



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PANEXINAS EN EL
FOLÍCULO OVÁRICO DE *Xenopus*.**

TESIS INDIVIDUAL

Que para obtener el título de
Licenciada en Biología

PRESENTA:

ALEJANDRA CRUZ RICO

DIRIGIDO POR:

Dra. TERESA EDITH GARAY ROJAS

Querétaro, Qro.
Marzo 2010

**BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

No. Adq. H74338

No. Título _____

Clas. TS 571.84-140

09570

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y REROS
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y REROS

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y REROS

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y REROS

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y REROS

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y REROS

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y REROS

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y REROS

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y REROS

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y REROS

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y REROS



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología

CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PANEXINAS
EN EL FOLÍCULO OVÁRICO DE *Xenopus*

TESIS INDIVIDUAL

Que para obtener el título de
Licenciada en Biología

Presenta:

Alejandra Cruz Rico

Dirigido por:

Dra. Teresa Edith Garay Rojas

SINODALES

Dra. Teresa Edith Garay Rojas

Presidente

Dr. Juan Campos Guillén

Secretario

Dr. Carlos Isaac Silva Barrón

Vocal

Dr. Rogelio Arellano Ostoa

Suplente

RESUMEN

Durante el desarrollo del folículo ovárico es esencial el establecimiento de la comunicación metabólica y eléctrica mediada por uniones comunicantes entre el ovocito y las células somáticas. Las uniones comunicantes tienen como base molecular a las conexinas (Cx) y a las panexinas (Px), proteínas que forman canales hexaméricos en la membrana celular. En el ovocito de la rana *Xenopus laevis* se expresan diferentes conexinas, siendo la más abundante la Cx38; sin embargo, estudios recientes en el laboratorio indican que esta proteína no es fundamental para el mantenimiento de la comunicación eléctrica. Con el fin de re-evaluar la participación de la Cx38, así como la posible expresión y participación de Px en la comunicación eléctrica y metabólica del folículo de *Xenopus laevis*; en el presente trabajo se evaluó: 1) la expresión de Px en las células foliculares, el ovocito y el folículo completo mediante ensayos por RT-PCR empleando oligonucleótidos específicos y, 2) el efecto de bloquear la expresión de Px1 y Cx38 sobre el grado de comunicación eléctrica (acoplamiento) entre el ovocito y las células foliculares, utilizando para ello métodos electrofisiológicos que permitieron evaluar el nivel de acoplamiento a través de la medición de corrientes eléctricas generadas en las células foliculares. Los resultados obtenidos mostraron la expresión de Px1, pero no de Px2, en las células foliculares y en el ovocito de *X. laevis*. Los estudios funcionales indicaron que la inhibición de la expresión de Px1 y Cx38 en el ovocito no disminuye de manera significativa el acoplamiento eléctrico, pero parecen tener un efecto importante sobre el acoplamiento metabólico, el cual puede ser debido principalmente por la disminución de Cx38.

Palabras clave: Panexina, conexina, comunicación celular.

SUMMARY

During the development of the ovarian follicle is essential the establishment of metabolic and electrical communication between the oocyte and somatic cells mediated by gap junctions. The molecular basis of gap junctions are two families of proteins that form hexameric channels in the cell membranes, the connexins (Cx) and the pannexins (Px). The oocyte of the frog *Xenopus laevis* expresses several connexins, being the most abundant Cx38; however, recent studies in the laboratory indicate that this protein is not essential for the maintenance of electrical communication. To re-evaluate the participation of Cx38 and the possible expression and function of Px in the electrical and metabolic communication in *Xenopus laevis* follicle, this study evaluated: 1) the Px expression in follicular cells, the oocyte and the whole follicle through RT-PCR assays using specific primers and 2) the effect of blocking the expression of Px1 and Cx38 on the degree of electrical communication (coupling) between the oocyte and follicular cells, using electrophysiological methods to evaluate the level of coupling through the measurement of electrical currents generated in the follicular cells. The results clearly showed the expression of Px1, but not of Px2 in the *X. laevis* oocyte and follicular cells. Functional studies indicated that the inhibition of the expression of Px1 and Cx38 in the oocyte does not significantly decrease the electrical coupling, but it seems to have a significant effect on metabolic coupling, which may be caused mainly by the decrease in Cx38.

Keywords: Pannexin, connexin, cell communication.

DÉDICATORIAS

A Dios por la vida y la fortaleza.

A mis padres que siempre me apoyaron y me acompañaron a lo largo de este trayecto tan importante en mi vida. Gracias por enseñarme que la constancia y la voluntad pueden llevarnos a donde queramos ir.

A mis hermanos por haber estado ahí cuando más los necesité. Gracias por sus palabras de aliento y por haber sido un soporte en mi vida.

A mi sobrino Santiago por haberme permitido compartir con él sus mejores etapas en momentos tan importantes. Gracias por las risas y el amor.

A mis amigos que fueron un apoyo irremplazable. Gracias por los consejos.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Dra. Teresa Edith Garay Rojas por su invaluable apoyo en la realización del proyecto. Gracias por la dedicación, la paciencia y las enseñanzas.

Al Dr. Rogelio Arellano Ostoa por sus contribuciones a lo largo de este proyecto de investigación y por las revisiones del escrito.

A mis asesores de tesis por las observaciones al escrito:

Dr. Juan Campos Guillén

Dr. Carlos Isaac Silva Barrón

A Leticia Robles Martínez por su colaboración con los cultivos celulares.

A Horacio Leyva por el apoyo técnico a lo largo del desarrollo de este proyecto.

A la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM por la realización de las secuencias de ADN.

Al personal y a mis compañeros del Instituto de Neurobiología que de alguna manera participaron en el trabajo brindando información bibliográfica y apoyo técnico.

A mis profesores de la UAQ por haber orientado mi formación.

A CONACyT por el apoyo para el desarrollo del proyecto: 82340.

A PAPIIT-UNAM por el apoyo para el desarrollo del proyecto: IN214409.

A CONACyT por la beca para estudiantes concedida; 80475,

A la SEP por la beca de titulación 814970 otorgada para la finalización de la tesis.

ÍNDICE

	Página
Resumen.	i
Summary.	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice.....	v
Índice de cuadros.	vii
Índice de figuras.	viii
Abreviaturas.	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Desarrollo folicular en anfibios.	4
Interacción entre las células de la granulosa y el ovocito durante el desarrollo folicular	5
Comunicación intercelular en el folículo ovárico.	6
Comunicación en el complejo celular ovocito-células foliculares mediada por uniones comunicantes: Las conexinas.....	8
Las inexas y las panexas, dos familias de proteínas que también forman UC's.	13
Respuestas eléctricas generadas en el folículo ovárico de <i>Xenopus laevis</i> ... 17	
Corrientes que requieren la presencia de las células foliculares.	19
Corriente de potasio mediada por AMPc ($I_{K,AMPc}$).	19
Corriente de cloro transitoria (F_{Cl}).	20
Corriente de cloro dependiente de calcio ($I_{Cl(Ca)}$).	21
Corrientes originadas en la membrana del ovocito.	22
Corriente I_c	22
II. ANTECEDENTES.....	25
III. HIPÓTESIS.	29
IV. OBJETIVO GENERAL.	29
V. OBJETIVOS PARTICULARES.....	29
VI. METODOLOGÍA.	30
Análisis de Secuencias	30
Tratamiento de folículos ováricos.	31

Extracción de ARN _T	32
Síntesis del ADN complementario (ADNc)	32
Amplificación del ADNc mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	33
Inhibición de la expresión de Px1 y Cx38.	34
Registro electrofisiológico.	34
Análisis estadísticos.	36
VII. RESULTADOS.	37
Expresión de Px1, Px2 y Cx38 en el folículo de <i>Xenopus laevis</i>	37
Estudios Electrofisiológicos.....	45
Corrientes con origen en la membrana del ovocito.	46
Corriente I_c	46
Corrientes con origen en las células foliculares.	49
Corriente de potasio mediada por AMPc ($I_{K,AMPc}$).....	50
Corriente de cloro transitoria (F_{Cl}).	52
Corriente de cloro dependiente de calcio ($I_{Cl(Ca)}$).	55
VIII. DISCUSIÓN.	58
Expresión de Px1 en el folículo ovárico de <i>Xenopus laevis</i>	58
Efecto de la inhibición de Px1 sobre la comunicación celular en el folículo de <i>X. laevis</i> : Participación en el acoplamiento eléctrico y metabólico.....	59
Expresión de Px2 en <i>Xenopus laevis</i>	60
Efecto de la inhibición de Cx38 sobre la comunicación celular en el folículo de <i>X. laevis</i> : Participación en el acoplamiento eléctrico y metabólico.....	61
Efecto de la inhibición de Px1 y Cx38 sobre la comunicación celular en un sistema acoplado.	61
IX. CONCLUSIONES.	64
X. LITERATURA CITADA.	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1.1. Distribución de la expresión de Px1, Px2 y Px3 en diferentes tejidos de humano y roedores.....	15
Cuadro 6.1. Parámetros de la RT-PCR.....	30
Cuadro 6.2. Oligonucleótidos antisentido.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1.1. Etapas del desarrollo del folículo ovárico en mamíferos.	2
Figura 1.2. Estructura de los canales que forman placas de unión en la membrana de células adyacentes.....	11
Figura 1.3. Diferentes configuraciones de los canales formados por conexinas y de los conexones.....	12
Figura 1.4. Estructura topológica de las tres familias de proteínas que forman uniones comunicantes: conexinas, inexinas y panexinas.	14
Figura 1.5. Diagrama que representa las capas que conforman al folículo ovárico de <i>Xenopus laevis</i> y algunos de los receptores membranales, canales iónicos y las vías que activan al ser estimulados.	19
Figura 1. 6. Algunas de las respuestas eléctricas generadas en la membrana de las células foliculares y en el ovocito de <i>Xenopus laevis</i>	23
Figura 7.1. ARN _T obtenido de las células que conforman al folículo ovárico de <i>X. laevis</i>	37
Figura 7.2. Ensayo por RT-PCR de Px1 en los distintos tejidos y células de <i>X. laevis</i>	38
Figura 7.3. Ensayo de RT-PCR por gradiente de temperatura de Px2 de cerebro de rana.	39
Figura 7.4. Alineamiento de las secuencias que codifican para Px2 de cerebro de rana.	40
Figura 7.5. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la Px2 de cerebro de rana comparada contra la Px2 de distintas especies.	41
Figura 7.6. Ensayo por RT-PCR de Px2 en los distintos tejidos y células de <i>X. laevis</i>	42
Figura 7.7. Ensayo por RT-PCR de la proteína ribosomal S5 del folículo de <i>X. laevis</i>	43
Figura 7.8. Ensayo por RT-PCR de Cx38 del folículo de <i>X. laevis</i>	44
Figura 7.9. Ensayo por RT-PCR del receptor P2Y8 del folículo <i>X. laevis</i>	44

Figura 7.10. Trazo y estadística de la respuesta I_C generada en los folículos en respuesta a una solución de Ringer sin calcio y el efecto de bloquear la expresión de Cx38 y Px1.	47
Figura 7.11. Trazo y estadística de la respuesta I_C generada en ovocitos desfolículos en respuesta a una solución de Ringer sin calcio y el efecto de bloquear la expresión de Cx38 y Px1.	49
Figura 7.12. Trazo y estadística de la respuesta $I_{K,AMPc}$ generada en los folículos en respuesta a adenosina y el efecto de bloquear la expresión de Cx38 y Px1.	52
Figura 7.13. Trazo y estadística de la respuesta F_{Cl} generada en los folículos en respuesta a ATP y el efecto de bloquear la expresión de Cx38 y Px1.....	53
Figura 7.14. Trazo y estadística de la respuesta F_{Cl} generada en los folículos en respuesta a acetilcolina y el efecto de bloquear la expresión de Cx38 y Px1.....	55
Figura 7.15. Trazo y estadística de la respuesta $I_{Cl(Ca)}$ generada en los folículos en respuesta a angiotensina II y el efecto de bloquear la expresión de Cx38 y Px1.	57

ABREVIATURAS

AII: Angiotensina II

AC: Adenilato Ciclasa

ACh: Acetilcolina

aCx38: Oligonucleótido Antisentido de Cx38

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico Complementario

ADO: Adenosina

AMPc: Monofosfato de Adenosina Cíclico

aPx1: Oligonucleótido Antisentido de Px1

ARNi: Ácido Ribonucleico de Interferencia

ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero

ARN_T: Ácido Ribonucleico Total

ATP: Trifosfato de Adenosina

BM: Medio modificado de Barth

BMP-6, BMP-15: Proteína Morfogenética del Hueso 6 y 15

BN: Medio Normal de Barth

CBX: Carbenoxolona

CC: Células del Cúmulo

c.f.: Células Foliculares

CG: Células de la Granulosa

CGP: Células Germinales Primitivas

CS: Células Somáticas

CT: Células de la Teca

c.t.: Ovocito Tratado con Colagenasa

CTE: Células de la Teca Externa

CTI: Células de la Teca Interna

Cx: Conexina

Cx38: Conexina 38

dNTP's: Deoxinucleótidos Trifosfatados

e.t.r.: Folículo sin Epitelio y sin Teca

F_{Cl}: Corriente de cloro transitoria

FFA: Ácido Flufenámico

FSH: Hormona Folículo Estimulante

G: Proteína G
GDF-9: Factor de Diferenciación del Crecimiento-9
GV: Vesícula Germinal
GVB: Rompimiento de la Vesícula Germinal
 I_c : Corriente iónica originada en la membrana del ovocito
 $I_{Cl(Ca)}$: Corriente de cloro dependiente de calcio
 $I_{K,AMPc}$: Corriente de potasio mediada por AMPc
INX: Inexinas
 IP_3 : Inositol- 1, 4, 5- trifosfato
LB: Lámina Basal
LH: Hormona Luteinizante
MII: Metafase de la segunda división meiótica
MAPK: Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos
NA: Noradrenalina
OO: Ovocito
P2Y: Receptor purinérgico metabotrópico
PGE: Prostaglandinas
PKA: Proteína Cinasa A
PLC: Fosfolipasa C
Px: Panexina
Px1: Panexina 1
Px2: Panexina 2
Px3: Panexina 3
RN: Solución Normal de Ringer
RT-PCR: Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa
 $RzCa^{++}$: Ringer Cero Calcio
SBF: Suero Bovino Fetal
sP2X5: Secuencia sentido de un receptor purinérgico ionotrópico
TR: Transcriptasa Reversa (-RT es un control de PCR sin TR)
UC: Unión Comunicante
VS: Vasos Sanguíneos
w.f.: Folículo Completo
ZP: Zona Pelúcida
38X: Secuencia modificada al azar del aCx38

I. INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo folicular de mamíferos, se ven implicados una serie de eventos fisiológicos por medio de los cuales los folículos primordiales que resultan de la diferenciación de las células germinales, sufren transformaciones hasta alcanzar el estado de madurez suficiente para que se lleve a cabo la ovulación de un ovocito (**Figura 1.1**) (Baird & Mitchell, 2002). El desarrollo del folículo ovárico involucra el reclutamiento de los folículos primordiales, el continuo crecimiento del folículo, la maduración meiótica, la selección de un folículo, la ovulación y finalmente la luteinización (Vanderhyden, 2002).

Durante la vida fetal se comienza la diferenciación de las células destinadas a formar el folículo ovárico. Las células germinales primitivas (CGP) provenientes del epiblasto extraembrionario migran hacia la cresta genital donde proliferan para formar ovogonias las cuales inician la meiosis (ovocito primario) y comienzan a organizar a las células somáticas vecinas derivadas de células epiteliales que más adelante darán origen a células de tipo escamoso (pregranulosa). Esta única capa de células aplanadas junto con el ovocito constituyen un folículo primordial o primario que serán reclutados a lo largo de toda la vida reproductiva del organismo. Posterior al nacimiento, los folículos primarios son arrestados en la profase de la primera división meiótica que se caracteriza por presentar intacta la membrana del núcleo conocido como vesícula germinal (GV) y más tarde, ya en el ovario adulto la meiosis reiniciará unas horas antes de la ovulación dándose el rompimiento de la vesícula germinal (GVB) (Baird & Mitchell, 2002; Vanderhyden, 2002; Velázquez & Mendieta, 2005). El desarrollo del folículo está caracterizado morfológicamente por un incremento en el diámetro del ovocito y una proliferación sincrónica de las células de la granulosa que rodean completamente a cada ovocito (Vanderhyden, 2002).

Hacia el final de esta etapa, el ovocito inicia la síntesis de las glucoproteínas que formarán la zona pelúcida. Las células cuboidales de la granulosa (CG) y el ovocito (OO) inician el desarrollo de extensiones citoplásmicas que atraviesan la zona pelúcida para mantener una

comunicación intercelular a través de uniones de tipo *gap*; además, se inicia una regulación continua de tipo parácrina que involucra productos, tanto del ovocito como de las CG, que son secretados hacia el espacio intercelular (Velázquez & Mendieta, 2005).

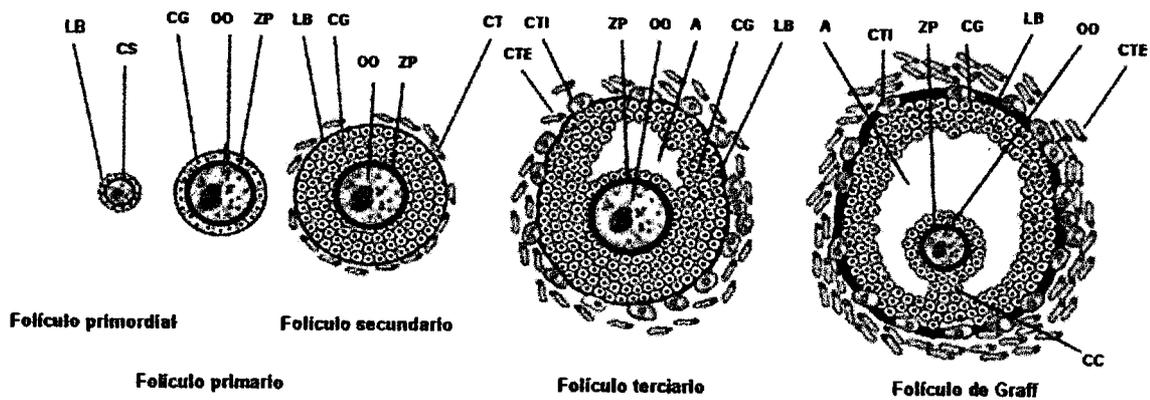


Figura 1.1. Etapas del desarrollo del folículo ovárico en mamíferos. El folículo primordial está compuesto por una única capa de células somáticas (CS) rodeadas de la lámina basal (LB). El folículo primario representa el crecimiento del ovocito que segrega una capa de glucoproteínas llamada zona pelúcida (ZP) que separa al ovocito (OO) de las células de la granulosa (CG). El folículo secundario marca la etapa final del crecimiento del ovocito (120 μm) y la diferenciación de las células de la teca (CT). El folículo terciario se caracteriza por la formación del antro (A) y la proliferación de las células de la teca interna (CTI) y externa (CTE). La maduración del folículo De Graff es promovido por las gonadotropinas y en esta fase el ovocito se encuentra rodeado de las células del cúmulo (CC) (Modificado de Bulun et al., 2009).

Durante la transición a folículo secundario las CG proliferan hasta completar de 2 a 3 capas que rodean el ovocito, además se inicia la diferenciación de las células estromáticas próximas a la lámina basal, para dar origen a las células de la teca (CT) que serán capaces de responder a la LH (hormona luteinizante) y producir andrógenos utilizados por las CG mediante la acción de la aromatasa para sintetizar estradiol ya en la fase antral. En estas etapas tempranas del desarrollo folicular las gonadotropinas parecen no estar

implicadas, por el contrario, se encuentran diversos factores paracrinos locales provenientes de folículos adyacentes en diferentes etapas del desarrollo, que interactúan con la FSH (hormona folículo estimulante) y la LH modificando su acción, para influenciar el crecimiento y el desarrollo de los folículos preantrales (Baird & Mitchell, 2002; Sánchez-Criado, 2005; Velázquez & Mendieta, 2005) cuya población homogénea de CG va ir adquiriendo receptores para la FSH y esteroides desde este momento (Vanderhyden, 2002).

La capa de CG que rodea directamente al ovocito comienza a diferenciarse en las células del cúmulo y las capas más alejadas darán origen a las células murales, las cuales adquieren diferentes funciones. En presencia de la FSH que induce la biosíntesis de estrógenos, se da la formación del antrum determinando la fase de folículos terciarios o antrales, que implica la maduración meiótica es decir, la reanudación de la meiosis la cual será detenida nuevamente en la metafase de la segunda división meiótica (MII) hasta la fertilización. Durante las siguientes etapas, el crecimiento de los folículos seleccionados depende de la acción combinada de las gonadotropinas (LH y FSH) y de los esteroides ováricos (andrógenos y estrógenos) sobre las CT y las CG, cuya síntesis es influenciada también por las gonadotropinas. La LH induce la maduración meiótica y la expansión del cumulus necesaria para la extrusión del complejo ovocito-células del cumulus y la fertilización. Los folículos considerados dominantes (folículos preovulatorios o de Graaf) lograrán terminar su desarrollo y el pico preovulatorio de la LH iniciará la rediferenciación de las CG y de las CT hacia células lúteas, la cual se completará una vez que se haya liberado el ovocito del folículo al término del ciclo ovárico. Los folículos influenciados por una baja señal de FSH, no llegan a terminar su desarrollo por lo que degenerarán, convirtiéndose en atrésicos (Baird & Mitchell, 2002; Vanderhyden, 2002; Sánchez-Criado, 2005; Velázquez & Mendieta, 2005).

Una vez llevada a cabo la ovulación, la LH estimula la luteinización de los folículos postovulatorios originando la formación de un cuerpo lúteo o cuerpo amarillo, considerado como la etapa final del desarrollo folicular (Baird & Mitchell, 2002; Velázquez & Mendieta, 2005).

Desarrollo folicular en anfibios

Las etapas fundamentales que ocurren durante el desarrollo folicular son similares en la mayoría de las especies y en la rana *Xenopus laevis* se requieren ocho meses para que se lleven a cabo, siendo distinguibles seis fases caracterizadas por la morfología del ovocito. En la rana la maduración del ovocito es un proceso asincrónico continuo lo cual quiere decir, que todas las etapas de crecimiento pueden ser encontradas en el ovario de un individuo adulto a un tiempo determinado (Dumont, 1972).

Las ovogonias en el ovario de la rana continúan dividiéndose durante toda la vida del organismo y se transforman en ovocitos una vez terminada su última división mitótica (Wyndham, 2006). En la etapa previtelogénica (I) el ovocito se encuentra rodeado de varias capas celulares y acelulares, siendo la más externa el epitelio ovárico debajo del cual se encuentra la teca que consiste en fibras de colágeno, fibroblastos y vasos sanguíneos, después se encuentra una monocapa de células foliculares que comienzan a proyectar unas extensiones citoplasmáticas llamadas macrovellosidades que atravesarán la membrana vitelina formada en la etapa III, y que contactan con el ovocito el cual desarrolla al igual microvellosidades, aumentando el área de contacto con la células foliculares (Dumont, 1972; Arellano et al., 1996).

Durante las etapas vitelogénicas (II-V) se da la formación de la membrana basal formada principalmente por fibras de colágeno que recubren a la monocapa de células foliculares, también comienza la síntesis de pigmento y el ovocito aumenta su tamaño volviéndose además, opaco por la acumulación de gránulos de yema (vitelogénesis), la cual finaliza en la etapa V. En la etapa III, los nutrientes de reserva (vitelo) se empaquetan en plaquetas vitelinas que definen la etapa de diferenciación de los polos animal y vegetal y son necesarias para mantener un adecuado desarrollo embrionario. El vitelo es transportado al ovocito a través de los vasos sanguíneos presentes en la teca interna pero también, la producción de estas sustancias ocurre a nivel de las células foliculares. El ovocito principalmente sintetiza e incorpora lípidos, proteínas y ácido ribonucleico (ARN) y en su citoplasma son evidentes las

vesículas periféricas llamadas gránulos corticales y los gránulos de pigmento (Dumont, 1972; Wyndham, 2006). En la etapa posvitelogénica (VI) el ovocito alcanza un tamaño de 1300 μm , esta etapa se caracteriza por la aparición de una banda ecuatorial sin pigmento (Dumont, 1972). Al igual que en otros vertebrados, los ovocitos de *Xenopus laevis* son arrestados en la profase de la primera división meiótica (Baulieu & Schorderet-Slatkine, 1983), y serán madurados por la progesterona que es producida por las 5000 células foliculares que lo rodean, luego de ser estimuladas con gonadotropinas (Baulieu & Schorderet-Slatkine, 1983; Miledi & Woodward, 1989 a).

De manera paracrina, la cascada de eventos celulares promovidos por la progesterona parece iniciar en la membrana del ovocito donde se da la inhibición de la adenilato ciclasa para finalmente inducir el reinicio de la meiosis. Compuestos como el cortisol, la testosterona y factores de crecimiento también pueden ser inductores de la meiosis *in vitro* o *in vivo* (Baulieu & Schorderet-Slatkine, 1983).

Durante el proceso de maduración del folículo ovárico, el potencial de membrana se despolariza drásticamente (Kusano et al., 1982) y un incremento en la concentración intracelular de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} en ovocitos en la etapa VI, parece promover la reanudación de la meiosis (Baltus et al., 1977). Estas alteraciones electro-químicas que implican una adecuada comunicación entre el ovocito y las células foliculares, parecen ser dirigidas por canales no selectivos presentes en ambas células y que permean iones, metabolitos y moléculas mensajeras (Shestopalov & Panchin, 2007) determinando así, un acoplamiento eléctrico y metabólico que promueve el desarrollo del folículo ovárico.

Interacción entre las células de la granulosa y el ovocito durante el desarrollo folicular

A través de las diferentes etapas del desarrollo folicular es imprescindible el establecimiento de una comunicación bidireccional entre las células somáticas y las ovogonias, ésta comunicación esta fuertemente

influenciada por factores de crecimiento y hormonas generadas por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

Los factores producidos por el ovocito (e.g.: GDF-9, BMP-15, BMP-6) actúan de manera paracrina sobre las células vecinas para organizar al folículo desde etapas tempranas del desarrollo sin embargo, no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de estos factores que dirigen la formación folicular. Se sabe que en los folículos preantrales, la diferenciación de las CG en células del cumulus solo se logra en presencia del ovocito y que los factores derivados del ovocito son supresores de la luteinización de las células de la granulosa, ya que los folículos De Graaf se transforman espontáneamente en un cuerpo lúteo al remover los ovocitos (Eppig et al., 2004).

Los mecanismos precisos por medio de los cuales tanto el ovocito como las células de la granulosa determinan el grado de desarrollo folicular son desconocidos, pero se sabe que el ovocito es el responsable del tiempo de desarrollo, además determina la proliferación y diferenciación de las CG, la expansión de las células de cumulus, la producción de hormonas esteroideas y la organización folicular, mientras que las células de la granulosa que rodean al ovocito, regulan la maduración meiótica, el arresto meiótico, el crecimiento del ovocito y proveen de sustratos metabólicos (Eppig et al., 2002; Vanderhyden, 2002). También, las células de la granulosa modulan tanto la actividad transcripcional como la expresión de proteínas en el ovocito en respuesta a interacciones paracrinas y endocrinas (Vanderhyden, 2002; Eppig et al., 2004).

Comunicación intercelular en el folículo ovárico

Además de la comunicación paracrina, el desarrollo folicular depende de la comunicación intercelular a través de uniones comunicantes (UC's).

Las primeras evidencias de la presencia de UC's en el folículo ovárico de mamífero, fueron mostradas por Bjorkman (1962) y por Albertini y Anderson (1974), quienes describieron la estructura de conexiones intercelulares ampliamente distribuidas entre las CG de rata y de conejo (Larsen et al., 1991).

Más tarde, surgieron diversos estudios que apoyaban la idea de que la comunicación intercelular establecida a través de UC's desempeñaba un papel muy importante en la coordinación de la actividad celular dentro del folículo ovárico (Vanderhyden, 2002), permitiendo a las CG proveer de componentes esenciales al ovocito durante su crecimiento.

La cooperación metabólica entre el ovocito y las células del cumulus es evidente cuando la estimulación con gonadotropinas incrementa el uso de la glucosa que es metabolizada por las células del cumulus en piruvato o ATP (trifosfato de adenosina), productos utilizados por el ovocito y que son transferidos a través de las UC's a éste (Eppig et al., 2004). Recientemente, en mamíferos ha sido demostrada de forma directa el acoplamiento eléctrico entre el ovocito y las células del cumulus que lo rodean; en estos estudios se mostró además que respuestas eléctricas generadas por transmisores químicos en las células somáticas son transmitidas al ovocito a través de las UC's (Arellano et al., 2002).

Las UC's no solo permiten la difusión de iones y sustratos metabólicos, además, median las señales involucradas tanto en el mantenimiento del arresto meiótico del ovocito como en la reanudación de la meiosis inducida por la LH y que se manifiesta por la GVB (Vanderhyden, 2002). La meiosis es un proceso discontinuo que ocurre exclusivamente en las células germinales y comienza desde el desarrollo fetal deteniéndose alrededor del nacimiento en la profase de la primera división meiótica y continuando hasta la vida adulta, donde nuevamente es detenido en la metafase de la segunda división meiótica y va a depender de la fertilización para completarse. La división reduce el número de cromosomas de un número diploide ($2n$) a uno haploide (n) en mamíferos y marca la transición de ovogonias que se dividen por mitosis, a ovocitos que comienzan la meiosis (Eppig et al., 2004; Edry et al., 2006).

Los ovocitos aislados de folículos antrales de mamíferos maduran espontáneamente en ausencia de la LH (Eppig et al., 2004). Las primeras observaciones al respecto fueron hechas por Pincus y Enzman en 1935, quienes sugirieron que el folículo ovárico proveía un ambiente inhibitorio que

mantenía al ovocito en arresto meiótico (Edry et al., 2006). Mas adelante se llegó a la conclusión que el acoplamiento metabólico del complejo células de la granulosa-ovocito era el responsable del arresto y que los ovocitos maduraban espontáneamente debido a la interrupción de la comunicación intercelular con las células de la granulosa mediada por las UC's (Eppig et al., 2004). El AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) producido por las células de la granulosa difunde al ovocito a través de las UC's para mantener al ovocito en arresto meiótico y mediante el surgimiento de la LH se da la activación de las MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos) que fosforilan a las proteínas encargadas de formar los canales intercelulares y con ello se interrumpe la comunicación mediada por UC's por lo que el nivel de AMPc dentro del ovocito disminuye y a falta de esta señal la meiosis reinicia hasta MII. Además de esta respuesta inmediata, se encuentran procesos de regulación a nivel transcripcional y traduccional que inhiben la expresión de las proteínas que forman las UC's para la reanudación de la meiosis (Granot and Dekel, 1994; Kalma et al., 2004).

Comunicación en el complejo celular ovocito-células foliculares mediada por uniones comunicantes: Las conexinas

Las interacciones celulares que ocurren a nivel del ovocito y de las células foliculares en el folículo se mantienen durante todo el proceso de ovogénesis para asegurar un adecuado desarrollo del gameto.

A través de las macro y microvellosidades desarrolladas en las células foliculares y en el ovocito respectivamente, se establecen puntos de contacto desde etapas tempranas de la maduración folicular que continúan hasta etapas tardías. De este modo, se mantiene una comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes que es la responsable de que el complejo celular formado por el ovocito y las células foliculares, esté acoplado eléctrica y metabólicamente (Browne & Werner, 1984).

Las primeras observaciones que proponían la existencia de ciertas estructuras que mediaban la comunicación entre las células fueron realizadas

por Engelmann (1877) quien con base en sus estudios electrofisiológicos e histológicos observó que “las células cardiacas se encontraban en contacto directo unas con otras durante su vida pero se volvían independientes en la medida en que éstas morían y el rescate de las células sanas dependía de las barreras iónicas que se establecían en sus límites”. Weidmann (1952) en este contexto, observó en el músculo cardiaco de mamífero la propagación de una corriente eléctrica a través de una “vía de baja resistencia”. Lo que sugirió que las fibras de Purkinje que estudiaba, no se encontraban subdivididas por barreras iónicas como se creía y que los iones intracelulares se movían libremente bajo la influencia de un campo eléctrico (Weidmann, 1952). Una evidencia que sostenía la existencia de tal vía, fue el descubrimiento de la transmisión eléctrica en las sinapsis motoras gigantes del acocil (Furshpan & Potter, 1959).

Robertson (1963) realizó observaciones importantes de estructuras que presentaban un arreglo hexagonal en el cerebro de pez, las cuales se repetían cada 95 Å y contenían un centro cuyo diámetro era menor a 25 Å (Robertson, 1963). Fue hasta 1964 cuando a través de estudios de microscopía electrónica, Barr y colaboradores propusieron el término de “nexus” para nombrar a estas estructuras hexagonales, las cuales eran “regiones entre las células del músculo cardiaco de rana donde las membranas celulares opuestas se encontraban fusionadas”. Al parecer los “nexus” eran sitios de acoplamiento eléctrico entre células adyacentes favorecidos por una vía de baja resistencia que permitía un flujo de corriente apreciable entre el interior de las células. (Barr et al., 1965). Regiones similares fueron encontradas en la sinapsis eléctrica entre neuronas y células gliales (Kensler et al., 1977). Revel y Karnovsky (1967) observaron también subunidades empaquetadas hexagonalmente en hígado y corazón de ratón, introduciendo el término de “uniones intercelulares” (Revel & Karnovsky, 1967).

Las UC's están formadas por canales de membrana intercelulares que conectan directamente los compartimentos citoplasmáticos de células vecinas (**Figura 1.2**) permitiendo un intercambio rápido de iones, aminoácidos y metabolitos incluyendo segundos mensajeros como el ión calcio, el IP₃,

nucleótidos cíclicos y otras sustancias con tamaños de hasta 1 kD. La identidad molecular de las uniones intercelulares fue determinada en hepatocitos de ratón por Goodenough (1974) quien propuso llamar a estas proteínas "conexinas" (Cx) (Goodenough, 1974). Mas tarde, las secuencias de estas proteínas fueron analizadas en hígado de mamífero (Paul, 1986) y hasta ahora se han identificado en el genoma humano 21 genes que codifican para conexinas y 20 genes en el genoma de ratón (Tong et al., 2007).

Las Cx representan una familia de proteínas transmembranales altamente conservadas en vertebrados, capaces de formar canales o conexiones cada uno de los cuales está formado por seis subunidades de conexina (Shestopalov & Panchin, 2007). La estructura topológica de las Cx contiene cuatro dominios transmembranales, dos dominios extracelulares y un amino terminal intracelular altamente conservados entre las distintas isoformas. Además, presentan un carboxilo terminal y un dominio intracelular que determinan diferencias funcionales entre los distintos subtipos de conexinas. Esta estructura resulta fundamental en la formación del complejo hexamérico. Un *canal intercelular* completo es formado con la contribución de un conexón de cada célula acoplada, su estabilidad depende de seis residuos de cisteína presentes en los dominios extracelulares de cada canal (**Figura 1.2**). Los dominios intracelulares de cada conexón, principalmente el carboxilo terminal, son sitios de interacción con otras proteínas que modulan la vida media de las conexinas, su actividad y función. Los canales intercelulares, en números de decenas a miles, se agregan en la membrana celular para conformar una placa que es llamada la UC (Sáez et al., 2003).

La mayoría de las células de organismos multicelulares, a excepción de eritrocitos, espermatozoides y miocitos del músculo esquelético, se comunican mediante UC's para regular varios procesos fisiológicos como crecimiento, diferenciación, desarrollo y muerte celular (Sáez et al., 2003). Cada tipo de conexina muestra un patrón de expresión específico en las células o tejidos y la mayoría de los órganos y células expresan más de un subtipo diferente de ésta proteína (Gershon et al., 2008).

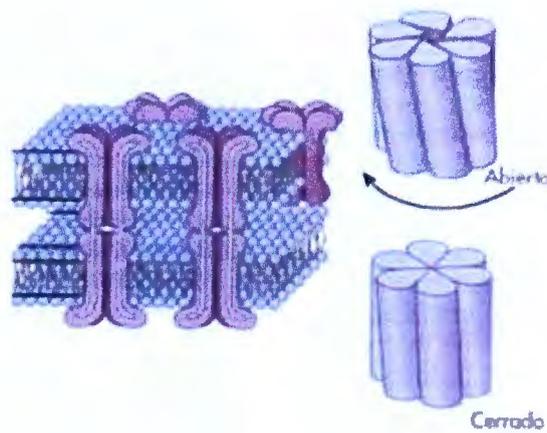


Figura 1.2. Canales que forman placas de unión en la membrana de células adyacentes. Los canales están formados por subunidades de conexina, que forman una estructura hexamérica llamada conexón el cual se ensambla con otro para conformar una UC (Modificado de Makowski et al., 2006).

Los mecanismos de regulación de los canales intercelulares incluyen modificaciones post-traduccionales como la fosforilación que modula la cinética del tráfico intracelular y su apertura, la internalización del canal, los procesos de degradación (Qin et al., 2003) y síntesis, el recambio de proteínas y también su sensibilidad a otros factores moduladores y la interacción de distintas subunidades de conexinas (**Figura 1.3**). Los conexones pueden ser formados a partir de la interacción de diferentes conexinas (canales heteroméricos) o conexinas del mismo tipo (canales homoméricos); y estos a su vez pueden formar canales intercelulares a través de conexones diferentes (canales heterotípicos) o iguales (homotípicos). Estas últimas características proveen una modulación funcional adicional, ya que modifican las propiedades de permeabilidad, conductancia del canal (Cottrell & Burt, 2001) y de apertura como por ejemplo, la sensibilidad al cambio de voltaje (Barrio et al., 1991). En algunos casos la fosforilación de ciertos residuos puede potenciar la conductancia del canal y cuando ésta se da en otros residuos puede inhibir la comunicación intercelular (Dekel et al., 1981; Procida et al., 2009).

El carboxilo terminal contiene la secuencia de aminoácidos precisa que permite el reconocimiento de las subunidades de conexinas para el

ensamblaje. La oligomerización de conexinas es un proceso que ocurre secuencialmente a través de todo el transporte de la proteína.

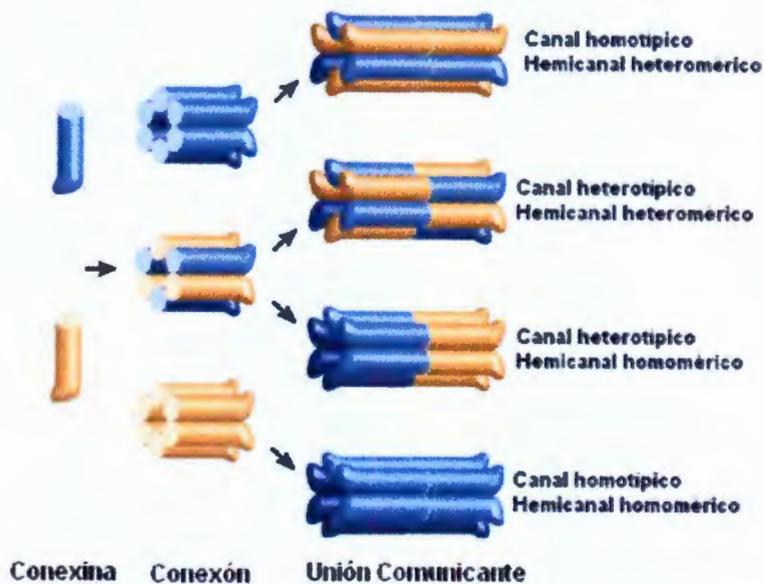


Figura 1.3. Los conexones se alinean en la membrana celular para completar la formación de canales intercelulares o de tipo “gap”. Diferentes conexinas pueden interactuar unas con otras para formar canales homotípicos o heterotípicos y conexones homoméricos o heteroméricos (Modificado de Mese et al., 2007).

Debido a que la vida media de las conexinas es corta, no excediendo de 1 a 3 horas (Sáez et al., 2003), la síntesis y la liberación de nuevas conexinas en la membrana se llevan a cabo de manera simultánea junto con la internalización y la degradación de conexinas. Los mecanismos involucrados en la internalización de estas proteínas se dan a través de la formación de uniones anulares, estructuras vesiculares de doble membrana, que junto con las UC's forman un complejo (Jordan et al., 2001) que comienza a desensamblar al conexón o a la UC, en conexinas individuales las cuales, serán degradadas mediante la activación de dos vías, la proteólisis lisosomal que ocurre antes de la formación de UC's funcionales o la proteólisis proteosomal (Qin et al., 2003).

Los estados de apertura y cierre del canal dependen de factores como la concentración de calcio y el pH, así como del grado de fosforilación de las

proteínas (Arellano et al., 1990). Los sitios que responden a los cambios de pH se encuentran en el dominio intracelular y el carboxilo terminal, regiones que muestran bajo grado de homología entre las diferentes conexinas. De aquí, que la composición de conexones de las UC's sea un factor determinante en la respuesta a los cambios de pH (Hirst-Jensen et al., 2007). Por ejemplo, en las UC's del axón gigante de acocil, la fosforilación y la disminución del pH de manera independiente no producen cambios significativos sobre la conductancia de unión mientras que, en presencia de calcio pueden modular el efecto de este ión sobre el cierre de las UC's probablemente por el aumento de afinidad del Ca^{++} al canal, cuya unión produce un desacople eléctrico (Arellano et al., 1986,1990). Dentro de las funciones que desempeñan las conexinas se encuentran: la sincronización de la contracción del músculo cardíaco, la diferenciación y proliferación celular durante la vida embrionaria y adulta, la propagación de las ondas de calcio durante los procesos de muerte celular, el rescate de las células con daño mediante el paso de sustancias como ATP, glucosa, ácido ascórbico y mediante la inhibición del paso de agentes citotóxicos como el óxido nítrico (Sáez et al., 2003).

Las inexinas y las panexinas, dos familias de proteínas que también forman UC's

Además de las conexinas, en invertebrados se ha identificado otra familia de proteínas con la misma función. El análisis de las secuencias génicas, junto con el estudio de la topología y de las propiedades funcionales de ciertas proteínas presentes en *Caenorhabditis elegans* (Bossinger & Schierenberg, 1992) y *Drosophila melanogaster* (Curtin et al., 1999), ha revelado la existencia de las inexinas (INX) (Figura 1.4), proteínas que en la evolución surgieron en un período más temprano que las conexinas (de Boer & van der Heyden, 2005).

Empleando como base las secuencia de las inexinas, se hizo un análisis en la base de datos de humanos, pollo y ratón y se identificaron secuencias con un nivel importante de identidad. Apoyándose en estas evidencias, se propuso el término "panexinas" (Px) (Figura 1.4) para nombrar a

estas proteínas que estaban ampliamente distribuidas en distintos grupos taxonómicos (Panchin et al., 2000).

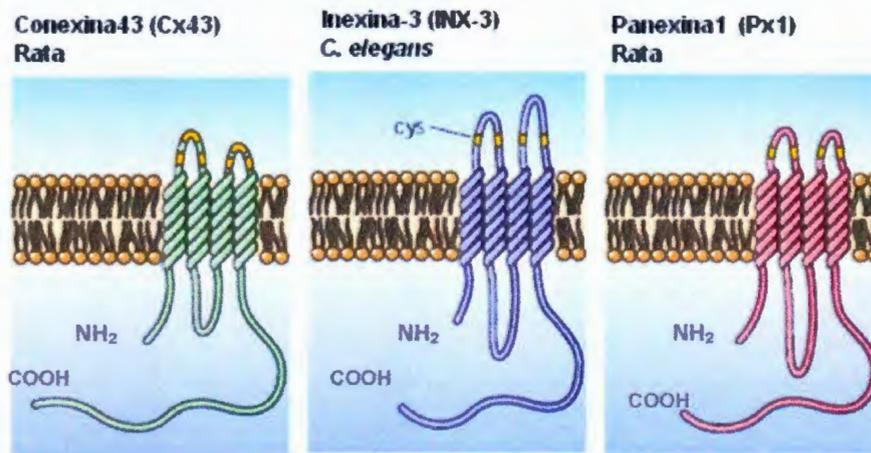


Figura 1.4. Estructura topológica de las tres familias de proteínas que forman uniones comunicantes: conexinas, inexinas y panexinas. Todas comparten los cuatro dominios transmembranales, dos dominios extracelulares (con la presencia de residuos de cisteína conservados) y uno intracelular, además un amino y carboxilo terminal intracelular (Modificado de Barbe et al., 2006).

El alineamiento de diversas secuencias de panexinas, conexinas e inexinas, excluyendo las regiones más divergentes (el carboxilo terminal y el asa citoplasmática), puso en evidencia un nivel bajo de homología entre ellas por lo que se propuso la inclusión de éstas proteínas en tres familias distintas (Panchin et al., 2000; White et al., 2004). Sin embargo, el análisis de su topología muestra que son similares pues cada subunidad está compuesta por cuatro dominios transmembranales, dos dominios extracelulares (que contienen residuos de cisteína en cada dominio), uno intracelular y un amino y carboxilo terminal intracelular (**Figura 1.4**) (Yen & Saier, 2007).

Actualmente se han identificado tres tipos de Px's en el genoma de roedores y de humano (**ver cuadro 1.1**) (Bruzzone et al., 2003; Baranova et al., 2004). El ARNm de la Px1 y de la Px2 (Panchin et al., 2000) se expresa en muchos tejidos, como el ojo, la tiroides, próstata, riñón, hígado y en el sistema nervioso central, donde Px2 muestra una gran distribución (Bruzzone et al.,

2003; Baranova et al., 2004). La expresión de la Px3 se limita casi a la piel donde no se encuentran transcritos de Px1 ni de Px2 (Bruzzone et al., 2003). Se han identificado transcritos de Px3 en hipocampo humano, y de manera particular, en humano, la Px1 presenta un nivel bajo de expresión en cerebro, placenta, timo, próstata e intestino delgado mientras que, presenta un nivel alto de expresión en corazón, gónadas y músculo esquelético. A diferencia de roedores, la expresión de Px2 en humano se restringe al cerebro (Baranova et al., 2004). El patrón de expresión de Px1 y Px2 en cerebro de rata se encuentra regulado de manera inversa a través del desarrollo y maduración de los circuitos neuronales. Px1 muestra un nivel alto de expresión en la vida embrionaria, el cual comienza a decrecer en el organismo adulto, por el contrario se observan bajos niveles de expresión de Px2 en el cerebro de embrión y una abundante expresión durante el desarrollo posnatal (Bruzzone et al., 2003).

Cuadro 1.1. Distribución de la expresión de Px1, Px2 y Px3 en diferentes tejidos de humano y roedores.

Panexina		Expresión	Referencia
Px1	Humano	Cerebro, placenta, timo, próstata, intestino delgado, riñón, corazón, músculo esquelético y gónadas.	Baranova et al., 2004.
	Roedor	Glándula adrenal, vejiga, ojo, médula espinal, cerebro, tiroides, estómago, próstata, intestino delgado, riñón, hígado y pulmón.	Bruzzone et al., 2003.
Px2	Humano	Cerebro adulto.	Baranova et al., 2004.
	Roedor	Ojo, médula espinal, cerebro, tiroides, próstata, testículo, riñón, hígado y corazón.	Bruzzone et al., 2003.
Px3	Humano	Hipocampo.	Baranova et al., 2004.
	Roedor	Piel.	Bruzzone et al., 2003.

A través de la expresión de panexinas exógenas en el ovocito de *Xenopus laevis*, se ha demostrado la formación de canales intercelulares y panexones funcionales tanto en configuraciones homoméricas como heteroméricas (Bruzzone et al., 2003, 2005; Bao et al., 2004). La participación de las panexinas en la formación de uniones comunicantes no ha sido establecida *in vivo* sin embargo, Bruzzone y colaboradores (2003) reportaron la

primera caracterización farmacológica de los canales de panexina mediante registros eléctricos en ovocitos de *X. laevis* aislados o en pareja, demostrando que Px1 era capaz de formar tanto panexones funcionales como canales intercelulares ya sea sola o en combinación con Px2, y que probablemente participaban en una nueva clase de sinapsis eléctrica. En sus estudios Bruzzone y colaboradores, observaron que los canales homoméricos de Px1 de rata podían generar corrientes salientes activadas por voltaje mientras que, los canales intercelulares funcionales de Px1 no mostraban alta sensibilidad al voltaje. En contraste con Px1, cuando se expresa solo a la Px2 o a la Px3 no se forman canales homoméricos funcionales (Bruzzone et al., 2003). Con base en evidencia bioquímica y electrofisiológica se ha propuesto que Px1 interactúa con Px2 para formar panexones heteroméricos caracterizados por la reducción en la amplitud de la corriente y por modificaciones en la cinética de apertura al voltaje con respecto a los panexones homoméricos conformados por Px1 (Bruzzone et al., 2003, 2005). La existencia de canales homoméricos y heteroméricos de panexina y las diferencias en la cinética de sus corrientes sugiere que ambos canales desempeñan funciones diferentes y algunos han propuesto también que Px2 actúa como un modulador de los canales de Px1. A diferencia de los canales compuestos por Cx's, la apertura de los canales de Px's es totalmente insensible a cualquier concentración del calcio extracelular. Por otro lado, los canales de panexinas son altamente sensibles a ciertos bloqueadores de canales y UC's formadas por conexinas como la carbenoxolona (CBX 5 μ M) y moderadamente al ácido flufenámico (FFA 300 μ M, que reduce 40% de la corriente) el cual es un bloqueador inespecífico de canales de cloro. Al parecer el mecanismo de acción de estos dos fármacos es distinto, la CBX inhibe tanto la amplitud de la corriente y la cinética de cierre del canal, mientras que el FFA solamente decrece el pico de la corriente (Bruzzone et al., 2005). Hasta ahora la falta de conocimiento de bloqueadores específicos para canales de panexina ha dificultado el estudio de la farmacología y de la cinética del canal, lo cual ha conducido al empleo de ARN_i y secuencias antisentido para inhibir selectivamente la expresión de la proteína.

Por otro lado, la coexpresión de panexina y receptores purinérgicos P2Y1 y P2Y2 ha demostrado que el ATP es capaz de activar los canales

constituidos por panexinas como consecuencia de un incremento en los niveles de calcio intracelular (Dahl & Locovei, 2006). En este contexto, varios estudios han propuesto un modelo que explica la propagación de ondas de calcio (Venance et al., 1997), una forma de señalización intercelular observada en diferentes órganos, incluido el cerebro, que es inducida por una estimulación mecánica, donde los canales de panexina podrían constituir el canal más adecuado para la liberación de ATP (Stout et al., 2002; Bao et al., 2004). En este modelo se propone que los receptores purinérgicos metabotrópicos (P2Y) al ser activados por ATP conducirían a la síntesis del IP_3 y con ello la liberación de calcio de los reservorios intracelulares. El incremento de calcio intracelular, a través de un mecanismo poco estudiado, activaría a los canales de panexina permitiendo la liberación de ATP al medio extracelular y la difusión del calcio vía UC's, propagándose de este modo una señal a las células vecinas en forma de onda. Por lo tanto, este modelo sugiere que los canales de panexina podrían estar desempeñando un papel importante en la homeostasis intercelular del calcio (Bao et al., 2004; Locovei et al., 2006). Una evidencia más a favor de la participación de panexones en la onda de propagación del calcio es que bloqueadores de panexinas como CBX y FFA pueden abolirla completamente. Por estas características y debido a su sensibilidad de apertura ante una elevación de calcio dentro de la célula, por estrés mecánico, potencial de membrana positivo y ATP extracelular, se ha sugerido que posiblemente las panexinas funcionen principalmente como panexones en la membrana celular, además de su función en la formación de UC's (Bruzzone et al., 2005; Dahl & Locovei, 2006; Locovei et al., 2006; Pelegrin & Surprenant, 2006).

Respuestas eléctricas generadas en el folículo ovárico de *Xenopus laevis*

El folículo ovárico de rana en las etapas IV y VI mantiene un nivel constante y alto de acoplamiento entre el ovocito y las celulares foliculares que lo rodean. Esta propiedad permite monitorear corrientes iónicas generadas en las células foliculares a través del empleo de microelectodos implantados en el ovocito. Estas corrientes de membrana son provocados al estimular el folículo

con diferentes hormonas y neurotransmisores que activan canales y receptores nativos presentes en las células foliculares o en el ovocito.

Entre las sustancias a las que responden los folículos se encuentran, los agonistas colinérgicos (Arellano & Miledi 1993), catecolaminérgicos (Kusano et al., 1982), agonistas purinérgicos (Arellano et al., 1998), gonadotropinas, péptido intestinal vasoactivo y prostaglandinas (Miledi & Woodward, 1989 *b*; Arellano & Miledi, 1993). Los agonistas mencionados anteriormente actúan sobre poblaciones diferentes de receptores específicos expresados en la membrana de las células foliculares que se acoplan a canales iónicos a través de diferentes vías de segundos mensajeros. Por ejemplo, la activación de la enzima adenilato ciclasa (AC) provoca un aumento en la síntesis de AMPc el cual a través de mecanismos intracelulares, genera corrientes de potasio (Arellano & Miledi, 1993). Por otra parte, la acetilcolina (ACh) y la angiotensina II (AII) actúan sobre receptores presentes en el ovocito o en células foliculares, que al ser estimulados activan la vía del IP₃ para generar corrientes oscilatorias de cloro que dependen de un aumento de la concentración del Ca⁺⁺ intracelular (**Figura 1.5**) (Kusano et al., 1982; Lacy et al., 1989; Sandberg et al., 1990; Woodward & Miledi, 1991).

Podemos de este modo dividir las respuestas foliculares en corrientes que dependen de la presencia de las células foliculares y corrientes que se generan por completo en el ovocito (**Figura 1.6**), aunque debemos aclarar que algunos agonistas como la ACh pueden llegar a tener receptores en ambas membranas sin embargo, debido a las respuestas que genera se puede distinguir de su origen (Arellano & Miledi, 1993; Arellano et al., 1996, 1998). A continuación se describen las características de algunas corrientes foliculares descritas en *Xenopus laevis*.

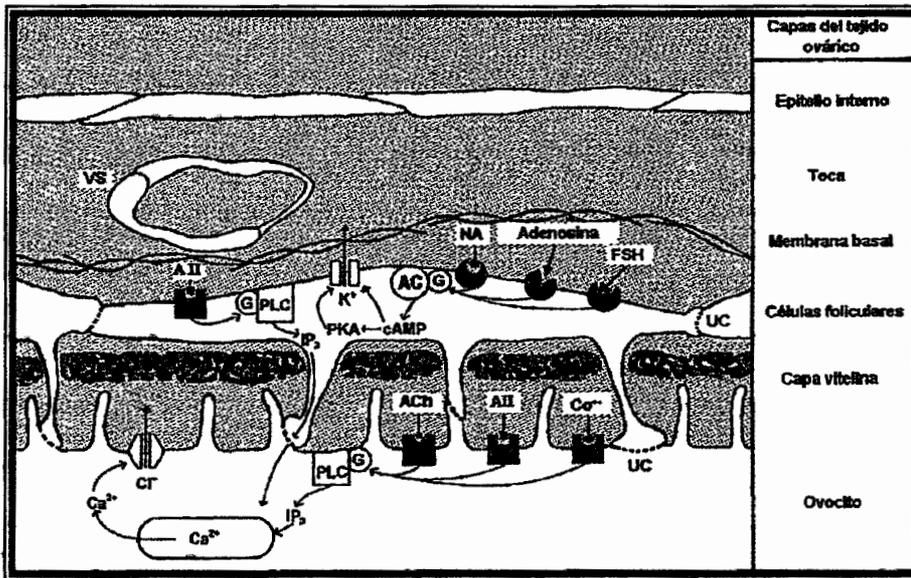


Figura 1.5. Diagrama que representa las capas que conforman al folículo ovárico de *Xenopus laevis*. Las uniones comunicantes (UC) permiten el establecimiento del acoplamiento metabólico y eléctrico entre las células foliculares y el ovocito. Se muestra también algunos de los receptores membranales, canales iónicos y las vías que activan al ser estimulados. VS: vasos sanguíneos; AII: angiotensina II; G: proteína G; PLC: fosfolipasa C; IP₃: inositol 1, 4, 5- trifosfato; PKA: proteína cinasa A; AC: adenilato ciclasa; AMPc: monofosfato de adenosina cíclico; NA: noradrenalina; FSH: hormona folículo estimulante y ACh: acetilcolina (Modificada de Arellano et al., 1996).

Corrientes que requieren la presencia de las células foliculares

Corriente de potasio mediada por AMPc ($I_{K,AMPc}$)

La corriente de potasio mediada por AMPc ha sido ampliamente estudiada y fue descrita en un inicio por Kusano y colaboradores (1977) por su activación a través de neurotransmisores como la adrenalina, la dopamina y la serotonina. Otras sustancias que generan esta respuesta folicular son la adenosina, las gonadotropinas (LH y FSH), prostaglandinas, el péptido intestinal vasoactivo, la oxitocina, entre otras (Miledi & Woodward, 1989 *b*; Greenfield et al., 1990a, *b*; Arellano et al., 1996). Todos estos agonistas activan

a la AC promoviendo así la síntesis de AMPc y la activación de la PKA, para generar una corriente saliente hiperpolarizante de potasio (Kusano et al., 1982).

En varios estudios se ha observado que la acumulación de AMPc y las corrientes de potasio son eliminadas al remover la capa de células foliculares que rodea al ovocito, lo que sugiere que los receptores que intervienen en la generación de la corriente $I_{K,AMPc}$ se localizan exclusivamente en las células foliculares y que posiblemente la corriente de potasio en estas células se transmite al ovocito a través de uniones de tipo gap (Miledi & Woodward, 1989 a, b; Greenfield et al., 1990b).

Esta respuesta hiperpolarizante de larga latencia, asociada a un incremento en la conductancia de la membrana, se desensibiliza con la aplicación prolongada del agonista y puede reducirse significativamente por la aplicación externa de bloqueadores inespecíficos de canales de potasio como el Ba^{2+} y TEA^+ . Por otro lado, agentes activadores de la AC pueden mimetizar la corriente de potasio y los inhibidores de fosfodiesterasas son capaces de potenciar la respuesta (Arellano et al., 1996).

Existe una posible participación de la activación de los canales de potasio durante el proceso de maduración del ovocito puesto que, sustancias que abren este tipo de canales y que mimetizan algunos aspectos de las corrientes de $I_{K,AMPc}$, incrementan el porcentaje de rompimiento de la vesícula germinal en ovocitos tratados con progesterona o gonadotropinas (Wibrand et al., 1992).

Corriente de cloro transitoria (F_{Cl})

La respuesta folicular inducida por la aplicación de acetilcolina (ACh) consiste en una corriente que presenta varios componentes, algunos de los cuales son eliminados al remover la capa de células foliculares, tal es el caso de la corriente transitoria de cloro con corta latencia o F_{Cl} (Kusano et al., 1982; Miledi & Woodward 1989 a; Arellano & Miledi, 1993). La F_{Cl} es una corriente entrante de curso temporal rápido que se genera por la activación de receptores muscarínicos y purinérgicos que inducen la apertura de canales de

cloro despolarizando la membrana. Los canales al igual que los receptores, se localizan en la membrana de las células foliculares (Arellano & Miledi, 1993; Arellano et al., 1998). Los mecanismos de activación de la I_{Cl} no han sido estudiados en detalle pero se sabe que el sistema de acoplamiento receptor-canal no depende de la presencia de calcio intracelular (Arellano & Miledi, 1993).

Corriente de cloro dependiente de calcio ($I_{Cl(Ca)}$)

La descripción original de las corrientes de cloro dependientes de calcio ($I_{Cl(Ca)}$) fue realizada por Miledi y colaboradores (Kusano et al., 1977, 1982; Miledi, 1982). La $I_{Cl(Ca)}$ se genera como resultado del incremento en la concentración intracelular del ión calcio, cuando este incremento es promovido por la acción de transmisores extracelulares, induce una corriente bifásica con un pico rápido inicial, seguido de dos componentes que decaen con diferentes constantes de tiempo (Miledi et al., 1989).

Esta respuesta bifásica es una corriente entrante de cloro asociada con un incremento en la conductancia de la membrana y presenta un curso temporal oscilatorio característico de respuestas endógenas mediadas por la activación de la vía del IP_3 (Kusano et al., 1982; Miledi et al., 1989), por ello a la $I_{Cl(Ca)}$ activada a través de este mecanismo se le denomina comunmente corriente oscilatoria. Las corrientes oscilatorias de cloro son generadas por la estimulación con ACh, cationes divalentes, ácido lisofosfatídico y angiotensina II, cuyos receptores específicos y componentes del mecanismo de respuesta pueden encontrarse en la membrana del ovocito y al ser activados estimulan la vía de la PLC, causando un incremento en la síntesis del IP_3 /diacilglicerol y con ello el aumento de la concentración de calcio intracelular activando canales de cloro dependientes de calcio. Al parecer, el calcio regula su propia liberación a través de una retroalimentación negativa que actúa sobre algún componente de la vía de señalización generando así las características corrientes oscilatorias (Parker & Yao, 1991).

Para el caso específico de los receptores de AII, estos aunque se pueden encontrar localizados en las dos membranas, tanto en el ovocito (Woodward & Miledi, 1991) como en las células foliculares (Sandberg et al., 1990), es más común que se encuentren expresados exclusivamente en las células somáticas. Cuando los receptores a AII se encuentran localizados en las células foliculares, la $I_{Cl(Ca)}$ es generada también a través de síntesis de IP_3 . Este segundo mensajero difunde hacia el citoplasma del ovocito a través de las uniones comunicantes, promoviendo la liberación de calcio de los reservorios intracelulares el cual activa a los canales de cloro presentes en el ovocito (Sandberg et al., 1992).

Ciertas evidencias plantean la posibilidad de que los canales y receptores de las células foliculares influyen de alguna manera sobre el proceso de maduración del ovocito (Arellano et al., 1996). Por ejemplo, la $I_{Cl(Ca)}$ mediada por AII es mayor en ovocitos en etapas tardías del desarrollo folicular (estadios IV-VI; Woodward & Miledi, 1991) y su activación parece promover el rompimiento de la vesícula germinal inducida por progesterona. Por otro lado, esta respuesta llega a detectarse en la etapa II por lo que esto sugiere, que la función fisiológica de los receptores de AII interviene también en procesos durante etapas tempranas del desarrollo (Woodward & Miledi, 1991). Además de la corriente de $I_{Cl(Ca)}$, algunos estudios han mostrado que la corriente $I_{K,AMPc}$ modula de forma positiva la eficiencia de maduración de los folículos, un efecto que parece depender directamente de la apertura del canal de K^+ y no solo de la producción de AMPc (Wibrand et al., 1992).

Corrientes originadas en la membrana del ovocito

Corriente I_c

Los ovocitos que son perfundidos en una solución Ringer con una baja concentración de cationes divalentes (principalmente Ca^{++} y Mg^{++}), generan una corriente endógena entrante con una cinética de activación exponencial lenta que es mantenida en presencia del agonista y es reversible al perfundir con una solución normal de Ringer (RN). Esta corriente asociada con un

incremento en la conductancia de la membrana es llamada I_c y su amplitud es incrementada al despolarizar la membrana. Los canales involucrados en la generación de la I_c son canales catiónicos no selectivos, presentes en la membrana del ovocito, que permean principalmente Na^+ y K^+ y en menor proporción aniones como Cl^- (Arellano et al., 1995). Los canales responsables de esta respuesta fueron identificados por Ebihara (1996) como conexones formados de conexina 38 (Cx38).

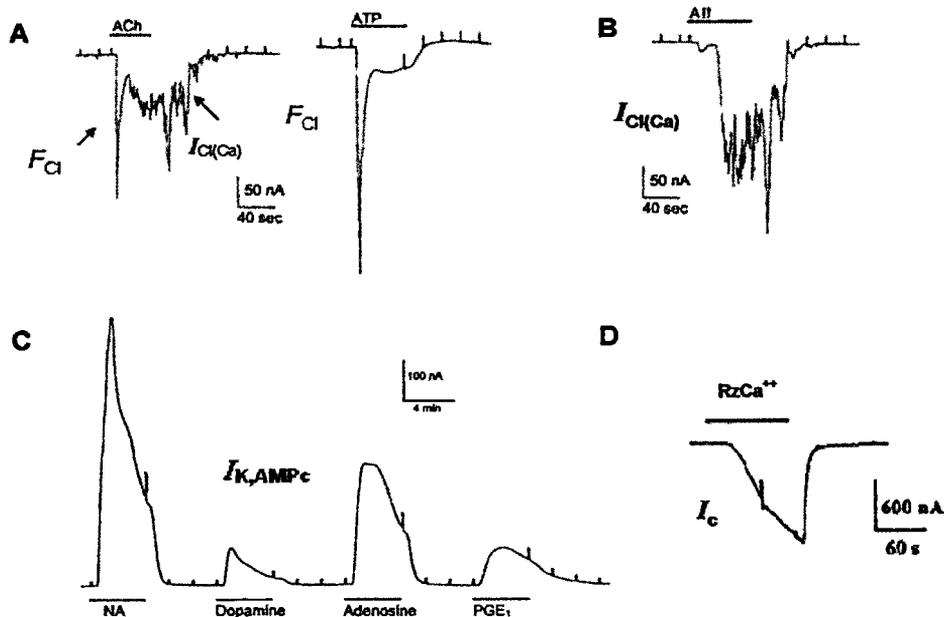


Figura 1.6. Algunas de las respuestas eléctricas generadas en la membrana de las células foliculares y en el ovocito de *Xenopus laevis*. A. Corriente F_{Cl} activada por 50 μM de ACh y ATP en folículos en RN. B. Corriente oscilatoria $I_{C(Ca)}$ mediada por 600 nM de AII en folículos en RN. C. Corrientes de $I_{K,AMPc}$ generadas en los folículos expuestos ante 10 μM de noradrenalina (NA), dopamina, adenosina y 1 μM de prostaglandinas (PGE_1) en RN (Modificado de Arellano et al., 1996). D. Corriente I_c generada en la membrana del ovocito por la exposición de Ringer libre de calcio ($RzCa^{++}$) (Modificado de Saldaña et al., 2009).

En este estudio, se demostró que la inhibición de la expresión de Cx38 provocaba un efecto específico sobre la I_c , la cual se elimina completamente, mientras que la sobreexpresión de Cx38 incrementa la amplitud de la corriente (Ebihara, 1996). Poco se sabe de la participación de los conexones de Cx38 en

la membrana del ovocito, por ejemplo, fue propuesto que dichos canales estaban involucrados en la liberación de ATP (Bahima et al., 2006) sin embargo, estudios realizados en el laboratorio mostraron que su participación en este fenómeno es nulo o indetectable (Saldaña et al., 2009). Por esto último, se piensa que la expresión de Cx38 en la membrana del ovocito obedece a otras necesidades, por ejemplo, la necesidad de mantener un *pool* de conexiones, que permitirán eventualmente ser utilizados en la formación de UC's con las células foliculares.

II. ANTECEDENTES

El desarrollo del folículo ovárico depende de la comunicación química y eléctrica que se da entre las células que lo conforman. El ovocito y las células somáticas establecen una comunicación metabólica y eléctrica a través de uniones intercelulares conocidas como uniones de tipo gap o uniones comunicantes (Baird & Mitchell, 2002). Las uniones comunicantes que proveen un sistema complejo de comunicación directa entre el citoplasma de células adyacentes, son esenciales para el transporte de diversas moléculas e iones, que brindan al folículo los elementos necesarios para su crecimiento y maduración (Shestopalov & Panchin, 2007).

Mediante el uso del modelo experimental de ratones y ratas deficientes de estas UC's, varios estudios han podido demostrar *in vivo* el papel esencial que desempeñan las uniones gap durante el desarrollo del folículo ovárico (Simon et al., 1997; Juneja et al., 1999; Ackert, et al., 2001; Gittens & Kidder, 2005; Tong et al., 2007). Por ejemplo, ratones a los que les fue bloqueada la expresión de la conexina 43 (presente a lo largo de todo el desarrollo folicular en las CG), mostraban gónadas de tamaño reducido y solo un 10% de células germinales comparadas con el grupo control. La baja cantidad de folículos encontrados solo llegaba a desarrollarse hasta el estadio primario y no se presentaba la proliferación de las células de la granulosa. Los pocos folículos secundarios que se desarrollaban eran significativamente más pequeños y presentaban hasta siete capas de células de la granulosa y un pequeño antrum provocando ovocitos incompetentes (Juneja et al., 1999; Ackert et al., 2001; Gittens & Kidder, 2005). Por otro lado, en folículos que expresaban conexiones funcionales de Cx43 pero que no tenían la capacidad para formar UC's, la foliculogénesis no se rescataba más allá de los primeros estadios del desarrollo (Tong et al., 2007).

Otro de los trabajos efectuados en roedores, mostró que al inhibir la expresión del gen que codifica para la conexina 37 (Cx37), la principal conexina en el ovocito de ratón, no se logra el desarrollo de los folículos De Graaf y la ovulación no puede ser inducida por la estimulación con gonadotropinas.

Además las células de la granulosa se diferencian a células lúteas antes de la ovulación por lo que los ratones llegan a ser infértiles (Simon et al., 1997). La agregación de ovocitos deficientes de Cx37 con células de la granulosa que no habían sido alteradas en la expresión de conexinas, producían folículos primarios pequeños que solo desarrollaban tres capas de células de la granulosa y que no llegaban a las últimas etapas del desarrollo folicular (Gittens & Kidder, 2005). Estas evidencias ponen de manifiesto la importancia de las UC's en la transmisión de señales químicas entre el ovocito y las células del cumulus para promover la completa maduración del ovocito y que éste pueda ser ovulado y fertilizado para continuar el proceso de embriogénesis.

Actualmente diversos estudios nos han permitido conocer parte de los mecanismos involucrados en el desarrollo del folículo ovárico (Arellano et al., 1996; Simon et al., 1997; Juneja et al., 1999; Ackert, et al., 2001; Eppig et al., 2002; Vanderhyden, 2002) sin embargo, aún no se ha detallado mucho acerca de las moléculas que participan en el acoplamiento de las células de la granulosa y el ovocito, además no se ha descrito puntualmente el papel de las UC's en este complejo celular. Una manera de aproximarnos a conocer cómo ocurren los procesos implicados en la maduración del folículo es empleando un modelo de estudio que permita evaluar el acoplamiento eléctrico que se establece entre las estirpes celulares que conforman al folículo, accediendo al estudio de la acción de una variedad de transmisores sobre sus receptores que se encuentran presentes en las células foliculares o de la granulosa, y la observación de las respuestas eléctricas generadas a través de su estimulación.

Los folículos de *Xenopus laevis* han sido ampliamente utilizados como modelo de expresión heterólogo para el estudio de canales, receptores o fármacos mediante técnicas de electrofisiología y de biología molecular. El gran tamaño del ovocito (1-1.4 mm), su amplia y constante producción en el ovario de la rana y la sencillez para su mantenimiento en cultivo, han favorecido su uso como un modelo de expresión, pero también nuestro laboratorio y otros, lo han empleado exitosamente para entender procesos del complejo folicular que implican comunicación celular (Arellano et al., 1996; Klein et al., 2006).

Con el descubrimiento de la co-expresión de conexinas y panexinas en diversos tejidos de vertebrados varias preguntas sobre el papel presuntamente redundante que juegan ambas proteínas en la comunicación celular, han sido planteadas. Sin embargo, hasta ahora no se ha aportado información acerca de la expresión de panexinas nativas en el folículo ovárico de la rana, ni sobre el papel fisiológico que podrían estar desempeñando en dicho complejo.

De manera particular, se desconoce si existe la participación de las panexinas en la comunicación que se establece entre las células foliculares y el ovocito de la rana, aún cuando existen evidencias que muestran la expresión de las panexina1-3 en las células de la granulosa de ovario de ratón (Tong et al., 2007). Estudios más recientes a través del análisis de secuencias en la base de datos, señalan la presencia de la Px1 en el ovocito de *X. laevis* (de Boer & van der Heyden, 2005).

Nuestro grupo de trabajo ha evaluado el papel de la Cx38, la conexina más abundante y exclusiva en el ovocito de *X. laevis* (Ebihara et al., 1989; Gimlich et al., 1990), en el establecimiento de la comunicación eléctrica entre el ovocito y las células foliculares y también el papel de esta conexina en la maduración del ovocito. Los resultados obtenidos muestran que esta proteína no participa en la comunicación eléctrica (Vega, 2001) sin embargo, otras evidencias parecen mostrar que modula la maduración del ovocito (E. Garay & R.O. Arellano, datos sin publicar). Con relación a la expresión de Cx's en el ovario de *Xenopus laevis*, la Cx38 (Ebihara et al., 1989; Gimlich et al., 1990) y la Cx43 (Landesman et al., 2003) se encuentran presentes a lo largo de todo el desarrollo del ovocito; también las células foliculares expresan la Cx41 (Bruzzone et al., 1995) y la Cx43 y el ovocito Cx31 en la etapa VI de la maduración (Landesman et al., 2003). Estas conexinas no han sido estudiadas en el contexto en el que se plantea el presente estudio por lo que, aún no queda clara su participación en el acoplamiento metabólico y eléctrico del folículo de *X. laevis*.

Si como indican nuestros resultados previos, la Cx38 no es la responsable del acoplamiento eléctrico entre el ovocito y las células foliculares

que lo rodean, entonces es posible sugerir que las panexinas podrían estar implicadas en esta comunicación. Es por ello que se plantearon las siguientes preguntas: ¿Las panexinas son expresadas en las células foliculares y en el ovocito de *Xenopus laevis*? y si se expresan, ¿Son las panexinas las proteínas que están interviniendo en el acoplamiento eléctrico en el folículo ovárico de *X. laevis*? y finalmente ¿la comunicación entre el ovocito y las células foliculares se ve alterada al inhibir la expresión de las panexinas y/o la Cx38?

III. HIPÓTESIS

Las panexinas están presentes en el folículo ovárico de la rana *Xenopus laevis* y participan en la comunicación celular establecida entre el ovocito y las células foliculares.

IV. OBJETIVO GENERAL

- ❖ Determinar la expresión de las panexinas en el folículo ovárico de *Xenopus laevis*.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Determinar la expresión del ARNm que codifica para las panexinas en los ovocitos desfoliculados y las células foliculares.
- ❖ Inhibir la expresión de las panexinas en los ovocitos de *Xenopus laevis* empleando oligonucleótidos antisentido.
- ❖ Determinar la participación de las panexinas en el acoplamiento eléctrico y metabólico entre las células foliculares y el ovocito; analizando las respuestas eléctricas del modelo celular mediante control de voltaje.

VI. METODOLOGÍA

Análisis de Secuencias

Para el diseño de los cebadores que se emplearon en ensayos de RT-PCR, se buscó en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) las secuencias descritas para panexinas en diversos organismos (*Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*), las cuales fueron comparadas con las secuencias de *Xenopus laevis*, mediante el uso del NCBI-Blast: *Xenopus sequences*, para analizar la posible homología.

Para el alineamiento de secuencias se utilizó el programa Clustal W2. En el programa NCBI-BLAST:Primers se introdujeron las secuencias de *Xenopus laevis* homólogas a las tres panexinas de los diferentes organismos para el diseño de los cebadores (ver cuadro 6.1) que se utilizaron en la amplificación del ADNc (DNA complementario a una cadena de ARNm) de dichas proteínas. Para la Px2 se diseñaron cebadores en base a una secuencia encontrada en la base de datos de *Xenopus tropicalis*. No se lograron diseñar cebadores para Px3 debido a que no se encontró una secuencia homóloga en la base de *X. laevis*.

Cuadro 6.1. Parámetros de la RT-PCR.

Gen	Cebadores	Temperatura de alineamiento (°C)	Amplicón esperado (pb)
Px1	5' GCC ACC GAG TAC GTC TTC TC 3' 5' GCT CCA CGA TTG GGT ACT TG 3'	53	561
Px2	5' ACT TAA AGA ACT GAT ACT GC 3' 5' GTG CGG GTA TGT ACA TTA TT 3'	53	360
Cx38	5' CTG CAG TTT CTC TTT GTC AGT A 3' 5' CCC AGA CAT TTT GTT ATA AGC T 3'	55	610
P2Y8	5' GTT CCC TTG TCA TGA GTC 3' 5' TGC TGC CGG TCT CCT ACA 3'	53	575
Ribosomal S5	5' TGG TAA CAG GGG AGG TTT CCG C 3' 5' ATA CCA GCC ATC ATG AGC AGC 3'	53	500

Tratamiento de folículos ováricos

Ranas *Xenopus laevis* adultas, fueron anestesiadas por hipotermia y sometidas a una ovariectomía para aislar lóbulos ováricos que se mantuvieron a 20 °C en medio normal de Barth (BN: NaCl 88 mM, KCl 1 mM, NaHCO₃ 2.4 mM, Ca(NO₃)₂ 0.33 mM, CaCl₂ 0.41 mM, MgSO₄ 0.82 mM, gentamicina 70 µg/ml (pH:7.4) y HEPES 5 mM). Luego, folículos independientes fueron aislados manualmente mediante el uso de pinzas finas. Esta preparación denominada *w.f.* (*whole follicle*), conserva el epitelio interno, la teca, la membrana basal y la monocapa de células foliculares, así como la capa vitelina que rodea al ovocito (Miledi & Woodward, 1989 a).

Para la extracción del ARN total (ARN_T) los folículos fueron tratados con colagenasa tipo I (Sigma), 0.5 mg/ml por 30 minutos en solución normal de Ringer (RN: NaCl 115 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1.8 mM, HEPES 5 mM, pH: 7.0). Las capas celulares que rodean al ovocito se removieron mediante una disección manual con pinzas finas y posteriormente fueron incubados a una temperatura de 18°C a 20°C en BN. A esta preparación se le llama *c.f.* (*collagenase treated*) o de ovocitos desfoliculados, la cual mantiene solo la capa vitelina cubriendo al ovocito (Miledi & Woodward, 1989 a).

Para el registro electrofisiológico se obtuvieron folículos *e.t.r.* (*epithelium and theca removed*) y se mantuvieron en solución modificada de Barth (solución BM: NaCl 88 mM, KCl 0.2 mM, NaHCO₃ 2.4 mM, Ca(NO₃)₂ 0.33 mM, CaCl₂ 0.41 mM, MgSO₄ 0.82 mM, KH₂PO₄ 0.88 mM, NaHPO₄ 2.7 mM, glucosa 5 mM, gentamicina 70 µg/ml, pH 7.4, y suero bovino fetal al 0.2%).

Para el cultivo primario de células foliculares se empleó una cuarta preparación llamada ovocitos "*unzipped*", en la cual se disecciona del *w.f.* el epitelio interno, la teca externa y la membrana basal de las células foliculares; esta disección expone a las células foliculares en la capa más externa. Los folículos *unzipped* se mantuvieron en solución BM y posteriormente se trataron con tripsina 1 mM y EDTA 0.53 mM por 15 minutos a temperatura ambiente, después de este tratamiento las células foliculares fueron separadas del

ovocito a través de agitación gentil de los folículos con una pipeta Pasteur en solución BM con 5% de suero bovino fetal (SBF), y finalmente se recuperaron las células en la solución BM con 0.2% de suero bovino fetal (Miledi & Woodward, 1989 a).

Extracción de ARN_T

La extracción de ARN_T total se llevó a cabo a partir de folículo completo *w.f.*, ovocitos *c.t.* y de células foliculares aisladas, mediante la técnica de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski, 2001), y fue conservado a -20°C para evitar su degradación. Posteriormente el ARN_T se cuantificó en un espectrofotómetro Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 3000 y se analizó por electroforesis en un gel de agarosa-formaldehído al 1.4% mediante un transiluminador de luz UV UVP modelo LMS-20E.

Síntesis del ADN complementario (ADNc)

Para demostrar la expresión de panexina en el folículo ovárico de rana, se llevó a cabo una transcripción reversa con la que se obtuvo el ADNc. Para la síntesis del ADNc fueron necesarios 2 µg de ARN_T, 1 µl de buffer 10X para ADNasa (que contiene 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 20 mM MgCl₂ y 500 mM KCl), 1 µl de de ADNasa y agua estéril para llevarlo a un volumen final de 10 µl. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Mediante este procedimiento se aseguró la eliminación previa a la síntesis del ADNc, de ADN contaminante que pudiera encontrarse en las muestras de ARN. Subsiguientemente se añadió 1 µl de EDTA 25 mM y se calentó a 65 °C por cinco minutos.

Se adicionó 1µl de oligo-dT y 0.5 µl de hexanucleótidos y se calentó a 65°C durante cinco minutos. La mezcla se colocó en hielo y se añadió 1 µl del inhibidor de ARNasa, 8 µl de buffer 5X, 2 µl de dNTP's (deoxinucleótidos trifosfatados), 6 µl de MgCl₂ y 9.5 µl de agua estéril. De esta mezcla, sin la enzima transcriptasa reversa (TR), se recuperó 6 µl que sirvieron como los controles negativos (-RT) en la amplificación del ADNc. Al resto de la mezcla se

le agregó 1.5 µl de la transcriptasa reversa ImpromII (Promega) y se mantuvo por una hora y media a 42 °C. El ADNc obtenido se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

Amplificación del ADNc mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En los ensayos de PCR se emplearon oligonucleótidos (cebadores) previamente diseñados contra la Px1 y Px2, la conexina más abundante en el ovocito Cx38, el receptor purinérgico metabotrópico P2Y8 y contra la proteína ribosomal S5 (control positivo). Las distintas parejas de oligonucleótidos utilizados se muestran en la **cuadro 6.1**.

Las reacciones se llevaron a cabo en 20 µl siendo necesario, 2 µl de buffer 10X (10 mM Tris-HCl pH 8.4, 25 mM KCl), 0.5 µl de MgCl₂ 50mM, 2 µl de dNTP's, 2µl de los primers específicos, 0.3 µl de la enzima *Taq* polimerasa *platinum* (Invitrogen), agua (la necesaria) y 2 µl del ADNc, agua o -RT como controles negativos. La PCR se efectuó en un termociclador Perkin Elmer, modelo Gene Amp PCR System 2400, bajo las siguientes condiciones: dos minutos a 94°C, por 35 ciclos 45 segundos a 94°C, 50 segundos a 53°C ó 55°C (temperatura de alineamiento, **ver cuadro 6.1**) y 50 segundos a 72°C, finalmente a 72°C por cinco minutos. Para la PCR del ADNc de Px2 fue necesario hacer un gradiente de temperaturas para determinar las condiciones óptimas de amplificación. Las muestras de ADN fueron analizadas en geles de agarosa al 1% mediante un transiluminador de luz UV UVP modelo LMS-20E.

Las bandas visualizadas se purificaron del gel utilizando el kit QIAquick (Qiagen), y se clonaron en el vector TOPO-A (Promega). Posteriormente se hizo una extracción del plásmido mediante una miniprep (Px1) y una maxiprep (Px2) para ser secuenciados los fragmentos obtenidos.

Inhibición de la expresión de Px1 y Cx38

Se diseñaron oligonucleótidos antisentido (**ver cuadro 6.2**) dirigidos contra el ARNm que codifica para Px1 y Cx38. El uso de oligonucleótidos antisentido permite suprimir selectivamente la expresión de proteínas blanco. El diseño se basa en una secuencia complementaria del mensajero de Px1 que corresponde al codón de inicio de la traducción.

Cuadro 6.2. Oligonucleótidos antisentido.

aPx1	^{5'} GGT GGC GAT ATC AGC TAT GGC CAT GGC TGG ^{3'}
aCx38	^{5'} GCT TTA GTA ATT CCC ATC CTG CCA TGT TTC ^{3'}
38X	^{5'} CTT TTG ACC GCT CAT CCC TAT AGT ATT TGC ^{3'}
Control	^{5'} TGG GAC TGG AAG GTG TGT TC ^{3'}

Los folículos *e.t.r.* fueron microinyectados con 50 ng de oligonucleótido antisentido contra la Px1 (aPx1), los cuales se incubaron durante 48 horas a 20°C en solución BM con 0.2% de SBF. Para comparar su efecto, otro grupo de folículos *e.t.r.* fueron inyectados con el antisentido de Cx38 (aCx38), así como dos diferentes grupos control que fueron inyectados con una secuencia modificada al azar del aCx38, llamada 38X, o un oligonucleótido con la secuencia sentido del P2X5 de ratón (todos a la misma concentración de aPx1). Un último grupo de folículos fue co-inyectado con aPx1 y aCx38. Posteriormente se llevó a cabo el análisis electrofisiológico para evaluar el grado de comunicación entre los ovocitos y sus células foliculares.

Registro electrofisiológico

La actividad electrofisiológica fue medida a través de la técnica de control de voltaje en folículos *e.t.r.* control o microinyectados con oligonucleótidos antisentido dirigidos contra uno de los mensajeros de las proteínas endógenas, Cx38 o Px1 del ovocito, o una mezcla de los antisentidos para cada uno.

Para los registros de corriente transmembranal fueron utilizados dos microelectrodos fabricados a partir de capilares de vidrio de borosilicato y

llenos con una solución de KCl 3M con una resistencia de 1-2 MΩ. Una vez insertados en el ovocito uno de los microelectrodos mide continuamente el potencial de membrana, mientras que el segundo inyecta la corriente necesaria para mantener el potencial de membrana en el valor deseado. El amplificador de control de voltaje empleado fue el GeneClamp Axon 500B, y fue utilizado para el registro continuo de la corriente transmembranal visualizada utilizando un osciloscopio marca Gould D50-602. Esta señal fue almacenada digitalmente y analizada utilizando el convertidor A/D Digidata 1200A y el programa pClamp 9 de Axon Inc. El registro electrofisiológico de los diferentes grupos de folículos *e.f.r.* se llevó a cabo 48 horas después de la microinyección. El potencial de membrana fue controlado en este estudio a -60 mV ó -40 mV dependiendo del experimento y la corriente a registrar. Los ovocitos fueron mantenidos con una perfusión continua de solución RN y se les dieron pulsos cortos despolarizantes de 20 mV cada 40 segundos con el fin de evaluar el comportamiento de la conductancia de la membrana durante la respuesta. Una vez evaluada la actividad eléctrica basal de los folículos se prosiguió a la aplicación de los distintos agonistas durante 40-80 segundos mediante el sistema de perfusión. Los agonistas fueron diluidos en solución de RN y las corrientes con origen en las células foliculares evaluadas fueron: 1) la corriente $I_{K,AMPc}$ activada por adenosina (ADO 100 μM); 2) la corriente F_{Cl} activada por acetilcolina (ACh, 100 μM) o ATP (100 μM); y 3) la $I_{Cl(Ca)}$ oscilatoria generada por angiotensina II (AII 1 μM), en este último caso se verificó en todos los donadores que los receptores se encontraban en las células foliculares, ya que la desfoliculación de los ovocitos eliminó las respuestas. Una cuarta respuesta que fue analizada sistemáticamente fue la amplitud de I_c , esta corriente fue activada por la perfusión de Ringer cero calcio (RzCa⁺⁺; conteniendo la misma formulación del RN sin agregar CaCl₂), ya que la generación de I_c es una medida directa del grado de expresión de conexiones de Cx38 en la membrana del ovocito.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron hechos utilizando el programa Origin 7.0 (Northampton, MA). Todos los resultados son expresados como la media \pm el error estándar. Para obtener la comparación entre las medias de los diferentes grupos bajo estudio, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey y/o de Bonferroni. El valor de *P* por debajo de 0.05 se consideró como diferencia significativa, la cual se muestra en cada gráfica.

VII. RESULTADOS

Expresión de Px1, Px2 y Cx38 en el folículo de *Xenopus laevis*

Con el fin de determinar la expresión de panexinas en el folículo de *Xenopus laevis* y corroborar la de Cx38, se realizaron ensayos por RT-PCR. A partir de los folículos extraídos de diferentes donadores, se obtuvieron los distintos tipos celulares y a partir de ellos el ARN_T. Una vez purificado, el ARN_T fue analizado por electroforesis en geles de agarosa-formaldehído al 1.4%. El resultado de la electroforesis se muestra en la **figura 7.1**. En cada muestra analizada se observan dos bandas bien definidas que corresponden al ARN ribosomal 28S y 18S, esto es indicativo de la calidad del ARN el cual no se encontró degradado.

Una vez verificada la calidad del ARN_T éste se empleó para sintetizar el ADNc que posteriormente sería utilizado para realizar los ensayos de PCR. Los cebadores específicos utilizados en el presente estudio fueron diseñados según se describe en la sección de metodología (**ver cuadro 6.1**).

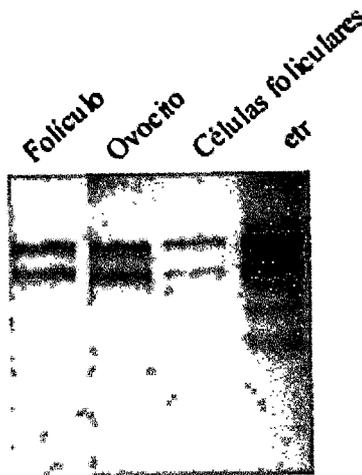


Figura 7.1. ARN total obtenido de folículo completo (*w.f.*), ovocito desfoliculado (*c.f.*), de células foliculares (*c.f.*) y de ovocito sin teca externa y sin epitelio interno (*e.t.r.*).

Una vez realizada la PCR, los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1%. En la **figura 7.2** se

muestran la imagen del gel correspondiente a los productos de amplificación por PCR utilizando los cebadores para la secuencia de Px1, en éste se puede observar un producto de aproximadamente 560 pares de bases (pb) en los carriles correspondientes al ADNc de cerebro, en el folículo completo, el ovocito desnudo, y en células foliculares aisladas. El tamaño de este producto de la amplificación corresponde con el esperado para la secuencia de Px1.

Con el fin de corroborar que los productos amplificados correspondían a Px1, estos fueron purificados del gel y clonados en el vector TOPO-A. Los plásmidos recombinantes así obtenidos, fueron empleados para transformar células competentes. Posteriormente, se seleccionaron algunas bacterias transformadas portadoras de los plásmidos recombinantes para purificar el plásmido y secuenciar el fragmento de DNA clonado.

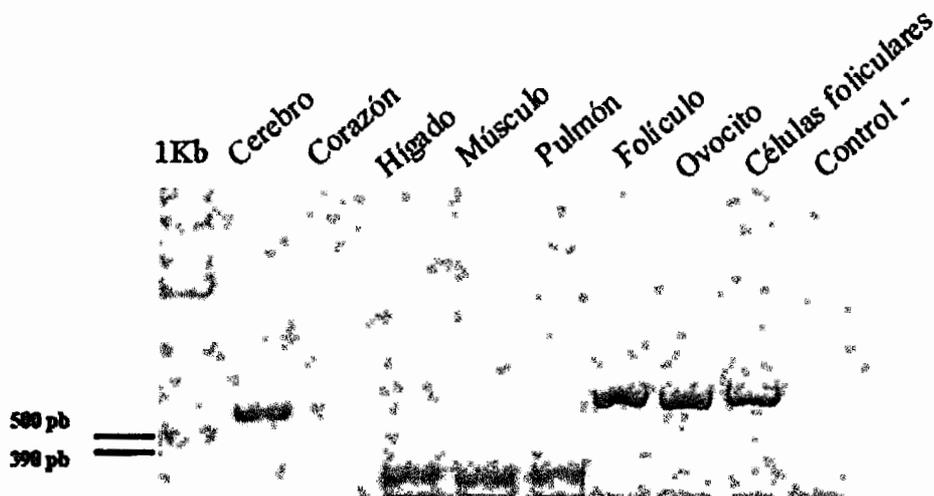


Figura 7.2. Análisis por RT-PCR de los ARNm que codifican para panexina 1 en los distintos tejidos y células de *Xenopus laevis*. Amplificación del ADNc de Px1 de cerebro, corazón, hígado, músculo, pulmón, folículo completo, ovocito desfolículado y células foliculares. 1 Kb: Marcador de peso molecular; Control -: control negativo.

Al comparar la secuencia de los fragmentos clonados con la base de datos del Genbank, empleando el algoritmo BLAST (Altschul et al., 1997), se encontró que ésta era 100% idéntica a la secuencia de Px1 de *Xenopus laevis*

y que compartía 91% de identidad con el ARNm de una proteína hipotética de *X. tropicalis*.

En el caso de los carriles correspondientes al ADNc de corazón, hígado músculo y pulmón diferentes bandas de amplificación fueron observadas. Estas bandas no han sido analizadas con detalle.

Para el ensayo por RT-PCR de Px2 fue necesario hacer un gradiente de temperaturas para determinar las condiciones óptimas de amplificación. Para ello, se empleó el ADNc de cerebro de rana y un gradiente de temperatura de 50 a 59 °C. Se eligió este tejido ya que la Px2, se expresa de manera importante en el mismo. Los resultados obtenidos de esta amplificación son mostrados en la **figura 7.3**, donde se puede observar que dos fragmentos de DNA de ~360 y 500 pb fueron amplificados preferentemente a las temperaturas entre 50 y 53°C. De estos fragmentos, el de 360 pb corresponde al tamaño esperado, mientras que el de ~500 pb podría representar un producto de amplificación inespecífico o bien una versión alternativa del mensajero para Px2. Para corroborar la identidad de los fragmentos de amplificación, estos fueron purificados del gel de agarosa, clonados y secuenciados.

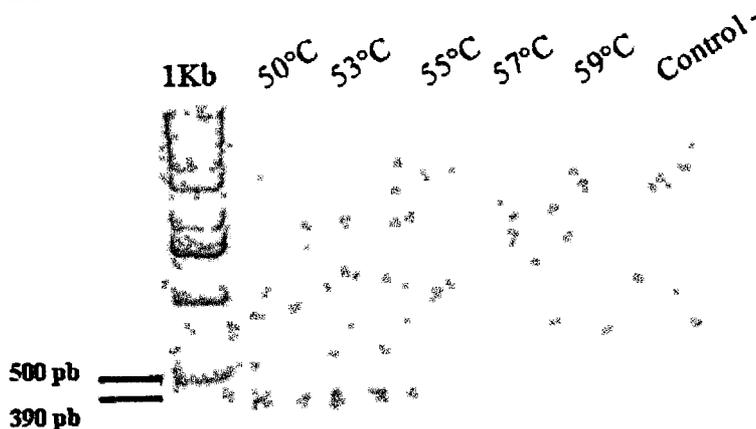


Figura 7.3. Ensayo de RT-PCR por gradiente de temperatura, de los ARNm que codifican para panexina 2 en cerebro de rana. 1 Kb: Marcador de peso molecular; Control -: control negativo.

La comparación de la secuencia obtenida con la base de datos del GenBank, mostró que el fragmento de 360 pb tuvo una identidad de más del 95% con la secuencia Px2 de *X. tropicalis* (Figura 7.4). Sin embargo, el de ~500 pb, además de la secuencia correspondiente al fragmento de 360 pb presentó una inserción de 104 pb a partir de el pb 168, sugiriendo que este es un producto del splicing alternativo del mensajero de Px2. Apoyando esta idea, en humanos se ha descrito la existencia de una versión alternativa del ARNm de Px2.

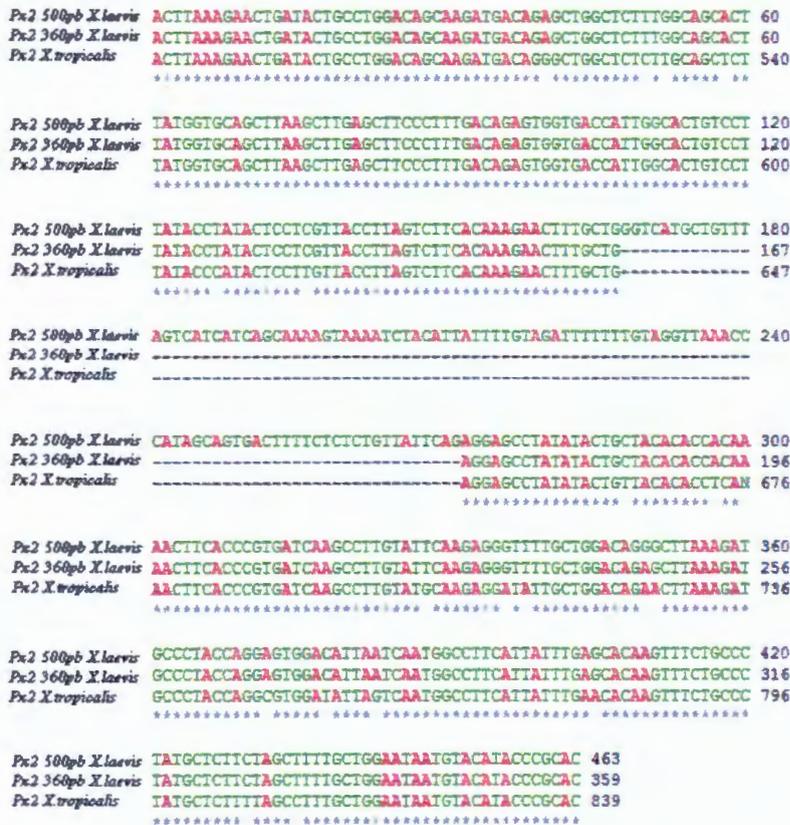


Figura 7.4. Alineamiento de las secuencias que codifican para Px2 de cerebro de rana obtenidas por RT-PCR comparadas con la secuencia de Px2 de *Xenopus tropicalis*. Px2 ~500 pb: es la isoforma que contiene la inserción de un exón adicional.

Los resultados permitieron hacer un análisis de las características de las proteínas que se podrían generar a través de estas dos secuencias encontradas en el cerebro. El fragmento de 360 pb, podría corresponder a un

mensajero que daría lugar a la proteína característica de la subunidad de Px2 de 125 aminoácidos, mientras que el de ~500 pb, generaría una proteína truncada de solo 80 residuos ya que el marco de lectura se modificaría. Esta proteína tendría solamente la región amino terminal, el primer pase transmembranal, y la primer asa extracelular (Figura 7.5).



Figura 7.5. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Px2 de cerebro de rana comparada con Px2 de *Taeniopygia guttata*, *Gallus gallus* y *Mus musculus*, organismos cuya Px2 presentaron mayor similitud secuencial con respecto a la Px2 de cerebro de *Xenopus laevis*. Px2 de ~500 pb representa la isoforma truncada de la proteína debido a un splicing por inserción de un exón adicional. Las secuencias peptídicas comparadas representan las regiones más conservadas de la proteína.

Una vez determinada la temperatura óptima de amplificación de los fragmentos Px2, se hizo el ensayo de PCR a 53°C con los ADNc de ovocito y células foliculares. Los resultados de esta amplificación son presentados en la figura 7.6. Como se observa, se obtuvieron los dos productos de amplificación previamente caracterizados en la muestra donde se empleó el ADNc de cerebro sin embargo, en las muestras correspondientes al ovocito o las células foliculares aisladas no se observaron productos de amplificación.

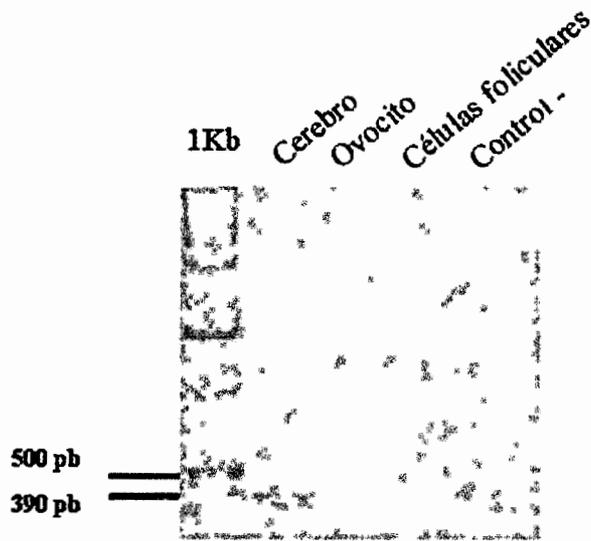


Figura 7.6. Ensayo por RT-PCR de los ARNm que codifican para Px2 en cerebro, ovocito desfoliculado y células foliculares de *Xenopus laevis*. 1 Kb: Marcador de peso molecular; Control - : control negativo.

Con el fin de verificar que los resultados de la expresión de Px1 en ovocito y células foliculares y de la ausencia de expresión de Px2 en el folículo ovárico de rana correspondían a la calidad de los ADNc empleados, se realizaron ensayos de PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar las secuencias codificantes de la proteína ribosomal S5 la cual es muy abundante y se encuentra presente en todos los tipos celulares, la de la Cx38 cuya expresión es específica del ovocito y la del receptor purinérgico P2Y8 que solo se expresa en las células foliculares del folículo de *Xenopus laevis*.

Los resultados obtenidos en las amplificaciones anteriormente mencionadas, se muestran en las **figuras 7.7, 7.8 y 7.9**, respectivamente. Productos de amplificación de tamaños esperados, fueron obtenidos en cada caso. Todos estos fueron clonados y secuenciados, para verificar la identidad de los mismos.

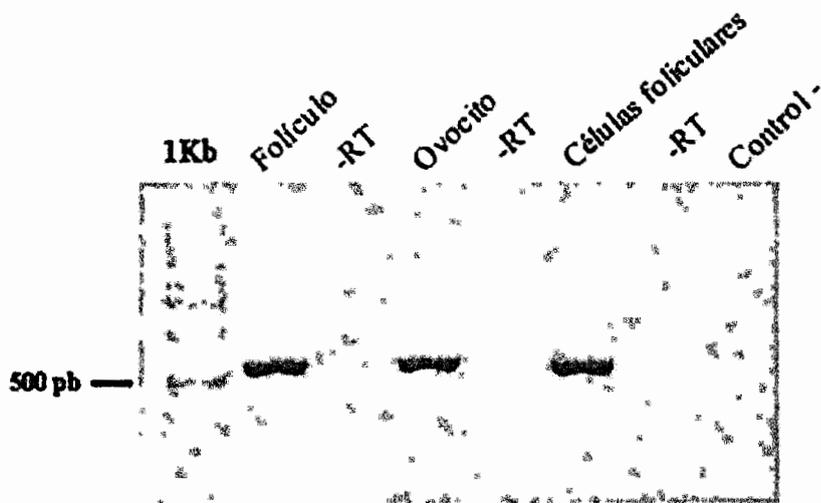


Figura 7.7. Análisis de la expresión génica de la proteína ribosomal S5 por RT-PCR en folículo completo, ovocito desfolículado y células foliculares de *Xenopus laevis*, mostrando sus respectivos controles negativos y el control de agua (control -). 1 Kb: Marcador de peso molecular; -RT: control negativo porque la muestra empleada para dicha amplificación proviene de una reacción en ausencia de la transcriptasa reversa.

Como se esperaba, en todas las muestras analizadas empleando los oligos específicos para la proteína ribosomal 5S, se amplificó un producto cuya cantidad es equiparable en todas las muestras. En la **figura 7.8** se observa que solo se amplificó un producto que correspondía a la secuencia que codifica para la proteína Cx38 en las muestras de ovocito y en la **figura 7.9** un producto que corresponde a la secuencia que codifica para P2Y8 amplificado solo en la muestra de las células foliculares.

Estos resultados en su conjunto muestran que el ovocito y las células foliculares expresan la Px1 pero no así la Px2.

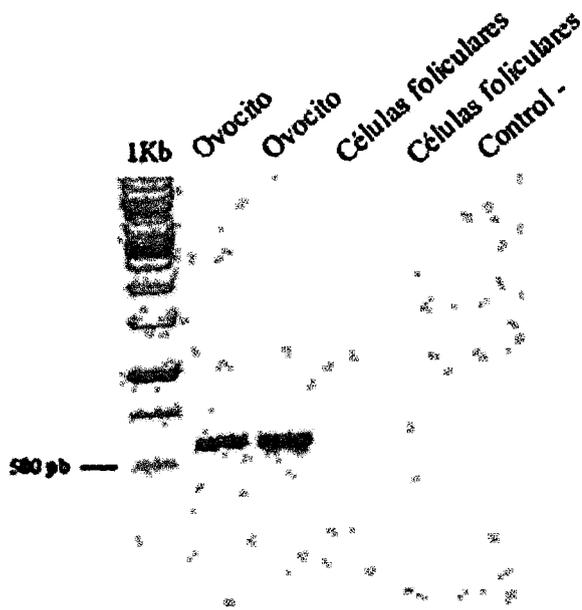


Figura 7.8. Amplificación del ADNc de conexina 38 de ovocito desfoliculado y células foliculares de rana. 1 Kb: Marcador de peso molecular; Control - : control negativo.

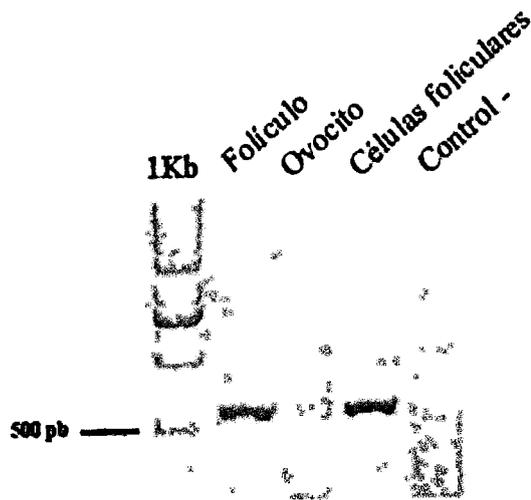


Figura 7.9. Amplificación del ADNc del receptor P2Y8 de folículo completo, ovocito desfoliculado y células foliculares. 1 Kb: Marcador de peso molecular. Control - : control negativo.

Estudios Electrofisiológicos

Debido al fuerte acoplamiento entre las células foliculares y el ovocito, las corrientes membranales que tienen origen en el compartimento de las células somáticas, pueden ser detectadas al registrar la actividad eléctrica desde el interior del ovocito. Tomando ventaja de esta propiedad, una parte importante de este estudio, correspondió con la evaluación del acoplamiento entre estos dos tipos celulares a través de monitorear las respuestas generadas en la membrana de las células foliculares mientras registramos eléctricamente desde el ovocito; implantando para ello microelectrodos que nos permiten medir la corriente iónica generada usando la metodología de control de voltaje con dos microelectrodos.

Para la evaluación de todas las respuestas eléctricas anteriormente descritas se emplearon 28 folículos *e.t.r.* de tres ranas (o donadores) mantenidos a 20°C en solución BM (SBF 0.2%). Posteriormente, se registraron en solución RN, donde presentaron en promedio un potencial de reposo de -33 ± 1 mV. Estudios electrofisiológicos adicionales fueron realizados en 19 ovocitos desfoliculados (un donador) con el propósito de corroborar los resultados obtenidos en los folículos *e.t.r.* con respecto a la respuesta activada por $RzCa^{++}$, la I_c . Este grupo de ovocitos desnudos tuvieron un potencial de reposo de -39 ± 3 mV. En general, los valores mostrados corresponden a folículos cuyo potencial de membrana se mantuvo a -40 mV sin embargo, también se realizaron pruebas adicionales en folículos mantenidos a -60 mV (datos no mostrados). Los parámetros de control de voltaje y aplicación de los diversos agonistas fueron igual para todas las corrientes estudiadas y se encuentran descritos anteriormente en la sección de metodología.

La observación de la actividad eléctrica basal de los folículos en RN, fue fundamental para evaluar el estado en que se encontraban dichos folículos antes de llevar a cabo el registro ante la presencia de varios agonistas. Entre los diferentes grupos bajo estudio no fueron observadas diferencias con respecto al potencial de reposo, lo cual resulta ser un buen indicador de que las inyecciones de los distintos oligonucleótidos antisentido empleados, parecen no

provocar efectos inespecíficos sobre el estado basal de la conductancia en las diferentes preparaciones. Los grupos de folículos *e.t.r.* registrados fueron: 1) folículos control inyectados con 38X (no mostrado) o sP2X5, 2) folículos inyectados con el antisentido de Cx38 (aCx38), 3) folículos inyectados con el antisentido de Px1 (aPx1), y 4) folículos co-inyectados con ambos antisentidos. Los grupos de folículos control fueron utilizados como índice de referencia contra el que se compararon las respuestas de los grupos experimentales para cada una de las corrientes evaluadas. Las pruebas electrofisiológicas se realizaron 48 horas después de la microinyección, tiempo definido para asegurar la actividad de los oligonucleótidos y para no alterar de manera significativa las respuestas eléctricas endógenas de los folículos. Los diferentes fármacos utilizados se usaron a concentraciones que generan respuestas máximas en los folículos.

Corrientes con origen en la membrana del ovocito

Corriente I_c

Como ya se mencionó la corriente endógena I_c es generada al perfundir los folículos controlados a -60 mV ó -40 mV con una solución de Ringer con una baja concentración de cationes divalentes y es reversible al perfundir con RN. Esta corriente está asociada con un incremento en la conductancia de la membrana e involucra la activación de canales no selectivos, presentes en la membrana del ovocito, canales de Cx38 que permean principalmente Na^+ y K^+ y en menor proporción Cl^- (Arellano et al., 1995).

La I_c activada por RzCa^{++} (Arellano et al., 1995) se presentó en el grupo de folículos *e.t.r.* control como una corriente entrante de curso temporal lento que se mantuvo por varios segundos en presencia de la solución de prueba, y en ausencia de ésta, se desactivó rápidamente (**Figura 7.10. A, B**). Las respuestas obtenidas en 6 folículos control de 2 ranas fueron de 578 ± 365 nA (a -40 mV) y 941 ± 235 nA (a -60 mV). Esta misma respuesta fue evaluada en ovocitos desfoliculados donde el grupo control (5 ovocitos, 1 rana) fue mantenido a un potencial de membrana de -60 mV (**Figura 7.11. A, B**) y la

corriente generada a través de la estimulación con $RzCa^{++}$ no presentó ninguna variación en su cinética con respecto a los folículos *e.t.r.* Estos datos corroboran que la I_c se origina en la membrana del ovocito y que no depende del acoplamiento con las células foliculares puesto que sin ellas continúa activándose (Arellano et al., 1995; Ebihara, 1996). La aparente disminución en la amplitud de la corriente en los ovocitos desnudos (288 ± 91 nA) que se muestra en la **figura 7.11. A**, no fue consistente en todos los casos. Por ejemplo, en un caso particular la I_c fue de 602 nA mientras que, en folículos *e.t.r.* se obtuvieron respuestas de 315 nA, menor que en ovocitos desfoliculados.

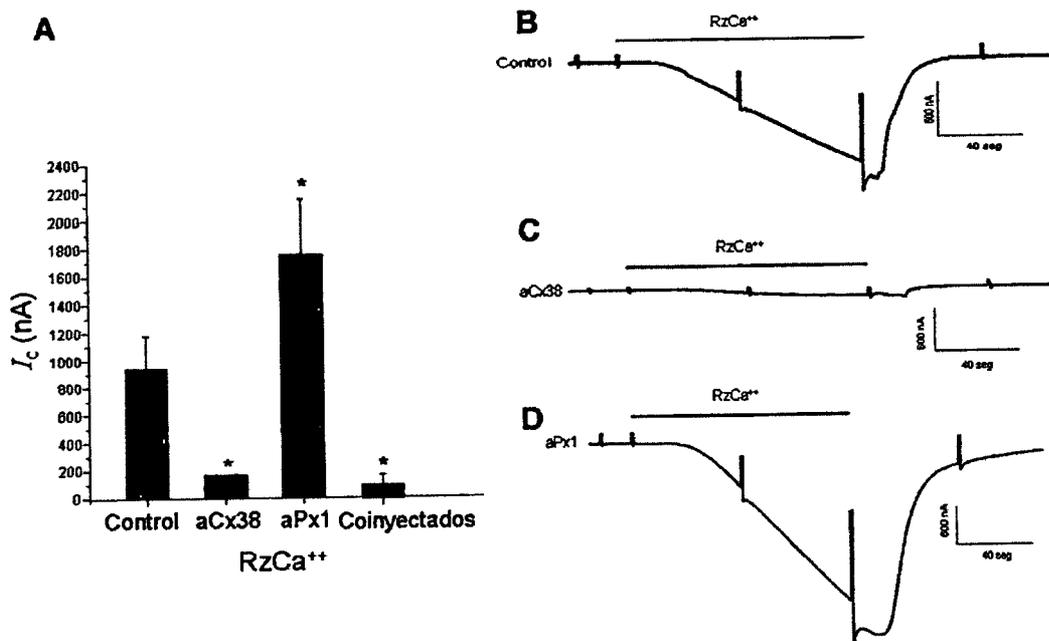


Figura 7.10. A) Gráfica que muestra la media y el error estándar de la I_c generada en folículos *e.t.r.* en respuesta a una solución $RzCa^{++}$ ($n=3$ por grupo; 1 donador; $P<0.05$, ANOVA). B) Trazo de una corriente típica generada en un folículo control, C) en un folículo inyectado con aCx38 y D) en un folículo inyectado con aPx1 en respuesta a la misma solución que A.

Con el fin de determinar el nivel de inhibición de la expresión de Cx38 con el oligonucleótido antisentido aCx38, se monitoreo la I_c en la membrana del ovocito. Una vez identificada en el grupo control la I_c que fue comparada con la descrita anteriormente en la literatura, se estudio el efecto de la inhibición de Cx38 sobre la misma. Los resultados obtenidos (**Figura 7.10**) muestran que la corriente I_c fue inhibida hasta en un 83% a las 48 horas de la microinyección con aCx38 comparado contra el grupo control, de este modo la amplitud de la corriente en tres folículos *e.t.r.* (una rana) inyectados con aCx38 fue de 174 ± 30 nA (a -40 mV) (**Figura 7.10. C**) y en folículos de un segundo donador la respuesta fue de 164 nA cuando el potencial se controló a -60 mV.

Con respecto a los resultados obtenidos en un experimento similar utilizando ovocitos defoliculados controlados a -60 mV, se mostró que la I_c se mantenía inalterada (288 ± 91 nA en 5 ovocitos, 1 rana) en el grupo control mientras que, en ovocitos a los que se les fue inhibida la Cx38 se observó una notable reducción de la I_c cuya amplitud fue de 38.33 ± 9 nA (3 ovocitos, 1 rana) (**Figura 7.11. C**), lo que equivale con respecto al control a una inhibición del 87% de la respuesta por lo que, la secuencia antisentido es capaz de bloquear la traducción de Cx38 y reducir considerablemente la amplitud de la I_c .

En todos los folículos inyectados con aPx1 que fueron evaluados para la generación de la I_c , se observó una potenciación en la corriente (**Figura 7.10. D**). Los valores obtenidos a un potencial de -40 mV fueron de 2006 ± 705 nA (3 folículos, 1 rana) y de 1750 ± 400 nA a -60 mV (2 folículos, 1 rana), valores que sobrepasan el doble de los del grupo control (578 ± 365 nA y 941 ± 235 nA respectivamente en 6 folículos, 2 ranas). Para descartar la idea de que las subunidades de Px1 pudieran actuar como un modulador de los conexones de Cx38, se prosiguió a realizar el mismo experimento pero en ovocitos desnudos que se trataron con colagenasa. Los ovocitos desnudos no presentaron modificaciones en la amplitud de la corriente (**Figura 7.11. D**) por el contrario, los ovocitos inyectados con aPx1 controlados a -60 mV presentaron amplitudes de 281.75 ± 55 nA (8 ovocitos, 1 rana) semejantes a las del grupo control que fueron de 288 ± 91 nA (5 folículos, 1 rana).

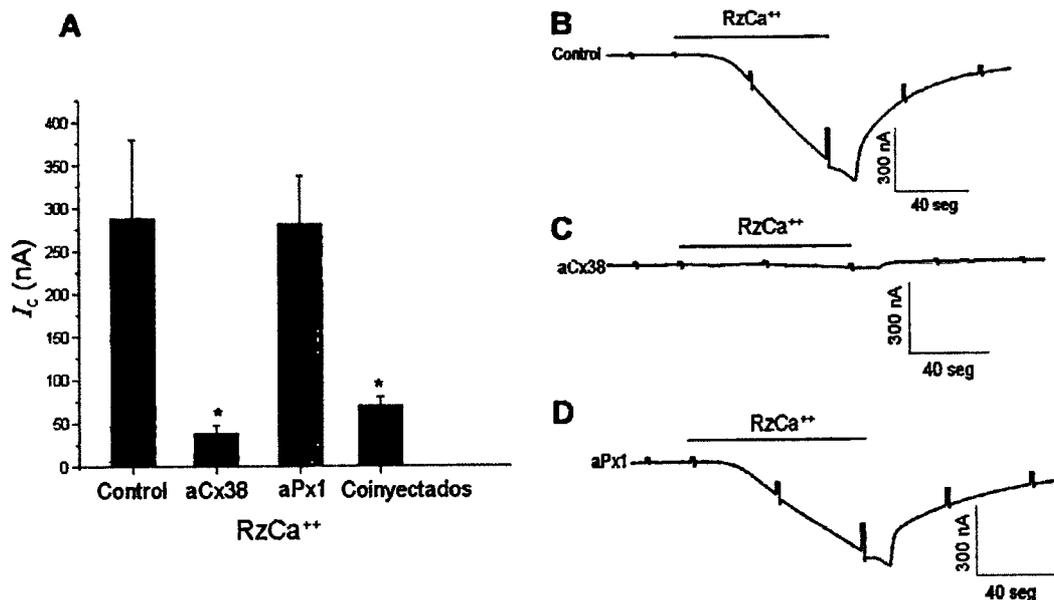


Figura 7.11. A) Gráfica que muestra la media y el error estándar de la I_c generada en ovocitos desnudos, en respuesta a una solución $RzCa^{++}$ ($n=19$ por todos los grupos; 1 donador; $P<0.05$, ANOVA). B) Trazo de una corriente típica generada en un ovocito control, C) en un ovocito inyectado con aCx38 y D) en un ovocito inyectado con aPx1 en respuesta a la misma solución que A.

Experimentos adicionales empleando folículos a los que se les fue bloqueada la expresión tanto de Cx38 como la de Px1, se llevaron a cabo con el fin de evaluar el efecto de la eliminación de estas dos proteínas transmembranales sobre las corrientes que tienen origen en el ovocito. Esta prueba sirvió como un control para verificar que las inyecciones fueran realizadas de la manera correcta y para corroborar los datos anteriormente analizados. Como era de esperarse en el grupo de folículos *e.t.r* como en el grupo de ovocitos desnudos co-inyectados la I_c disminuyó en un 90% (8 folículos, 3 ranas).

Corrientes con origen en las células foliculares

Las respuestas con origen en las células foliculares representan un buen indicador del grado de acoplamiento entre éstas y el ovocito, esto es: a

mayor grado de acoplamiento la corriente generada será transmitida con mayor amplitud al ovocito, a menor acoplamiento las respuestas generadas en las células foliculares disminuirán en amplitud al ser registradas desde el ovocito.

Corriente de potasio mediada por AMPc ($I_{K,AMPc}$)

Dentro de las corrientes foliculares que dependen del acoplamiento eléctrico, la $I_{K,AMPc}$ generada a través de la estimulación con diversos transmisores es una de las más conspicuas y es producida por la activación de la AC que promueve la síntesis de AMPc y la activación de la PKA, esto genera una corriente saliente hiperpolarizante al promover la apertura de canales de potasio (Greenfield et al., 1990a) que parece intervenir en el proceso de maduración meiótica del folículo (Wibrand et al., 1992). La alta conductancia a potasio en estas células se transmite al ovocito a través de las uniones comunicantes (Woodward & Miledi, 1990 a).

La corriente de $I_{K,AMPc}$ activada por adenosina 100 μ M fue observada en folículos control (6 folículos, 2 ranas) como una corriente saliente con un curso temporal lento, y presentó un retraso de activación de \sim 10 s. La respuesta se mantuvo por varios segundos y comenzó a decrecer lentamente en presencia del agonista (**Figura 7.12. A, B**). El tiempo de recuperación de la corriente basal del folículo luego de regresar a la perfusión con RN, fue de 60-90 s. El grupo control que se empleó durante estas pruebas fueron los folículos inyectados con oligonucleótidos que no se complementan con ningún mensajero del ovocito, como sP2X5 (secuencia sentido de un receptor purinérgico ionotrópico de ratón) y 38X, secuencia modificada al azar del antisentido de Cx38 que no altera la traducción de dicha proteína. El potencial de membrana de estos folículos fue mantenido a -40 mV o -60 mV, obteniéndose respuestas de 379 ± 67 nA (3 folículos, 1 rana) y 63 ± 12 nA (3 folículos, 1 rana) respectivamente. Esto es indicativo de que el acoplamiento entre el ovocito y las células foliculares fue suficiente para registrar la corriente originada en las células somáticas aún después de 48 horas desde la microinyección. Como es de esperarse la corriente de potasio mediada por AMPc resultó ser mayor en los folículos mantenidos a -40 mV comparada a la

obtenida a -60 mV, y sus características generales corresponden a las descritas previamente en la literatura (Arellano et al., 1996).

Luego de verificar por medio del registro de la I_c , la efectividad de la secuencia antisentido de Cx38 sobre la inhibición de su expresión, se prosiguió con el registro de estos folículos para corroborar la participación de Cx38 en la comunicación eléctrica y metabólica usando como índice de ésta, corrientes con origen en las células foliculares que dependen del acoplamiento provisto por las UC's. Además, esta serie de experimentos nos sirvió de control para demostrar que la inyección *per se* no induce efectos inespecíficos. La $I_{K,AMPc}$ en este grupo de folículos (**Figura 7.12. C**) no presentó variación alguna en la amplitud o en la cinética de la corriente (494.66 ± 94 nA en 3 folículos, 1 rana) con respecto al grupo control (379 ± 67 nA en 3 folículos, 1 rana) en folículos controlados a -40 mV.

Con el fin de analizar la participación de Px1 entre el ovocito y las células foliculares se hicieron registros electrofisiológicos en folículos *e.t.r.* microinyectados con un oligonucleótido antisentido que bloquea la expresión de Px1. Los resultados del efecto de la inhibición de la expresión de Px1 sobre las respuestas foliculares son mostrados en las **figuras 7.12-7.15**. En el caso de la corriente $I_{K,AMPc}$, el grupo de folículos aPx1 a -40 mV mostró una tendencia a aumentar la amplitud de la corriente (1033.66 ± 401 nA; **Figura 7.12. D**) con respecto al grupo control sin embargo, la variación entre cada folículo es amplia y la diferencia no es significativa. Por ejemplo, en un folículo del grupo aPx1 la corriente fue de 441 nA y en otro caso la amplitud alcanzó hasta 1800 nA. Los ovocitos registrados en un potencial de -60 mV mostraron resultados semejantes. Por otro lado, la cinética de la corriente de potasio mantuvo las características anteriormente descritas para el grupo control.

Las respuestas obtenidas en el grupo de folículos co-inyectados no fueron diferentes de aquellas presentadas por el grupo de folículos inyectados con el aCx38, la $I_{K,AMPc}$ mediada por ADO fue de 464.33 ± 111 nA (3 folículos, 1 rana).

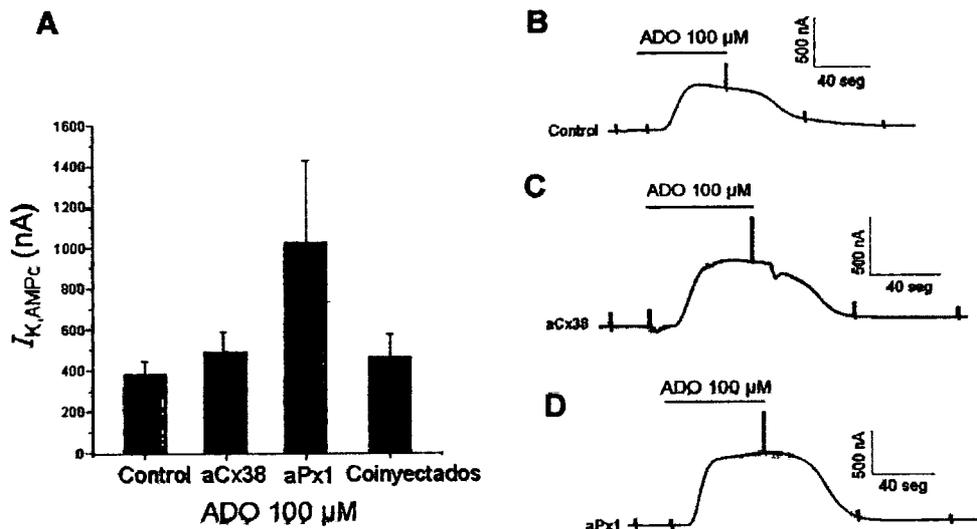


Figura 7.12. A) Gráfica que muestra la media y el error estándar de la corriente $I_{K,AMPc}$ en respuesta a una concentración de 100 μM de ADO ($n=3$ por grupo; 1 donador; $P<0.05$, ANOVA). B) Trazo de una corriente típica generada en un folículo control, C) en un folículo inyectado con aCx38 y D) en un folículo inyectado con aPx1 en respuesta 100 μM de adenosina.

Corriente de cloro transitoria (F_{Cl})

La F_{Cl} se genera por la activación de receptores muscarínicos y purinérgicos que inducen la despolarización de la membrana del ovocito. Los mecanismos de activación de la F_{Cl} no han sido estudiados en detalle pero se conoce que los canales que generan esta corriente al igual que los receptores que la activan, se localizan en la membrana de las células foliculares (Arellano & Miledi, 1993; Arellano et al., 1998).

Las respuestas generadas por ATP 100 μM correspondieron con la corriente F_{Cl} (6 folículos, 2 ranas), ésta es una corriente entrante acarreada por iones cloro de curso temporal rápido (Kusano et al., 1982; Arellano & Miledi, 1993; Arellano et al., 1998) y presenta un retraso de activación de aproximadamente 900 ms. En aproximadamente 2 s de activación esta corriente comenzó a decrecer rápidamente en presencia del agonista (Figura

7.13. A, B). Los valores de la F_{Cl} fueron de 459.66 ± 58 nA cuando el potencial de membrana se mantuvo a -40 mV y cuando la misma respuesta fue evaluada en folículos mantenidos a -60 mV la corriente se incrementó a 512 ± 194 nA (datos no mostrados), este comportamiento está de acuerdo a lo esperado para una corriente acarreada por iones cloro (Arellano et al., 1998).

En el caso de los folículos inyectados con aCx38 la F_{Cl} activada por ATP (3 folículos, 1 rana) (Figura 7.13. C) no presentó diferencia significativa en la cinética de la corriente (446.66 ± 74 nA) con respecto al grupo control. Esta respuesta evaluada entre los potenciales de -40 y -60 mV tampoco se vio modificada en los folículos inyectados con aPx1 (502.33 ± 129 nA y 776 ± 116 nA respectivamente en 6 folículos de 2 ranas; Figura 7.13. D) ni en el grupo de folículos co-inyectados (471.33 ± 202 nA en 3 folículos de 1 rana).

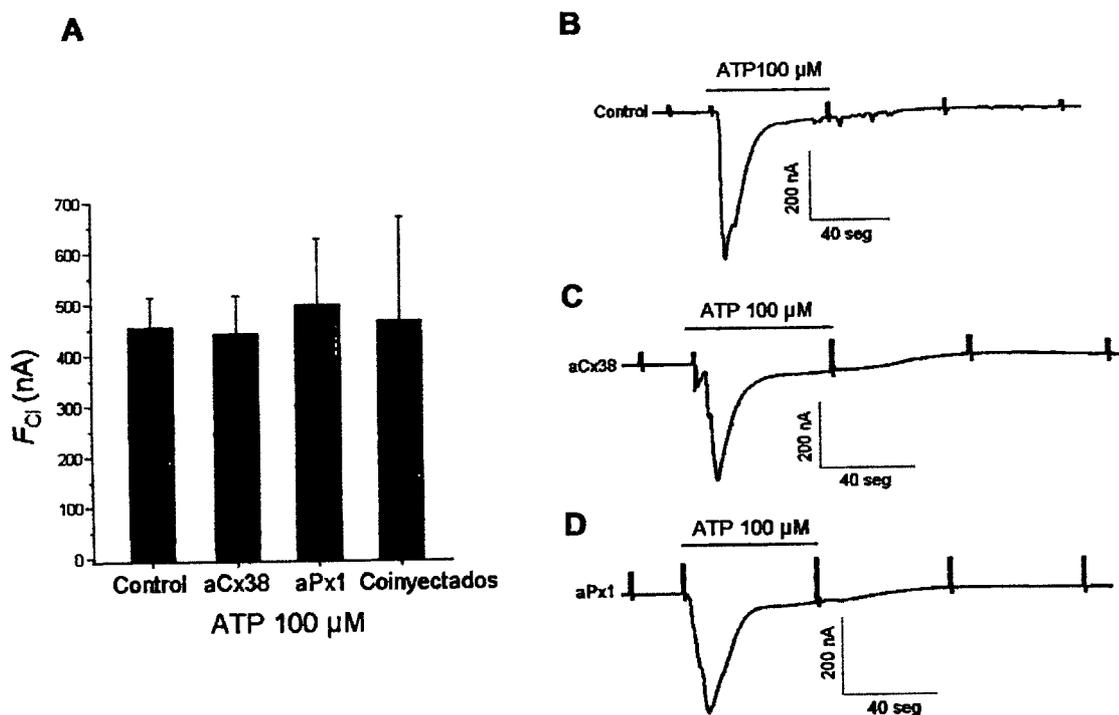


Figura 7.13. A) Gráfica que muestra la media y el error estándar de la corriente F_{Cl} en respuesta a una concentración de 100μ M de ATP ($n=3$ por grupo; 1 donador; $P>0.05$, ANOVA). B) Trazo de una corriente típica generada en un folículo control, C) en un folículo inyectado con aCx38 y D) en un folículo inyectado con aPx1 en respuesta a 100μ M de ATP.

La aplicación de ACh ($100\mu\text{M}$) generó en los folículos *e.t.r* una respuesta multifásica que incluyó a la corriente F_{Cl} y corrientes oscilatorias de cloro ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) que parecen ser generadas a través de un mecanismo semejante al estimulado por AII en las células foliculares. La F_{Cl} generada en el grupo control mantenido a -60 mV fue de $740.33 \pm 203\text{ nA}$ (3 folículos, 1 rana) y para folículos mantenidos a -40 mV se obtuvieron respuestas de $452.33 \pm 179\text{ nA}$ (3 folículos, 1 rana). Las corrientes oscilatorias fueron en promedio de $1094 \pm 341\text{ nA}$ y se mantuvieron por varios segundos. Estos folículos llegaron a presentar respuestas de 602 nA a 1750 nA cuando el potencial de membrana se mantenía a -40 mV (3 folículos, 1 rana). En algunos casos evaluados se presentaron corrientes oscilatorias de mayor amplitud que la F_{Cl} , por ejemplo, en un folículo control mantenido a -40 mV se generó una F_{Cl} y una corriente oscilatoria de cloro ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) de 650 y 1750 nA respectivamente. Las corrientes oscilatorias tienen una latencia de varios segundos y continúan generándose aún después de varios segundos de lavado con RN (Figura 7.14 A, B).

La F_{Cl} activada por $100\ \mu\text{M}$ de ACh monitoreada en el grupo aCx38 (4 folículos, 2 ranas) (Figura 7.14. C) no presentó variación en la amplitud o en la cinética de la corriente ($563.33 \pm 83\text{ nA}$) con respecto al grupo control en folículos controlados a -40 ó -60 mV . Esto sugiere junto con los resultados obtenidos al evaluar la corriente de potasio y la F_{Cl} activada por ATP, que la comunicación eléctrica entre los dos tipos celulares no disminuye en forma concomitante con la disminución en la expresión de conexones de Cx38.

En el grupo de folículos inyectados con aPx1 la F_{Cl} fue de $633.33 \pm 201\text{ nA}$ cuando el voltaje se controló a -40 mV y cuando éste se mantuvo a -60 mV la respuesta fue de $482 \pm 133\text{ nA}$ (8 folículos, 3 ranas) (Figura 7.14. D). Con respecto al grupo de folículos co-inyectados con aPx1 y aCx38 la amplitud de la corriente fue de $636 \pm 202\text{ nA}$ y $129.5 \pm 50\text{ nA}$ (5 folículos, 2 ranas). Como se observa en la gráfica mostrada en la figura 7.14. A, la corriente de cloro en estos dos grupos se generó sin modificaciones significativas en la amplitud de la corriente cuando fueron comparadas con su grupo control.

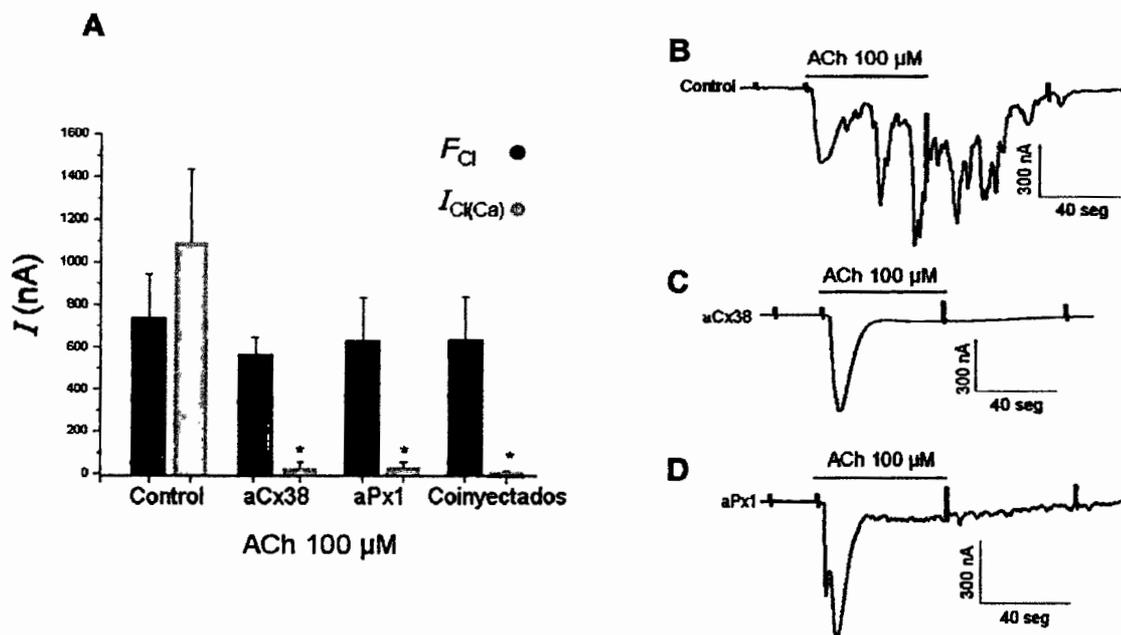


Figura 7.14. A) Gráfica que muestra la media y el error estándar de la corriente F_{Cl} en respuesta a una concentración de $100 \mu\text{M}$ de ACh ($n=3$ por grupo; 1 donador; $P>0.05$, ANOVA). B) Trazo de una corriente típica generada en un folículo control, C) en un folículo inyectado con aCx38 y D) en un folículo inyectado con aPx1 en respuesta a $100 \mu\text{M}$ de ACh.

Corriente de cloro dependiente de calcio ($I_{Cl(Ca)}$)

Las corrientes oscilatorias de cloro ($I_{Cl(Ca)}$) provocadas por ACh son muy semejantes a las $I_{Cl(Ca)}$ generadas por angiotensina II (AII $1 \mu\text{M}$), que en los folículos control se mostró como una corriente oscilatoria entrante que se activa lentamente y se mantiene por varios segundos durante el lavado del agonista con RN. Su amplitud varía mucho entre cada folículo y tiene un retraso de activación de ~ 16 segundos. Las respuestas en éstos folículos mantenidos a -60 mV fueron de $109 \pm 59 \text{ nA}$ en promedio (3 folículos, 1 rana) (Figura 7.15. A, B). Estas dos corrientes oscilatorias, la activada por ACh y la de AII, son de especial interés en este estudio, ya que implican el establecimiento de comunicación metabólica puesto que, el respectivo agonista que las activa tiene sus receptores en la membrana de las células foliculares y se encuentran acoplados a una proteína G que activa directamente a la PLC, lo que provoca

un aumento en la síntesis de un segundo mensajero, IP_3 que difunde de las células foliculares al ovocito a través de las UC's en donde induce la liberación de Ca^{++} de los reservorios intracelulares, con la consecuente activación de los canales de Cl^- dependientes de Ca^{++} en la membrana del ovocito (Sandberg et al., 1990, 1992; Woodward & Miledi, 1991).

Los resultados mostraron que las corrientes oscilatorias de cloro inducidas por la aplicación de 100 μM de ACh en el grupo aCx38 (4 folículos, 2 ranas) se vieron considerablemente disminuidas mostrando una inhibición del 97 al 100% (amplitud promedio de 26.66 ± 26 nA, ver **Figura 7.14. C**). Esto último fue consistente con los efectos sobre las respuestas foliculares generadas por 1 μM AII (1 μM), que presentaron una disminución consistente del 99% en todos los folículos evaluados a los que se les inhibió la Cx38. Por ejemplo, en el grupo control las respuestas obtenidas fueron de 109 ± 59 nA (3 folículos, 1 rana) mientras que en el grupo de folículos inyectados con aCx38 la amplitud de la $I_{Cl(Ca)}$ fue eliminada en todos los casos (**Figura 7.15. C**). La pérdida de esta respuesta sugiere que los conexones de Cx38 podrían participar de manera importante en la comunicación metabólica que se establece en el folículo.

En resumen, las respuestas eléctricas foliculares dependientes de la adecuada comunicación ovocito-células foliculares no se ven alteradas en su amplitud con la disminución de la I_c , esto corrobora que el nivel de expresión de Cx38 no guarda relación alguna con el grado de acoplamiento eléctrico puesto que, las respuestas de origen folicular no presentaron modificaciones importantes cuando la expresión de Cx38 fue bloqueada, con la clara excepción de las respuestas que requieren de la difusión de IP_3 (acoplamiento metabólico) para activar la corriente oscilatoria en el ovocito.

En el caso de la respuesta $I_{Cl(Ca)}$ mediada por 1 μM AII que fue generada en folículos a los que se les inhibió la Px1 (2 folículos, 1 rana) (**Figura 7.15. D**) no presentó modificaciones en la cinética o amplitud de las corrientes oscilatorias (135 ± 10 nA) en el potencial de -60 mV cuando fue comparada contra su grupo control. Sin embargo, las corrientes oscilatorias

activadas por 100 μM de ACh sufren una disminución semejante a la observada en el grupo inyectado con aCx38, y fueron atenuadas en un 98%, e incluso en la mayoría de los casos se pierden por completo (8 folículos, 3 ranas). Si las corrientes oscilatorias activadas por ACh se generan por la síntesis de IP_3 , el cual difundiría desde las células foliculares hacia el ovocito, entonces, podríamos sugerir con respecto a este último resultado que Px1 tiene una participación en el acoplamiento metabólico. Sin embargo, se han propuesto diversos mecanismos que podrían activar esta respuesta muscarínica por lo que se requiere de estudios más amplios para discernir entre varias posibilidades.

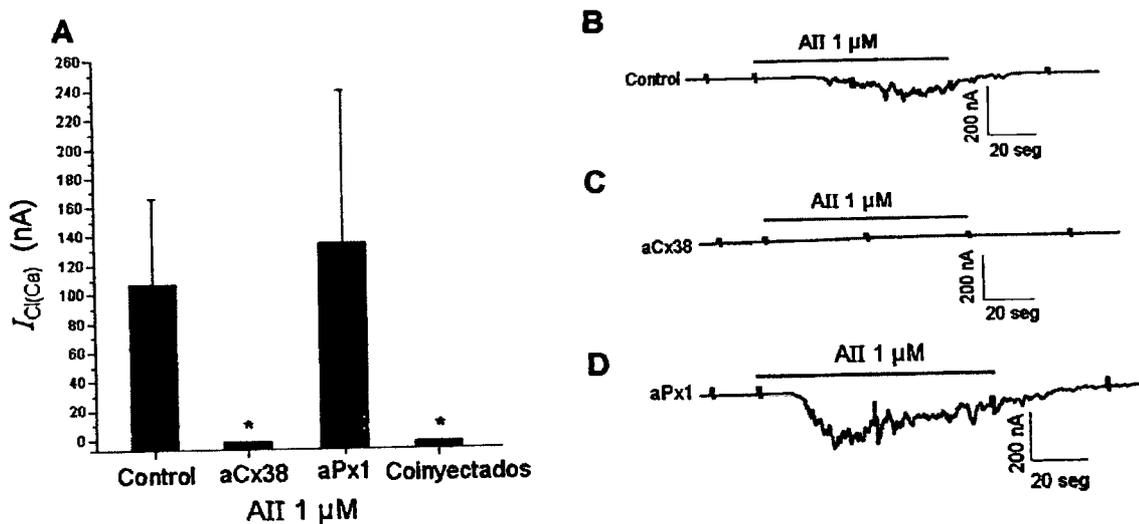


Figura 7.15. A) Gráfica que muestra la media y el error estándar de la corriente $I_{Cl(Ca)}$ en respuesta a una concentración de 1 μM de AII ($n=8$ por todos los grupos; 1 donador; $P<0.5$, ANOVA). B) Trazo de una corriente típica generada en un folículo control, C) en un folículo inyectado con aCx38 y D) en un folículo inyectado con aPx1 en respuesta a 1 μM de AII.

En los folículos co-inyectados con aCx38 y aPx1 las corrientes oscilatorias activadas por la aplicación de ACh o AII disminuyeron considerablemente en un 98% o en algunos casos fueron eliminadas por completo (3 folículos, 1 rana y 2 folículos, 1 rana respectivamente).

VIII. DISCUSIÓN

Expresión de Px1 en el folículo ovárico de *Xenopus laevis*

El primer objetivo de este estudio fue la detección de los transcritos de las diferentes panexinas en el folículo ovárico de *X. laevis*, para lo cual se realizaron ensayos por RT-PCR y se determinó la expresión de Px1 en el folículo pero no de la Px2. De manera particular, Px1 se encontró expresada tanto en el ovocito como en las células foliculares. También en diferentes tejidos de rana como cerebro, corazón, músculo, hígado y pulmón se identificó la expresión de la Px1 lo cual es coincidente con los datos obtenidos por Baranova y colaboradores (2004), quienes demostraron la expresión de Px1 en estos mismos tejidos de humano (Baranova et al., 2004).

Nuestros datos también son consistentes con los obtenidos por Tong y colaboradores (2007) quienes demostraron la expresión de Px1 en las células de la granulosa de ovario de ratón (Tong et al., 2007) y con los resultados de De Boer & van der Heyden (2005) quienes por análisis de secuencias en la base de datos de *X. laevis* sugirieron la expresión de Px1 en el ovocito (de Boer & van der Heyden, 2005). La expresión de Px1 tanto en las células foliculares como en el ovocito de *X. laevis*, nos sugiere la posible formación de canales intercelulares compuestos por panexones presentes en cada tipo celular.

La formación de canales intercelulares conformados por subunidades de Px1 expresadas en el ovocito de *X. laevis* ya ha sido confirmada *in vitro* (Bruzzone et al., 2003) y sugiere junto con nuestros resultados un papel fisiológico importante, no redundante al de las conexinas puesto que, la conexina más abundante y exclusiva del folículo no es la responsable del acoplamiento eléctrico. De ahí que, la función que desempeña Px1 podría estar interviniendo en el acoplamiento que se establece entre las estirpes celulares que forman al folículo ovárico de la rana.

Efecto de la inhibición de Px1 sobre la comunicación celular en el folículo de *X. laevis*: Participación en el acoplamiento eléctrico y metabólico

Con respecto a la participación de Px1 en el acoplamiento del folículo, las respuestas foliculares como la corriente de $I_{K,AMPc}$, $I_{Cl(Ca)}$ activada por AII y la F_{Cl} se mantienen inalteradas aún en ausencia de Px1, este dato sugiere que los canales Px1 no juegan un papel importante en la comunicación eléctrica entre el ovocito y las células foliculares puesto que, ante su inhibición el folículo sigue manteniendo un alto grado de acoplamiento. Sin embargo, donde se observó un cambio considerable fue en las corrientes oscilatorias de cloro $I_{Cl(Ca)}$ activadas por ACh, las cuales se cree que forman parte de una vía activada por el aumento de IP_3 el cual difunde al ovocito a través de uniones comunicantes establecidas con las células foliculares, provocando una liberación de calcio del retículo endoplásmico activando canales de cloro dependientes de calcio en la membrana del ovocito. Sin embargo, esta misma vía activa las corrientes oscilatorias $I_{Cl(Ca)}$ mediadas por AII, las cuales no se ven modificadas ante la carencia de Px1, lo que sugiere que las corrientes oscilatorias de cloro activadas por ACh se generan por la activación de otra vía que posiblemente no involucre la síntesis del IP_3 como en el caso de las $I_{Cl(Ca)}$ activadas por AII.

La activación de estas corrientes a través de la vía del IP_3 ha sido ampliamente estudiada en el ovocito de *X. laevis* sin embargo, en otros tipos celulares se ha estudiado la liberación de Ca^{++} mediante la difusión de otro segundo mensajero, el ADP-Ribosa cíclico (ADPRc) molécula que activa los receptores de rianodina (RyRs) de los reservorios intracelulares para liberar Ca^{++} . Este sistema no se encuentra presente en el ovocito de *X. laevis* debido a la ausencia de los RyRs (Yamasaki-Mann et al., 2009) no obstante, no se ha estudiado su expresión en las células foliculares por lo que no se puede descartar la presencia de este mecanismo en este compartimento folicular. Aunado a esta idea, la posible activación de la vía del ADPRc en las células foliculares podría generar las corrientes oscilatorias donde este mismo nucleótido podría modular de manera negativa la liberación de calcio a través de la bomba ATPasa- Ca^{++} del retículo endoplásmico (SERCA) presente en el folículo para secuestrar el calcio y generar las oscilaciones observadas en esta

respuesta. Por otro lado, se cree que la población de células foliculares no es del todo homogénea. Posiblemente al igual que en mamíferos se encuentren células foliculares que presentan distintos receptores, algunas podrían responder más a AII y otras a ACh y compartir diferentes uniones *gap* que permitan el paso selectivo de segundos mensajeros para desencadenar la respuesta sin embargo, no hay estudios al respecto en el folículo de rana que pongan en evidencia la heterogeneidad de este compartimento folicular y de la expresión diferencial de proteínas que forman parte de las UC's.

Expresión de Px2 en *Xenopus laevis*

En relación a la Px2, esta no se expresa ni en el ovocito, ni en las células foliculares. Sin embargo, el transcrito de Px2 fue detectado en el cerebro de *X. laevis* donde se encontró una versión alternativa de dicha proteína. El producto amplificado de 360 pb corresponde al fragmento esperado de Px2 y la banda de ~500 pb corresponde a una secuencia que presenta la inserción de un exón adicional de ~104 pb que produce en su traducción una proteína truncada justo en una de las regiones más conservadas (los primeros dominios transmembranales y el asa extracelular intermedia a ellos) (Panchin et al., 2000; Baranova et al., 2004) y presenta aproximadamente 80 residuos a diferencia de la Px2 de 360 pb conformada por 125 aminoácidos. La isoforma de Px2 podría jugar un papel importante en la regulación de la expresión de la proteína. Con respecto a este dato, estudios anteriores han detectado mediante el análisis de secuencias en la base de datos la presencia del ARNm de Px2 en cerebro de rana (de Boer & van der Heyden, 2005) además, en humano (Baranova et al., 2004) y ratón (Bruzzone et al., 2003) se ha demostrado su expresión y la presencia de una isoforma de Px2 en cerebro de humano, cuya secuencia contiene un exón suplementario "A" que reduce el marco de lectura y que presenta un bajo grado de homología en los sitios más conservados de la proteína (Baranova et al., 2004).

Efecto de la inhibición de Cx38 sobre la comunicación celular en el folículo de *X. laevis*: Participación en el acoplamiento eléctrico y metabólico

Como ya se mencionó anteriormente, se pudo corroborar mediante ensayos por RT-PCR que Cx38 se expresaba en el ovocito de la rana en la etapa VI del desarrollo folicular (Ebihara et al., 1989) y no en las células foliculares (Bruzzone et al., 1995; Vega, 2004). Estos datos junto con los estudios electrofisiológicas de Cx38, podrían confirmar el papel de dicha proteína en la formación de canales funcionales que son responsables de la generación de la I_c (Ebihara, 1996; Saldaña et al., 2008) y su posible capacidad para ensamblar canales heterotípicos con Cx's presentes en las células foliculares como Cx43 y Cx41 (Bruzzone et al., 1995), los cuales podrían participar más en el acoplamiento metabólico como lo muestra la pérdida de la respuesta folicular generada por la estimulación con AII y el mantenimiento de las respuestas $I_{K,AMPc}$ y la F_{CI} en folículos que no expresan Cx38.

Efecto de la inhibición de Px1 y Cx38 sobre la comunicación celular en un sistema acoplado

A pesar de la inhibición de la expresión de Cx38 y de Px1 en los folículos co-inyectados, el acoplamiento eléctrico responsable de la generación de las corrientes foliculares se mantuvo inalterado mientras que, las corrientes oscilatorias $I_{Cl(Ca)}$ activadas por ACh y AII fueron atenuadas hasta en un 98%. Esta observación sugiere que tanto Cx38 como Px1 funcionan como canales que intervienen en la comunicación metabólica más que en la comunicación eléctrica durante el desarrollo folicular. Sin embargo, no es posible descartar por completo la participación de estas proteínas en el acoplamiento celular ya que se ha propuesto que el complejo folicular de *X. laevis* de alguna manera activa sistemas de compensación para reemplazar la ausencia de una proteína que interviene en la comunicación eléctrica y metabólica por otra que cumple con funciones similares es decir, la falta de Px1 o de Cx38 en el folículo puede ser compensada por otra conexina, manteniendo el acoplamiento entre las células sin alteraciones evidentes lo que nos impediría ver el efecto de la

inhibición de ambas proteínas. De hecho, esto podría explicar los resultados obtenidos cuando se inhibe la expresión de Px1. En este caso, se observó la potenciación de la corriente I_c en folículos *e.t.r.* debida tal vez, a la sobreexpresión de Cx38 en un complejo acoplado para atenuar el efecto de la falta de Px1. Tal fenómeno de potenciación no sucede cuando el mismo experimento es realizado sobre ovocitos desnudos sugiriendo que estos mecanismos de rescate para sustituir la falta de alguna proteína no se activan en un sistema que no se encuentra acoplado o cuando las células foliculares son eliminadas. Estos datos sugieren que estas hipótesis deberán ser confirmadas con ensayos de PCR en tiempo real para detectar el nivel de expresión de Cx38 y de Px1 en folículos previamente registrados donde se observe la potenciación de la I_c . Con respecto a esto, algunos estudios han demostrado en el folículo ovárico de ratón la inalteración de los niveles de expresión de panexinas cuando suprimen la expresión de una de las conexinas más abundantes y esenciales de las células de la granulosa (Tong et al., 2007).

Si Px1 y Cx38 no intervienen de manera importante en el acoplamiento eléctrico establecido dentro del complejo folicular, es imprescindible el estudio del papel que desempeñan las distintas conexinas expresadas en el ovocito. Además se requieren estudios posteriores que demuestren *in vivo* la formación de canales intercelulares formados por panexinas y la formación de canales heterotípicos y heteroméricos con conexinas. Pese a la presencia de Px1 en las células foliculares y en el ovocito, otro aspecto importante a considerar en este estudio es que Px1 podría no estar involucrada en el ensamblaje de uniones comunicantes entre estos dos tipos celulares sino que, podría desempeñar un papel fundamental como un canal no selectivo como lo han demostrado estudios anteriores (Bruzzzone et al., 2005).

El hecho de que los ovocitos de *X. laevis* sean utilizados ampliamente como modelo experimental para el estudio de diversos canales, receptores o fármacos debido a que es un sistema de expresión heteróloga fácil de manipular (Klein et al., 2006), obliga a conocer más sobre su fisiología. Es fundamental comprender como se lleva a cabo el desarrollo folicular y las relaciones celulares que se establecen en este complejo folicular ya que esto

permitiría considerar las características fisiológicas del sistema cuando, por ejemplo, se analizan las funciones de proteínas exógenas expresadas en el ovocito.

IX. CONCLUSIONES

1. Con base en los resultados obtenidos se puso en evidencia la expresión de Px1, pero no la de Px2, en las células foliculares y en el ovocito de *Xenopus laevis*.

2. Los estudios funcionales indican que la inhibición de la expresión de Px1 en el ovocito, no disminuye de manera significativa el acoplamiento eléctrico y metabólico de este complejo celular.

3. Corroboramos que la Cx38 juega un papel importante en la comunicación metabólica establecida entre el ovocito y las células foliculares y que sus conexiones son los responsables de la generación de la corriente I_c .

4. Los resultados indican que existe un efecto sobre la comunicación metabólica por parte de Px1 similar al observado con Cx38, que fue más evidente cuando los receptores de ACh son los responsables de la comunicación.

X. LITERATURA CITADA

Ackert, C.L., J.E.I. Gittens, M.J. O'Brien, J. Eppig & G.M. Kidder. 2001. Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Dev. Biol.* 233: 258–270.

Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids. Res.* 25:3389-3402.

Arellano, R.O.; F. Ramón; A. Rivera & G.A. Zampighi. 1986. Lowering of pH does not directly affect the junctional resistance of crayfish lateral axons. *J. Membr. Biol.* 94(3):293-9.

Arellano, R.O., A. Rivera & F. Ramón. 1990. Protein phosphorylation and hydrogen ions modulate calcium-induced closure of gap junction channels. *Biophys. J.* 57(2):363-7.

Arellano, R.O. & R. Miledi. 1993. Novel Cl⁻ currents elicited by follicle stimulating hormone and acetylcholine in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* 102(5):833-57.

Arellano, R.O., R.M. Woodward & R. Miledi. 1995. A monovalent cationic conductance that is blocked by extracellular divalent cations in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 484: 593-604.

Arellano, R.O., M.R. Woodward & R. Miledi. 1996. Ion channels and membrane receptors in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. In: Narahashi, T. (Ed.). *Ion Channels*. p 203. Volumen 4. Plenum Press, Nueva York.

Arellano, R.O., E. Garay & R. Miledi. 1998. Cl⁻ currents activated via purinergic receptors in *Xenopus* follicles. *Am. J. Physiol.* 274: C333-40.

Arellano, R.O., A. Martínez-Torres & E. Garay. 2002. Ionic currents activated via purinergic receptors in the cumulus cell-enclosed mouse oocyte. *Biol. Reprod.* 67(3):837-46.

Bahima, L., J. Aleu, M. Elias, M. Martín-Satué, A. Muhaisen, J. Blasi, J. Marsal & C. Solsona. 2006. Endogenous hemichannels play a role in the release of ATP from *Xenopus* oocytes. *J. Cell. Physiol.* 206(1):95-102.

Baird, D.T. & A. Mitchell. 2002. Hormonal control of folliculogénesis: The key to successful reproduction. In: Eppig, J., C. Hegele-Hartung & M. Lessl (Ed.). *The future of the oocyte: Basic and clinical aspects*. p 1. Springer, Nueva York.

Baltus, E., J. Hanocq-Quertier, A. Pays & J. Brachet. 1977. Ionic requirements for induction of maturation (meiosis) in full-grown and medium-sized *Xenopus laevis* oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74(8): 3461-3465.

Bao, L., S. Locovei & G. Dahl. 2004. Pannexin membrane channel are mechanosensitive conduits for ATP. FEBS. Lett. 572: 65-68.

Baranova, A., D. Ivanov, N. Petrash, A. Pestova, M. Skoblov, I. Keimanson, D. Shagin, S. Nazarenko, E. Geraymovych, O. Litvin, A. Tiunova, T.L. Born, N. Usman, D. Staroverov, S. Lukyanov & Y. Panchin. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. Genomics. 83(4):706-16. 2004.

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

Barbe, M.T., H. Monyer & R. Bruzzone. 2006. Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. Physiology (Bethesda). 21:103-14.

Barrio, L.C., T. Suchyna, T. Bargiello, L.X. Xu, R.S. Roginski, M.V. Bennett & B.J. Nicholson. 1991. Gap junctions formed by connexins 26 and 32 alone and in combination are differently affected by applied voltage. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 88(19):8410-4.

Baulieu, E.E & S. Schorderet-Slatkine. 1983. Steroidal and peptidic control mechanisms in membrane of *Xenopus laevis* oocytes resuming meiotic division. J. Steroid. Biochem. 19: 139-145.

Bossinger, O. & E. Schlierenberg. 1992. Cell-cell communication in the embryo of *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol. 151(2):401-9.

Browne, C.L. & W. Werner. 1984. Intercellular junctions between the follicle cells and oocytes of *Xenopus laevis*. J. Exp. Zool. 230(1):105-13.

Bruzzone, R., T.W. White, G. Yoshizaki, R. Patiño & D.L. Paul. 1995. Intercellular channels in teleosts: functional characterization of two connexins from Atlantic croaker. FEBS. Lett. 358(3):301-4.

Bruzzone, R., S.G. Hormuzdi, M.T. Barbe, A. Herb & H. Monyer. 2003. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 100: 13644-13649.

Bruzzone, R., M.T. Barbe, N.J. Jakob & H. Monyer. 2005. Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes. J. Neurochem. 92: 1033-1043.

Bulun, S.E. & E.Y. Adashi. 2009. Fisiología y patología del eje reproductor femenino. In: Kronenberg, H.M., S. Melmed, K.S. Polonsky & P.R. Larsen (Ed.). Tratado de Endocrinología. p 549. XI Edición. Elsevier. Barcelona.

Chomczynski, P., R.E. Kingston & N. Sacchi. 2001. Guanidine methods for total RNA preparation. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 4: Unit 4.2.

Cottrell, G.T. & J.M. Burt. 2001. Heterotypic gap junction channel formation between heteromeric and homomeric Cx40 and Cx43 connexons. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 281(5):C1559-67.

Curtin, K.D., Z. Zhang & R.J. Wyman. 1999. *Drosophila* has several genes for gap junction proteins. *Gene.* 232(2):191-201.

Dahl, G. & S. Locovei. 2006. Pannexin: to gap or not to gap, is that a question?. *IUBMB life* 58: 408-19.

De Boer, T.P. & M.A. van der Heyden. 2005. *Xenopus* connexins: how frogs bridge the gap. *Differentiation.* 73: 330-340.

Dumont, J.N. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136: 153-180.

Ebihara, L., E.C. Beyer, K.I. Swenson, D.L. Paul & D.A. Goodenough. 1989. Cloning and expression of a *Xenopus* embryonic gap junction protein. *Science.* 243(4895):1194-5.

Ebihara, L. 1996. *Xenopus* connexin38 forms hemi-gap-junctional channels in the nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 71(2):742-8.

Edry, I., S. Sela-Abramovich & N. Dekel. 2006. Meiotic arrest of oocytes depends on cell-to-cell communication in the ovarian follicle. *Mol. Cell. Endocrinol.* 252(1-2):102-6.

Eppig, J., K. Wigglesworth & F. Pendola. 2002. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 2890-2894.

Eppig, J., M.M. Viveiros, C.M. Bivens & R. de la Fuente. 2004. Regulation of mammalian oocyte maturation. In: Adashi E.Y. & P.C.K. Leung (Ed.). *The ovary.* p 113. Segunda edición. Elsevier, Nueva York.

Furshpan E.J. & D.D. Potter. 1959. Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J. Physiol.* 145(2):289-325.

Gershon, E., V. Plaks & N. Dekel. 2008. Gap junctions in the ovary: expression, localization and function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 282(1-2):18-25.

Gimlich, R.L., N.M. Kumar & N.B. Gilula. 1990. Differential regulation of the levels of three gap junction mRNAs in *Xenopus* embryos. *J. Cell. Biol.* 110(3):597-605.

Gittens, J.E. & G.M. Kidder. 2005. Differential contributions of connexin37 and connexin43 to oogenesis revealed in chimeric reaggregated mouse ovaries. *J. Cell. Sci.* 118(Pt 21):5071-8.

Goodenough, D.A. 1974. Bulk isolation of mouse hepatocyte gap junctions. Characterization of the principal protein, connexin. *J. Cell. Biol.* 61, 557-63.

Granot, I. & N. Dekel. 1994. Phosphorylation and expression of connexin-43 ovarian gap junction protein are regulated by luteinizing hormone. *J. Biol. Chem.* 269(48):30502-9.

Greenfield, L.J., J.T. Hackett & J. Linden. 1990a. *Xenopus* oocyte K⁺ current. I. FSH and adenosine stimulate follicle cell-dependent currents. *Am. J. Physiol.* 259 (5 Pt 1): C775-83.

Greenfield, L.J., J.T. Hackett & J. Linden. 1990b. *Xenopus* oocyte K⁺ current. II. Adenylyl cyclase-linked receptors on follicle cells. *Am. J. Physiol.* 259 (5 Pt 1): C784-91.

Hirst-Jensen, B.J., P. Sahoo, F. Kieken, M. Delmar & P.L. Sorgen. 2007. Characterization of the pH-dependent interaction between the gap junction protein connexin43 carboxyl terminus and cytoplasmic loop domains. *J. Biol. Chem.* 282:5801-5813.

Jordan, K., R. Chodock, A.R. Hand & D.W. Laird. 2001. The origin of annular junctions: A mechanism of gap junction internalization. *J. Cell. Sci.* 114:763-773.

Juneja, S.C., K.J. Barr, G.C. Enders & M. Kidder. 1999. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin 43. *Biol. Reprod.* 60: 1263-1270.

Kalma, Y., I. Granot, D. Galiani, A. Barash & N. Dekel. 2004. Luteinizing hormone-induced connexin 43 down-regulation: inhibition of translation. *Endocrinology.* 145(4):1617-24.

Kensler, R.W., P. Brink & M.M. Dewey. 1977. Glial cells in the earthworm ventral nerve cord make an A-type nexus. *Am. J. Anat.* 149(4):605-11.

Klein, S.L., D.S. Gerhard, L. Wagner, P. Richardson, L.M. Schriml, A.K. Sater, W.C. Warren & J.D. McPherson. 2006. Resources for Genetic and Genomic Studies of *Xenopus*. In: Liu, X.J. (Ed.). *Xenopus* protocols: Cell biology and signal transduction. p 1. Human Press. Ottawa.

Kusano, K., R. Miledi & J. Stinnakre. 1977. Acetylcholine receptors in the oocyte membrane. *Nature.* 270(5639):739-41.

Kusano, K., R. Miledi & J. Stinnakre. 1982. Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *J. Physiol.* 328:143-170.

Lacy, M.P., R.P. McIntosh & J.E. McIntosh. 1989. Angiotensin II stimulates an endogenous response in *Xenopus laevis* ovarian follicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159(2):658-63.

Landesman, Y., F.R. Postma, D.A. Goodenough & D.L. Paul. 2003. Multiple connexins contribute to intercellular communication in the *Xenopus* embryo. *J. Cell. Sci.* 116:29-38.

Larsen, W.J., S.E. Wert, L. Chen, P. Russell & E.M. Hendrix. 1991. Expansion of the cumulus-oocyte complex during the preovulatory period: Possible roles in oocyte maturation, ovulation, and fertilization. In Familiari, G., S. Makabe & P.M. Motta (Ed.). *Ultrastructure of the ovary.* p 45. Kluwer Academic Publishers, Nueva York.

Locovei, S., L. Bao & G. Dahl. 2006. Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(20):7655-9.

Makowski, L., D.L. Caspar, W.C. Phillips, D.A. Goodenough, P.N. Unwin & G. Zampighi. 2006. Transmisión sináptica. In: Levy, M.N., B.M. Koeppen & B.A. Stanton (Ed.). *Fisiología.* p 43. Cuarta Edición. Elsevier. Madrid.

Meşe, G., G. Richard & T.W. White. 2007. Gap junctions: basic structure and function. *J. Invest. Dermatol.* 127(11):2516-24.

Miledi, R. 1982. A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 215(1201):491-7.

Miledi, R. & R. M. Woodward, 1989 a. Effects of defolliculation on membrane current responses of *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 416: 601-621.

Miledi, R. & R.M. Woodward. 1989 b. Membrane currents elicited by prostaglandins, atrial natriuretic factor and oxytocin in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 416:623-43.

Miledi, R., I. Parker & K. Sumikawa. 1989. Transplanting receptors from brains into oocytes. In Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lectures. p 57. Raven Press, New York.

Panchin, Y., I. Kelmanson, M. Matz, K. Lukyanov, N. Usman & S. Lukyanov. 2000. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr. Biol.* 10(13): R473-4.

Parker, I. & Y. Yao. 1991. Regenerative release of calcium from functionally discrete subcellular stores by inositol trisphosphate. *Proc. Biol. Sci.* 246(1317):269-74.

Paul, D.L. 1986. Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J. Cell. Biol.* 103, 123-34.

Pelegri, P. & A. Surprenant. 2006. Pannexin-1 mediate large pore formation and interleukin-1 β release by ATP-gated P2X₇ receptor. *EMBO journal* 25: 5071-5082.

Procida, K., L. Jørgensen, N. Schmitt, M. Delmar, S.M. Taffet, N.H. Holstein-Rathiou, M.S. Nielsen & T.H. Braunstein. 2009. Phosphorylation of connexin43 on serine 306 regulates electrical coupling. *Heart. Rhythm.* 6(11):1632-8.

Qin, H., Q. Shao, S.A. Igdoura, M.A. Alaoui-Jamali & D.W. Laird. 2003. Lysosomal and proteasomal degradation play distinct roles in the life cycle of Cx43 in gap junctional intercellular communication deficient and competent breast tumor cells. *J. Biol. Chem.* 278: 30005-30014.

Revel, J.P. & M.J. Karnovsky. 1967. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell. Biol.* 33(3):C7-C12.

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.* 19:201-21.

Saez, J.C., V.M. Berthoud, M.C. Branes, A.D. Martínez & E.C. Beyer. 2003. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol. Rev.* 83(4):1359-400.

Saldaña, C., E. Garay, G.E. Rangel, L.M. Reyes & R.O. Arellano. 2009. Native ion current coupled to purinergic activation via basal and mechanically induced ATP release in *Xenopus* follicles. *J. Cell. Physiol.* 218(2):355-65.

Sánchez-Criado, J.E. 2005. Fisiología del ovario. In: Tresguerres, J.A.F. (Ed.). *Fisiología humana*. p 1060. Segunda edición. McGraw Hill, Madrid.

Sandberg, K., M. Bor, H. Ji, A. Markwick, M.A. Millan & K.J. Catt. 1990. Angiotensin II-induced calcium mobilization in oocytes by signal transfer through gap junctions. *Science.* 249(4966):298-301.

Sandberg, K., H. Ji, T. Iida & K.J. Catt. 1992. Intercellular communication between follicular angiotensin receptors and *Xenopus laevis* oocytes: mediation by an inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent mechanism. *J. Cell. Biol.* 117(1):157-67

Shestopalov, V.I. & Y. V. Panchin. 2007. Pannexins and gap junction protein diversity. *Cellular and molecular life sciences: C.M.L.S.* 65: 376-394.

Simon, A.M., D.A. Goodenough, E. Li & D.L. Paul. 1997. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature.* 385: 525-529.

- Stout, C.E., J.L. Costantin, C.C. Naus & A.C. Charles. 2002.** Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J. Biol. Chem.* 277(12):10482-8.
- Tong, D., T.Y. Li, K.E. Naus, D. Bai & G.M. Kidder. 2007.** *In vivo* analysis of undocked connexin43 gap junction hemichannels in ovarian granulosa cells. *J. Cell. Sci* 120: 4016-4024.
- Vanderhyden, B. 2002.** Molecular basis of ovarian development and function. *Frontier. Bioscience.* 7:d2006-2022.
- Vega, L.J. 2001.** Participación de la conexina 38 en la comunicación entre células foliculares y ovocito de *Xenopus laevis*. Tesis de Maestría en Ciencias, Instituto de Neurobiología, UNAM. Querétaro, México. 51 pp.
- Velázquez, J.A. & E. Mendieta. 2005.** Factores que regulan el desarrollo folicular II: Folículos antrales. *Encuentros en la Biología* 101: 1134-8496.
- Venance, L., N. Stella, J. Glowinski & C. Giaume. 1997.** Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signaling in cultured rat astrocytes. *J. Neurosci.* 17(6):1981-92.
- Weidmann, S. 1952.** The electrical constants of Purkinje fibres. *J. Physiol.* 118(3):348-60.
- White, T.W., H. Wang, R. Mui, J. Litteral & P.R. Brink. 2004.** Cloning and functional expression of invertebrate connexins from *Halocynthia pyriformis*. *FEBS. Lett.* 577(1-2):42-8.
- Wibrand, F., E. Honoré & M. Lazdunski. 1992.** Opening of glibenclamide-sensitive K⁺ channels in follicular cells promotes *Xenopus* oocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89(11):5133-7.
- Woodward, R.M. & R. Miledi. 1991.** Angiotensin II receptors in *Xenopus* oocytes. *Proc. Biol. Sci.* 22; 244(1309):11-9.
- Wyndham, J.M. 2006.** *Xenopus*. In: Wyndham, J.M. (Ed.). *Essential developmental biology.* p 67. Segunda edición. Blackwell publishing Ltd, Malden.
- Yamasaki-Mann, M., A. Demuro & I. Parker. 2009.** cADPR stimulates SERCA activity in *Xenopus* oocytes. *Cell. Calcium.* 45:293-299.
- Yen, M. R. & M. H. Saier. 2007.** Gap junctional proteins of animals: The innexin/pannexin superfamily. *Prog. in Biophys. Mol. Biol.* 94: 5-14.