emplearon también células cultivadas sobre ellos. Posteriormente se le dieron tres lavados de 10 min. c/u con PBS para después ser fijadas por 20 min en etanol al 70% a -20° C (para la Cx32 y Cx43), o por 5: 3: 5 min. en acetona al 100; 50; y 100% respectivamente (para la Cx26). Las muestras fueron preincubadas con 0.1% de albúmina de suero de bovino libre de IgG en PBS, por 1 h para reducir los enlaces no específicos y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4° C. Al día siguiente después de 1 h de lavados con PBS, las muestras fueron incubadas durante 1 h con un anticuerpo secundario unido a una molécula fluorescente de isotiocianato de fluoresceína (FITC). Más tarde, después de otra hora de lavados, los cubreobjetos fueron montados en 0.5% de p-fenilenediamina (en glicerol al 33% en PBS) para preservar la fluorescencia, examinados y fotografiados bajo objetivos de 40X y 63X en microscopio de transmisión de luz o epifluorescencia (ver diagrama 2).

DISECAR LOS TEJIDOS

CORTAR BLOQUES (~0.5 cm.)

CONGELAR (con nitrógeno líquido)

**CORTAR EN CRIOSTATO Y OBTENER
REBANADAS (4-7 μ m)**

LAVAR CON PBS ($\frac{1}{2}$ h)

PERMEABILIZAR

Cxs 32 y 43 (20 min. en ET-OH al 70% a -20°C)

Cx 26 (5:3:5 min. en acetona al 100,50 y 100%)

PREINCUBAR CON BSA AL 0.1% (1 h)

**INCUBAR CON ANTICUERPO PRIMARIO
(toda la noche a 4°C)**

LAVAR CON PBS (1 h)

**INCUBAR CON ANTICUERPO SECUNDARIO
(1 h a T° Amb.)**

LAVAR CON PBS (1h)

**MONTAR LAS PREPARACIONES Y
OBSERVARLAS AL MICROSCOPIO
DE FLUORESCENCIA**

Esquema 2. Procedimiento para la obtención de las muestras e inmunofluorescencia.

4.7 CONTROLES.

En cada experimento se procesaron tejidos controles positivos y negativos en paralelo a los tejidos de la glándula mamaria. Los tejidos controles normalmente usados son, hígado, páncreas y corazón, ya que los hepatocitos y células pancreáticas acinares expresan abundante Cx32 y Cx26 (Dermietzel et al., 1984; Nicholson et al. 1987; Traub et al. 1989), y los miocitos cardiacos expresan abundante Cx43 (Beyer et al., 1987). Los anticuerpos contra la Cx26 y la Cx32 marcan las aposiciones membranales de los hepatocitos y de las células acinares, en tanto que en secciones de corazón los resultados son negativos. Todo lo contrario ocurre cuando se aplica un anticuerpo contra la Cx43 (ver fig. 4). Por último, la especificidad de la unión de los anticuerpos contra las Cx26 y la Cx43 de las uniones comunicantes en tejidos de glándula mamaria se confirmaron por estudios de "immunoblot".

4.8 "IMMUNOBLLOT".

Los cultivos enriquecidos en células epiteliales, los fragmentos de glándula mamaria y los tejidos controles fueron homogeneizados en 10 mM de NaHCO₃ conteniendo 1 mM de fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF) para inhibir la proteólisis. El concentrado de proteína de los homogenados se determinó usando un analizador de proteínas Bio-Rad que emplea BSA como estándares, 80 microgramos del total de proteína de ambas muestras fueron cargadas en geles de poliacrilamida-SDS al 12.5% (Cx43) y al 10% (Cx32) y separadas por electroforesis. Los geles fueron transferidos a papel de nitrocelulosa (2 h a 300 mA), bloqueando con leche sin grasa a una concentración del 5% en TBS y subsecuentemente se incubaron toda la

noche con el anticuerpo contra la Cx43 a una dilución final de 1:1000, o bien, con un anticuerpo contra la Cx32 del hígado de rata (594) a una dilución final de 1:500. Las membranas fueron lavadas con PBS por 2 h y el anticuerpo fue conjugado con proteína A marcado con ¹²⁵I y visualizado por autorradiografía.

5.0 RESULTADOS.

En la Fig. 5 se muestran micrografías de inmunofluorescencia (IF) de regiones del parénquima de la glándula mamaria de ratas (A,C,E) y ratones (B,D,E) lactando obtenidas después de que las secciones congeladas fueron incubadas con un anticuerpo dirigido contra la secuencia de aminoácidos 101-119 de la Cx26 (A,B), otro anticuerpo contra la Cx32 (C,D) y un más contra la secuencia de aminoácidos 346-360 de la Cx43 (E,F). En esta se pueden observar estructuras acinares formadas por células epiteliales alrededor de un lumen. La marca de la Cx26 (A,B) y Cx32 (C,D) se detectó como un marcado punteado en la membrana lateral y en la región basal (flechas). El puntilleo para ambas conexinas fue detectado en todos los alvéolos. Resultados semejantes se obtuvieron con dos diferentes anticuerpos contra la Cx26 y tres contra la Cx32. En contraste la marca de la Cx43 (E,F) no se localizó en las membranas laterales y sólo se restringió a la periferia de las estructuras acinares, hacia el polo basal de las células epiteliales.

En la fig. 6a. se muestra que el puntilleo inmunofluorescente de la Cx32 se localizó en las aposiciones membranales de las células epiteliales cultivadas por 16 h obtenidas de las glándulas mamarias de ratas lactando. En la fig. 6b. se muestra el "immunoblot" obtenido con el mismo anticuerpo (594) de un homogenado de glándula mamaria de rata lactando (línea b) y de una preparación enriquecida de células epiteliales disociadas (línea d) donde se detecto una banda de 27 kDa característica de la Cx32 (Paul, 1986). Bandas con el aparente mismo peso molecular fueron detectadas en homogenados de tejidos control que se conoce expresan abundante Cx32, tales como el hígado (línea a) y el páncreas (línea e),

pero no en el corazón (línea c) tejido que expresa principalmente la Cx43 (Beyer et al., 1987). El nivel de expresión de la Cx32 en la glándula mamaria fue relativamente menor a el encontrado en el hígado o en el páncreas, consistentemente con el menor inmunopuntilleo detectado por IF entre las células epiteliales de la glándula mamaria y el detectado en esos tejidos (Fig. 4 y 5).

En la Fig. 7, 8 y 9 se comparó el patrón de expresión de las conexinas en las glándulas de los organismos vírgenes, gestantes y lactando. La expresión de la Cx26 y de la Cx32 se restringió a las células epiteliales. La marca fluorescente para ambas conexinas fue escasa en las glándulas de los animales vírgenes (Fig. 7B, 8B), mayor en la de los animales gestantes (Fig. 7D, 8D), y mucho mayor (en número y extensión) en la de los animales lactando (Fig. 7F, 8F). En tejidos de animales gestantes, no todos los alvéolos fueron marcados uniformemente y la localización basal de esas dos conexinas no se observó claramente como en los tejidos de ratas lactando. La marca de IF de la Cx43 se restringió siempre hacia el polo basal de las células epiteliales, esto es, hacia la periferia de los alvéolos, tanto en las glándulas de animales vírgenes, como en las de los animales gestantes y lactando. El marcado fue relativamente abundante en todos los estados (Fig. 9 B,D,F).

Una distribución similar de las conexinas se encontró por IF en las estructuras que semejan conductos colectores. En la Fig. 10 se muestran secciones de la rata lactando (A,B) y virgen (C), en las cuales se observaron estructuras luminarias 4-5 veces mayores que en los acinos (comparar con Fig. 5 A,C,E). Puede observarse que al igual que en los acinos alveolares la marca de la Cx26 se restringió a las aposiciones membranales entre las células del epitelio luminal (Fig. 10A y ampliación). La marca de la Cx43 se observó en el tejido estromal que

engloba a los conductos en donde se localizan las capas concéntricas de fibroblastos (Eyden et al., 1986) (Fig. 10 B,C), y la marca se concentró aún más hacia el polo basal de las células epiteliales, donde se localizan las células mioepiteliales (Pitelka et al., 1973).

El estroma de la glándula mamaria consiste de tejido conectivo interlobular denso e intralobular laxo que engloba al tejido parenquimatoso y esta formado principalmente por fibroblastos, células adiposas y elementos vasculares (Pitelka, 1977). En el estroma el puntilleo de la IF de la Cx43 se observó que se extiende en el tejido conectivo laxo entre los acinos (Fig. 9A), así como las bandas de tejido conectivo denso que separan a los diferentes lóbulos en todos los estados funcionales (Fig. 10 B,C). En elementos vasculares, la marca de las Cxs 26, 32 y 43 no fue detectada.

La especificidad de la marca de la Cx43 se confirmó por estudios de "immunoblot". En la Fig. 11 se muestran "immunoblots" obtenidos al correr por electroforesis las proteínas totales de homogenados de glándula mamaria de animales en diferentes estados funcionales; virgen (línea b), gestante (línea c) y lactando (línea d) además de controles positivo y negativo tales como el corazón (línea a) y el hígado (línea e) respectivamente. Se detectó una banda de 43 kDa tanto en la glándula mamaria en todos los estados funcionales, como en el corazón y el testículo (f) pero no en el hígado, confirmándose con esto, la presencia de la Cx43 en este tejido y la especificidad de la unión del anticuerpo.

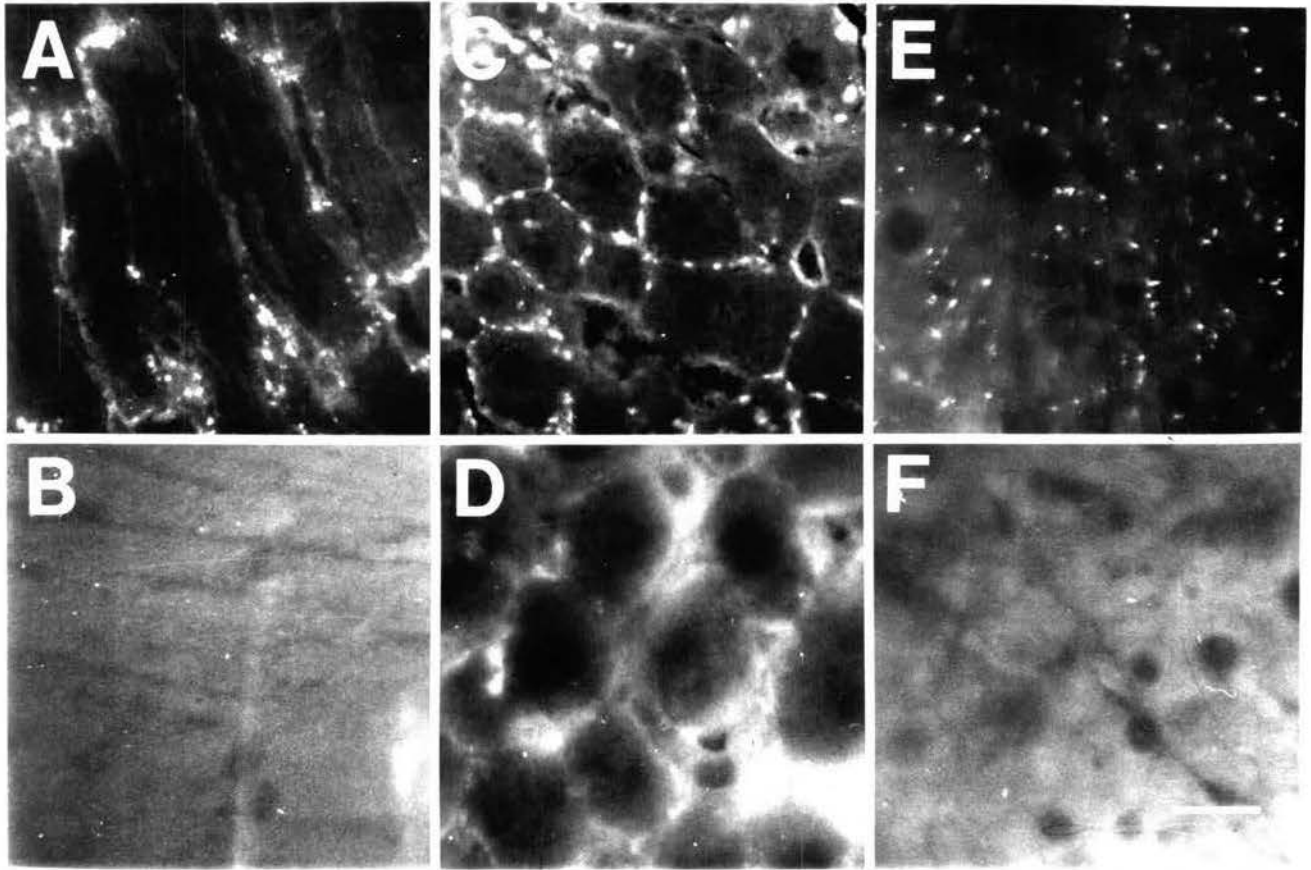


Fig. 4. Expresión de las conexinas en tejidos controles. Micrografías de criosecciones de corazón (A,B), hígado (C,D) y páncreas (E,F) después de que fueron incubadas con anticuerpos específicos dirigidos en contra de las Cxs 43 (A,B), 32 (C,D) y 26 (E,F). La inmunoreacción con el anticuerpo contra la Cx43 en corazón dio como resultado una marca punteada fluorescente entre los discos intercalares de las fibras cardiacas (A). En el hígado y el páncreas también se marcaron zonas de las membranas plasmáticas celulares en aposición (C y E) con el anticuerpo contra las Cxs 32 y 26 respectivamente. En B,D y F las criosecciones fueron incubadas con anticuerpo secundario (B y D) o suero preinmune (F), en ausencia del anticuerpo primario. Estas últimas criosecciones muestran imágenes características de los tejidos controles negativos, en los cuales no se detectan puntos fluorescentes. Barra de calibración 20 μ m.

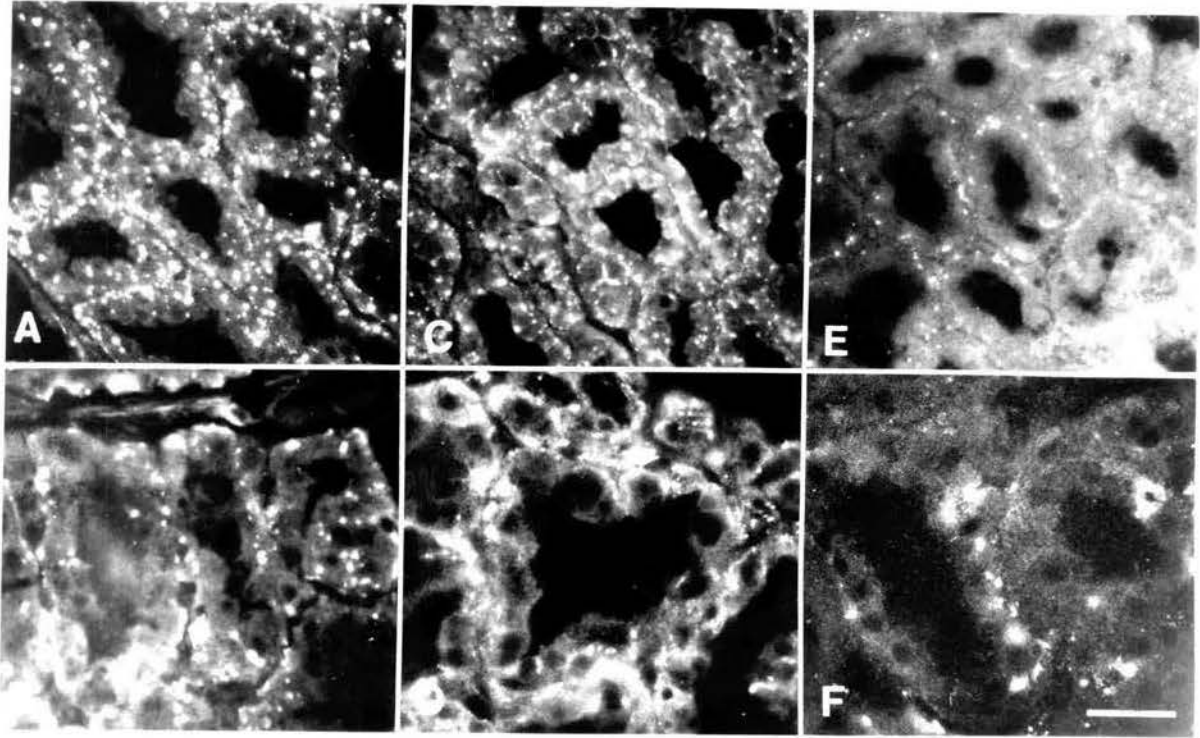
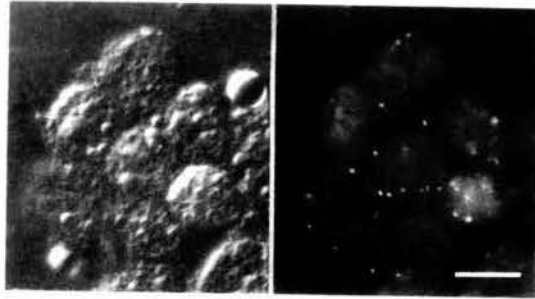


Fig. 5. Expresión de las conexinas (Cxs) 26, 32 y 43 en células epiteliales del parénquima de la glándula mamaria de rata y ratón en estado de lactancia. Micrografías de inmunofluorescencia (IF) de criosecciones de las glándulas mamarias de rata (A,C,E) y ratón (B,D,F) después de que fueron incubadas con anticuerpos contra las Cx26 (A,B) Cx32 (C,D) y Cx43 (E,F). La marca de las Cxs 26 y 32 mostraron una distribución similar, localizándose esta marca en la membrana lateral y basal de las células epiteliales (flechas). En contraste, el marcado por la IF contra la Cx43 se restringió únicamente a la periferia de las estructuras epitelio acinares, hacia el polo basal de las células epiteliales. Barra de calibración de (A,C,E) 40 μ m. y (B,D,F) 20 μ m.

(a)



(b)

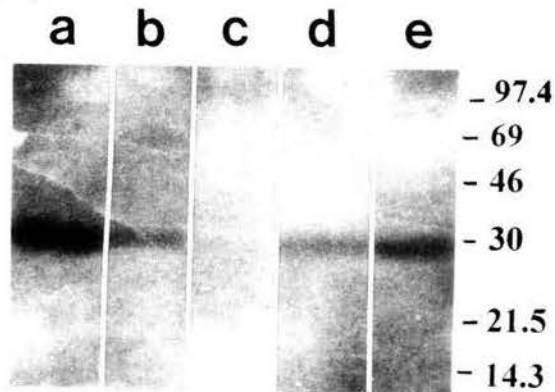


Fig. 6. (a) Expresión de la Cx32 en células epiteliales mamarias de rata lactando en cultivos de 16 h. Micrografías de contraste de fase (izquierda) y de fluorescencia (derecha). Se observó una marca fluorescente (puntilleo) en las zonas de aposición membranal de las células epiteliales. Barra de calibración 20 μ m. (b) Autoradiografía de un "immunoblot" obtenido después del corrimiento de las proteínas totales en geles de poliacrilamida-SDS (separadas por electroforesis) de homogenados de: hígado (a), tejido mamario de rata lactando (b), corazón (c), células epiteliales dispersadas de rata lactando (d) y páncreas (e). Los pesos moleculares están indicados en miles a la derecha. Se observa claramente que el anticuerpo reconoce una banda de 27 kDa en las células epiteliales disociadas, así como en el tejido mamario y en los tejidos controles de hígado y páncreas, pero no en el corazón que es un tejido control negativo.

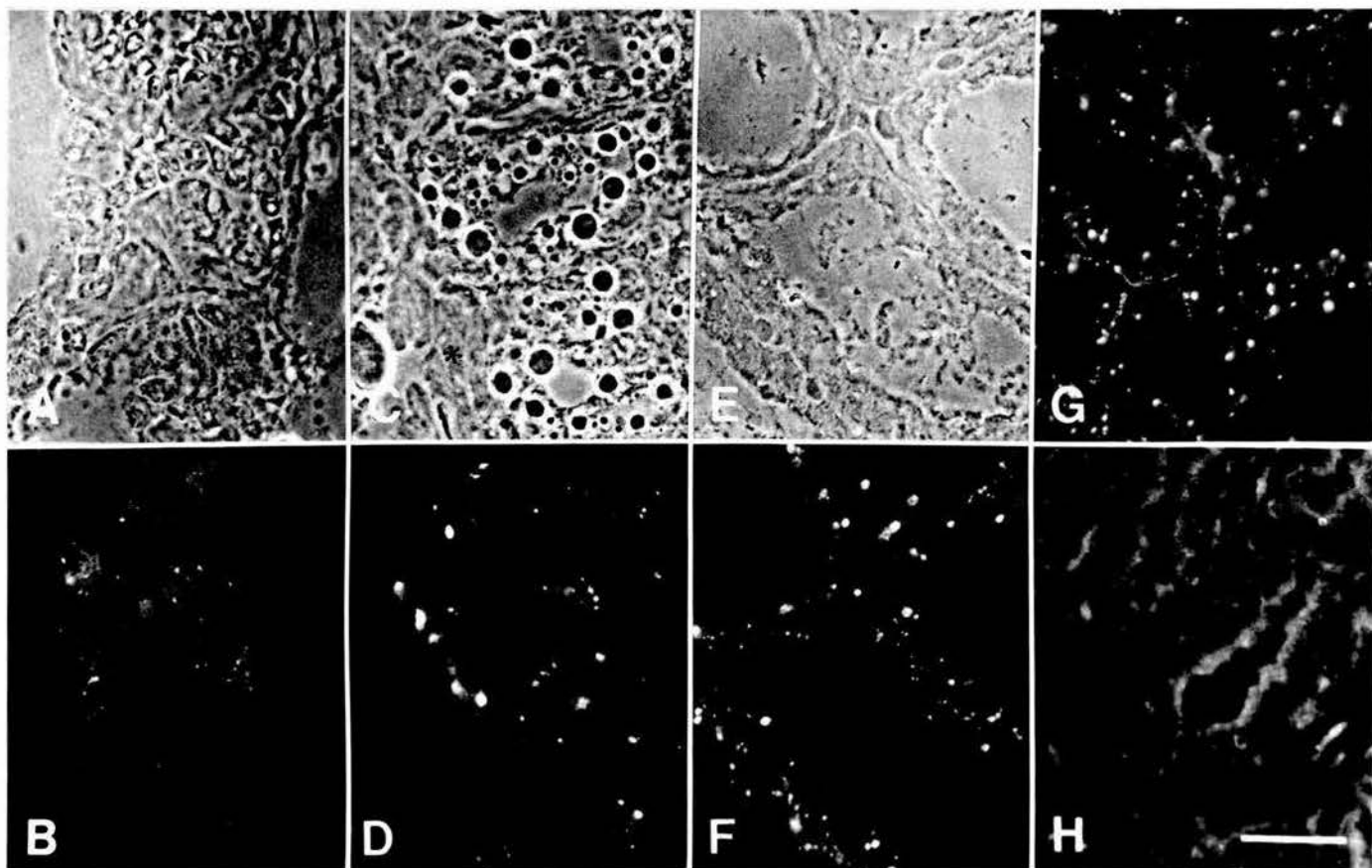


Fig. 7. Expresión de la Cx26 en glándulas mamarias de ratas vírgenes, gestantes y lactando. Micrografías de contraste de fase e IF de criosecciones de glándula mamaria de rata virgen (A,B) gestante (C,D) y lactando (E,F,G,H) en regiones del parénquima después de que fueron incubadas con un anticuerpo dirigido contra los a.a. (105-119) de la Cx26 (B,D,F), así como también con un anticuerpo policlonal dirigido contra la proteína total de la Cx26 (G) o con suero preimmune (H). En todos los estados la marca de la Cx26 se encontró en el componente parenquimatoso o epitelial de la glándula y no se detectó en el tejido conectivo (*) (A,B). En los animales vírgenes se detectó poca marca (puntos pequeños) en las células epiteliales (C,D), que aumentó moderadamente en animales gestantes (C,D) y significativamente en animales lactando (F,G). La marca se observó claramente en la membrana lateral y basal de las células epiteliales (F,G). Resultados negativos se obtuvieron cuando las secciones se incubaron con suero preimmune (H). Barra de calibración 20 μ m.

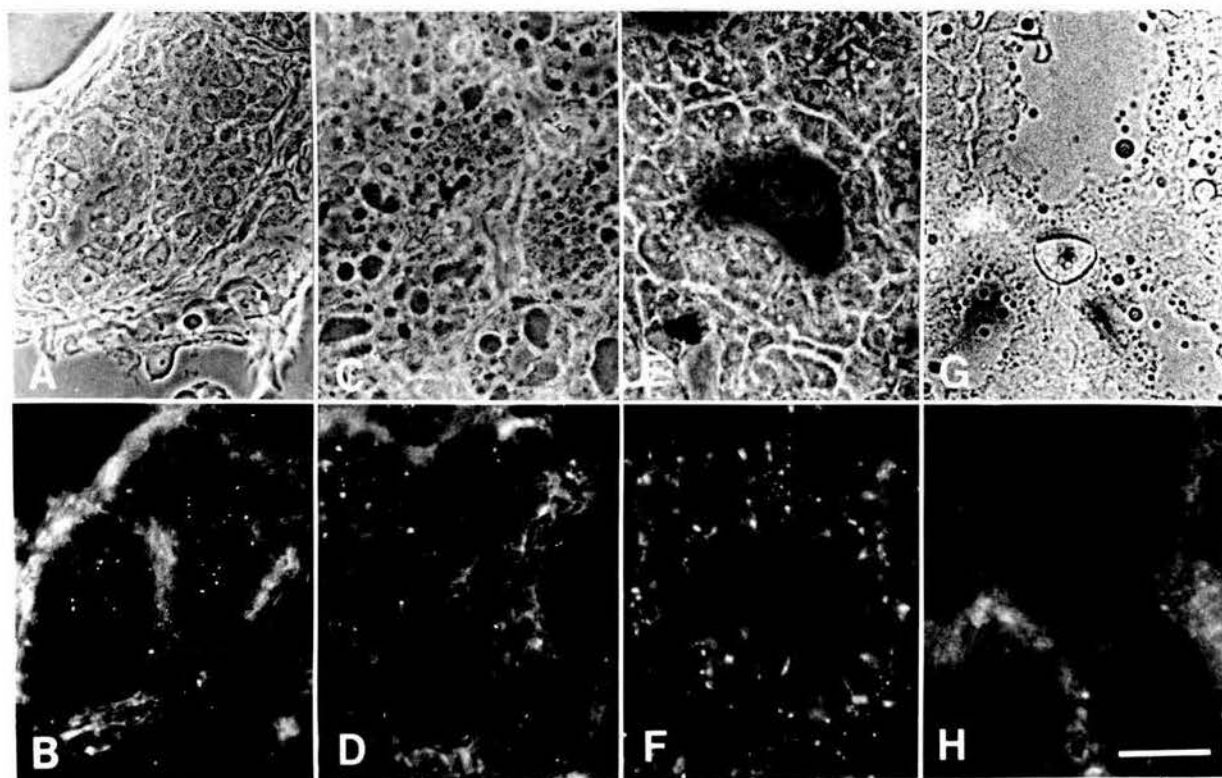


Fig. 8. Expresión de la Cx32 en glándulas mamarias de ratas vírgenes, gestantes y lactando. Micrografías de contraste de fase e IF de criosecciones de glándula mamaria de rata virgen (A,B), gestante (C,D) y lactando (E-H) en regiones del parénquima después de que fueron incubadas con un anticuerpo policlonal dirigido contra la proteína total de la Cx32 (B,D,F) o con suero preinmune (H). En todos los estados la marca fluorescente se localizó únicamente en las células epiteliales. En los organismos vírgenes (A,B) solamente se observaron unos pequeños puntos fluorescentes en las células epiteliales. La marca aumentó moderadamente en animales gestantes (C,D) y significativamente en animales lactando (E,F) en los cuales la marca fluorescente pudo observarse claramente en las membranas basales y laterales de estas células. Resultados negativos se obtuvieron cuando las secciones se incubaron con suero preinmune (G,H). Barra de calibración 20 μ m.

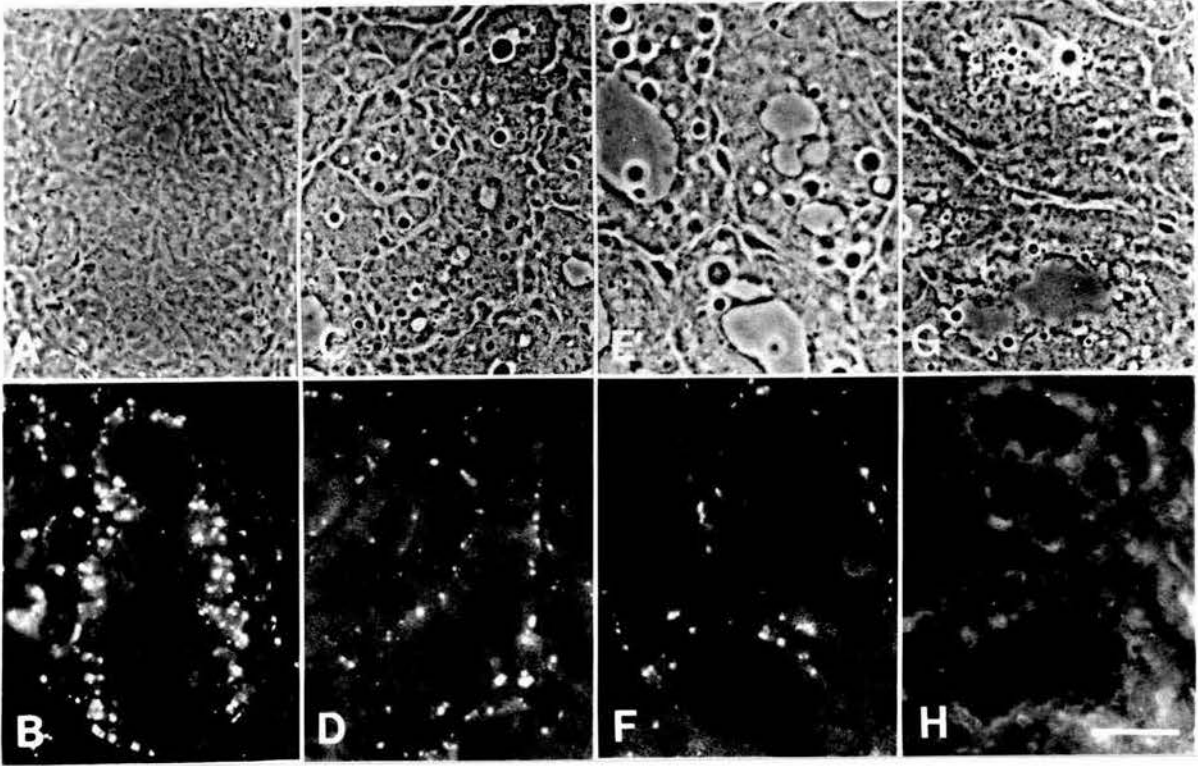


Fig. 9. Expresión de la Cx43 en glándulas mamarias de ratas vírgenes, gestantes y lactando. Micrografías de contraste de fase e IF de criosecciones de glándula mamaria de rata virgen (A,B), gestante (C,D) y lactando (E-H) en regiones del parénquima después de que fueron incubadas con un anticuerpo contra la Cx43 (B,D,F) o con suero preinmune (H). En contraste con el escaso marcado descubierto para la Cx26 y la Cx32 en las células epiteliales de animales vírgenes, el marcado de la Cx43 fue abundante y se restringió a la periferia de los alvéolos epiteliales y en las células del estroma que los encierran (A,B). En criosecciones de rata gestante (C,D) y lactando (E,F) la marca de la Cx43 continuó restringida a la periferia de las estructuras epitelio acinares. Resultados negativos se obtuvieron cuando las secciones se incubaron con suero preinmune (G,H). Barra de calibración 20 μ m.

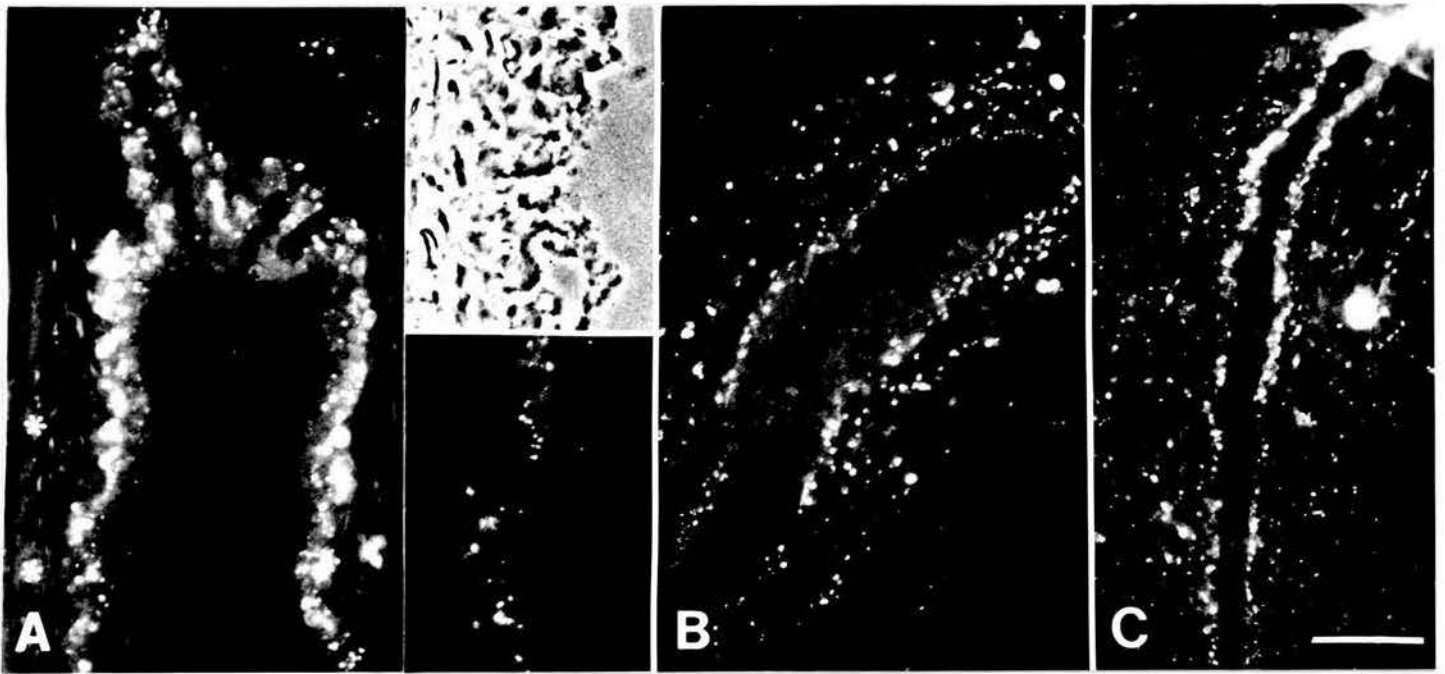


Fig. 10. Distribución de las Cxs 26 y 43 en los conductos y el estroma. Micrografías de criosecciones de glándula mamaria de ratas lactando (A,B) y virgen (C) en regiones que semejan conductos colectores. (A) La Cx26 se localizó restringida en las aposiciones membranales de las células epiteliales. Barra de calibración (A,B,C) 40 μ m. La zona en (A) marcada con asteriscos esta amplificada a la derecha de la misma y la barra de calibración corresponde en este caso a 20 μ m. La Cx43 se encontró ampliamente distribuida en el tejido estromal que engloba los conductos, concentrándose hacia el polo basal de las células epiteliales tanto en secciones de rata virgen (C) como lactando (B).

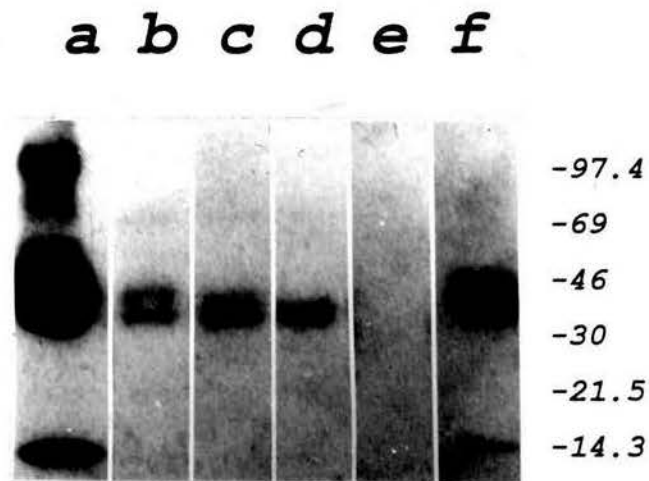


Fig. 11. La Cx43 se expresa en diferentes estados funcionales de la glándula mamaria. Autorradiografía de un "Immunoblot" después del corrimiento de las proteínas totales en geles de poliacrilamida-SDS (separadas por electroforesis) de homogenados de: tejidos de glándula mamaria de rata virgen (b), gestante (c), lactando (d), tejido control negativo de hígado (e) y tejidos control positivo de testículo (f) y corazón (a). Los pesos moleculares están indicados en miles a la derecha. Se observa claramente que el anticuerpo reconoce una banda de 43 kDa en todos los tejidos mamarios, así como en el tejido de corazón y en el testículo, pero no en el hígado.

6.0 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Identificación de la Cx32 en las células epiteliales mamarias.

Con los resultados obtenidos se demostró que la Cx32 es expresada en las células epiteliales mamarias de las glándulas de rata y ratón, así como en cultivos de células epiteliales de rata lactando. Estos resultados difieren de otros estudios recientes realizados en paralelo a este proyecto, en los cuales no se logró identificar a la Cx32 en la glándula mamaria de ratón (Monaghan et al. 1994) y de humano (Wilgenbus et al. 1992), ni tampoco en cultivos de células epiteliales (Lee et al. 1992). Es difícil que los resultados aquí presentados resulten de una falsa positiva, ya que el anticuerpo contra la Cx32 utilizado principalmente en este estudio detectó únicamente una banda de 27 kDa en "immunoblots" de glándula mamaria lo mismo que en tejidos controles positivos. Además el puntilleo de la IF se restringió a marcar las zonas de aposición de las membranas celulares. También cabe mencionar que el mismo patrón de inmunomarcado se encontró en la glándula mamaria de animales lactando con otros dos diferentes anticuerpos contra la Cx32. Por lo anterior, es probable que la diferencia entre nuestros resultados y los de otros (Monaghan et al. 1994) se deban a diferencias en la afinidad de los anticuerpos utilizados y/o a que Monaghan y colaboradores hayan inducido una alteración de los sitios antigénicos de la Cx32, debido a las diferencias en los métodos que se utilizaron para fijar y preservar los tejidos mamaros de la actividad proteolítica.

Identificación de la Cx43 en las células epiteliales y el estroma.

Los resultados presentados aquí demuestran que la Cx43 se expresó tanto en el estroma como en el parénquima de las glándulas mamarias en todos los estados funcionales. Estos resultados son consistentes con otros hallazgos obtenidos por nosotros, en donde se identificó a la Cx43 en estas localizaciones utilizando la técnica de inmuno-oro ("immuno-gold") (Pérez-Armendariz et al. 1995a). Nuestros resultados difieren de otro trabajo en donde la Cx43 no se detectó en ningún estado fisiológico de la glándula mamaria de ratón (Monaghan et al. 1994). Las diferencias con este último trabajo pueden haber resultado de los factores ya mencionados que les impidieron a esos autores el detectar la Cx32.

La localización por IF de la Cx43 en el estroma indica que los fibroblastos y las células adiposas pueden estar interconectadas por uniones comunicantes formadas por la Cx43. De acuerdo a esta interpretación la Cx43 se ha identificado en tejido conectivo de mama humana (Wilgenbus et al. 1992) y en cultivos de fibroblastos de la misma (Tomasetto et al. 1993). En el trabajo aquí presentado, la restricción del marcado de la Cx43 hacia la periferia de los ductos y de los alvéolos en el parénquima, encontrado en todos los estados funcionales, sugieren que las células mioepiteliales están interconectadas con uniones comunicantes formadas por Cx43 y/o que la expresión de la Cx43 en las células epiteliales alveolares esta restringido a regiones basales de la membrana, en donde es posible que establezcan contacto con las células mioepiteliales. Esta interpretación es consistente con la identificación previa de uniones comunicantes entre células mioepiteliales (Pitelka et al. 1973) y con la descripción del acople con colorantes fluorescentes entre células epiteliales y mioepiteliales (Berga, 1984).

Co-expresión de la Cx26 y la Cx32 en las células epiteliales.

Los resultados aquí presentados, muestran que en las membranas laterales de las células epiteliales de las glándulas mamarias en estado de lactancia, poseen numerosas uniones comunicantes formadas por Cx26 y Cx32. Esas uniones pueden explicar la extensa comunicación intercelular encontrada con colorantes fluorescentes entre éstas células in situ (Berga, 1984). Aquí además encontramos que ambas conexinas están localizadas en el polo basal. Esta última localización sugiere que aparte de la Cx43, las células mioepiteliales también expresan la Cx26 y la Cx32. Esto es, el acople entre las células mioepiteliales y epiteliales puede ocurrir por uniones comunicantes homotípicas formadas por las Cxs 26, 32 ó 43 o bien, por uniones heterotípicas formadas por Cx26/Cx43, Cx32/Cx43, ó Cx26/Cx32, ya que la expresión del cDNA de las últimas dos combinaciones en pares de ovocitos adyacentes induce la formación de uniones heterotípicas funcionales (Swenson et al. 1989; Barrio et al. 1991).

Cambios en la expresión de las conexinas durante el desarrollo.

Los resultados aquí presentados apoyan la hipótesis de que las uniones comunicantes pueden ser importantes para el control de la diferenciación celular y secreción de las células epiteliales, ya que, primero; Se identificó que hay un incremento en la expresión de las Cxs 26 y 32 tanto del estado virgen al estado gestante, como de éste último al de lactancia, y segundo; el principal incremento en la expresión de conexinas se correlacionó con el máximo grado de diferenciación celular que ocurre con la instalación de la función secretora, más que con la mayor tasa de crecimiento celular la cual ocurre durante las primeras semanas de la gestación (Imagawa et al. 1990). Esos hallazgos están de acuerdo

con otros estudios *in situ* e *in vitro* en donde se ha encontrado que otros tipos de células secretoras también muestran una correlación entre un mayor número de uniones comunicantes y/o incremento en la expresión de conexinas con etapas de mayor diferenciación celular, tanto en la ontogénesis (Decker, 1981; Ishimura & Fujitta 1979; Risley et al. 1992; Yamamoto & Kataoka 1985,1988), como durante el ciclo de maduración celular de otros tipos de epitelios proliferativos secretores (Takashi et al. 1992). También están de acuerdo con otro estudio donde se ha encontrado que condiciones que inducen un aumento en la liberación de los productos de secreción por períodos largos (horas), también incrementan el tamaño de las uniones comunicantes (In't Veld et al. 1986; Meda et al. 1979; Saéz et al. 1991; Pérez-Armendariz et al. 1995b).

Aquí demostramos que tanto las células epiteliales mamarias no diferenciadas como diferenciadas expresan la Cx43 y las Cxs 26 y 32, así como el que la expresión de la Cx26 y la Cx32 aumenta a lo largo de la membrana lateral y la membrana basal en el estado de iactancia. Estos resultados indican que en las células epiteliales mamarias aumentan las UC durante la diferenciación y el crecimiento y que este incremento resulta de un aumento en la distribución espacial de un mismo grupo de conexinas.

La identificación de estas Cxs 26, 32 y 43 en las células ductales de ratas vírgenes, aquí presentado, está de acuerdo con la previa identificación morfológica de placas de unión comunicante en este estado (Pitelka et al. 1973), pero difiere de un estudio realizado en paralelo al presente donde ninguna de esas conexinas fue detectada en las glándulas de ratón virgen (Monaghan et al. 1994). Las diferencias con este último pueden haber resultado de los reducidos niveles de expresión de la Cx26 y la Cx32 en las células epiteliales de las glándulas de

animales vírgenes, así como de las diferencias metodológicas que ya fueron mencionadas anteriormente.

Aquí además se demostró que al menos dos de los componentes moleculares de las uniones comunicantes (Cx26 y Cx32) en las células epiteliales mamarias son regulados durante el desarrollo que ocurre durante la gestación y la lactancia. El incremento de ambas conexinas tiene una amplitud y distribución semejante, así como su expresión parece estar correlacionada. Es posible que las hormonas y factores paracrinos que modulan el crecimiento celular y la diferenciación de las células epiteliales durante la gestación y la lactancia (para revisión ver Oka & Yoshimura 1986; Bissel & Ram 1989; Imagawa et al. 1990) también participan en la regulación de la expresión de las conexinas.

Finalmente este estudio sugiere algunas posibles implicaciones funcionales de las uniones comunicantes en las células de la glándula mamaria. En la glándula virgen la reducida expresión de la Cx26 y Cx32 puede representar un factor crítico que permita que ocurran incrementos por encima del nivel umbral de señales específicas que disparan el crecimiento, semejante a la propuesta para otros tipos celulares (para revisión ver Lowenstein 1979; Lowenstein & Rose 1992). El aumento moderado de las uniones comunicantes detectado en las células epiteliales durante la gestación puede ser requerido para mantener una proliferación celular organizada y para equilibrar las señales necesarias entre las células requeridas para activar los organelos y la maquinaria enzimática requerida para su futura función secretora. En glándulas lactando, el importante incremento en la distribución de la Cx 26 y Cx32 a lo largo de las membranas basales y laterales de las células epiteliales, sugieren primero, que en este estado existe un mayor acople intercelular entre las células mioepiteliales y/o entre entre las células

mioepiteliales y epiteliales, el cual puede ser requerido para mejorar su contracción sincronica y/o coordinación requerida para la secreción de la leche, y segundo, que un aumento en la comunicación intercelular entre células epiteliales puede ser necesaria para la completa activación de los mecanismos requeridos para la síntesis de diversos componentes de la leche y su liberación coordinada.

7.0 BIBLIOGRAFIA.

Barr, L., Dewey, M. M., Berger W. 1965. Propagation of action potentials and the structure of the nexus in cardiac muscle. J. Gen. Physiol. 48, 797-823.

Barr, L., Berger, W., Dewey, M. M. 1968. Electrical transmission at the nexus between smooth muscle. cell. J. Gen. Physiol. 51, 347-358.

Barrio, L. C., Suchyna, T., Bargiello, T. A. 1991. Gap junctions formed by connexin 26 and 32 alone and in combination are differently affected by applied voltage. Proc. Natl Acad. Sci. USA 88, 8410-8414.

Bennett, M. V. L., Aljure, E., Nakajima, Y., Pappas G. D. 1963. Electronic junctions between teleost spinal neurons: Electrophysiology and ultrastructure. Science. 141, 262-264.

Bennett, M. V. L., Barrio, L. C., Bargiello, T. A., Spray, D. C., Hertzberg, E., Saéz, J. C. 1991. Gap Junctions: New tools, new answers, new questions. Neuron 6, 305-320.

Berga, S. E. 1984. Electrical potential and cell-to-cell dye movement in mouse mammary gland during lactation. Am J. Physiol. 247, C20-25.

Bergoffen, J., Scherer, S. S., Wang, S. 1993. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. Science 262, 2030-2041.

Beyer, E. C., Paul, D. L., Goodenough, G. A. 1987. Connexin 43, a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. J. Cell Biol. 105, 2621-2629.

Beyer, E. C., Paul, D. A., Goodenough, D. A. 1990. Connexin family of gap junction proteins. *J. Memb. Biol.*, 116, 187-194.

Bissel, M. J., Ram, T. G. 1989. Regulation of functional cytodifferentiation and histogenesis in mammary epithelial cells: Role of the extracellular matrix. *Environ. Health Perspect.* 80, 61-70.

Caspar, D. L. D., Goodenough, D. A., Makowski, L., Phillips W. D. 1977. Gap junction structures. I. Correlated electron microscopy and X-ray diffraction. *J. Cell Biol.* 74, 605-628.

Cox, P. 1974. Cell communication. Wiley series in the dynamics of cell biology. New York. U.S.A. 262.

Decker, R. S. 1981. Gap junctions and steroidogenesis in the fetal mammalian adrenal cortex. *Develop. Biol.* 82, 20-31.

De Mello, C. 1977. Intercellular communication. Plenum, Press, New York, U.S.A. 225.

Dermietzel, R., Kessler, J. A., Hertzberg, E. L., Spray, D. C. 1991. Gap junctions between cultured astrocytes: Immunocytochemical, molecular and electrophysiological analysis. *J. Neurosci.* 11, 1421-1432.

Dermietzel, R., Leibstein, A., Fixen, U. Janssen-Timmen, U., Traub, O., Willecke, K. 1984. Gap junctions in several tissues share antigenic determinants with liver gap junctions. *EMBO J.* 3, 2261-2270.

Du Bois, M., Elias, J. J. 1984. Subpopulations of cells in immature mouse mammary glands as detected by proliferative response to hormones in organ culture. *Dev. Biol.* 106, 70-75.

Dunbar, B.S., Schwoebel, D. E., 1990. Guide to protein purification. Academic Press, Inc. San Diego California, E.U.A. Vol. 182. Cap. 49-50. pp. 663-679.

Eyden, B. P., Watson, R. J., Harris, M., Howell, A. 1986. Intralobular stromal fibroblast in the resting human mammary gland: Ultrastructural properties and intercellular relationships. *J. Submicrosc. Cytol.* 18, 397-408.

Fairweather, N., Bell, C., Cochranes, S. 1994. Mutations in the connexin 32 gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX1). *Hum. Molec. Genet.* 3, 29-34.

Fallon, R. F., Goodenough, D. A. 1981. Five-hour half life of mouse liver gap-junction protein. *J. Cell Biol.* 90, 521-526.

Farguhar, M. 1963, Junctional complex in various ephitelia. *J. Cell Biol.* 17, 375-412.

Fawcett, M. 1991. Tratado de histologia, Nueva editorial Interamericana, Mc. Graw-Hill, México, D. F. 1026.

Fentiman, L. S., Hurst, J., Ceriani, R. L., Taylor-Papadimitriou, J. 1979. Junctional intercellular communication pattern of cultured human breast cancer cells. *Cancer Res.* 39, 4739-4743.

Flag-Newton, J., Simpson I., Loewenstein, W. R. 1979. Permeability of the cell-to-cell membrane channels in mammalian cell junction. Science. 205, 404-407.

Furshpan, E., Potter. 1968. Resistance junction between cell in embryos and in tissue culture. Curr Top Dev. Biol. 3: 95-127.

Goodenough, D. A., Revel, J. P., 1970. A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver. J. Cell Biol. 45, 272-290.

Ham, W. 1975. Tratado de histologia. Interamericana. México, D. F. 935.

Hertzberg, E. L., Skibbens, R. V. 1984. A protein homologous to the 27.000 dalton liver gap junction protein is present in a wide variety of species and tissues. Cell 39, 61-69.

Imagawa, W., Bandyopadhyay, G. K., Nandi, S. 1990. Regulation of mammary epithelial cell growth in mice and rats. Endocrinol. Rev. 11, 494-523.

In't Veld, P. A., Pipeleers, D. G., Gepts, W. 1986. Glucose alters configuration of gap junctions between pancreatic islet cells. Am. J. Physiol. 251, C191-196.

Ionasescu, V, Searby, S., Ionasescu, R. 1994. Point mutations of the connexin 32 (GJB1) gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy. Human. Molec. Genet. 3, 355-358.

Ishimura, K., Fujita, H. 1979. Development of cell-to-cell relationships in the thyroid gland of the chick embryo. Cell. Tissue Res. 198, 15-25.

Kanno, Y., Lowenstein, W. R. 1964. Intercellular diffusion. *Science*, 143, 959-960.

Lee, S. W., Tomasetto C., Paul, D., Keyomarsi, K., Saeger, R. 1992. Transcriptional downregulation of gap-junction protein blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines. *J. Cell Biol.* 118, 1213-1221.

Lowenstein, W. R. 1979. Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim. Biophys. Acta* 560, 1-65.

Lowenstein, W. 1981. Junctional intercellular communication, the cell to cell membrane channel. *Physiological Reviews*. 61, 829-913.

Lowenstein, W. R., Rose, B. 1992. The cell-cell channel in the control of growth. *Semin Cell. Biol.* 3, 59-79.

Makowski, L., Caspar, D. L. D., Phillips, W. C., Goodenough, D. A. 1977. Gap junction structures, II. Analysis of the X-ray diffraction data. *J. Cell Biol.* 72, 629-645

Meda, P., Perrelet, A., Orci, L. 1979. Increase of gap junctions between pancreatic B-cells during stimulation of insulin secretion. *J. Cell Biol.* 82, 441-448.

Meda, P., Bosco, D., Giordano, E., Chanson, M. 1990. Junctional coupling modulation by secretagogues in two-cell pancreatic systems. In *Biophysics of Gap Junction Channels* (Ed. C. Peracchia) pp. 191-208. CRC, Boca Raton, FL.

Meda, P., Pepper, M. S., Traub, O. 1993. Differential expression of gap junction connexins in endocrine and exocrine glands. *Endocrinology* 133, 2371-2378.

Monaghan, P., Perusinghe, N., Carlile, G., Evans, W. H. 1994. Rapid modulation of gap junction expression in mouse mammary gland during pregnancy, lactation and involution. *J. Histochem. Cytochem.* 42, 931-938.

Nicholson, B., Dermietzel, R., Teplow, D., Traub, O., Willecke, K., Revel, J. P. 1987. Two homologous protein components of hepatic gap junction. *Nature* 329, 732-734.

Nicolson, G. L., Dulski, K. M., Trosko, J. E. 1988. Loss of intercellular junctional communication correlates with metastatic potential in mammary adenocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 473-476.

Oka, T., Yoshimura, M. 1986. Paracrine regulation of mammary gland growth. *Clin. Endocrinol. Metabol.* 15, 79-97.

Paul, D. 1986. Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J. Cell Biol.* 103, 123-134.

Pérez-Armendariz, E. M., Roy, C., Spray, D. C., Bennett, M. V. L. 1991. Biophysical properties of gap junctions between freshly dispersed pairs of mouse pancreatic beta cells. *Biophys. J.* 59, 76-92.

Pérez-Armendariz, E. M., Romano, M., Luna, J., Miranda, C., Bennett, M. V. L., Moreno, A. P., 1994. Characterization of gap junctions between pairs of Leydig cells from mouse testis. *A. J. Physiol.* 267, C570-580.

Pérez-Armendariz, E. M., Atwater, I., Bennett, M.V. L. 1995a. Mechanisms for fast intercellular communication within a single islet of Langerhans. En: Pacemaker Activity and Intercellular communication. Huizinga, J. D. (Ed). CRC press. Chapter 17, 305-321.

Pérez-Armendariz, E.M., Romano, M., Luna, J., Moreno. A. P., Bennett, M.V.L., 1995b. Coupling of Leydig cell is mediated by connexin 43, minimized by transjunctional voltaje and modulated by luteinizing hormone. En: Intercellular communication through gap junctions. Kanno, Y., Kataoka K., Shiba., Y. Shivata., Y., Shimazu., T. (Eds) Elsevier Science B. V. Amsterdam. Progress in Cell Res. 4, 413-417.

Pérez-Armendariz, E. M., Tapia, D., Luna, J., Bennett, M. V. L., Hall, D. 1995c. Gap junctions expressed in mammary glands. En: Intercellular communication through gap junctions. Kanno, Y., Kataoka K., Shiba., Y. Shivata., Y., Shimazu., T. (Eds) Elsevier Science B. V. Amsterdam. Progress in Cell Res. 4, 301-304.

Pitelka, D. R., Hammamoto, S. T., Duafala, J. G., Nemanic, M. K. 1973. Cell contacts in the mouse mammary gland. I. Normal gland in postnatal development and the secretory cycle. J. Cell Biol. 56, 797-818.

Pitelka, D. R. 1977. The mammary gland. En Histology (Eds. L. Weiss and R. O. Greep) pp. 925-950. Mc Graw Hill Inc., New York.

Ramón, F. 1988a. Un bosquejo histórico del descubrimiento de las uniones comunicantes. Avance y Perspectiva. I. P. N. 34, 3-8.

Ramón, F. 1988b. ¿Cuántos canales de acoplamiento debe haber entre dos células?. Avance y Perspectiva. I. P. N. 34, 9-18.

Ren, J., Hamada, J., Takeichi, N., Fujikawa, S., Kobayashi, H. 1990. Ultrastructural differences in junctional intercellular communication between highly and weakly metastatic clones derived VC from rat mammary carcinoma. *Cancer Res.* 50, 358-362.

Revel, J. P., Karnovsky, M. J. 1967. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell Biol.* 33, C7-C12.

Richards, J., Larson, L., Yang, J. 1983. Method for culturing mammary epithelial cell in a rat tail collagen gel matrix. *J. Tiss. Cult. Meth.* 8, 31-36.

Risley, M. S., Tan, I. P., Roy, C., Sáez, J. C. 1992. Cell-age- and stage-dependent distribution of connexin 43 gap junctions in testes. *J. Cell Sci.* 103, 81-96.

Robertson, J. D., 1963. The occurrence of a subunit pattern in the unit membranes of club endings in mauthner cell synapses in goldfish brains. *J. Cell Biol.* 19, 201-221.

Rook, M. B. 1991. Gap junctions between heart cells in vitro: electrophysiological, ultrastructural, and immunocytochemical correlates. *Academich Profschrift, New York., U.S.A.* 128.

Russo, I. H., Ireland, M., Isemberg, W., Russo, J. 1976. Ultrastructural description of three different epithelial cell types in rat mammary gland. *Proc. Electron Microsc. Soc. Am.* 34, 146.

Saéz, J. C., Berthoud, V. M., Kadle, R. 1991. Pinealocytes in rats: Connexin identification and increase in coupling caused by norepinephrine. *Brain Research* 568, 265-275.

Saéz, J. C., Spray, 1991. *Cell junctions. Encyclopedia of human biology. V. 2. Academia Press U.S.A. 267-278.*

Schwarzmann, G., Wiegandt, H., Rose, B., Zimmerman, A., Ben-Haim D., Loewenstein, W. R. 1981. *Diameter of cell-to-cell junctional membrane channels as probed with neutral molecules. Science, 213, 551-553.*

Stagg, R. B., Fletcher, W. H. 1990. *The hormone-induced regulation of contact-dependent cell-cell communication by phosphorylation. Endocrinol. Reviews 11, 302-325.*

Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S., Goodenough, D. A. 1986. *Identification of ZO-1: A high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. J. Cell Biol. 103, 755-766.*

Stewart, W. W. 1981. *Lucifer dyes-highly fluorescent dyes for biological tracing. Nature. 292, 17-21.*

Stutenkemper, R., Geisse, S., Schwartz, H. J. 1992. *The hepatocyte-specific phenotype of murine liver cells correlates with high expression of connexin 32 and connexin 26 but very low expression of connexin 43. Exp. Cell Res. 201, 43-54.*

Swenson, K. I., Jordan, J. R., Beyer, E. C., Paul, D. L. 1989. *Formation of gap junctions by expression of connexins in Xenopus oocyte pairs. Cell 57, 145-155.*

Takashi, K., Fusao, U., Kiyoshi, K., Masao, Y., Katsuko, K. 1992. Development of gap junctions between gastric surface mucous cells during cell maturation in rats. *Gastroenterology* 102, 1930-1935.

Tomasetto, C., Neveu, M. J., Daley, J., Horan, P. K., Sager, R. 1993. Specificity of gap junctions communication among human mammary cells and connexin transfectants in culture. *J. Cell Biol.* 122, 157-167.

Traub, O., Look, J., Dermietzel, R., Brümmer, F., Hüsler, D., Willecke, K. 1989. Comparative characterization of the 21-KD and 26-KD gap junction protein in murine liver and cultured hepatocytes. *J. Cell Biol.* 108, 1039-1051.

Traub, O., Look, J., Paul, D., Willecke, K. (1987). Cyclic adenosine monophosphate stimulates biosynthesis and phosphorylation of the 26 KDa gap junction protein in cultured mouse hepatocytes. *Eur. J. Cell Biol.* 43, 48-54.

Tseng, J., Dilorio, L., Mortensen, R. F. 1988. Monoclonal antibodies to human (- reactive protein (CRP) that recognize epitopes in functional regions. *Hybridoma.* 7, 185-191.

Unwin P. N. T., Zampighi, G. 1980. Structure of the junction between communicating cells. *Nature london* 283, 597-549.

Warner, A. 1992. Gap junction in development -- a perspective. *Semin. Cell Biol.* 3, 81-91.

Weidmann, S. 1952. The electrical constants of Purkinje fibres. *J. Physiol.* 118, 348-360.

Wilgenbus, K. K., Kirkpatrick, C. J., Knuechel, R., Willecke, K., Traub, O. 1992. Expression of Cx26, Cx32 and Cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues. *Int. J. Cancer* 51, 522-529.

Yamamoto, M., Kataoka, K. 1985. Large particles associated with gap junctions of pancreatic exocrine cells during embryonic and neonatal development. *Anat. Embryol.* 171, 305-310.

Yamamoto, M., Kataoka, K. 1988. An electron microscopic study of the development of the exocrine and endocrine pancreas with special reference to intercellular junctions. *Arch. Histol. Cytol.* 51, 315-325.

Yamamoto, T., Ochalski, A., Hertzberg, E. L., Nagy, J. I. 1990. LM and EM immunolocalization of gap junctional protein connexin 43 in rat brain. *Brain Res.* 508, 313-319.

Zimmer, D. A., Green, C. R., Evans, H. W., Gilula N. B. 1978. Topological analysis on the major protein in isolated intact rat liver gap junctions and gap junction-derived single membrane structures. *J. Biol. Chem.* 262 (16), 7751-7763.