



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE UN CANAL DE  $Cl^-$   
ACTIVADO POR VOLTAJE DEL OVOCITO DE *Xenopus laevis*”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**DIANA BERENICE SALAZAR SOTO**

DIRIGIDA POR

**Dr. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2007.**

No. Adq: H71646

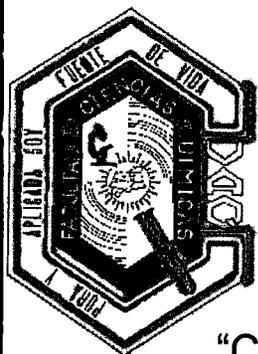
No. Título \_\_\_\_\_

Clas / TS

572.8

S16/c

\_\_\_\_\_



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**"CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE UN CANAL DE  $Ca^{2+}$   
ACTIVADO POR VOLTAJE DEL OVOCITO DE  
*Xenopus laevis*"**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**DIANA BERENICE SALAZAR SOTO**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES**

**SINODALES**

**Dr. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES  
DIRECTOR**

**Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER  
SINODAL**

---

**Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA  
SINODAL**

**Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA  
SINODAL**

## DEDICATORIAS A:

Mis padres Ricardo Salazar Álvarez y Josefina Soto Soto por su amor, fe, confianza, amistad, tiempo, paciencia y apoyo en cada instante mi vida, gracias a ellos soy quien soy. A quienes han entregado su vida por mi bienestar, integridad y felicidad.

“Nananito” Ricardo Alejandro Salazar Soto por ser cómplice, amigo, hermano, enseñarme lo que es ser incondicional ante cualquier circunstancia, eres mi ejemplo de nobleza y lealtad.

Daniel Valdés Latapi por tu amor, apoyo, confianza, transparencia de tu ser, al demostrarme cuan feliz se puede ser en la vida y como se puede obtener todo en ella, amando sin temor. Gracias por enseñarme que existe el amor puro y sincero, al complementar mi ser y coincidir en el mismo destino, para que juntos recorramos el camino, construyendo sueños y metas compartidas hasta la eternidad.

La memoria de María Aurea Soto Soto “Adela” porque fuiste, en vida, una persona de vital importancia me enseñaste a creer y a crecer con Dios; y después de ella, por estar más cerca que nunca de mi ser, aún sin la presencia de tu cuerpo.

Ascensión Soto Soto por estar conmigo ante la adversidad, con fe, esperanza y por ocupar un lugar tan cerca entre Dios y mi ser, a través de tu apoyo.

Dr. Ataúlfo Martínez Torres por su confianza, consejos y enseñanzas que me brindaste no solo en el conocimiento; abriendo las puertas de la curiosidad científica, también me diste tu amistad.

Dra. Ma. Guadalupe García Alcocer por ser ejemplo tan importante, llevándome cada vez a mayores retos haciendo de mí una mejor estudiante y sobretodo mejor persona.

Dr. Ricardo Miledi por su apoyo durante la elaboración de este trabajo y ser tan gran ejemplo académico y humano.

Dra. Angélica López Rodríguez por tu paciencia, apoyo y tiempo en enseñarme, porque creíste en mí, impulsándome a la investigación.

M en C. Abraham Rosas Arellano por esa forma tan especial de querer, aún con el tiempo fuera de lugar.

Mis amigos: José Ramón Cruz Hernández porque gracias a ti conocí el verdadero significado de una amistad, por tu sinceridad y apoyo; porque, juntos hemos superado obstáculos y retos siempre con cariño. Y Jesús Edmundo Saldaña García ya que en los momentos más difíciles apareciste dando un poco de luz, esperanza y fuerza a mi vida, por tu cariño bajo un cielo gris.

## **AGRADECIMIENTOS A:**

Mis padres (mi ejemplo de vida y sabiduría) y mi hermano por su apoyo incondicional en todos los sentidos de mi vida, porque nunca terminaré de agradecerles lo que han hecho por mí.

Dr. Daniel Valdés Latapi por tu apoyo, confianza, amor y todo lo que significas para mí.

Dr. Ataúlfo Martínez Torres por permitirme colaborar en su laboratorio y tener de cerca el conocimiento científico.

Dra. Guadalupe García Alcocer por su orientación administrativa, académica, técnica, invaluable apoyo moral y amistad.

Dra. Alejandra Rojas y Dra. Laura Berumen por comentarios, apoyo, y orientación en la elaboración de este trabajo.

Al laboratorio D-15 del Instituto de Neurobiología UNAM en especial:

Dra. Angélica López Rodríguez quien motivo el comienzo del saber científico.

Dra. Irma Alicia Martínez Dávila y Efrén Ruíz Alcibar, por el apoyo técnico.

Dr. Lenin Ochoa de la Paz (al pan de Dios) por tu paciencia, compañía, enseñanza, amistad y ayuda cuando era abandonada en terrenos técnicos que no conocía.

M. en C. Abraham Rosas Arellano por las compañías nocturnas, desvelos, apoyo técnico y moral.

M. en C. Fernando Rosas Sánchez y M. en C. Argel Raúl Estrada Mondragón por su amistad, apoyo y confianza.

M. en C. Joel Vergara Quintanar, Q.F.B. Carlos Martínez del Valle, Dra. Carmen Mejía Vázquez, Q. F. B. Ernesto López Salas y M. en C. Gustavo Martínez Delgado por compañía, consejos y apoyo.

Mis amigos J. Ramón Cruz Hernández, J. Edmundo Saldaña García e Ignacio Coronel quienes siempre han estado al pendiente de mi vida.

## Ciencia y Dios bajo un mismo sol

Vida es amor y la ciencia pasión,  
Sin pasión, la vida no sería entendida.

Dios creo al hombre con razón,  
Y éste, a la ciencia

La ciencia es todo en la vida  
Crea, diseña, madura, avanza  
Tanto que tenemos una mejor vida

Dios y hombre ¿qué hay en común?

Inventamos para crear  
Dios con su magnificencia  
Y el hombre con la ciencia

Criterios erróneos dicen  
Igualar a Dios queremos  
Personas que no saben,  
Que entender buscamos

Ciencia es vida, vida es ciencia  
No rompemos sus leyes naturales  
Sin embargo, las tratamos de hacer mas digna para la vida.

RAS

# ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Ovogénesis	4
II.2 Características de los ovocitos usados en estudios electrofisiológicos	5
II.3 Canales endógenos del ovocito	6
II.3.1 Canales de potasio	6
II.3.2 Canales de sodio	6
II.3.3 Canales de calcio	6
II.3.4 Canales de cloro activados por calcio	7
II.3.5 Canales de cloro activados por voltaje	7
II.4 Familia de canales de cloro CIC	7
III. HIPÓTESIS	12
IV. OBJETIVOS	13
IV.1 General	13
IV.2 Específicos	13
V. METODOLOGÍA	14
V.1 Materiales	14
V.2 Métodos	15
V.2.1 Biológicos	15
V.2.2 Registro electrofisiológico	16
V.2.3 Extracción de RNA de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	17
V.2.4 RT-PCR (retrotranscriptasa- reacción en cadena de la polimerasa)	17
V.2.5 Primers (oligonucleótidos)	18
V.2.6 Electroforesis en gel de agarosa	18

V.2.7 Clonación	19
V.2.7.1 Ligación	19
V.2.7.2 Transformación	20
V.2.7.3 Obtención de DNA plasmídico (miniescala)	21
V.2.7.4 Análisis electroforético y cuantificación del DNA	22
V.2.8 Obtención de DNA a partir de mediana escala (Midiprep kit)	22
V.2.9 Secuenciación	23
VI. RESULTADOS	24
VI.1 Selectividad aniónica	26
VI. 2 Efecto del calcio intracelular y extracelular	30
VI.3 Efecto de la maduración	31
VI. 4 Obtención de RNA	33
VI. 5. RT-PCR	34
VI. 6. Extracción de DNA (minipreparaciones)	34
VI. 7 Digestión enzimática	35
VII. DISCUSIÓN	37
VIII. CONCLUSIÓN	39
IX. BIBLIOGRAFÍA	40
Anexo A: Electrocromatograma de la clona 22 obtenida a partir de técnicas de RT-PCR a partir de RNA de ovocito de <i>X. laevis</i>	44
Anexo B: Alineamiento entre la clona 22 y el gen de CIC-5. En rojo se muestra el codón de inicio y en amarillo aquellos aminoácidos idénticos, los primer que fueron empleados se muestran en azul	45

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación de los grupos experimentales de ovocitos de <i>X. laevis</i>	16
2	Secuencias de los primers empleados en la PCR	19

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Xenopus laevis</i> . A. rana adulta (Miledi y col., 2004). B. Ovocitos en estadio V y VI.	3
2	Dendograma de la familia de canales de cloro CIC (Jentsch y col., 1999)	9
3	Estructura del canal de cloro CIC. A. Representación del dímero EcCIC. B. Topología de la subunidad EcCIC (Dutzler, 2004). Los alineamientos de secuencias muestran los aminoácidos importantes para la formación del poro.	10
4	Canal de cloro CIC de la bacteria <i>E. coli</i> . Canal de cloro EcCIC silvestre con dos sitios de unión a iones cloro $S_{int}$ y $S_{cen}$ (Dutzler, 2004).	10
5	BAPTA. Ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N,N,N'N'-tetracético, es un quelador específico de calcio (estudios recientes también muestran quelación al zinc en igual especificidad). Sus cuatro grupos funcionales carboxílicos son capaces de unirse a dos iones calcio, cuando pierde los cuatro protones (en círculos rojo del grupo hidroxilo) y se une al ión divalente calcio (cuadro verde).	16
6	Vector pGEM-T Easy. Contiene los sitios promotores T7 y SP6, (y el sitio múltiple de clonación), la región de la enzima $\beta$ -galactosidasa (para diferenciar colonias con el inserto, colonias blancas, círculo en naranja) y sitio de restricción enzimática para <i>EcoR1</i> (Rectángulo en rojo).	20
7	Pulso a -160 mV al fijar el potencial a -60mV. A. Pulso a -160 mV durante 1 s. B. Corriente generada por el ovocito, se puede observar la respuesta máxima obtenida a un tiempo de 200 ms, (señalada por la flecha), posteriormente existe un periodo de cierre del canal de varios segundos	25
8	Protocolo del registro electrofisiológico para determinar la desensibilización del canal. A. Respuesta obtenida de un	25

- ovocito al estímulo del voltaje. B. Amplificación del primer, quinto y décima corriente generada por el pulso correspondiente (señalado en D). C. Protocolo de 10 pulsos consecutivos a  $-150$  mV cuando el potencial se fijó a  $-50$ mV con duración de 200 ms a intervalos de 9.8 s entre cada pulso. D. Amplificación del primer, quinto y décimo pulso.
- 9 Relación corriente-voltaje. A. Protocolo de fijación de voltaje. 26  
B. Curva corriente-voltaje en Ringer normal.
- 10 Pulsos a  $-140$  mV cuando se fijó el potencial a  $-60$ mV. A. 27  
Corriente producida por un ovocito al encontrarse en Ringer con sulfato. B. Con nitrato. C. Con yoduro. D. Ringer normal. E. Con bromuro. F. Bajo en cloruro. En todos los casos se muestran respuestas obtenidas por diferentes ovocitos de diferentes donadoras, posteriormente existe un periodo de cierre del canal de varios segundos (flechas).
- 11 Desensibilización del canal en diferentes sustituciones 27  
aniónicas. Protocolo a 10 pulsos de  $-150$  mV durante 200 ms, se fijó el potencial a  $-50$  mV. En ■ valores obtenidos en Ringer normal (N= 8 n= 45), ● Ringer con bromo (N= 8 n= 22), ▲ Ringer con yodo (N= 7 n= 22), ▼ Ringer con nitrato (N= 5 n= 18), ◆ Ringer con sulfato (N= 3 n= 9), ◀ Ringer bajo en cloro (N= 3 n= 10) (Promedio  $\pm$  error experimental).
- 12 Relación corriente-voltaje en diferentes sustituciones 28  
aniónicas, fijando el potencial a  $-60$  mV. En ■ valores obtenidos en Ringer normal (N=2 n=6), ● Ringer con yodo (N= 2 n= 4), ▲ Ringer con bromo (N=2 n=5), ▼ Ringer con nitrato (N=2 n=6), ◆ Ringer bajo en cloro (N=2 n=6), (promedio  $\pm$  error experimental).
- 13 Selectividad aniónica. Valores normalizados con respecto al 29  
cloro como 100%, existe una preferencia a la permeabilidad del ión sulfato, no así en bajo en cloruro donde la concentración de cloruro (31.81% de cloro en Ringer bajo en

- cloro) es proporcional la caída en las corrientes generadas.
- 14 Efecto del ión calcio en la desensibilización del canal iónico 30  
fijando el potencial a -50 mV. En ■ valores obtenidos en incubación con BAPTA (N=2 n=10), ● Ringer sin calcio (N=6 n=17), ▲ Ringer normal (N=2 n=7), (promedio  $\pm$  error experimental).
- 15 Efecto del ión calcio intracelular y extracelular en la relación 31  
corriente-voltaje, fijando el potencial a -60 mV. En ■ valores obtenidos en incubación con BAPTA (N=3 n=13), ● Ringer sin calcio (N=2 n=4), ▲ Ringer normal (N=2 n=12), (promedio  $\pm$  error experimental).
- 16 Ovocitos de *X laevis* en diferentes etapas de maduración. A. 32  
ovocito en estadio VI. A'. Ovocito en estadio VI vista desde el hemisferio animal, no se observa la vesícula germinal. B. ovocito sometido a incubación con progesterona (10  $\mu$ M), evolución temprana de la vesícula germinal. C. Ovocito maduro después de 4 horas de incubación con progesterona. Las flechas en B y C muestran la vesícula germinal.
- 17 Efecto del estado de madurez en el que se encuentre, el 32  
potencial se fijó a -60 mV. En ■ valores obtenidos en progesterona (N=2 n=7), ● Ringer normal (N=2 n=7), (promedio  $\pm$  error experimental).
- 18 Relación corriente-voltaje en ovocitos expuestos a 33  
progesterona, fijando el potencial a -60 mV. En ■ valores obtenidos en presencia de progesterona (N=3 n=16), ● Ringer normal (N=2 n=12), (promedio  $\pm$  error experimental).
- 19 Gel de electroforesis de la extracción de RNA, se observan las 33  
bandas a 28, 18 y 5 S.
- 20 PCR. En el primer carril se observa el marcador de peso 34  
molecular lambda Pst I, en el segundo el control negativo (blanco, todo el contenido de reactivos excepto el DNA) de la PCR, la reacción de RT-PCR (Las manchas de la parte inferior

- corresponden a los primers dimers).
- 21 Obtención de DNA de diferentes colonias (se representan 36 de las 200 clonas que se obtuvieron en su totalidad), para identificar las más adecuadas se realizó digestión enzimática de las posibles candidatas a un canal de CIC. 35
- 22 Restricción enzimática del plásmido obtenido de minipreparaciones (a partir de la obtención de DNA a mini escala). La banda superior es el vector pGEM-T (3018 pb) cortado con EcoR1 y la columna 2 y 4 se muestra una banda alrededor de 300 pb. Cada carril numerado fueron, respectivamente, una de las posibles clonas que presentaron banda clara y definida en la extracción de DNA de mini escala. 35
- 23 Alineamiento entre las clonas 22 y 22<sup>a</sup> con una alta similitud entre ellas del 94.8%. En rojo están indicados los primers que se emplearon y las flechas indican el sentido de los mismos 5' 3' (Los asteriscos en la parte inferior de la alineación indican que nucleótidos son idénticos). 36

## RESUMEN

Los ovocitos de *Xenopus laevis* son empleados en investigaciones de tipo biológico, farmacológico y electrofisiológico para el estudio de los mecanismos de canales iónicos, cascadas de señalización, receptores proteicos y de transporte. Dado que es una célula de gran tamaño, ya que mide hasta 1.3 mm, es fácil de manejar, además no requiere de condiciones especiales en medios de cultivo, o condiciones estériles. Actualmente los ovocitos se usan en la investigación como modelo en la expresión heteróloga de proteínas mediante la inyección de RNAm o DNA, proveniente de diferentes fuentes biológicas.

A pesar de ser un modelo biológico para el estudio de canales iónicos, muchos de sus canales endógenos no se han caracterizado por completo y a la fecha sólo algunos se han clonado.

En el presente estudio se caracterizó electrofisiológicamente un canal de cloro activado por voltaje (hiperpolarización). Se encontró que la activación del canal es independiente del calcio extracelular e intracelular, de igual forma es independiente del estado de maduración del ovocito. Es un canal aniónico poco selectivo, teniendo mayor afinidad a la conducción de sulfato, y conduce de forma similar bromo, yodo, nitrato y cloro.

Finalmente, en estudios de biología molecular se aisló un fragmento de 580 pb que tiene una identidad en su secuencia nucleotídica de alrededor del 98% con un canal de la familia de canales de cloro activados por voltaje (CIC-5). Sin embargo, CIC-5 es un canal que se activa por despolarización de la membrana plasmática, por lo que la identidad molecular del canal aquí reportado aún no se ha definido.

## I. INTRODUCCIÓN

Los ovocitos de *Xenopus laevis* han tomado una gran importancia en la investigación, dado que son células de gran tamaño (hasta 1.3 mm en estadio VI), de fácil manejo, no requieren de medio de cultivo especial o condiciones estériles, para su conservación *in vitro*. Se pueden emplear en cualquier época del año, lo que le da una gran ventaja entre anfibios de otras especies.

Se han empleado en los últimos años, como modelo de estudio en investigaciones relacionadas a búsquedas de mecanismos de: cascadas de señalización, canales iónicos, proteínas de transporte, receptores hormonales, entre otros. A través de estudios bioquímicos, farmacológicos y electrofisiológicos se han logrado conocer ciertos mecanismos a nivel molecular y celular, no sólo de proteínas endógenas, sino también de otras especies (expresión heteróloga de proteínas y membranas). Mediante técnicas de inyección de DNA en el núcleo, o RNAm y proteínas de membrana, en el citoplasma, el ovocito es capaz de expresar dicho material genético generando las respectivas proteínas, canales o receptores, dependiendo del material empleado, haciéndolas electrofisiológica y biológicamente funcionales.

De particular interés son los canales iónicos de las membranas plasmáticas. Éstos llegan a ser altamente selectivos a un tipo particular de ión, mantienen altas velocidades de transporte y son capaces de regular el flujo de iones mediante sistemas de apertura y cierre (proceso llamado "gating"). Sin embargo, a pesar de múltiples estudios, poco se sabe acerca de los canales iónicos endógenos de los ovocitos, y a la fecha sólo unos cuantos han sido clonados.

En este trabajo abordamos el estudio de un canal de cloro activado por voltaje endógeno del ovocito, el cual probablemente pertenece a una familia de genes llamada CIC, la cual comprende un grupo de proteínas de membrana cuya

mayor acción es traslocar iones cloruro a través de las membranas celulares, manteniendo el potencial de membrana y el control intravesicular del pH.

La familia CIC tiene sus homólogos en el humano y algunos de los canales de esta familia, están involucrados en enfermedades hereditarias como la miotonía congénita, epilepsia idiopática, enfermedad de Dent's, Síndrome de Bartter y osteopetrosis.

## II. ANTECEDENTES

*Xenopus laevis* pertenece a la familia *Pipidae*, subfamilia *Xenopodinae*. Las ranas *X. laevis* (Figura 1A) provienen del sur de África. Tiene un estilo de vida acuático, lo que permite conservarlas en tanques de agua y son altamente resistentes a enfermedades e infecciones. Tiene un ciclo de vida corto ya que después de la fertilización pueden desarrollarse a adultos sexualmente maduros en 1 año, o menos en caso de los machos.

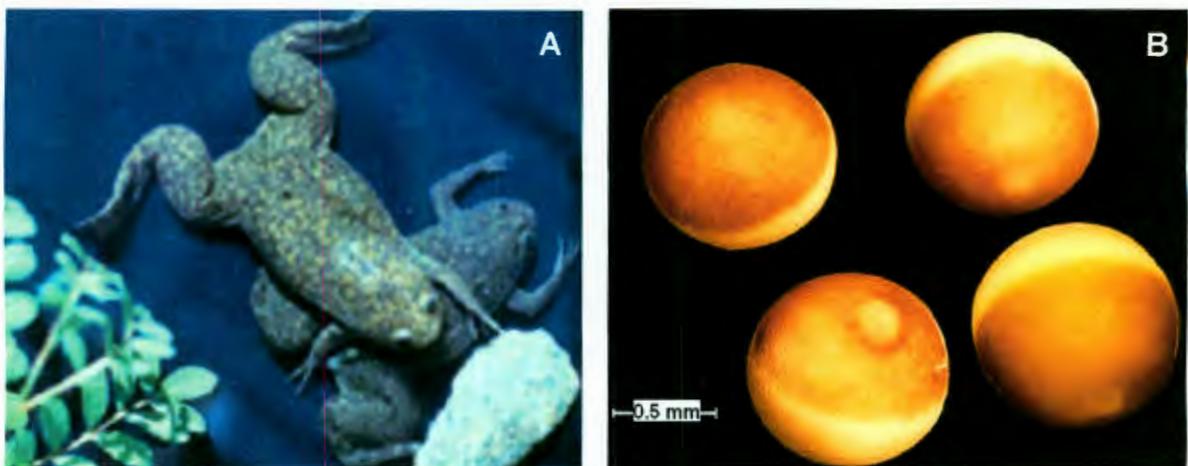


Figura 1. *Xenopus laevis*. A. rana adulta (Miledi y col., 2004). B. Ovocitos en estadio V y VI.

Durante los años 1940 a 1950 los ovocitos eran empleados en pruebas de fertilización humana, se inyectaban unos cuantos mililitros de orina de una mujer embarazada, bajo la piel de una rana hembra, induciendo la ovoposición. Alrededor de 1950 fueron reemplazadas este tipo de pruebas; pero, se seguían empleando para obtener embriones fértiles con hormona gonadotropina de otras especies de vertebrados (Tinsley y Kobel, 1996).

Los ovocitos de *X. laevis* son fáciles de manejar, poseen un tamaño de hasta 1.3 mm en el estadio VI (Figura 1B), se pueden emplear en cualquier momento por lo que se ha incrementado su uso en estudios biológicos y farmacológicos, en investigaciones asociadas a cascadas de señalización

intracelular, rutas bioquímicas y sistemas de transporte proteico, así como en el estudio de canales iónicos, neurotransmisores y receptores hormonales, entre otros (Weber, 1999).

Actualmente se han desarrollado sistemas para expresión heteróloga de proteínas basados en la microinyección de RNA mensajero de diferentes fuentes (García-Alcocer y col., 2001), de DNA (Martínez-Torres y col., 2000) e incluso de membranas plasmáticas (Miledi y col., 2002; Miledi y col., 2004). Después de la microinyección de este material, los ovocitos producen una proteína; por ejemplo un receptor o canal iónico que es funcional, el cual exhibe propiedades farmacológicas y electrofisiológicas propias del polipéptido en su ambiente nativo (Sumikawa y col., 1989).

## II.1 Ovogénesis

La ovogénesis comprende del estadio I al VI, es asincrónico, es decir, todos los estadios se encuentran en el ovario al mismo tiempo. Las diferencias más notorias entre ellas son: el tamaño, el cual va desde 100  $\mu\text{m}$  a 1300  $\mu\text{m}$ , y su pigmentación, va en los rangos de incoloro a una marcada coloración a oscuro en el hemisferio animal y beige en el hemisferio vegetal (Figura 1B) (Weber, 1999; Alberts y col., 2002).

En el estadio VI, los ovocitos se dividen por una banda ecuatorial sin pigmento y dejan de crecer en tamaño para iniciar su maduración y posterior fertilización. El proceso de ovogénesis requiere aproximadamente 8 meses (Weber, 1999). Los ovocitos se pueden mantener por años en estado diploteno, de la profase de la meiosis, este estado se parece a la fase G2/M del ciclo de la división celular (Gilbert, 2000).

Una capa de células foliculares rodean al ovocito y ésta consiste en aproximadamente 5 000 células (Weber, 1999), las cuales permiten intercambio de

pequeñas moléculas; pero, no de macromoléculas (Alberts y col., 2002). La liberación de gonadotropina estimula las células foliculares a producir progesterona (Weber, 1999). Con seis horas de estimulación de progesterona, ocurre la generación de la vesícula germinal, el nucléolo se desintegra, los cromosomas se contraen y emigran al polo animal para comenzar la división meiótica. Inmediatamente después que ocurre la primera división meiótica, el óvulo maduro es liberado del ovario por el proceso llamado ovulación (Gilbert, 2000).

La maduración puede alcanzarse *in vitro* por incubación de los ovocitos con progesterona a una concentración de 10  $\mu$ M durante 30 min o *in vivo* por inyección subcutánea de gonadotropina coriónica humana. Durante la maduración las propiedades bioeléctricas de la membrana del ovocito cambian profundamente. El potencial de membrana se despolariza dramáticamente de -50 mV a -10 mV, ya que la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa es inactivada por la despolarización de la membrana y solo algunos sistemas de transporte se mantienen activos en la maduración como los canales de cloro independientes de calcio (Weber, 1999).

## II.2 Características de los ovocitos usados en estudios electrofisiológicos

Para estudios electrofisiológicos, farmacológicos y bioquímicos se usan ovocitos de estadios V y VI, éstos tienen un diámetro de 1 a 1.3 mm y usualmente se requiere remover las células foliculares, mediante un tratamiento enzimático con colagenasa seguido de un lavado en Ringer libre de calcio o desfoliculación manual con pinzas (Sumikawa y col., 1989). Las células foliculares y la membrana plasmática del ovocito están conectadas por uniones comunicantes (“gap junctions”); así, el ovocito está rodeado de una capa vitelina, células foliculares y la teca. Después de la desfoliculación la membrana esta cubierta aún por una capa de proteína vitelina que es secretada por las células foliculares (Miledi y Woodward, 1989).

Los potenciales de membrana oscilan entre -30 a -70 mV, raramente se observan a -90 mV. Es importante señalar que el potencial de equilibrio de iones cloro en ovocitos de *Xenopus* es -27 mV en Ringer (Kusano y col., 1982).

### II.3 Canales endógenos del ovocito

Entre los canales iónicos que posee el ovocito se encuentran:

#### II.3.1 Canales de potasio

Son activados por despolarización a +30 mV y muy seguramente existe una diversidad de genes que les codifica ya que sus características varían; por ejemplo algunos son sensibles a bario, y entre éstos hay sensibles a iones hidrógeno (Burckhardt y Frömter, 1992), asociados a bombas (Huang y col., 1995), activados por calcio (Parekh y col., 1993); también hay insensibles a bario y subdivididos en sensibles o no a tetraetilamonio (TEA) (Lu y col., 1990; Parker e Ivorra, 1990). Existen algunos inducidos por expresión de otras proteínas (Ben-Efraim y col., 1996).

#### II.3.2 Canales de sodio

Dentro de la clasificación de estos canales se encuentran los inducidos por amoniaco (Cognon y col., 1996; Burckhardt y Burckhardt, 1997), inducidos por despolarización y éstos se subdividen en los que son sensibles o no a tetrodotoxina (TTX), sensibles a calcio intracelular y los inactivados por Mg-ATP (Weber, 1999).

#### II.3.3 Canales de calcio

Se encuentran los canales de calcio voltaje dependientes (VDCC), los cuales se activan a potenciales más positivos de -30 mV. Estos canales se pueden

distinguir de los canales de calcio tipo P, T y N por las diferencias farmacológicas (Dascal y col., 1992).

Otro tipo de canales son los canales de calcio dependiente de almacenaje (SOCC), los cuales son modulados por la fosforilación de PKC, tienen un potencial que revierte a 40 mV (Weber, 1999).

#### II.3.4 Canales de cloro activados por calcio

Los canales de cloro activados por calcio (Miledi, 1982) son dependientes de calcio intracelular y son corrientes oscilatorias. Éstas son activadas por la producción de inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) y por la movilización de calcio intracelular (Parker y col., 1985; Parker y Miledi, 1987).

#### II.3.5 Canales de cloro activados por voltaje

Son inducidos cuando los ovocitos son defoliculados manualmente y activados por hiperpolarización (Parker y Miledi, 1988). Estos canales se activan lentamente y no se inactivan en la mayoría de ellos. Son altamente selectivos a cloro; pero, también son permeables a algunos aniones, siguiendo una secuencia de selectividad preferencial como sigue:  $I^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $Br^-$ ,  $Cl^-$ , propionato y acetato (Kowdley y col., 1994).

#### II.4 Familia canales de cloro CIC

La familia CIC comprende un grupo de proteínas de membrana cuya principal acción es traslocar iones cloruro a través de la membrana celular (Chen, 2005). Contribuyen a importantes procesos fisiológicos, como el mantenimiento del potencial de reposo, regulación del transporte transepitelial de iones cloruro y la acidificación de organelos intracelulares.

Algunas enfermedades hereditarias humanas son causadas por mutaciones en estos canales: mionía (CIC-1), síndrome de Bartter (CIC-Kb) y enfermedad de Dent (CIC-5), el cual se asocia a proteinuria e hipercalciuria (Jentsch y col., 1999).

Los canales de cloro dependientes de voltaje se describieron hace varios años por Miller y White (1980, 1984) y se identificaron molecularmente al clonarse el CIC-0 del órgano eléctrico de la raya *Torpedo californica* (Jentsch y col., 1990). Es importante señalar que la apertura de este canal por cambios en el voltaje de la membrana es similar más no idéntico al canal endógeno del ovocito.

En mamíferos se han encontrado nueve genes que codifican para proteínas homólogas a CIC-0. Se conocen desde CIC-1 hasta CIC-7, CIC-Ka y CIC-Kb (Maduke y col., 2000; Jentsch y col., 1999). Además se han descrito CIC's en bacterias (*E. coli*), levaduras (*S. cerevisiae*) y plantas (*Arabidopsis thaliana*). A todos estos CLC's se les clasificó en tres ramas (Figura 2).

La primera rama de la familia incluye CIC-0 y sus homólogos en mamíferos (CIC-1, CIC-2, CIC-Ka y CIC-Kb) comparten entre el 50 al 60 % de homología en la secuencia, se encuentran en la membrana plasmática controlando el flujo de Cl<sup>-</sup> y el potencial de membrana. La segunda incluye CIC-3, CIC-4 y CIC-5, se localizaron en membranas de vesículas y organelos intracelulares, tienen gran importancia en el mantenimiento del pH en estos organelos. La tercera comprende CIC-6 y CIC-7, se expresan de forma amplia en varios tejidos, sin embargo la expresión heteróloga de éstos en ovocitos de *X. laevis* no genera un canal funcional, tal vez están presentes en organelos intracelulares para regular el pH vesicular (Chen, 2005).

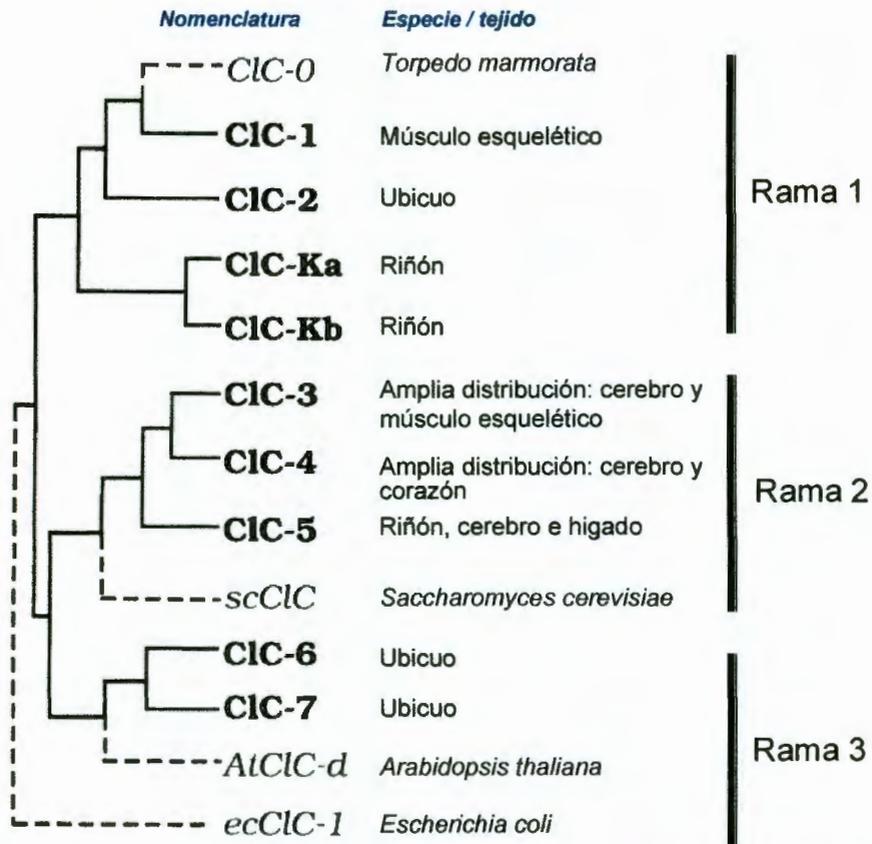


Figura 2. Dendrograma de la familia de canales de cloro CIC (Jentsch y col., 1999)

Todos los miembros de la familia de CIC tienen una estructura conservada que consiste en dominios transmembranales y dominios reguladores citoplasmáticos. Se ha determinado, por cristalografía de rayos X, la estructura de alta resolución del CIC de *E. coli* (EcCIC), el cual es un homodímero con dos subunidades idénticas (Figura 3), cada una contiene un poro independiente de translocación de Cl<sup>-</sup> y de arquitectura antiparalela (Dutzler y col., 2002).

La estructura de EcCIC muestra que los canales de CIC forman una configuración en “doble barril”: las dos subunidades son idénticas y están relacionadas en una simetría perpendicular al plano de la membrana, si se observa a lo largo del eje, por la parte externa de la célula, cada subunidad es triangular (Dutzler y col., 2002). En la Figura 3 A se muestra una representación del dímero de un lado extracelular de la estructura EcCIC, y en la Figura 3 B la

topología de la subunidad, las ( $\alpha$ -hélices son dibujadas como cilindros de la A - R, los segmentos en rojo corresponden a los residuos que forman el filtro de selectividad (Dutzler, 2004).

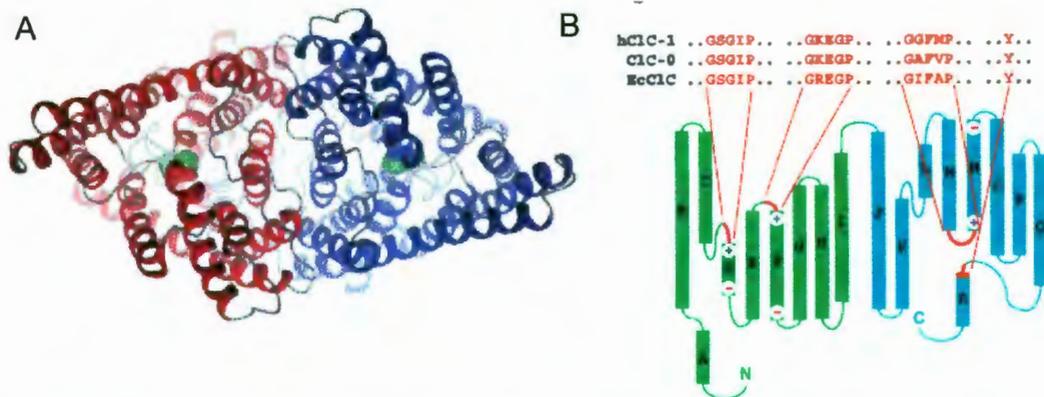


Figura 3. Estructura del canal de cloro CIC. A. Representación del dímico EcCIC. B. topología de la subunidad EcCIC (Dutzler, 2004). Los alineamientos de secuencias muestran los aminoácidos importantes para la formación del poro.

En EcCIC existen tres sitios de unión al ión cloruro que son llamados  $S_{ext}$ ,  $S_{cen}$  y  $S_{int}$  (Figura 4 B) dada su localización con respecto a la membrana plasmática, dos sitios están constitutivamente ocupados ( $S_{cen}$  y  $S_{int}$ ) por  $Cl^-$  (Figura 4) (Dutzler, 2004).

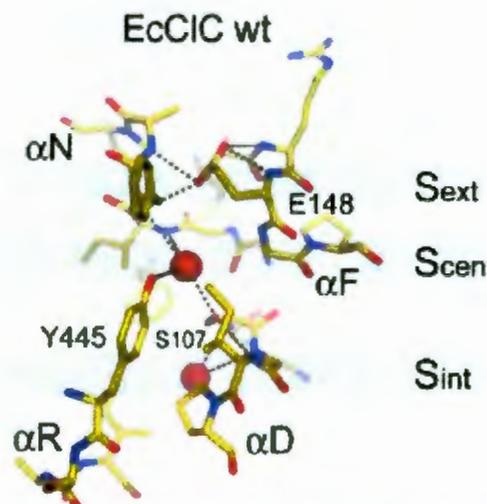


Figura 4. Canal de cloro CIC de la bacteria *E. coli*. Canal de cloro EcCIC silvestre con dos sitios de unión a iones cloro  $S_{int}$  y  $S_{cen}$ . (Dutzler, 2004.)

Se sabe que los enlaces se estabilizan por fuerzas de las cargas parciales del dipolo de la  $\alpha$ -hélice y no por contacto directo de  $\text{Cl}^-$  con los aminoácidos cargados positivamente en la proteína, lo que permite estabilizar dicho enlace aún en difusiones rápidas (Chen, 2005).

### III. HIPÓTESIS

En este trabajo se plantearon tres hipótesis las cuales son:

- ❖ El canal de cloro activado por hiperpolarización del ovocito conduce otros aniones ( $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{NO}_3^-$ ).
- ❖ La activación del canal de cloro es independiente de calcio intracelular y extracelular.
- ❖ La activación del canal de cloro es independiente de la fase de maduración en la que se encuentre el ovocito.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1 General

Caracterizar funcionalmente un canal de cloro activado por voltaje en la membrana plasmática del ovocito de *Xenopus laevis*.

### IV.2 Específicos

- ❖ Determinar la selectividad aniónica preferencial en la conducción a través de este canal.
- ❖ Conocer el papel del calcio intracelular y extracelular en la activación del canal.
- ❖ Explorar la relación entre la maduración del ovocito y la activación del canal.

## V. METODOLOGÍA

### V.1 Materiales

Se emplearon ovocitos de *Xenopus laevis* de donadoras hembras adultas (NASCO).

Los reactivos que se emplearon para preparación de las soluciones fueron: acetato de sodio, alcohol isoamílico, bicarbonato de sodio, cloroformo, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, EDTA, fenol, nitrato de calcio, sacarosa, sulfato de magnesio, sulfato de sodio todos los anteriores de marca J. T. Baker, HEPES (GIBCO), colagenasa I (SIGMA), gentamicina (AMRESCO).

Las soluciones Ringer empleadas fueron: 1) Ringer de anfibio, solución base de registro (mM): NaCl 115, KCl 2, CaCl<sub>2</sub> 1.8, HEPES 5 a pH= 7. 2) Ringer libre de calcio, solución para analizar el efecto del calcio extracelular: NaCl 115, KCl 2, MgCl<sub>2</sub> 10, EDTA 1, HEPES 5 a pH= 7. 3) Ringer bajo en cloro (mM): NaCl 28, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30, sacarosa 30, KCl 2, CaCl<sub>2</sub> 1.8, HEPES 5 a pH= 7.

Para las sustituciones iónicas solo se modificó el cloruro de sodio, por el respectivo anión objeto de estudio (yodo, bromo, nitrato, sulfato); yoduro de sodio, bromuro de sodio, nitrato de sodio y sulfato de sodio, respectivamente conservando la misma concentración molar en la solución.

Se utilizó material de vidrio como matraces Erlenmeyer, vasos de precipitado, probetas (Pyrex), tubos capilares (WPI), pipetas desechables, caja Petri desechables (Nunc), tubos Eppendorf.

El equipo de disección: bisturí, tijeras punta fina, pinzas de disección, pinzas punta roma, pinzas No. 5.5 y 6 para eliminar los folículos celulares de los ovocitos.

Los aparatos que se usaron como balanza (Mettler Toledo PB1502), balanza analítica (Sartorius CP224S), restirador de capilares (Pul-100), amplificador (oocyte-clamp OC-725C), microscopio estereoscópico (Olympus S2X7), microcentrífuga (Biofuge Heraeus), pHmetro (pH210 Hanna instrument), termociclador (Techne Flexigene), incubadoras (Imperial III, Labline), cámara de electroforesis (CBS, MGV-202T), lámpara de luz ultravioleta (Bio Imaging System).

## V.2 Métodos

### V.2.1 Biológicos

Se emplearon ranas hembras adultas *X. laevis*, las cuales se anestesiaron por hipotermia y mediante una incisión quirúrgica en la parte inferior de la cavidad general a la altura de los ovarios, se extrajo un fragmento del ovario, el cual inmediatamente se colocó en una caja Petri en solución Barth (en mM: NaCl 88, KCl 1, NaHCO<sub>3</sub> 2.4, MgSO<sub>4</sub> 0.82, Ca(NO<sub>3</sub>) 0.33, CaCl<sub>2</sub> 0.41, HEPES 5 y 2 ml/L de gentamicina). Se dejó la rana en reposo, en agua hasta su recuperación.

Los ovocitos fueron separados en forma manual con pinzas (No. 5.5 o 6), seleccionando solo aquellos que estaban en los estadios V y VI dada la caracterización morfológica mencionada anteriormente, se sometieron a desfoliculación tratando con colagenasa a una concentración de 0.5 µg/ml en Ringer libre de calcio durante 40 min, después se hicieron dos lavados con solución Barth con duración de 10 min cada uno. Se eliminaron aquellos que no resistieron y el resto se mantuvo en reposo durante toda la noche a 14° C.

Los ovocitos que se obtuvieron de diferentes donadores se colocaron en grupos los cuales se representan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de los grupos experimentales de ovocitos de *X. laevis*.

Grupo	Condiciones
Control	Se mantuvieron en solución Barth hasta su registro al siguiente día de su desfoliculación, y se realizó el registro en Ringer normal.
Sustitución iónica	Se mantuvieron en solución Barth, durante el registro se hicieron cambios en el baño de Ringer normal por Ringer con sustituyentes iónicos (el cloro fue sustituido por: bromo, yodo, nitrato, sulfato), así como la concentración de cloro fue disminuida (Ringer bajo en cloro).
Maduración	Los ovocitos fueron incubados con progesterona (10 $\mu$ M), a 14° C durante 4 h previo a su registro.
Calcio intracelular y extracelular	Con el fin de quelar el calcio intracelular los ovocitos fueron incubados con BAPTA (Figura 5) 10 $\mu$ M, a 14° C durante 4 h previo a su registro. También se sustituyó el calcio por Mg <sup>++</sup> para observar si el calcio extracelular influye en la corriente de cloro.

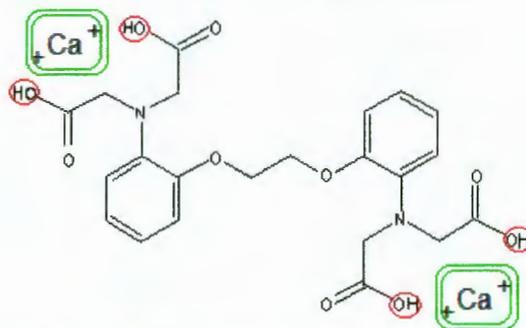


Figura 5. BAPTA. Ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N,N,N',N'-tetracético, es un quelador específico de calcio (estudios recientes también muestran quelación al zinc en igual especificidad). Sus cuatro grupos funcionales carboxílicos son capaces de unirse a dos iones calcio, cuando pierde los cuatro protones (en círculos rojo del grupo hidroxilo) y se une al ión divalente calcio (cuadro verde).

### V.2.2 Registro electrofisiológico

Se empleó la técnica de fijación de voltaje del sistema de dos electrodos (Miledi, 1982), se fijaron los ovocitos a un voltaje de -50 o -60 mV, para posteriormente dar los pulsos según los siguientes protocolos.

El primer protocolo consistió en dar 10 pulsos consecutivos de -50 a -150 mV durante 200 ms, con intervalos de tiempo de 9.6 s de recuperación del potencial.

El segundo protocolo consistió en dar diferentes pulsos de voltaje, un primer pulso hiperpolarizante de -60 a -160 mV con incrementos de +20 mV hasta +60 mV, durante 1 s.

### V.2.3 Extracción de RNA de ovocitos de *Xenopus laevis*

Se obtuvieron 0.7 g de ovocitos de *X. laevis* desfoliculados, los cuales fueron congelados en nitrógeno líquido, se agregaron 3 ml de la solución D (100 g triocianato de guanidina, 117.2 ml de agua DEPC (1 ml de dietilpirocarbonato en 1 l de agua destilada, se incubó toda la noche a 37° C y se esterilizó en autoclave a 121° C, 15 min.), 4.74 ml de citrato de sodio 1 M pH = 7 y 10.56 ml de Sarcosil al 10 %), se homogenizó de 15 a 30 s en hielo (Chomczynski y Sacchi, 1987). Se agregaron 0.3 ml de acetato de sodio 2 M pH = 4, 3 ml de fenol y 0.9 ml de Sevag (1:50 alcohol isoamílico-cloroformo), se agitó en vortex por 10 s y se incubó en hielo 15 min. Se centrifugó a 10 000 rpm durante 20 min a 4° C, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregó un volumen de isopropanol y se mezcló, se precipitó 1 h a -70° C. Después se centrifugó a 10 000 rpm durante 30 min a 4° C, se decantó el isopropanol y se disolvió la pastilla en 0.3 ml de solución D, se transfirió a un tubo nuevo y se agitó en vortex, se agregó un volumen de isopropanol y se incubó 1 h mas a -70° C, se colectó el RNA por centrifugación a 14000 rpm por 10 min a 4° C, se lavó la pastilla con etanol al 75 % en agua DEPC y se centrifugó nuevamente, se desechó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 50 µl de agua DEPC.

### V.2.4 RT-PCR (retrotranscriptasa - reacción en cadena de la polimerasa)

Se colocaron en un tubo eppendorf 1 µl oligo (dT 500 µg/ml), 5 µl de RNA

(200 ng/μl), 1 μl dNTPs (mix 10 mM de c/u) y se aforó a un volumen final de 13 μl, se colocaron a 65° C durante 5 min, se colocaron en hielo, se adicionaron 4 μl de Buffer 5X, 2 μl DTT (0.1 M), y 0.5 μl inhibidor de RNAsa. Se mezcló e incubó a 42°C por 2 min, se adicionó 1 μl de RT (superscript II, Invitrogen) y se prosiguió con el siguiente ciclo: 25° C (10 min), 42° C (50 min), 70° C (15 min) y 10° C por 5 min.

Posteriormente se colocó en un tubo Eppendorf la siguiente mezcla de reacción (en μl): 2.5 Buffer 10X, 1.25 MgCl<sub>2</sub> (50 nM), 0.5 dNTPs (10 mM c/u), 2 primer (oligonucleótido) 3' [2.5 μM], 2 primer 5' [2.5 μM], 14.75 de agua destilada estéril, 0.5 de enzima Taq (5 U/μL) y 1.5 de cDNA (producto obtenido de la reacción anterior).

Las condiciones de la PCR son las siguientes: 1 ciclo de 95° C por 1 min; 30 ciclos de: 95° C (1 min), 50° C (1 min), 72° C (3 min); y un último tiempo de extensión final de 72° C por 5 min.

#### V.2.5 Primers (oligonucleótidos)

Se diseñaron tres juegos de primers (Cuadro 2) con el objetivo de identificar la presencia de un gen que exprese algún canal de cloro de la familia de los CIC. Se empleó cada juego de primers respectivamente a las tres ramas en que se clasifican los canales CIC.

#### V.2.6 Electroforesis en gel de agarosa

Para poder observar el fragmento amplificado de la reacción de PCR, se corrieron 5 μl del producto de reacción en un gel de agarosa al 0.8 % (0.4 g de agarosa, en 50 ml de buffer TAE 1X (TAE 50X: tris base 242 g, acético glacial 57.1 ml, EDTA 100 ml de 0.5 M pH 8) en un Erlenmeyer de 250 ml.

Cuadro 2. Secuencias de los primers empleados en la PCR.

Rama*	Nombre	Secuencia	pb	PM
1	mCIC5'	5'-GGCGTCCTGTTTCAGCATCGAGGTC-3'	24	7361
	mCIC3'	5'-GCATGGGGGATGGTGGTGGCCA-3'	22	6912
2	2CIC5'	5'-AGGGGCTACTTGGGAAAGTGGAC-3'	23	7194
	2CIC3'	5'-GCCACCAAAGCAGCAAAAATGA-3'	22	6739
3	3CIC5'	5'-TCTCATTGAGCCGGTGGC-3'	18	5506
	3CIC3'	5'-GTGAGCCCTTGGTTCCAGAAGGACG-3'	25	7723

\*El número de rama corresponde a la relación filogenética descrita previamente (Figura 2).

Se calentó la suspensión hasta fundir la agarosa. Se agregaron 4µl de bromuro de etidio (10 mg/ml), se vertió la agarosa fundida en el molde y se colocó el peine mientras la agarosa está líquida. Se dejó solidificar. Se retiró el peine y se agregó buffer TAE 1X hasta cubrir la superficie del gel) mezclándose con jugo azul 6X (azul de bromofenol al 0.25 %, xilencianol al 0.25 % y glicerol al 30 %), en una relación 5:1 (v/v), junto con un marcador de peso molecular, se corrió el gel a 100 V durante 20 min, se visualizaron las bandas en una lámpara de luz ultravioleta.

## V.2.7 Clonación

### V.2.7.1 Ligación

Se colocaron 5 µl de buffer de ligación, 1 µl del vector PGEM-T Easy (10 ng/µl, Promega) (Figura 6), 3 µl del producto PCR, 1 µl de enzima ligasa (5 U/µl). Se mezcló con la puntilla, se dejó incubar toda la noche a temperatura ambiente. El producto obtenido se empleó para introducirlo en las bacterias y poder obtener DNA para posteriormente secuenciar.

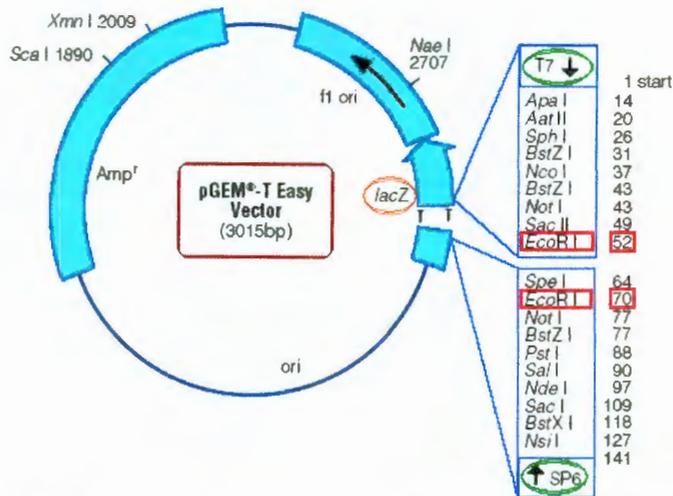


Figura 6. Vector pGEM-T Easy. Contiene los sitios promotores T7 y SP6, (y el sitio múltiple de clonación), la región de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (para diferenciar colonias con el inserto, colonias blancas, círculo en naranja) y sitio de restricción enzimática para *EcoR1* (Rectángulo en rojo)

#### V.2.7.2 Transformación

Se colocaron 4  $\mu$ l de la ligación en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se colocaron en hielo, se descongeló un vial de células comerciales (*E. coli*, DH5 $\alpha$ , Invitrogen) que se encontraban a -70° C y éstas se transfirieron en una hielera, se agregaron 50  $\mu$ l de las células, se agitó ligeramente. Se incubó en hielo durante 20 min, y a 42° C por 45 s (choque térmico). Se colocaron en hielo durante 2 min, se añadió 950  $\mu$ l de medio LB (250 ml de agua y 5 g LB (bactotriptona 10 g/L, extracto de levaduras 5 g/L, cloruro de sodio 10 g/L, pH 6.5 - 7.0)). Se incubó 1.5 h a 37° C agitando. Se sembró en cajas conteniendo LB con ampicilina (50  $\mu$ g/  $\mu$ l), 20  $\mu$ l IPTG (100 mM) (isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) y 50  $\mu$ l XGAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-  $\beta$ -D-galactopiranosido) (20 mg/ml en dimetilformamida) a las 16 h se observó el crecimiento. Se levantaron las colonias blancas, las cuales representan las colonias con el inserto de la clona en el vector pGEM-T, y se procedió a hacer minipreparados, colocando la colonia en un tubo de ensaye con medio LB (3 ml), incubando a 37° C con agitación toda la noche.

### V.2.7.3 Obtención de DNA plasmídico (miniescala)

Las clonas recombinantes obtenidas fueron procesadas para la obtención del DNA plasmídico utilizando la técnica de lisis alcalina a partir del cultivo (Sambrook y col., 2001).

Se hizo crecer una colonia en 3 ml de medio LB con agitación vigorosa toda la noche. Después se transfirió 1.5 ml de medio en tubos Eppendorf, los cuales se centrifugaron durante 4 min a 7 000 rpm; el sobrenadante se descartó completamente, por decantación cuidando de no tirar la pastilla, y ésta se resuspendió en 150 µl de solución I (Tris-Cl 25 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM, pH 8.0). Se agitó vigorosamente en el vortex hasta que la pastilla se disolviera completamente, y se incubó 5 min en hielo. Posteriormente, se adicionaron 200 µl de solución II recién preparada (0.2 ml de NaOH 10 N, 1.0 ml de SDS 10 % y 8.8 ml de agua), se mezcló por inversión y se incubó 5 min en hielo, después se agregaron 100 µl de solución III (60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético concentrado, 28.5 ml de agua), se agitó en un vortex y se incubó 5 min en hielo. El tubo se centrifugó 5 min a 10 000 rpm; el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregó un volumen de fenol saturado y un volumen de sevag (alcohol isoamílico: cloroformo 49:1). Se agitó en vortex y se centrifugó 10 min a 10000 rpm. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se añadieron 2.5 volúmenes de etanol al 100 % frío dejándose incubar 0.5 h a -70° C, se repitió el paso de centrifugación y se descartó el sobrenadante, se lavó la pastilla con etanol al 70 % frío y después de centrifugar 10 min a 10 000 rpm, se removió completamente el sobrenadante dejando secar la pastilla al aire, invirtiendo los tubos en una servilleta; y ésta fue resuspendida en 50 µl de H<sub>2</sub>O miliQ y se observó el producto en un gel de agarosa al 0.8%.

#### V.2.7.4 Análisis electroforético y cuantificación del DNA

Las muestras de DNA se analizaron por electroforesis en geles de agarosa en buffer TAE. Una vez solidificados, se depositaron en una cámara de electroforesis y se cubrieron con el mismo buffer. Las muestras a analizar se depositaron en el gel preparado, mezclándose con jugo azul 6X (azul de bromofenol al 0.25 %, xilencianol al 0.25 % y glicerol al 30 %), en una relación 5:1 (v/v) y una solución de bromuro de etidio a 5 µg/ml. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V concluida ésta, se procedió a su observación y análisis.

Las clonas cuyo retardo en la migración fue mayor a PGEM-T (3.1 Kb) se cortaron con la enzima de restricción *Eco*-R1 (0.5 µl de enzima (10 U/µl), 1 µl de Buffer 3 (10X), 8.5 µl de DNA, se incubaron durante 1.5 h a 37° C) y si se obtenía la liberación de un inserto de 500 pb del vector se procedía a hacer crecer en medio LB (50 ml) para realizar la extracción de DNA a mediana escala y poder tener una alta concentración y obtener su secuencia nucleotídica.

#### V.2.8 Obtención de DNA a partir de mediana escala (Midiprep kit)

Se obtuvo el pellet de 50 ml de medio LB en crecimiento, se transfirió a un tubo Falcon; se centrifugó a 7 000 rpm, por 4 min a 4° C. Se desechó el sobrenadante por decantación, se resuspendió a las células en 4 ml de solución I, se agitó en vortex, se incubó por 5 min en hielo. Se adicionó 4 ml de la solución II y se mezcló por inversión y se incubó 3 min en hielo. Se adicionaron 4 ml de la solución III fría, al lisiado de las células y se agitó en vortex para mezclar. Se centrifugó a 10 000 rpm, durante 5 min a 4° C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo Falcon de 15 ml y se añadió 1.5 ml de fenol y 1.5 ml de Sevag, se agitó al vortex y se centrifugó a 10 000 rpm, por 10 min a 4° C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo Falcon de 15 ml y se añadió 1.05 ml de etanol frío, se incubó media h a -70° C, se centrifugó a 10 000 rpm durante 30 min. Se desechó el sobrenadante, se

adicionó 1.5 ml de etanol frío al 70 %. Se centrifugó a 10 000 rpm a 4° C por 10 min. Se desechó el líquido del tubo y se dejó secar la pastilla.

#### V.2.9 Secuenciación

Las muestras que amplificaron un fragmento con el peso esperado y liberaron el inserto; se secuenciaron (Unidad de Proteogenómica INB - UNAM). La secuencia obtenida se comparó con el banco de genes por el programa BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>), y se alinearon por Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

## VI. RESULTADOS

En este estudio se analizaron más de 200 ovocitos de hasta 13 donadoras, los valores fueron normalizados para poder determinar diferencias significativas, aunque debemos recordar que tratándose de entidades biológicas independientes, responden de diferente forma; con ello cabe esperar que las magnitudes de las corrientes obtenidas tengan una variabilidad.

Cabe mencionar que el potencial en reposo de los ovocitos varió de  $-11.1$  a  $-86.9$  mV,  $(-29.42 \pm 12.2247; N=13 n=237)$  donde no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio. Cuando un mismo ovocito era sometido al protocolo de registro, al finalizar éste, su potencial de membrana frecuentemente se despolarizaba y al realizarse los cambios de baño (Ringer con diferentes sustituciones aniónicas), este potencial se recuperaba en parte.

En el protocolo de activación del canal, las corrientes oscilaron en un rango desde  $35$  nA hasta  $20$   $\mu$ A en respuesta al primer estímulo a  $-160$  mV por  $1$  s (Figura 7). Sin embargo, dicha exposición causaba daños irreparables al ovocito por lo que se redujo a un tiempo de  $200$  ms (Figura 8) donde podemos observar el pico máximo de respuesta sin dañar al ovocito aún después de diez pulsos consecutivos.

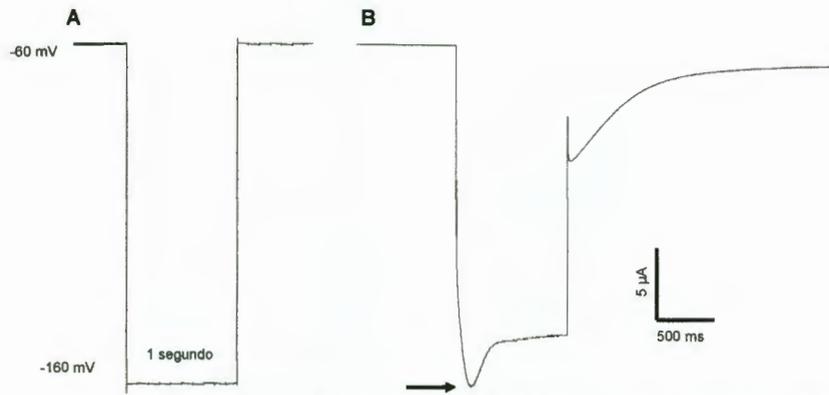


Figura 7. Pulso a -160 mV al fijar el potencial a -60mV. A. Pulso a -160 mV durante 1 s. B. Corriente generada por el ovocito, se puede observar la respuesta máxima obtenida a un tiempo de 200 ms, (señalada por la flecha), posteriormente existe un periodo de cierre del canal de varios segundos.

La Figura 8 muestra diez pulsos consecutivos del ovocito de -50 a -150 mV por 200 ms. Esto indujo la apertura de un canal que prácticamente no se desensibilizó. En la Figura 8.B se muestran ampliaciones del 1º, 5º y 10º pulso respectivamente.

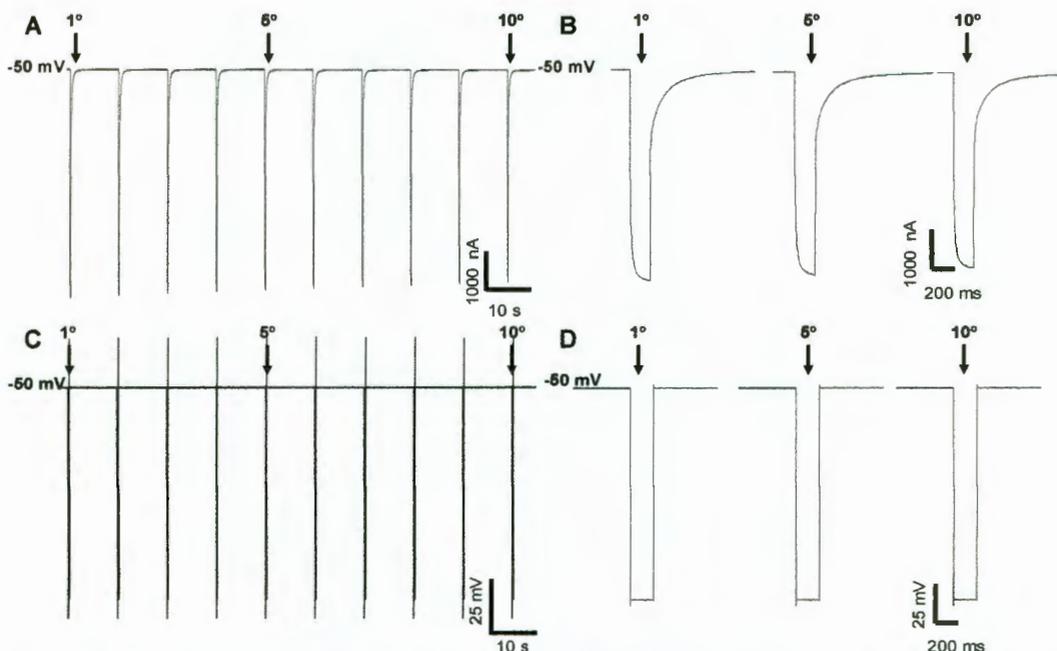


Figura 8. Protocolo del registro electrofisiológico para determinar la desensibilización del canal. A. Respuesta obtenida de un ovocito al estímulo del voltaje. B. Amplificación del primer, quinto y décimo corriente generada por el pulso correspondiente (señalado en D). C. Protocolo de 10 pulsos consecutivos a -150 mV cuando el potencial se fijó a -50mV con duración de 200 ms a intervalos de 9.8 s entre cada pulso. D. Amplificación del primer, quinto y décimo pulso.

Para la determinación de la relación corriente-voltaje, se realizaron protocolos los cuales consistieron en dar pulsos durante 1 s a un voltaje de -140 mV hasta +60mV en intervalos de +20 mV (Figura 9).

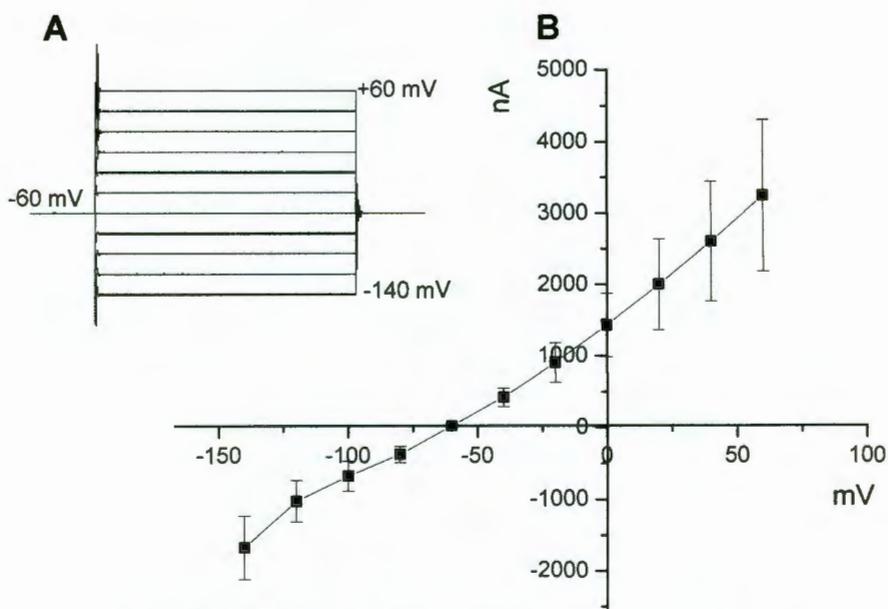


Figura 9. Relación corriente-voltaje. A. Protocolo de fijación de voltaje. B. Curva corriente-voltaje en Ringer normal.

Se tomaron en cuenta solamente los pulsos a -140 mV en la curva corriente-voltaje ya que en el primer pulso (-160 mV) en ocasiones el ovocito no soportaba la máxima respuesta. Se puede observar el incremento no lineal en la corriente entre -120 mV y -140 mV. Además, en algunos ovocitos se observó la apertura de un canal a pulsos despolarizantes, muy probablemente corresponde al canal de  $\text{Cl}^-$  reportado por Arreola y col. en 1996.

### VI.1. Selectividad aniónica

Para la determinación de la selectividad aniónica se aplicaron pulsos de -60 a -140 mV por 200 ms y se realizaron sustituciones aniónicas en la solución Ringer (Figura 10).

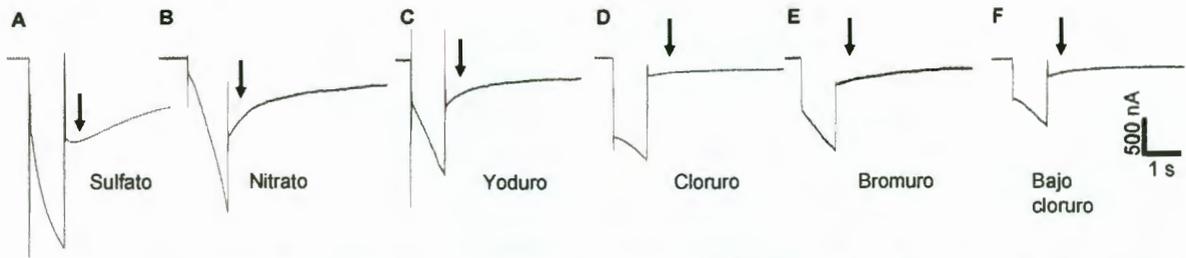


Figura 10. Pulsos a  $-140$  mV cuando se fijó el potencial a  $-60$  mV. A. Corriente producida por un ovocito al encontrarse en Ringer con sulfato. B. Con nitrato. C. Con yoduro. D. Ringer normal. E. Con bromuro. F. Bajo en cloruro. En todos los casos se muestran respuestas obtenidas por diferentes ovocitos de diferentes donadoras, posteriormente existe un periodo de cierre del canal de varios segundos (flechas).

Posteriormente, se determinó si las sustituciones iónicas afectaban la desensibilización del canal. Para ello, se obtuvieron ovocitos de hasta 8 donadoras obteniendo los resultados que se observan en la Figura 11 cuyos valores fueron normalizados con respecto al promedio del primer pulso respectivamente.

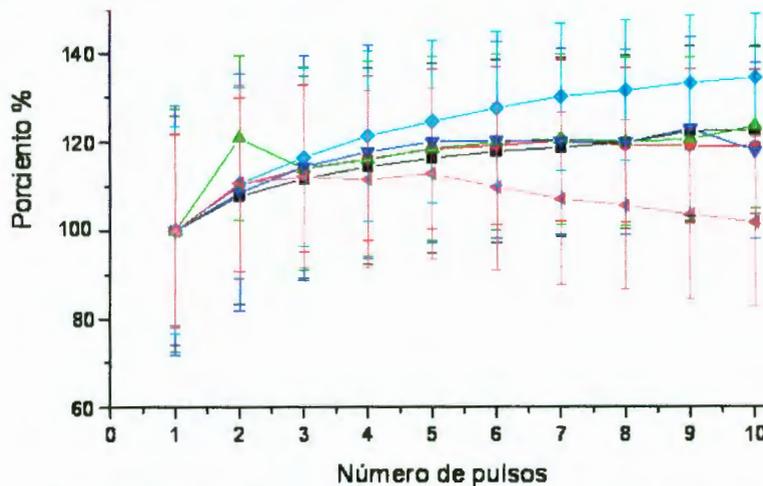


Figura 11. Desensibilización del canal en diferentes sustituciones aniónicas. Protocolo a 10 pulsos de  $-150$  mV durante 200 ms, se fijó el potencial a  $-50$  mV. En ■ valores obtenidos en Ringer normal (N= 8 n= 45), ● Ringer con bromo (N= 8 n= 22), ▲ Ringer con yodo (N= 7 n= 22), ▼ Ringer con nitrato (N= 5 n= 18), ◆ Ringer con sulfato (N= 3 n= 9), ◄ Ringer bajo en cloro (N= 3 n= 10) (Promedio  $\pm$  error experimental).

En estos resultados no se encontró diferencia significativa (ANOVA  $p=0.05$ ) entre las diferentes soluciones Ringer, si comparamos el primer y el décimo pulso existe una diferencia de un 20 % aproximadamente, lo cual indica que el ovocito

en valores reales se está despolarizando. Esto nos permite sugerir que la no desensibilización del canal es independiente del ión ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) que este transportando.

Sin embargo, se puede observar una ligera tendencia, (no significativa), en la sustitución con el ión sulfato, cuya comparación entre el primer y último pulso hay una variabilidad de aproximadamente un 30 % hacia valores menos negativos. En Ringer bajo en cloro, la tendencia es inversa, es decir, las corrientes generadas del último pulso son menores con respecto al primero.

Para la relación corriente-voltaje (voltaje en milivolts y corriente en nanoamperios) con las diferentes sustituciones se fijó el potencial a  $-60$  mV y se dieron pulsos hiperpolarizantes desde  $-160$  a  $+60$  mV en intervalos de  $20$  mV, se obtuvieron ovocitos de 2 donadoras obteniendo los siguientes resultados (Figura 12). Con fines comparativos se grafican también los resultados obtenidos en solución Ringer normal.

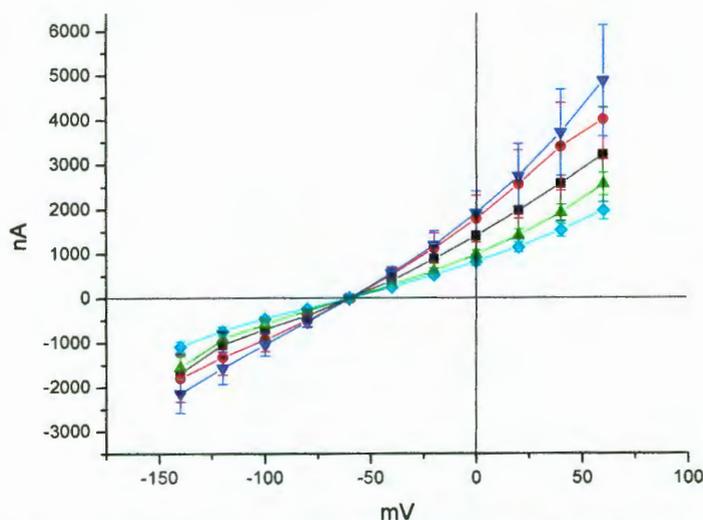


Figura 12. Relación corriente-voltaje en diferentes sustituciones aniónicas, fijando el potencial a  $-60$  mV. En ■ valores obtenidos en Ringer normal (N=2 n=6), ● Ringer con yodo (N=2 n=4), ▲ Ringer con bromo (N=2 n=5), ▼ Ringer con nitrato (N=2 n=6), ◆ Ringer bajo en cloro (N=2 n=6), (promedio  $\pm$  error experimental).

Se observa que a pulsos hiperpolarizantes de -100 mV, se muestra un incremento en la conductancia a valores más negativos, sin embargo entre valores de -80 mV a 0 mV, se aprecia un incremento lineal. De manera interesante en varios ovocitos se observó también un incremento en la conductancia a valores positivos.

Se analizó la selectividad aniónica de dicho canal encontrándose que es más permeable el ión sulfato > yoduro = nitrato = cloruro = bromuro < bajo en cloruro. Entre los iones  $I^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $Cl^-$  y  $Br^-$  no se encuentran diferencias significativas, no así con el sulfato el cual es más permeable que los otros aniones probados y en el caso del Ringer que tenía bajo cloro muestra un decremento proporcional a la concentración de cloro extracelular. (Figura 13)

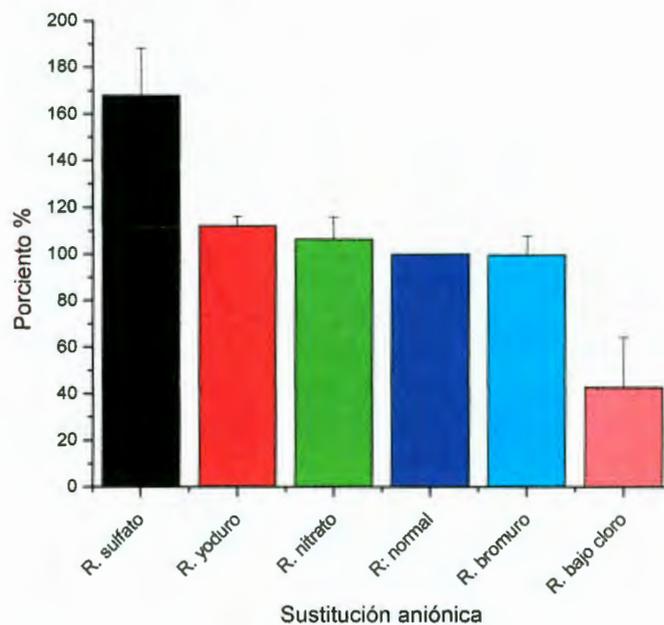


Figura 13. Selectividad aniónica. Valores normalizados con respecto al cloro como 100 %, existe una preferencia a la permeabilidad del ión sulfato, no así en bajo en cloruro donde la concentración de cloro (31.81% de cloro en Ringer bajo en cloro) es proporcional la caída en las corrientes generadas.

## VI.2. Efecto del calcio intracelular y extracelular

Para comprobar si el calcio extracelular influye en la activación de dicho canal, se preparó Ringer sin calcio el cual fue sustituido por el ión manganeso. Para probar el papel del calcio intracelular se incubaron los ovocitos con BAPTA (10  $\mu$ M) (Arellano y Miledi, 1993) durante 4 h (Figura 14).

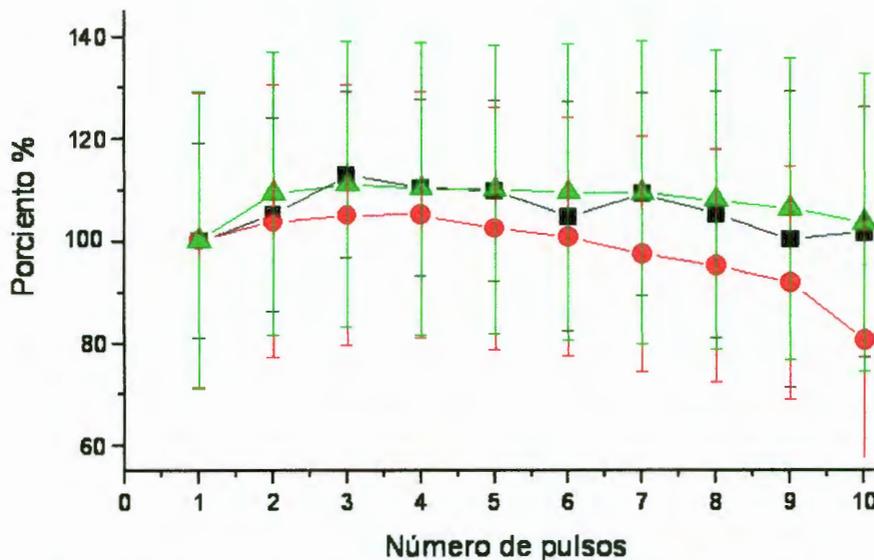


Figura 14. Efecto del ión calcio en la desensibilización del canal iónico fijando el potencial a -50 mV. En ■ valores obtenidos en incubación con BAPTA (N=2 n=10), ● Ringer sin calcio (N=6 n=17), ▲ Ringer normal (N=2 n=7), (promedio  $\pm$  error experimental).

Dichos resultados no muestran diferencias significativas. La curva del Ringer sin calcio muestra una caída de casi un 20 % al comparar el primer y último pulso. Los ovocitos incubados con BAPTA y en Ringer normal, se mantienen casi constantes a lo largo de los pulsos. Por lo que el efecto del calcio extracelular sobre la desensibilización es poco considerable, mientras que el del calcio intracelular es nulo.

Para la determinación del efecto del calcio en la curva corriente-voltaje se observan los resultados en la Figura 15, los cuales fueron normalizados con respecto al promedio de la corriente generada en Ringer Normal a -140 mV.

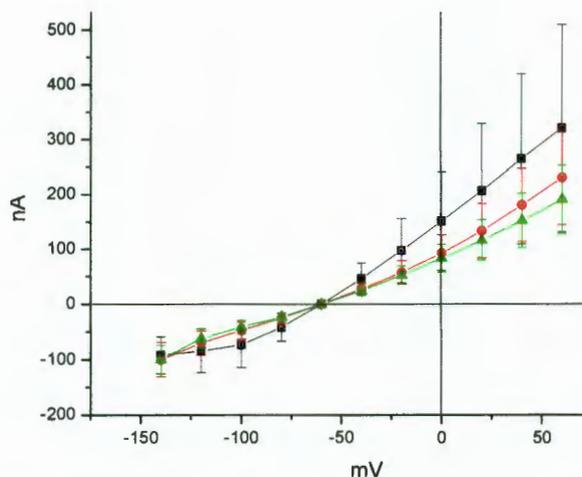


Figura 15. Efecto del ión calcio intracelular y extracelular en la relación corriente-voltaje, fijando el potencial a  $-60$  mV. En ■ valores obtenidos en incubación con BAPTA (N=3 n=13), ● Ringer sin calcio (N=2 n=4), ▲ Ringer normal (N=2 n=12), (promedio  $\pm$  error experimental).

En la relación corriente-voltaje no hay diferencia significativa según el grupo control (Ringer normal), con respecto al grupo con calcio intracelular quelado por BAPTA ni con el grupo con ausencia de calcio extracelular. Sin embargo, a pulsos entre  $-100$  a  $50$  mV, en los grupos donde fue alterada la presencia del calcio (intra o extracelular) se mantiene una relación en línea recta, la cual se ve incrementada en los extremos hiperpolarizantes y despolarizantes.

### VI.3. Efecto de la maduración

Los ovocitos en el proceso de maduración inician con cambios morfológicos, los cuales son apreciables por la generación de la vesícula germinal, la cual se observa en el hemisferio animal con una pigmentación más clara, la cual se muestra en la Figura 16 en diferentes tiempos de maduración.

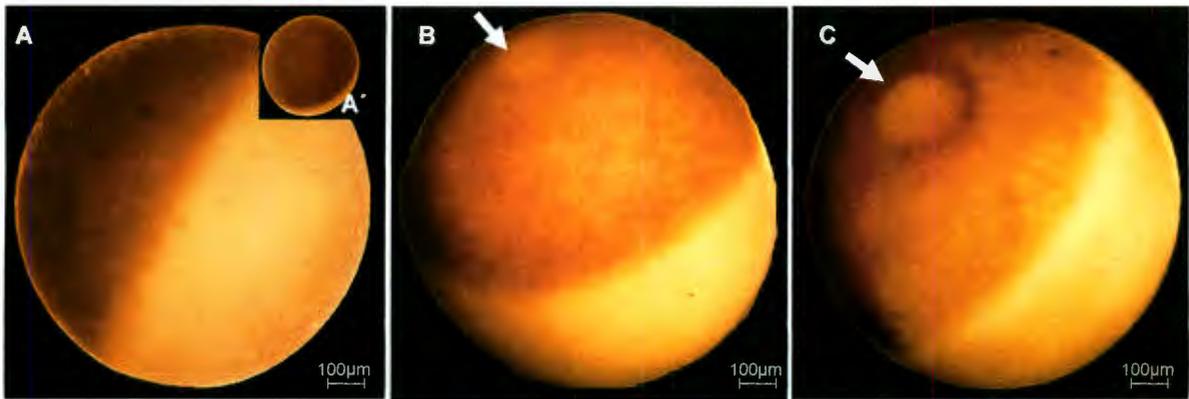


Figura 16. Ovocitos de *X laevis* en diferentes etapas de maduración. A. ovocito en estadio VI. A'. Ovocito en estadio VI vista desde el hemisferio animal, no se observa la vesícula germinal. B. ovocito sometido a incubación con progesterona (10  $\mu$ M), evolución temprana de la vesícula germinal. C. ovocito maduro después de 4 h de incubación con progesterona. Las flechas en B y C muestran la vesícula germinal.

En la Figura 17 se observan los pulsos hiperpolarizantes a -150 mV para determinar la desensibilización del canal durante el proceso de maduración *in vitro*, con ovocitos de dos donadoras para cada grupo, control y progesterona.

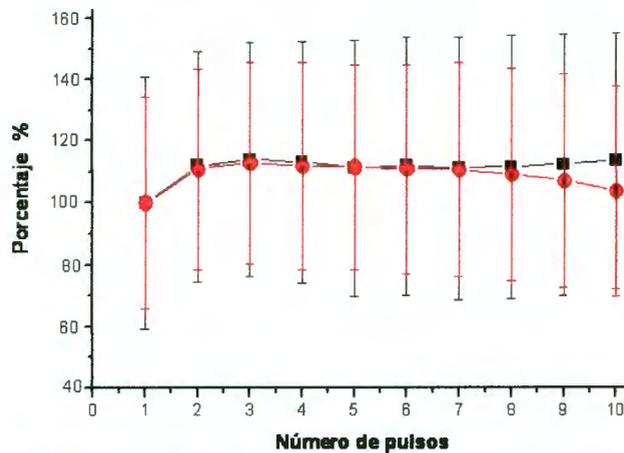


Figura 17. Efecto del estado de madurez en el que se encuentre, el potencial se fijó a -60 mV. En ■ valores obtenidos en progesterona (N=2 n=7), ● Ringer normal (N=2 n=7), (promedio  $\pm$  error experimental).

La variabilidad es muy pequeña, a lo largo de los pulsos y en ambos casos se mantienen casi iguales y no se muestran diferencias significativas.

En la relación corriente–voltaje (Figura 18), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, sin embargo, cabe mencionar que la intensidad de la respuesta se vio incrementada en los ovocitos expuestos a progesterona.

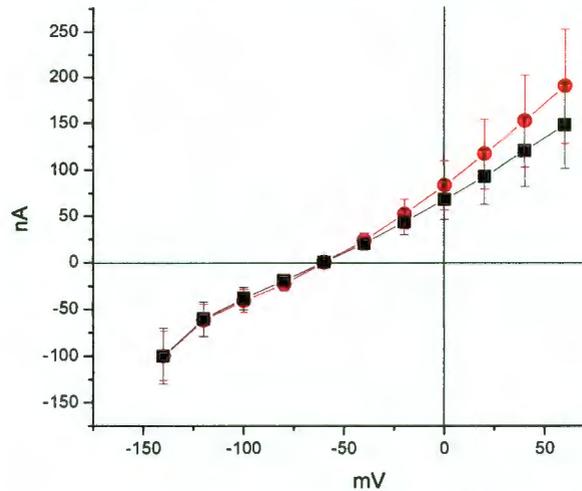


Figura 18. Relación corriente-voltaje en ovocitos expuestos a progesterona, fijando el potencial a -60 mV. En ■ valores obtenidos en progesterona (N=3 n=16), ● Ringer normal (N=2 n=12), (promedio  $\pm$  error experimental).

#### VI.4 Obtención de RNA

En la Figura 19 se muestra un gel de agarosa de la extracción de RNA a partir de ovocitos de *X. laevis*, se aprecian las tres bandas del RNA ribosomal.



Figura 19. Gel de electroforesis de la extracción de RNA, se observan las bandas a 28, 18 y 5 S.

## VI.5 RT-PCR

Se utilizaron tres juegos de “primers” para amplificar, pero sólo se obtuvieron resultados con la rama 2 (2CIC-5’ y 2CIC-3’). En la Figura 20 se observa en el gel de agarosa 0.8% la amplificación por RT-PCR de las bandas de 400 pb correspondientes al amplicón de la rama 2. Cabe destacar que no se observaron amplicones utilizando los primers para las ramas 1 y 3.



Figura 20. PCR. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular lambda Pst I, en el segundo el control negativo (blanco, todo el contenido de reactivos excepto el DNA) de la PCR, la reacción de RT-PCR. (Las manchas de la parte inferior corresponden a los primers dimers)

## VI.6 Extracción de DNA (minipreparaciones)

A partir de los amplicones se procedió a ligar el inserto al vector pGEM-T Easy, para luego dicho plásmido introducirlo en bacterias *E.coli*, de las cuales se obtuvieron 200 clones de las cuales 36 se muestran en la Figura 21. De las diferentes colonias que se obtuvo el DNA se eligieron las que tuvieran una banda clara y definida para que fueran cortadas con enzimas de restricción.



Figura 21. Obtención de DNA de diferentes colonias (se representan 36 de las 200 clonas que se obtuvieron en su totalidad), para identificar las más adecuadas se realizó digestión enzimática de las posibles candidatas a un canal de CIC.

### VI.7 Digestión enzimática

De las clonas elegidas se realizó una restricción enzimática (Figura 22) con *Eco R1* para liberar el inserto (580 pb) del vector (3015 pb), las clonas positivas se crecieron en mediana escala (50 ml) y su secuencia nucleotídica fue determinada.

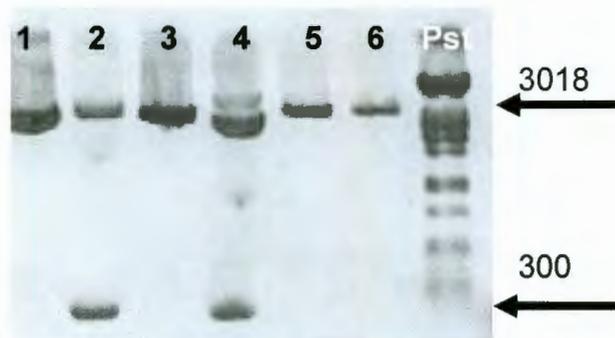


Figura 22. Restricción enzimática del plásmido obtenido de minipreparaciones (a partir de la obtención de DNA a mini escala). La banda superior es el vector pGEM-T (3018 pb) cortado con *EcoR1* y la columna 2 y 4 se muestra una banda alrededor de 300 pb. Cada carril numerado fueron, respectivamente, una de las posibles clonas que presentaron banda clara y definida en la extracción de DNA de mini escala.

Al comparar dos secuencias obtenidas se muestra que las clonas que nombramos 22 se encontró que tiene 98% de similitud con CIC-5 de *X laevis*. La otra clona 22<sup>a</sup> tiene una gran similitud (94.8%) con la clona 22, sin embargo, éstas pueden ser debidas a errores puntuales en la secuenciación, por lo que se sugiere

que el amplicon corresponde a XCIC-5. El alineamiento entre ambas secuencias se encuentra en la Figura 23.

El electrocromatograma de la clona 22 se encuentra en el Anexo A, y en el Anexo B se observa el alineamiento (W clustal) entre el gen completo del CIC-5 y de la clona 22.



Figura 23. Alineamiento entre las clonas 22 y 22<sup>a</sup> con una alta similitud entre ellas del 94.8%. En rojo están indicados los primers que se emplearon y las flechas indican el sentido de los mismos 5'y 3'. (Los asteriscos en la parte inferior de la alineación indican que nucleótidos son idénticos).

## VII. DISCUSIÓN

Hemos empleado técnicas electrofisiológicas, empleando Ringer con diferentes sustituciones aniónicas para conocer la selectividad del canal activado por voltaje (hiperpolarización), ( $\text{Br}^-$ ,  $\text{SO}_4^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ). Los canales CIC son canales selectivos a aniones que preferentemente conducen cloro, pero también conducen otros aniones monovalentes como  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{SCN}^-$  con menor eficiencia (Dutzler, 2004). Estudios realizados por Reyes y col., en 2004 encontraron que una secuencia de selectividad aniónica de un canal de cloro, fue:  $\text{SCN}^- > \text{ClO}_4^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$ , pero de un canal activado por despolarización. Sus radios iónicos fueron preferenciales a radios de mayor tamaño.

Dado que en este estudio se encontró una similitud en la conducción de yodo, bromo, cloro y nitrato, no podemos asegurar que dicho canal sea selectivo en base al radio iónico. Sin embargo, los canales de cloro CIC no tienen una cavidad acuosa dentro del poro (Jentsch, 2002), sino dos vestíbulos acuosos que vienen de la membrana intracelular y extracelular y es más estrecho en el filtro de selectividad (Dutzler, 2004).

Los ovocitos analizados con una menor concentración de cloro, mostraron una menor conducción tanto a pulsos hiperpolarizantes, como a despolarizantes, por lo que se sugiere que hay una relación directa con la concentración de aniones disponibles que pueda transportar.

En las curvas corriente-voltaje se encontró una relación lineal a partir de voltajes superiores a  $-100$  mV, a diferencia de una tendencia en decaimiento a potenciales más negativos ( $< -100$  mV), Parker y Miledi en 1988, mostraron en estudios electrofisiológicos de una corriente de cloro independiente de calcio activada por hiperpolarización, que a voltajes entre  $0$  mV y  $-100$  mV cambia el potencial provocando cambios ohmicos seguido de un incremento lineal a potenciales más negativos.

Nuestros resultados muestran que la activación del canal es independiente de calcio intracelular y extracelular y sugieren también que el calcio no juega un papel fundamental en la activación de la corriente. Las corrientes de cloro generadas por los CIC's son independientes de calcio extracelular. (Parker y Miledi, 1988; Arreola y col., 1996; Reyes y col., 2004).

Se sabe que las corrientes de cloro activadas por calcio aparentemente están involucradas en la generar del potencial de fertilización (Parker y Miledi, 1988), durante la maduración las propiedades bioeléctricas del ovocito cambian profundamente, el potencial de membrana se despolariza dramáticamente de valores de  $-50$  mV a  $-10$  mV, ésta causa una baja regulación en los canales iónicos y sistemas de cotransporte en la membrana. La bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa es inactivada por la despolarización de la membrana y sólo algunos sistemas de transporte se mantienen activos en la maduración como los canales de cloro independientes de calcio (Weber, 1999). Encontramos que la activación por hiperpolarización del canal de  $\text{Cl}^-$  es independiente del estado de maduración del ovocito, por lo que dicho canal no modifica sus propiedades. Sin embargo, observamos que los potenciales de reposo de la membrana se encontraron despolarizados.

Al extraer RNA de los ovocitos y mediante RT-PCR encontramos que un fragmento obtenido corresponde en gran similitud a CIC-5, el cual corresponde a la segunda rama de CIC (incluye CIC-3, 4 y 5). Estos canales se presentan en membranas intracelulares de las vesículas y son de importancia en el mantenimiento del pH en estas vesículas (Yu-Chen, 2005). Es importante mencionar que CIC-5 parece estar localizado principalmente en organelos intracelulares y no en la membrana plasmática, aunque estudios recientes sugieren que CIC-5 podría estar en la membrana plasmática de *Xenopus* en células renales A6 (Reyes y col., 2004). Sin embargo, CLC-5 es activado por despolarización de la membrana, opuesto al canal aquí registrado.

## VIII. CONCLUSIÓN

El canal iónico tiene una preferencia en la conductividad de iones sulfato, seguido de yodo, nitrato, cloro, bromo. Entre estos últimos, no se observó una diferencia significativa en la conductividad. Además el canal activado por hiperpolarización no desensibiliza y ésto es independiente del ión sulfato, yodo, nitrato, cloro o bromo.

El canal conduce aniones cloro independientemente del calcio que se encuentre en el medio extracelular o intracelular.

El canal tiene conductividad similar, independientemente del estado de maduración (estadio VI G2/M, o madurando *in vitro* con progesterona).

En el RNA del ovocito de *X. laevis* se encontró un fragmento con 316 pares de bases (desde el inicio del primer 5' al final del primer 3'), el cual mantiene una identidad del 98%, con la secuencia nucleotídica del canal CIC-5.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

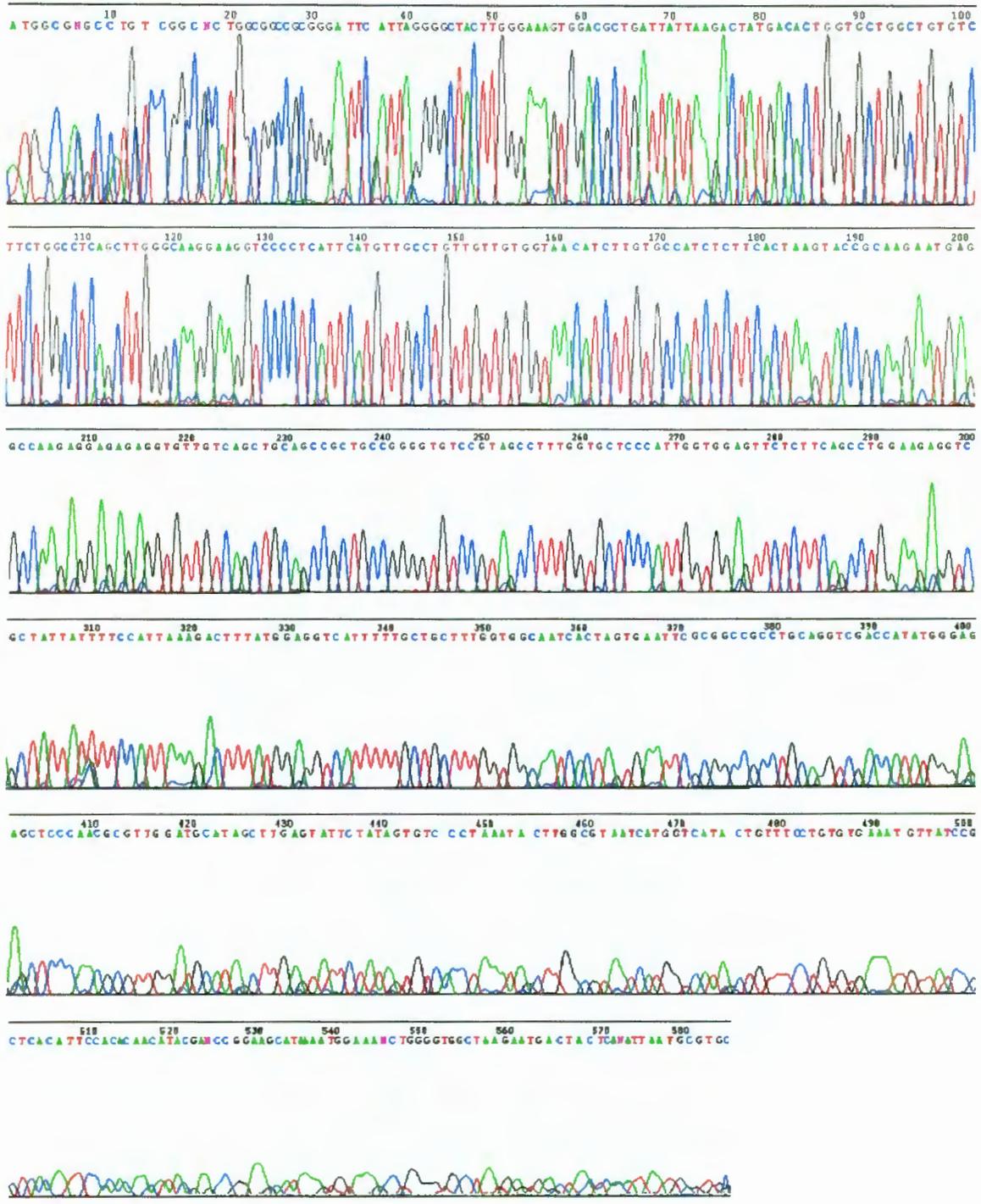
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002.** Molecular biology of the cell. 4<sup>th</sup> ed. Garland Science. New York, EUA: 1210-1216.
- Arellano, R., Miledi, R. 1993.** Follicle stimulating hormona and acetylcholine in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. J. Gen. Physiol. 102:833-857.
- Arreola, J., Park, K., Melvin, J., Begenisich, T. 1996.** Three distinct chloride channels control anion movements in rat parotid acinar cell. J. Physiol. 490.2:351-362.
- Ben-Efraim, I., Shai, Y., Attali, B. 1996.** Cytoplasmic and extracellular IsK peptides activate endogenous K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in *Xenopus* oocytes. J. Biol. Chem. 271:8768-8771.
- Burckhardt, B. C., Burckhardt, G. 1997.** NH<sub>4</sub><sup>+</sup> conductance in *Xenopus laevis* oocytes. I. Basic observations. Pflügers Arch- Eur J. Physiol. 434:306-312.
- Burckhardt, B.-C., Frömter, E. 1992.** Pathways of NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> permeation across *Xenopus laevis* oocyte cell membrane. Pflügers. Arch. 420:83-86.
- Chen, T. Y. 2005.** Structure and function of ClC channels. Annu. Rev. Physiol. 67: 809-839.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987.** Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. Analytical Biochemistry. 162:156-159.
- Cougnon, M., Bouyer, P., Hulin, P., Anagnostopoulos, T., Planelles, G. 1996.** Further investigation of ionic diffusive properties and of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pathways in *Xenopus laevis* oocyte cell membrane. Pflügers. Arch. Eur. J. Physiol. 431:658-667.
- Dascal, N., Lotan, I., Karni, E., Gigi, A. 1992.** Calcium channel currents in *Xenopus* oocytes injected with rat skeletal muscle RNA. J. Physiol. 450: 469-490.
- Dutzler, R., Campbell, E., Cadene M., Cahlt, B., MacKlinnon, R. 2002.** X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. Nature. 415:287-294.
- Dutzler, R. 2004.** Structural basis for ion conduction and gating in ClC chloride channels. FEBS. 564:229-233.

- García-Alcocer, G.,** García-Colunga, J., Martínez-Torres, A., Miledi, R. **2001.** Characteristics of glycine receptors expressed by embryonic rat brain mRNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. 98:2781-2785.
- Gilbert, S.,** **2000.** Developmental Biology. 6<sup>th</sup> edición. Swarthmore college. EUA. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=dbio.TOC&depth=2>
- Huang, H.,** St.-Jean, H., Coady, M. J., Lapointe, J. Y. **1995.** Evidence for Coupling between Na<sup>+</sup> pump activity and TEA-sensitive K<sup>+</sup> currents in *Xenopus laevis* oocytes. J. Membrane Biol. 143:29-35.
- Jentsch, T. J.,** Friedrich, T., Schriever, A., Yamada, H. **1999.** The CLC Chloride channel family. Pflugers. Arch. Eur. J. Physiol. 437:783-795.
- Jentsch, T.J.,** Steinmeyer, K., Schwartz, G. **1990.** Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. Nature. 348: 510-514.
- Jentsch, T.** Friedrich, T., Schreuer, A., Yamada, H. **1999.** The ClC chloride channel family. Plügers. Arch. Eur. J. Physiol. 437:783-795.
- Jentsch, T.** **2002.** Chloride channels are different. Nature. 415:276-277.
- Kowdley, G. C.,** Ackerman, J. S., John, J. E., Jones, L. R., Moorman, J. R. **1994.** Hyperpolarization-activated chloride currents in *Xenopus* oocytes. J. Gen. Physiol. 103:217-230.
- Kusano, K.,** Miledi R., Stinnakre, J. **1982.** Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. J. Physiol. 328:143-170.
- Lu, L.,** Montrose-Rafizadeh, C., Hwang, T.-C., Guggino, W. B. **1990.** A delayed rectifier potassium current in *Xenopus* oocytes. J. Biophys. 57:1117-1123.
- Maduke, M.,** Miller, C., Mindell, J. A. **2000.** A Decade of CLC chloride channels: structure, mechanism and many unsettled questions. Ann. Rev. of Biophys. Biomol. Struct. 29: 411-438.
- Martínez-Torres, A.,** Demuro, A., Miledi, R. **2000.** GABA<sub>ρ</sub>1/GABA<sub>A</sub>α1 receptor cimeras to study receptor desensitization. Proc. Natl. Acad. Sci. 97:3562-3566.

- Miledi, R., Dueñas, Z., Martínez-Torres, A., Kawas, C. H., Eusebi, F. 2004.** Microtransplantation of functional receptors and channels from the Alzheimer's brain to frog oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:1760-1763.
- Miledi, R., Eusebi, F., Martínez-Torres, A., Palma, E., Trettel, F. 2002.** Expression of functional neurotransmitter receptors in *Xenopus* oocytes after injection of human brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 13238-13242.
- Miledi, R., Woodward, R. M. 1989.** Effects of defolliculation on membrane current responses of *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 416: 601-621.
- Miledi, R. 1982.** A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. R. Soc. London B. Biol. Sci.* 215:491-497.
- Miller, C., White, M. M. 1984.** Dimeric structure of single chloride channels from *Torpedo electropolar*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 2271-2253.
- Miller, C., White, M. M. 1980.** A voltage-dependent chloride conductance channel from *Torpedo electroplax* membrane. *Ann. NY Acad. Sci.* 341:534-551.
- Parekh, A. B., Terlau, H., Stuhmer, W. 1993.** Depletion of InsP3 stores activates a  $Ca^{2+}$  and  $K^+$  current by means of a phosphatase and a diffusible messenger. *Nature.* 364:814-818.
- Parker, I., Ivorra, I. 1990.** A slowly inactivating potassium current in native oocytes of *Xenopus laevis*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 238:369-381.
- Parker, I., Miledi, R. 1988.** A calcium-independent chloride current activated by hyperpolarization in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 233:191-199.
- Parker, I., Miledi, R. 1987.** Injection of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate into *Xenopus* oocytes generates a chloride current dependent upon intracellular calcium. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 232:59-70.
- Parker, I., Gunderson, C. B., Miledi, R. 1985.** A transient inward current elicited by hyperpolarization during serotonin activation in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 223: 279-292.
- Reyes, J., Hernández-Carballo, C., Pérez-Cornejo, P., Meza, U., Espinosa-Tanguma, R., Arreola J., 2004.** Ion channels, transporters. *Pflugers Arch-Eur J. Physiol.* 449:271-277.

- Sambrook, J. 2001.** Molecular cloning. 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbord. New York, EUA. 1.32-1.34.
- Sumikawa, K. Parker, I., Miledi, R. 1989.** Expression of neurotransmitter receptors and voltage-activated channels from brain mRNA in *Xenopus* oocytes. *Methods in Neurosci*, 1:30-45.
- Tinsley, R.C., Kobel, H. R. 1996.** The biology of *Xenopus*. Oxford University Press, New York, U.S.A.:3-7.
- Weber, W. M. 1999.** Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *BBA*. 1421:213-233.
- Yu-Chen, T. 2005.** Structure and funtion of CIC channels. *Annu. Rev. Physiol.* 67: 809-839.

Anexo A: Electrocromatograma de la clona 22 obtenida a partir de técnicas de RT-PCR a partir de RNA de ovocito de *X. laevis*.





```

22      ATACTGTTTCCGTGTGTGA-AATGTTATCGCT--CACATTCCACACAACATACGANCGGAAGC-ATAAAATGG--AAAN 546
clc5    TGCCTTTTATCCGTGCCAACATTGCCTGGTGTCACAGACGGAAACCCCAAACTCGGTCGCTATCCTGTTGGCGGAAG 1560
      *** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

22      CTGGGGTGGCTAAGAATGAC-TACTCANTTAATGCGTGC----- 585
clc5    TCCTAATGGTGACGGCTTATTACAGCCATACTGGCATTTCCCAATGATTACACGAGAATGAGCTCTAGTGAAATGATATCT 1640
      *** * * * * * ** * ** * ** * ** *

22      -----
clc5    GAGCTTTTCAATGACTGCGGCCTCTTGACTCGTCCAAGCTATGTGATTATGTTAATGATTACAACAACACAAAGGGGGG 1720

22      -----
clc5    CAACCTCCCTGACCGTGCAGCAGGAAATGGAGTCTACACAGCCATGTGGCAACTGTCCCTGGCGTTGATCTTCAAAGCTG 1800

22      -----
clc5    TGATTACCATATTCACATTTGGCATAAAGGTGCCATCAGGCCTTTTCATCCCAAGCATGGCTGTGGGTGCTATAATGGGA 1880

22      -----
clc5    AGGCTTTTGGGGGTTGCCATGGAACAGCTTCTCTTACCATCACGACTGGCTGATCTTCAGAGGATGGTGCAACCAAGG 1960

22      -----
clc5    AGCAGACTGTATCACTCCTGGTCTCTATGCCATGGTTGGAGCAGCGGCTGCCTAGGTGGCGCCACACGTATGACTGTCT 2040

22      -----
clc5    CACTTGTGGTTATTATGTTGAGTTAACTGGTGGATTGGAATACATTGTACCTCTGATGGCCGCCCGCCATGACCAGCAAG 2120

22      -----
clc5    TGGGTGGCAGACGCTTTGGGACGGGGAGTATTTATGATGCCACATCCATTTAAATGGTTACCCCTTCTCGAGGCGAA 2200

22      -----
clc5    GGAAGAGTTCAGCCATAAAAACTGGCTATGGATGTCATGCGTCCCGGCGCAATGACCCTATATTAACGGCCATTACTC 2280

22      -----
clc5    AAGACAGCATGACGGTGGAGGACATTGAGGCCATTATAAGTGAAACGACCTACAGTGGTTTCCCAATTGTAGTTTCTAGA 2360

22      -----
clc5    GAATCCCAAAGACTAATGGGCTTTGTACTGAGAAGAGACTTAATTATCTCTATCGAAAGCGCCGAAAAAAGCAAGAAGG 2440

22      -----
clc5    GATAGTGAGCACATCGCGGATTACTTTACAGAGCACACGCCAACACAACCCACGACTGCTCCACCCAGCCTAAAGCTTC 2520

22      -----
clc5    GTGCAATTATGGACTTAAGCCCTTCACAATAACAGACCAGACCTATGGAGATTGTGGTGGATATCTTCCGTAAGCTT 2600

22      -----
clc5    GGTCTGCGCCAGTGCCTTGTGACACACAATGGGAGATTGCTTGGCATAATAACAAAGAAAGATGTCTTAAAGCATATAGC 2680

22      -----
clc5    ACAGATGCCAATCAAGATCCGGACTCTATATTATTTAACTGA 2723

```