

03040219



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA
CAMPUS UNAM-UAQ, JURIQUILLA QUERÉTARO

PARTICIPACIÓN DE LA CONEXINA 38 EN LA COMUNICACIÓN ENTRE
CÉLULAS FOLICULARES Y OVOCITO DE
Xenopus laevis

294505

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

P R E S E N T A

Lic. en Biol. LAURA JOSEFINA VEGA RIVEROLL

DIRECCIÓN DE TESIS:

Dr. ROGELIO ARELLANO OSTOA

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA

CAMPUS UNAM - UAQ JURQUILLA
Km. 15 CARRETERA QRO.-S.L.P.
JURIQUILLA, QRO. C.P 76230

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez

Director General de Administración Escolar, UNAM

Presente.

El Subcomité de la Maestría en Ciencias (Neurobiología) del 28 de junio del 2001, y en uso de las atribuciones del RGE y de las normas operativas del Programa de Posgrado al que se inscribió la alumna: VEGA RIVEROLL LAURA JOSEFINA, con número de cuenta 97843522, realizando el trabajo "**PARTICIPACIÓN DE LA CONEXINA 38 EN LA COMUNICACIÓN ENTRE CÉLULAS FOLICULARES Y OVOCITO DE *Xenopus laevis***" bajo la dirección del Dr. Rogelio Arellano Ostoa, designó el siguiente jurado:

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera	Presidente
Dr. Rogelio Arellano Ostoa	Secretario
Dr. Isaac Silva Barrón	Vocal
Dr. Mauricio Díaz Muñoz	Suplente
Dr. Alberto Pérez Samartín	Suplente

Sin otro particular, me despido de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Campus UNAM-UAQ, Juriquilla, Qro. a 02 de julio del 2001.

Dr. Raúl Paredes Guerrero
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del alumna.

INDICE

Resumen en español	i
Resumen en inglés	ii
Indice de figuras	iii
INTRODUCCIÓN	1
Comunicación ovocito célula folicular	7
Respuestas generadas en células foliculares	14
Corrientes que requieren la presencia de células foliculares	16
Corrientes de potasio	16
Corrientes F_{in}	16
Corrientes de cloro dependientes de calcio	17
Corrientes independientes de las células foliculares	17
Corriente I_C	17
ANTECEDENTES	19
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	22
MÉTODOS	23
Microinyección con oligonucleótidos	24
Electrofisiología	24
Síntesis del ADN complementario	25
Ampliación de secuencias de ADN por RCP	26
RESULTADOS	29
Identificación de las respuestas	29

Inhibición de la expresión de la conexina 38	32
Inhibición de I_C por aCx38 y su relación con las respuestas foliculares	33
Reacción en Cadena de la Polimerasa	38
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFÍA	45

RESUMEN

La foliculogénesis depende de la comunicación tanto química como eléctrica.

En el folículo ovárico de *Xenopus laevis* se expresan las conexinas (Cx) : Cx38, Cx41 y Cx43 proteínas responsables de la comunicación eléctrica. En el presente estudio se inhibió la expresión de Cx38 en el ovocito, por medio de la inyección de un oligonucleótido antisentido (aCx38) específico para esta conexina, con la intención de determinar como influye la carencia de ésta sobre el grado de comunicación entre células foliculares y ovocito, utilizando como índice de esta comunicación diversas corrientes iónicas con origen en las células foliculares. Para los registros de estas corrientes utilizamos la técnica de control de voltaje con dos microelectrodos.

Los resultados obtenidos de la amplificación de secuencias de ADN por RCP indicaron que la Cx38 es expresada en ovocitos pero no en células foliculares. Mientras que los estudios electrofisiológicos nos muestran que : 1) El oligonucleótido aCx38 efectivamente reduce en forma importante la amplitud de la corriente I_C , la cual es un índice de la presencia de Cx38 en la membrana del ovocito ; 2) Las respuestas de Cl^- llamadas F_{in} provocadas por ACh o ATP así como la respuesta llamada K^+-AMP_c generada por ADE, que involucran comunicación eléctrica, no presentaron cambios en ovocitos donde la I_C fue inhibida en alrededor del 95 % ; y 3) La corriente $I_{Cl(Ca)}$ generada por la activación de receptores a AII localizados en las células foliculares tuvo una disminución consistente de 70 % en ovocitos inyectados con aCx38, en este caso la comunicación es principalmente metabólica.

Estos resultados permiten sugerir que Cx38 tiene una importante participación en la comunicación metabólica entre el ovocito y las células foliculares, sin embargo, su participación en la comunicación eléctrica es mínima, o puede ser substituida por la expresión de otra conexina en el ovocito.

ABSTRACT

Folliculogenesis is dependent on both chemical and electrical communication. Connexins (Cx) which are the proteins that form the gap junctions are expressed in the *Xenopus* follicle. These three connexins, are Cx38, Cx41 and Cx43. In the present study the Cx38 expression was inhibited, by injecting into the oocyte specific anti-sense oligonucleotide (aCx38) for this connexin. This allowed to determine whether or not the lack of this connexin had influence on the communication between the follicular cells and the oocyte. For this was used as an index to evaluate this communication three different ionic currents with origin in the follicular cells. These currents were recorded using the voltage clamp technique with two microelectrodes, which were inserted into the oocyte.

Results obtained by amplifying DNA sequences by PCR indicated that Cx38 is expressed in the oocytes but not in the follicular cells. The electrophysiological studies showed that: 1) aCx38 strongly reduced the I_C current amplitude, this is an index of Cx38 expression in the oocyte membrane ; 2) the Cl⁻ currents named F_{in} elicited by ACh or ATP and the K⁺-AMPc currents generated by ADE, did not show changes in follicles where I_C was inhibited by 95% ; and 3) $I_{Cl(Ca)}$ generated by AII had a consistent 70% decrease in oocytes injected with aCx38.

These results support the idea that Cx38 might be important to maintain the metabolic communication between the oocyte and its follicular cells, while participation in the electrical communication.

Figura 1.- Esquema de los estadios del desarrollo del folículo ovárico de ratón.	2
Figura 2.- Diagrama de las diferentes capas que forman el folículo ovárico de <i>Xenopus</i>	6
Figura 3.- Estructura de las uniones comunicantes.	10
Figura 4.- Modelo molecular de la topología de las conexinas.	11
Figura 5.- Esquema del arreglo de los conexones.	11
Figura 6.- Diagrama de los canales iónicos y receptores de la membrana de la célula folicular.	15
Figura 7.- Esquema de las diferentes respuestas que se generan en folículo de <i>Xenopus</i>	15
Figura 8.- Esquema del método.	25
Figura 9.- Gráficas que contrastan la corriente I_C con la respuesta a ADE y ACh.	32
Figura 10.- Esquema que muestra las respuestas F_{in} e I_C	34
Figura 11.- Gráfica y corriente típica generada en respuesta a ADE.	35
Figura 12.- Gráfica y corriente típica generada en respuesta a ACh.	36
Figura 13.- Gráfica y corriente típica generada en respuesta a ATP.	36

Figura 14.- Gráfica y corriente típica generada en respuesta a solución ringer sin Ca^{++}	37
Figura 15.- Gráfica y corriente típica generada en respuesta a AII.	38
Figura 16.- Fotografía de una electroforesis de productos obtenidos por RCP.	39

**PARTICIPACIÓN DE CONEXINA 38
EN LA COMUNICACIÓN ENTRE CÉLULAS FOLICULARES Y OVOCITO DE
Xenopus laevis.**

INTRODUCCIÓN.

La foliculogénesis ovárica consiste de una serie de eventos que promueven el crecimiento y la diferenciación tanto de las células germinales como de sus células somáticas, y que culmina con la producción de un ovocito que puede ser fertilizado y comenzar el subsecuente desarrollo embrionario. El contacto célula somática- célula somática y la comunicación de éstas con las células germinales son necesarias para la sobrevivencia y el desarrollo del ovocito.

El proceso de la ovogénesis (fig. 1) incluye varios pasos :

1) Durante el desarrollo embrionario, el primordio de ovario es dotado con un número finito de células germinales, las cuales juegan un papel importante en la inducción del mismo desarrollo gonadal, al grado que no hay formación de estructuras gonadales en la ausencia de las células germinales.

2) Diferenciación de las células germinales en ovogonias, las cuales incrementan en número a través de divisiones mitóticas.

3) Cese de la mitosis (ovogonia) e inicio de la meiosis (ovocito primario). En el folículo primordial se observa al ovocito rodeado de células somáticas planas (pregranulosa).

4) Arresto prolongado del proceso de meiosis . En el folículo primario encontramos al ovocito rodeado de células de la granulosa cúbicas.

5) Crecimiento del ovocito y formación del folículo secundario, junto con la proliferación de las células de la granulosa, la formación de la zona pelucida (capa glicoproteica) alrededor del ovocito y el establecimiento de uniones especializadas entre el oolema y células de la granulosa.

6) En la fase preantral las célula de la granulosa parecen ser una población homogénea desde el punto de vista morfológico e inmunológico y adquieren receptores de alta afinidad para la hormona estimulante del folículo (FSH) y a hormonas esteroides. Además las células somáticas del tejido intersticial

adyacente se diferencia en células de la teca y forman la cubierta celular externa del folículo. En la fase antral, la cual se inicia en respuesta a la FSH secretada por la pituitaria anterior, se acumulan fluidos entre células de la granulosa. Una cavidad central el antrum folicular es formada por las células murales de la granulosa localizadas en la periferia. El ovocito permanece rodeado y estrechamente asociado con células de la granulosa (aproximadamente 2000 por ovocito en ratón), esto forma el complejo células del cumulus ovocito. En la etapa final del crecimiento folicular las células murales de la granulosa localizadas en diferentes regiones del folículo adquieren una morfología y propiedades diferentes.

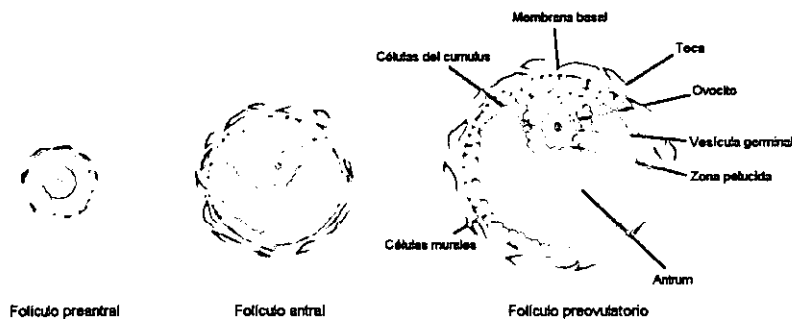


Figura 1.- Esquema de los estadios del desarrollo del folículo ovárico de ratón. Estadio preantral, el folículo mide de 50 a 200 μm , el ovocito casi ha alcanzado su máximo tamaño, ya está presente la zona pelúcida, le rodean varias capas de células de la granulosa y la teca interna crece. Estadio antral, el folículo mide aprox. 250 a 500 μm , el ovocito ha alcanzado su máximo tamaño 85 μm y la zona pelúcida su mayor grosor, se inicia la formación del antrum. Estadio preovulatorio, el folículo mide aproximadamente 600 μm y hay mayor acumulación de fluido folicular. Modificado de Wright et al 2001.

7) Al final de la fase antral el ovocito completa la segunda reducción meiótica del proceso de meiosis y se lleva a cabo la ovulación. Los cambios morfológicos y funcionales que sufren las células somáticas durante la foliculogénesis son promovidos en parte a través de la interacción de las mismas

células con sus vecinas ; y de forma fundamental están involucrados una gran cantidad de fenómenos fisiológicos regulados sistémicamente por hormonas y otros mensajeros químicos producidos a diferentes niveles del sistema de control hipofisiario. También juegan un importante varias moléculas originadas en el mismo folículo ovárico. Numerosos estudios han demostrado que las células de la granulosa influyen sobre diversas funciones del ovocito durante el desarrollo folicular (Salustri et al., 1993 ; Eppig, 1993). Por ejemplo, en un trabajo realizado en mamífero (Eppig, 1979) , los ovocitos fueron aislados en un estadio intermedio de crecimiento, se observó que no podían crecer en cultivo sin la asociación directa de células de la granulosa. Los resultados sugieren que esto es debido en parte a que las uniones comunicantes, entre ovocito y células de la granulosa, transfieren de estas últimas al citoplasma del ovocito sustancias de bajo peso molecular, principalmente nutrientes y precursores metabólicos. Además de este papel nutricional, las células de la granulosa parecen regular el crecimiento del ovocito de manera más específica, ya que al establecer uniones comunicantes heterólogas entre un ovocito y células somáticas diferentes a las de la granulosa, se logra mantener vivo al ovocito pero sin promover su crecimiento (Eppig, 1979). Las interacciones entre las células de la granulosa y el ovocito también parecen regular la progresión de la meiosis (Salustri et al., 1993). La meiosis es un proceso fundamental para la reproducción que ocurre únicamente en las células germinales y reduce el número de cromosomas de un número diploide a uno haploide. En el periodo fetal los ovocitos de los vertebrados generalmente son detenidos durante la meiosis en la profase I. Cuando logra su máximo crecimiento el ovocito, prosigue el proceso de meiosis, ocurriendo entonces la primera división. La segunda división meiótica es iniciada inmediatamente después de terminada la primera, pero el proceso es detenido nuevamente en la metafase II, hasta la penetración del espermatozoide (Eppig, 1993). En el arresto meiótico del ovocito en mamíferos influyen varios elementos, entre los más importantes están el mantenimiento de la comunicación entre los componentes del folículo y la presencia de diversas sustancias en el líquido folicular. Así los ovocitos desnudos en cultivo que han sido aislados del folículo, maduran espontáneamente (Hillensjö

et al., 1980). En condiciones fisiológicas los ovocitos en folículos preovulatorios reinician la meiosis ante un aumento de la hormona luteinizante (LH). La capacidad de la LH para liberar al ovocito de su arresto meiótico es debida a las acciones de esta hormona sobre las células de la granulosa, que a su vez envían una señal de maduración al ovocito (Salustri, et al., 1993).

Como se sabe las hormonas gonadotrópicas, FSH y LH, tienen un papel fundamental en la estimulación del desarrollo folicular. Ambas son hormonas glicoprotéicas secretadas por la hipófisis anterior bajo la influencia de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que es liberada por el hipotálamo.

La inducción experimental de bajos niveles de gonadotropinas circulantes, ya sea por hipofisectomía o por el uso de antagonistas de GnRH, provoca una marcada reducción en el número de folículos en desarrollo en una gran variedad de especies incluyendo : rata, ratón, hamster, cobayo y oveja. Además la recuperación del crecimiento folicular puede ser observada cuando se inyecta a estos animales con gonadotropinas. En mujeres existe un número de condiciones clínicas que demuestra la importancia que las gonadotropinas tienen sobre el desarrollo del folículo ovárico. En pacientes con el síndrome de Kallmann, condición que se caracteriza por la ausencia de secreción de GnRH y por lo tanto bajos niveles de LH y FSH, resulta difícil observar folículos que se desarrollen más allá de la etapa primordial. Por otra parte mujeres con síndrome de ovario resistente a gonadotropinas, el desarrollo folicular está limitado al folículo en estadio primordial y algunos en estadio primario.

También estudios recientes con ratones transgénicos a los cuales les es provocado el bloqueo de la expresión de genes específicos confirman la importancia de los estrógenos y la progesterona en el desarrollo folicular, así como un amplio número de otras sustancias que también son importantes (FSH, activina, etc.) (Van Voorhis, 1999). En ratones sin receptores a estrógenos, se ha observado infertilidad y en un exámen histológico a los ovarios se observa la presencia solamente de folículos primordiales, primarios y secundarios. Este estudio demuestra la importancia de los estrógenos en la modulación en las etapas finales del desarrollo folicular al menos en el ratón. Los ratones sin

receptores de progesterona, son también infértiles debido al menos en parte a su incapacidad para ovular. Un exámen histológico del ovario revela folículos ováricos maduros los cuales no pueden ovular y en consecuencia formar el cuerpo luteo. Esto demuestra que la progesterona puede no tener un papel importante en el desarrollo folicular pero puede jugar un papel central en la ovulación.

En algunas especies las hormonas no son las señales para el reinicio de la meiosis, en estos casos algunos neurotransmisores parecen actuar como moduladores de esta función. Por ejemplo en ovocitos de *Spisula* (bivalvo marino) se ha propuesto que la serotonina (5-HT) remueve el bloqueo de la meiosis, de acuerdo con esto, experimentalmente los antagonistas de serotonina bloquean el proceso.

En el caso de los anfibios la maduración o liberación del ovocito del arresto meiótico, es debido a la progesterona (Masui and Clark, 1979). Además estudios realizados en cultivo, muestran que las condiciones iónicas externas juegan un papel importante en los procesos de maduración de los ovocitos de anfibio (Schorderet-Slatkine, 1976 ; Baltus et al., 1977 ; Bellé et al., 1986). Evidencias aportadas por diversos grupos de trabajo sugieren que el Ca^{++} y el Mg^{++} juegan un papel importante en los procesos de maduración (Merriam, 1971 ; Baltus 1977).

La mayor parte de los antecedentes hasta ahora descritos aquí, son resultado de estudios hechos en mamíferos y para este trabajo será importante apuntar algunas características distintivas del folículo ovárico de *Xenopus laevis* (fig. 2). Este es un sistema celular complejo consistente del ovocito per se, rodeado de varias capas celulares y no celulares. Las diferentes capas que rodean al ovocito son las siguientes: la más interna es una capa acelular llamada vitelina (zona pelucida en mamífero), ésta separa al ovocito de una monocapa de células foliculares que se encuentra rodeada a su vez de una membrana basal, formada principalmente por fibras de colágeno (Dumont, 1972) en comparación con mamífero en *Xenopus* no se forman varias capas de células foliculares. La membrana basal marca una separación entre las células foliculares y los tejidos de la teca externa entre los que se encuentran además fibroblastos y vasos sanguíneos. Finalmente la capa celular más externa del folículo es la del epitelio

interno (teca) del ovario, sin embargo al igual que en mamífero, durante el desarrollo del gameto las células foliculares extienden prolongaciones membranales a través de pequeñas perforaciones de la cubierta vitelina para hacer contacto con microvellocidades de la membrana del ovocito (Browne et al., 1984). Ha sido demostrado por varias técnicas de microscopía que en muchos de estos puntos de contacto membranales, las células foliculares se encuentran eléctrica y metabólicamente comunicadas (acopladas) con el ovocito, y que este tipo de comunicación es importante para el adecuado desarrollo del gameto (Shultz, 1985). Como en otros sistemas es probable que este acoplamiento entre los dos tipos celulares a través de uniones comunicantes, sea importante para un adecuado desarrollo del gameto y las células foliculares.

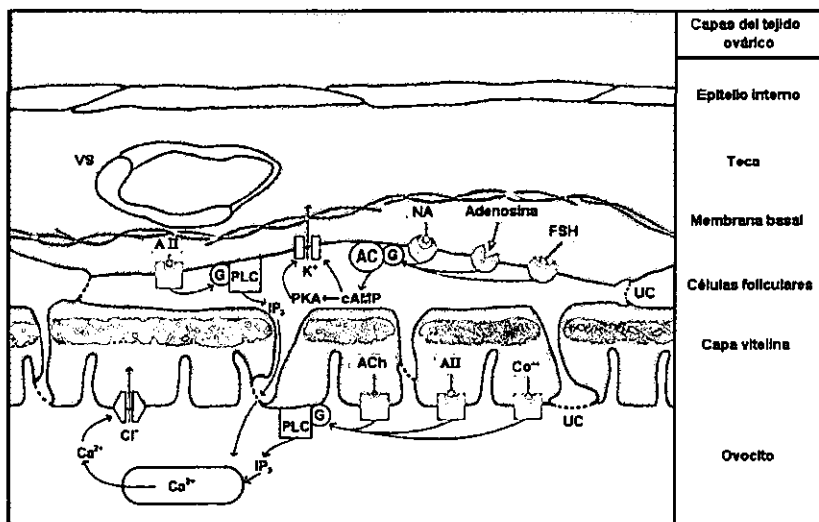


Figura 2.- Diagrama de las diferentes capas que forman el folículo ovárico de *Xenopus*. VS - vasos sanguíneos ; UC - uniones comunicantes ; G - proteínas G ; AC - adenilato ciclasa ; PKA proteína cinasa A ; PLC - fosfolipasa C ; FSH - hormona folículo estimulante ; NA noradrenalina ; A II - angiotensina II ; ACh acetilcolina. (Modificada de Arellano et al 1996).

En términos generales, la intercomunicación metabólica y eléctrica entre estos tipos celulares, participa en el mantenimiento de un adecuado microambiente para el ovocito. También existe una importante comunicación

parácrina a través de la secreción de diversas sustancias (Buccione et al., 1990). Especialmente las células foliculares son responsables de la producción y secreción de esteroides (Shultz, 1985), así como de otros factores que promueven el crecimiento y la maduración del ovocito (Mulner & Ozon, 1981).

Comunicación ovocito-celula folicular.

La comunicación entre células foliculares y ovocito puede ser de naturaleza química, por ejemplo a través de hormonas, neurotransmisores y péptidos, que son secretados por las células foliculares y que inducen respuestas en el ovocito o viceversa. El ejemplo típico de esta comunicación es la producción y secreción de hormonas esteroides por las células foliculares. Los esteroides liberados al medio actúan sobre receptores en la membrana del ovocito, y en el caso de progesterona promueven su maduración (Mulner, et al., 1978). Trabajos recientes en mamífero sugieren, la síntesis de neurotransmisores en el propio folículo (Mayerhofer, et al, 1998 ; Fritz, et al, 1999)

En folículos de *Xenopus* encontramos respuestas a varios neurotransmisores y hormonas, como catecolaminas, agonistas colinérgicos y purinérgicos, gonadotropinas y prostaglandinas. Todos estos agonistas parecen actuar sobre poblaciones específicas de receptores. La mayoría de estos receptores están localizados en la membrana de las células foliculares (Arellano et al., 1996), sin embargo generalmente la membrana del ovocito presenta también receptores colinérgicos y a angiotensina II (A II) (Kusano et al., 1977, 1982 ; Woodward & Miledi 1991). Los receptores foliculares se acoplan preferentemente a dos de los sistemas de segundos mensajeros mejor conocidos, el de la adenilato ciclasa y el de la fosfolipasa C (FLC). La activación del primer sistema membranal estimula la síntesis de AMPc que a su vez activa canales selectivos a K^+ (Kusano et al., 1982 ; Miledi & Woodward, 1989) y Cl^- (Arellano & Miledi 1994) localizados en la membrana de las células foliculares. El segundo sistema provoca la apertura de canales de Cl^- que dependen de un incremento intracelular de calcio (Miledi, 1982 ; Parker & Miledi, 1986, 1987). Aunque la activación de FLC ocurre principalmente en la membrana del ovocito a través de la

activación de receptores específicos a diversas sustancias (e.g., la acetilcolina, un factor del suero, cationes divalentes, etc. Miledi et al., 1989), la estimulación de esta enzima membranal puede ocurrir también en las células foliculares a través de receptores para A II (Sandberg et al., 1992). En este caso específico la activación de FLC por A II en células foliculares aumenta la síntesis de IP_3 en estas células, el IP_3 parece difundir al citoplasma del ovocito a través de uniones comunicantes (comunicación metabólica) provocando la liberación de calcio en el citoplasma del ovocito y la activación de canales de Cl^- dependientes de Ca^{++} en su membrana, generando una corriente llamada $I_{Cl(Ca)}$.

El acoplamiento eléctrico y metabólico a través de uniones comunicantes entre el ovocito y las células foliculares podría jugar un papel fisiológico importante en el desarrollo del folículo, pero los eventos específicos con los que se relaciona aún no han sido estudiados por completo. En el folículo las uniones comunicantes pueden establecerse entre células homólogas (célula folicular-célula folicular) o heterólogas (célula folicular-ovocito). En otros sistemas la comunicación entre células homólogas permite la sincronización de las células (e.g., el tejido cardíaco y circuitos neuronales). En el caso de las uniones heterólogas su papel todavía no es claro, sin embargo se ha especulado que este tipo de contactos permite que una célula que posee cierto tipo de receptores membranales, transfiera información vía segundos mensajeros a las células acopladas que carecen de ellos. Un ejemplo de este tipo podría estar representado en el folículo por la respuesta generada por la aplicación de A II (mencionada anteriormente) transferida de las células foliculares al ovocito.

La base molecular de las uniones comunicantes o sinapsis eléctricas, son las conexinas. Los primeros estudios donde se sugiere la existencia de uniones comunicantes entre las células, son los realizados por Weidman en 1952 en músculo cardíaco, donde observó que la propagación de la corriente eléctrica era mayor que la estimada para el tamaño de una célula, sugiriendo que la corriente se propaga desde una célula a otra a través de una vía de baja resistencia eléctrica (Weidmann, 1952). Robertson hace las primeras observaciones de las

uniones comunicantes en cerebros de carpa dorada, y describe el patrón hexagonal de estas estructuras (Robertson, 1963). Barr y Berger con base en estudios de propagación del potencial de acción en músculo cardíaco de rana propusieron que : “ciertas partes de la superficie celular deben estar especializadas para permitir un flujo apreciable de corriente entre el interior de las células”. Ellos mismos hacen estudios de micrografía electrónica que muestran los llamados “nexus” los cuales son caracterizados como regiones del músculo cardíaco donde las membranas de las células vecinas están fusionadas (ahora se sabe que realmente las membranas mantienen su individualidad). Se propone que los “nexus” sirven para la transmisión eléctrica entre células adyacentes y que este acoplamiento significa una ruta de baja resistencia para el flujo de corriente entre los flujos celulares (Barr et al., 1965).

Es hasta 1967 con los trabajos de micrografía de Revel y Karnovsky que se habla de uniones comunicantes en músculo cardíaco de rata, con la misma estructura hexamérica que aquella observada por Robertson en cerebro de pez.

Las uniones comunicantes tienen como base molecular a las conexinas, proteínas que forman hemicanales hexaméricos en la membrana celular, son expresadas en la mayoría de los tejidos y una sola célula puede expresar más de un subtipo diferente de conexinas (Barrio et al., 1991). Son codificadas por una familia de genes que debieron aparecer en forma temprana en la evolución de los organismos multicelulares (Trosko, et al., 1993) ; esta familia de genes es altamente conservada (Bennett, 1997) y en la membrana forman estructuras llamadas conexones (hemicanales) la cual está compuesta por seis moléculas de conexina. Las conexinas se encuentran distribuidas diferencialmente en los tejidos así como durante el desarrollo y la diferenciación. Las regiones conservadas de estas proteínas se encuentran localizadas en las regiones transmembranales y en las regiones externas de unión. Con la excepción de algunas células altamente especializadas (e.g. glóbulos rojos, espermatozoides maduros y miocitos del músculo esquelético), la mayoría de las células de organismos pluricelulares, están acopladas a través de uniones comunicantes, (fig. 3) (Trosko, et al., 1993 ; Saez, J.C. 1996).

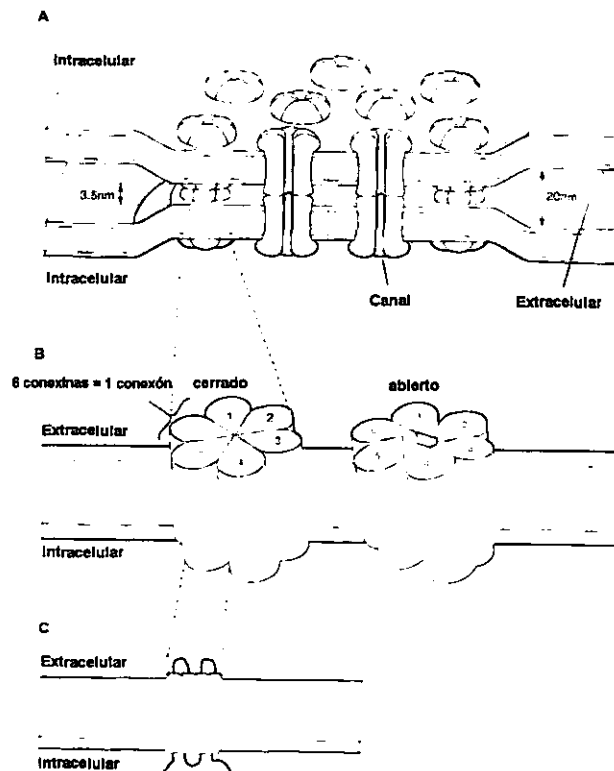


Figura 3.- Estructura de las uniones comunicantes. **A** - placas de unión, formación del canal completo. **B** - hemicanal en la membrana celular. Y **C** - estructura de la conexina. (Modificado de Kandel, 1995).

Las conexinas presentan una estructura primaria altamente homóloga. Los análisis de hidrofobicidad de sus secuencias aminoacídicas predicen cuatro segmentos transmembranales, cada uno de aproximadamente 20 aminoácidos, debido a esta característica se les considera proteínas transmembranales clase III. Tres de los segmentos transmembranales están predominantemente constituidos por aminoácidos hidrofóbicos. El tercer segmento transmembranal, contando desde el NH₂ terminal, presenta una hélice anfipática que se cree que expone su cara hidrofílica hacia el poro del canal. Varias de las características topológicas de las conexinas localizadas en la membrana citoplásmica han sido demostradas experimentalmente e indican que existen dos dominios extracelulares, cuya secuencia está bien conservada; estas regiones participan en

el proceso de reconocimiento conexón-conexón, para la formación de un canal completo (fig. 4) (Laird, 1996; White, & Bruzzone 1996; Saez, J.C. 1996). Cada hemicanal (conexón) es aportado por una de las células vecinas para establecer la comunicación. Los canales que se forman pueden ser homoméricos o heteroméricos, es decir que los hemicanales que se acoplan sean del mismo tipo de conexina o estén cada uno formado por una conexina distinta. La formación de canales heteroméricos es un proceso regulado por un código de compatibilidad entre las conexinas, en este proceso se encuentran involucradas las secuencias de identidad. (White, & Bruzzone 1996) (fig. 5).

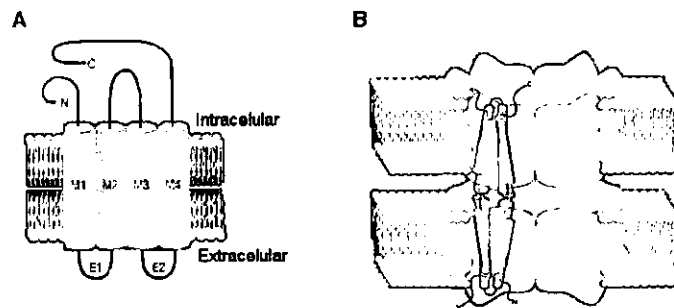


Figura 4.- Modelo molecular de la topología de las conexinas. **A** - los cilindros representan los dominios transmembranales (M1-M4). Las asas entre el primero y el segundo así como entre el tercero y el cuarto dominios transmembranales son extracelulares E1 y E2. **B** - las seis subunidades de conexina formando un hemicanal en cada una de las membranas de las células adyacentes para formar un canal comunicante. (Modificado de Kumar y Gilula, 1996).

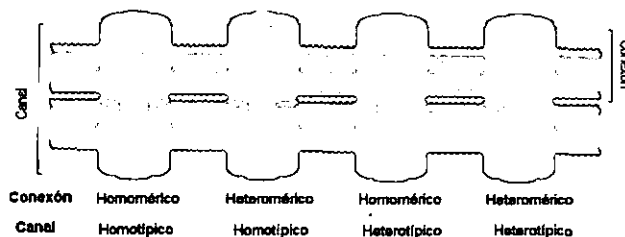


Figura 5.- Esquema de las posibles combinaciones de diferentes conexinas para la formación de hemicanales y canales completos de unión comunicante. (Modificado de Kumar y Gilula 1996).

La estabilidad de las uniones comunicantes parece lograrse cuando varios canales se unen para formar una placa. El grado de acoplamiento eléctrico y/o metabólico entre células adyacentes de un tejido, depende del tamaño y la cantidad de uniones comunicantes presentes y del estado funcional de cada canal (Saez, J.C., 1996). El número total de canales depende de la vida media de sus componentes moleculares, es decir, de las velocidades de síntesis y degradación. Las proteínas de uniones comunicantes son consideradas como proteínas dinámicas, debido a que en contraste con muchas otras proteínas de membrana, su vida media se encuentra entre 1 y 3 horas (Berthoud, 2000), por ejemplo la vida media de CX32 en células hepáticas de roedores fluctúa entre 2.5 y 5 horas dependiendo de las condiciones experimentales, Cx45 de miocitos ventriculares de rata y Cx43 de cristalino de pollo tienen una vida media menor a tres horas.

En varios sistemas celulares acoplados la comunicación eléctrica es regulada a través de neurotransmisores y hormonas, la regulación de los canales de unión tienen importantes efectos en la fisiología de estos sistemas por ejemplo en mamíferos, justo antes del parto, ocurre un cambio en la concentración de hormonas circulantes, consistente en un incremento en estrógenos, prostaglandinas F2, E1 y E2, así como un decremento en la concentración de progesterona y prostaglandina I2. Estos cambios hormonales ocurren paralelamente con la expresión de un gran número de uniones comunicantes entre las células del miometrio incrementando el acoplamiento eléctrico y la cooperación metabólica. Estas y otras observaciones sugieren que la síntesis de conexinas está bajo el control de estrógenos, a través de la activación de un receptor nuclear a esteroides (Garfield et al, 1980).

En casos como por ejemplo el músculo cardíaco de rata (White, et al, 1990), neuronas de invertebrados (Arellano et al., 1990), numerosos estudios sugieren que tanto el pH como las concentraciones de Ca^{++} , son importantes para modular la conductancia de las uniones. Por ejemplo la resistencia en las células de Purkinje se incrementa en un 30% cuando el pH intracelular se reduce de 7.4 a 6.8. También al acidificar el medio intracelular con CO_2 a miocitos ventriculares de rata puede observarse una disminución en la conductancia. Además parece que

esta acidificación del medio intracelular se relaciona con un incremento del Ca^{++} intracelular que favorece o actúa sinérgicamente para provocar la disminución de la conductancia. Ha sido sugerido que estos cambios en la permeabilidad de la unión, pueden tener desde el punto de vista fisiológico un papel importante, al limitar la propagación de un daño cuando una parte del corazón sufre una lesión.

Los cambios en las concentraciones de Ca^{++} intracelular y la disminución en el pH se observan durante la isquemia cardiaca. En áreas de infarto, el cierre de las uniones comunicantes impide el paso de corrientes y metabolitos hacia las células sanas adyacentes, limitando el área de necrosis. (Tamargo y Delpon, 1992).

Ha sido sugerido que la calmodulina podría mediar los efectos del Ca^{++} sobre las uniones comunicantes. Con la intención de probar la participación de la calmodulina en el acoplamiento celular, un grupo de investigadores, inhibieron específicamente la expresión de la calmodulina (con oligonucleótido antisentido) en ovocitos de *Xenopus* expresando la conexina 38 nativa. En estos estudios utilizaron ovocitos defoliculados que fueron apareados por el polo vegetal, para realizar posteriormente registros eléctricos y cuantificar el grado de acoplamiento entre ellos. Las parejas de ovocitos control (sin inyección del antisentido de calmodulina), se desacoplan al disminuir el pH intracelular por la perfusión de una solución burbujeada con CO_2 , mientras que las inyectadas con oligonucleótido antisentido para calmodulina, pierden progresivamente la capacidad de desacoplarse en presencia del CO_2 . Este efecto inhibitorio sobre la regulación de la conductancia de unión fue de un 60% a las 24 h, un 76% a las 48 h y un 93% a las 72 h, posteriores a la inyección del oligonucleótido antisentido. Estos resultados sugieren que un pH intracelular bajo, desacopla las uniones comunicantes a través de un mecanismo mediado por Ca^{++} -Calmodulina (Peracchia et al, 1996).

Las conexinas pueden ser reguladas también a nivel post transcripcional, a través de la fosforilación o defosforilación en residuos de serina y treonina, que se encuentran presentes en la región carboxi-terminal de algunas conexinas. La fosforilación de las conexinas no parece necesaria en la formación de uniones

comunicantes funcionales, sin embargo parece afectar la permeabilidad y propiedades electrofisiológicas. Existen trabajos que sugieren que la fosforilación regula la cinética del tráfico de proteínas, apertura y recambio (Cooper et al 2000).

El mecanismo por el cual las uniones comunicantes son removidas de la membrana celular y/o desensambladas no ha sido bien estudiado. Uno de los primeros modelos para la remoción de uniones está basado en la identificación de una estructura intracelular de doble membrana la cual fue definida como unión comunicante anillada. Hasta ahora no hay evidencia de que las conexinas que constituyen a las uniones comunicantes sean recicladas hacia la superficie celular. Varias evidencias sugieren que los lisosomas están involucrados en la degradación de las conexinas (Laird, 1996). Trabajos recientes proponen también la participación de los proteosomas (Berthoud, et al, 2000).

Respuestas generadas en células foliculares.

Como se mencionó anteriormente, una parte importante de la comunicación entre células foliculares y ovocito se da a través de uniones comunicantes. El que esta comunicación exista permite que podamos registrar algunas corrientes, monitoreadas por electrodos insertados en el ovocito, que tengan su origen en la membrana de la célula folicular y no en la membrana del ovocito, en consecuencia variaciones en estas corrientes pueden ser resultado de un cambio en el nivel de acoplamiento del ovocito con las células foliculares.

En el contexto del siguiente estudio es importante hacer una breve descripción de las respuestas que son generadas en las células foliculares (fig. 6).

Las respuestas eléctricas del foliculo pueden ser divididas en : 1) corrientes que requieren la presencia de las células foliculares y 2) corrientes que son independientes de estas, es decir corrientes que se originan en el ovocito.

Como respuesta a la activación de receptores específicos a diversas sustancias el foliculo genera varias corrientes iónicas membranales (fig. 7).

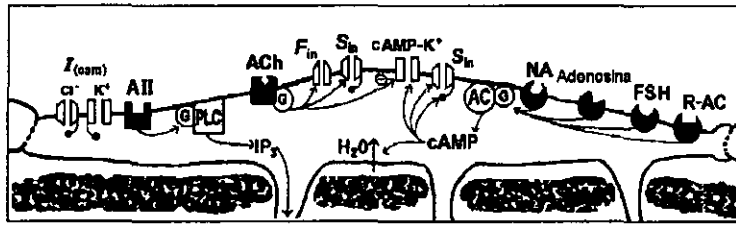


Figura 6. - Diagrama de canales iónicos y receptores de membrana de la célula folicular, y las vías de señalización que actúan. (Modificado de Arellano et al 1996).

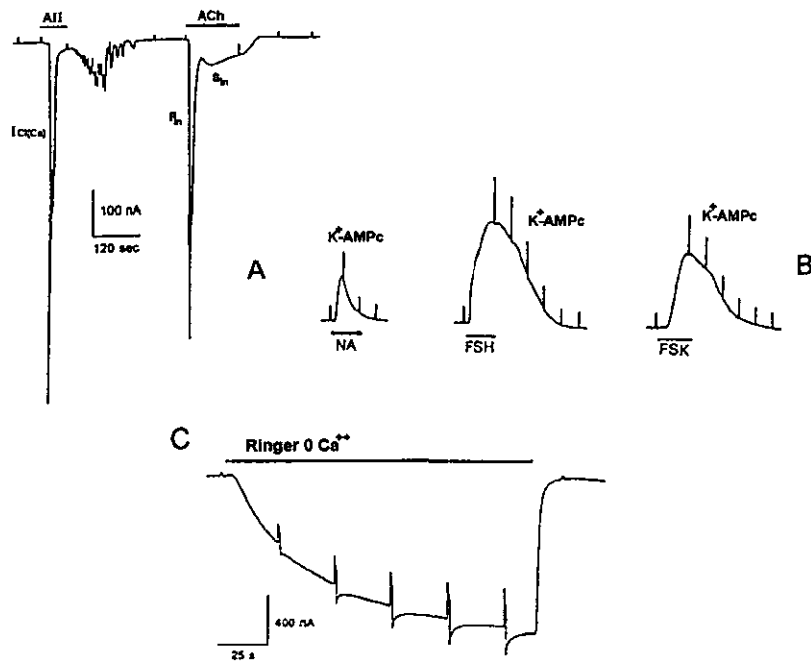


Figura 7. - Esquema de las diferentes respuestas que se generan en foliculo de *Xenopus*. **A** - respuesta $I_{Cl(Ca)}$ generada por AII y corriente F_{in} en respuesta a ACh. **B** - corrientes K^+-AMP_c en respuesta a NA, FSH y FSK. **C** - corriente I_C como respuesta a ringer libre de Ca^{++} . (Modificado de Arellano et al, 1996).

1) Corrientes que requieren la presencia de células foliculares

Corrientes de potasio, K^+ - AMP_c .

Existen varios neurotransmisores, péptidos y hormonas que producen en el folículo de *Xenopus* corrientes de K^+ . Hay dos grupos de corrientes que muestran una clara diferencia en sus mecanismos de acción, sugiriendo que estas respuestas son debidas al menos a la activación de dos vías. Estos dos grupos son : 1) AMP_c - K^+ y 2) corrientes de K^+ activadas por ACh y ATP.

Las respuestas AMP_c - K^+ son las más ampliamente estudiadas, fueron descritas inicialmente por su activación por catecolaminas como la adrenalina, dopamina y serotonina. Los receptores activados en el caso de la adrenalina son β -adrenérgicos. También la hormona folículo estimulante (FSH) activa estas corrientes de potasio que son generadas a través de la síntesis de AMP_c (Woodward and Miledi, 1987 ; Greenfield et al., 1990). Otras sustancias que pueden generar este tipo de respuesta son adenosina, prostaglandinas y oxitocina, todas actuando sobre receptores específicos localizados en la membrana de células foliculares (Arellano et al., 1996). Algunas sustancias que favorecen la apertura de los canales de K^+ , las cuales mimetizan algunos aspectos de las corrientes foliculares de AMP_c - K^+ , han mostrado una potenciación en el porcentaje de rompimiento de la vesícula germinal en ovocitos tratados ya sea con gonadotropinas o progesterona. Esto sugiere una participación de estos canales en el proceso de maduración del ovocito (Arellano et al., 1996).

Corriente F_{in} .

Otra respuesta que podemos observar como resultado de la activación de receptores muscarínicos o purinérgicos, es una corriente entrante con un curso temporal rápido que llamamos corriente F_{in} (Arellano & Miledi, 1993 ; Arellano y cols., 1998). Esta corriente es generada por la apertura de canales de Cl^- . Los mecanismos de activación de los canales F_{in} aún no han sido definidos en detalle,

pero sabemos que receptores y canales, así como el sistema membranal de acoplamiento entre ellos debe estar localizado en las células foliculares. Debido a esto y como en el caso de las corrientes AMP_C-K^+ pensamos que las modificaciones del acoplamiento entre células foliculares y ovocito influirán directamente en nuestra capacidad de detección de corrientes F_{in} .

Corrientes de Cl^- dependientes de Ca^{++} ($I_{Cl(Ca)}$).

Esta corriente es generada en el ovocito a través de la estimulación de receptores membranales, localizados regularmente en el ovocito mismo, por ejemplo a ACh, su activación promueve la síntesis de IP_3 y el incremento de Ca^{++} intracelular, este incremento resulta en la activación de canales de Cl^- dependientes de Ca^{++} (Miledi, 1982 ; Parker and Miledi, 1986, 1987). Esta corriente que llamaremos $I_{Cl(Ca)}$ es generada por la estimulación de receptores nativos, por ejemplo: ACh, cationes divalentes y un factor del suero. Como se mencionó anteriormente esta corriente también puede ser activada por receptores a A II localizados en la membrana de las células foliculares, en este caso la comunicación entre células foliculares y ovocito permite que el IP_3 sintetizado por la estimulación de A II, difunda al citoplasma del ovocito vía uniones comunicantes, en donde promueve la liberación de Ca^{++} y la activación de los canales de Cl^- en la membrana. Pensamos que una alteración en el grado de acoplamiento entre los dos compartimientos citoplásmicos, influirá sobre la difusión de IP_3 generado por la estimulación de receptores a AII y esto podría entonces afectar la generación de $I_{Cl(Ca)}$ en el ovocito. El comportamiento de esta respuesta podría ser un índice indirecto de la comunicación metabólica entre células foliculares y ovocito.

2) Corrientes independientes de las células foliculares.

Corriente I_C .

Los ovocitos que son expuestos a solución Ringer con una baja concentración de cationes divalentes (Ca^{++} y Mg^{++}) generan una corriente iónica

asociada con un incremento en la conductancia de la membrana que llamamos I_C (Arellano et al., 1995). Esta corriente es acarreada principalmente por los cationes Na^+ y K^+ , y es el resultado de la remoción del efecto bloqueador de cationes divalentes, sobre una población específica de canales que ha sido identificada recientemente como hemicanales de conexina 38 (Ebihara, 1996 ; Zang et al, Arellano y Garay, resultados no publicados).

ANTECEDENTES

La participación fundamental de la comunicación celular vía uniones comunicantes durante el desarrollo de las células foliculares y el ovocito ha sido demostrada en varios estudios (Eppig, 1979 ; Simon et al 1997 Juneja et al 1999). Un ejemplo importante en este contexto es el estudio realizado en ratones a los cuales les fue bloqueada la expresión del gen que codifica para la principal conexina en el ovocito de mamífero, la Cx37, y que ha mostrado ser un componente esencial en la formación de uniones comunicantes entre el ovocito y las células del cumulus. Los resultados de su inhibición mostraron que los roedores que no expresan Cx37 son infértiles debido a la ausencia de desarrollo de los folículos ováricos. Esto aparentemente es una consecuencia directa de la falta de señales mediadas por las uniones comunicantes, provocando que los ovocitos no completen su desarrollo y puedan entonces ser ovulados (Simon et al 1997). También ratones hembra a los que les fue bloqueada la expresión de Cx43 (Juneja et al, 1999), la conexina principal de las células de la granulosa, muestran que las gónadas son de tamaño reducido en relación con las de individuos normales y esto en apariencia es debido a una menor cantidad de células germinales, de forma importante los folículos de estos ratones sólo logran desarrollarse hasta el estadio primario. Estos resultados indican que el acoplamiento a través de uniones comunicantes compuestas por canales de Cx43 juega un papel indispensable desde los estados tempranos de la foliculogénesis en mamíferos.

Los ovocitos de *Xenopus* han sido un modelo muy usado para estudios de segundos mensajeros en respuesta a neurotransmisores así como estudios de genética y biología molecular. Recientemente estudios detallados sobre las características eléctricas del folículo de rana también han aportado información valiosa acerca de las posibles funciones que tienen la activación de receptores a diversas sustancias en este complejo celular (Arellano y cols., 1996). En contraste, la información que tenemos a cerca de las moléculas involucradas en el acoplamiento de las células foliculares y el ovocito de *Xenopus* es escasa, no

existen estudios detallados sobre la participación de las diferentes conexinas en el folículo. Conocer esta participación será importante para comprender de forma integral el papel fisiológico que juegan las uniones comunicantes en este sistema celular durante el crecimiento y desarrollo del gameto, además de que podría dar información relevante para conocer acerca del papel funcional de las diferentes corrientes iónicas generadas en el folículo.

Los estudios realizados hasta ahora señalan que en el folículo de *Xenopus* las conexinas principales son la Cx38, la Cx41 y la Cx43 (Ebihara, 1989 ; Gimlich, 1990 ; Yoshizaki & Patiño, 1995). Cada una de estas conexinas tiene una distribución y abundancia relativa distinta en los tejidos de *Xenopus* (Gimlich, 1990 ; Yoshizaki & Patiño, 1995), así como niveles de transcripción distinta a lo largo de la foliculogénesis y desarrollo embrionario.

Las siguientes son algunas evidencias que sugieren que Cx38 es la conexina responsable de la comunicación del ovocito con las células foliculares:

a) Su abundante expresión en el ovocito de *Xenopus*. Se ha estimado que el ARNm para Cx38 es 10 veces más abundante en el ovocito que el ARNm de Cx43 el cual también está presente (Gimlich, 1990).

b) Su exclusividad en el tejido ovárico, ya que esta conexina no se ha encontrado en ningún otro tejido (Ebihara, 1989 ; Gimlich, 1990 ; Yoshizaki & Patiño, 1995).

c) La presencia de Cx38 desde estadios tempranos en la foliculogénesis y hasta la formación de la gástrula (Gimlich, 1990 ; Yoshizaki & Patiño, 1995).

Sin embargo algunas otras evidencias sugieren que el papel de Cx38 podría ser mucho más amplio que el de la formación de uniones comunicantes, inclusive que este último no sea de hecho el más importante, por ejemplo :

a) En ensayos de formación de canales de unión entre ovocito-ovocito ha sido demostrado consistentemente que la conductancia de unión de canales de unión formados por Cx38 endógena es baja (Gimlich, 1988 ; Ebihara, 1989 ; Swenson, 1989) comparado con las conductancias de canales formados por otras proteínas.

b) Algunos estudios electrofisiológicos y de microscopía electrónica muestran que en ovocitos en su mayor estado de desarrollo pueden presentar un muy bajo nivel de Cx38, es decir presentan bajos niveles de la corriente I_C asociada con la presencia de estos hemicanales. En estos estudios también se ha mostrado que la membrana plasmática del ovocito no tiene partículas de hemicanales característicos de esta conexina (Zampighi y cols., 1999). Lo cual sugiere que la ausencia de Cx38 no es fundamental para el completo crecimiento del ovocito.

Estas discrepancias y el hecho de que su participación no está demostrada directamente nos llevan a hacernos la siguiente pregunta : ¿Cuál es el papel que tiene la conexina 38 en la comunicación entre las células foliculares y el ovocito de *Xenopus laevis* ? Por lo que nos planteamos la siguiente hipótesis :

HIPÓTESIS.

El bloqueo en la expresión de Cx38 influye sobre el grado de comunicación eléctrica entre las células foliculares y el ovocito de *Xenopus laevis* .

OBJETIVOS.

1) Inhibir selectivamente la expresión de Cx38 en el ovocito a través de la inyección de un oligonucleótido antisentido específico.

2) Determinar en folículos sin Cx38 el grado de comunicación eléctrica entre ovocito y células foliculares, utilizando como índice de ésta, diversas corrientes iónicas con origen en las células foliculares.

3) Determinación de la expresión del ARNm para Cx38 en ovocitos y células foliculares aisladas.

MÉTODOS.

Folículos ováricos, en el estadio VI (Dumont, 1972), de ranas adultas de *Xenopus laevis* fueron obtenidos por cirugía en animales anestesiados por hipotermia. Estos folículos completos (w.f., whole follicles) fueron incubados en solución de Barth normal que contiene (en mM): 88 NaCl, 1 KCl, 2.4 NaHCO₃, 0.33 Ca(NO₃)₂, 0.41 CaCl₂, 0.82 MgSO₄, 5 HEPES, pH ajustado a 7.4 y con gentamicina 70 µg ml⁻¹.

Se manejan dos diferentes preparaciones :

1. Folículos sin epitelio (e.r., epithelium removed), a estos folículos únicamente les fue disecado el epitelio ovárico interno y la teca externa, esto se logra por medio de una disección manual con pinzas finas, que conserva la membrana basal de las células foliculares y no afecta el acoplamiento de estas células con el ovocito (Arellano & Miledi, 1993) (ver fig. 8). Los folículos e.r. fueron mantenidos en incubación en solución de Barth modificada conteniendo (en mM) : 88 de NaCl ; 0.2 de KCl ; 2.4 NaHCO₃ ; 0.33 Ca(NO₃)₂ ; 0.41 CaCl₂ ; 0.82 MgSO₄ ; 0.88 KH₂PO₄ ; 2.7 Na₂HPO₄, gentamicina 70 µg ml⁻¹ , glucosa 5 mM ; y 0.2 % de suero bovino fetal, pH 7.4.

2. Ovocitos defoliculados (c.t., collagenase treated). Ovocitos solamente con la capa vitelina, éstos son preparados a partir de w.f. y fueron incubados en solución de Barth normal. Los w.f. fueron tratados 24 horas después de inyectados (ver más adelante) con colagenasa (tipo I de Sigma) 0.5 mg ml⁻¹ por 30 minutos en solución de Ringer normal (RN) para anfibio (conteniendo en mM : 115 NaCl ; 2 KCl ; 1.8 CaCl₂ ; 5 HEPES, pH ajustado a 7.0) y sus capas foliculares externas fueron eliminadas por disección utilizando pinzas finas (Miledi & Woodward, 1989). Finalmente los ovocitos c.t. fueron incubados en la solución de Barth normal a una temperatura de 18 a 20 °C, hasta su uso para registros eléctricos.

Microinyección con oligonucleótidos.

Inhibición de la expresión de Cx38.

La presencia de Cx38 fue alterada a través de la inyección de un oligonucleótido antisentido específico. El uso de oligonucleótidos antisentido permite suprimir selectivamente la expresión de proteínas blanco.

Tanto folículos e.r. como w.f. fueron microinyectados con 50 nl ya sea del oligonucleótido antisentido o un oligonucleótido control, los oligonucleótidos tienen las siguientes secuencias : 1) oligonucleótido antisentido (aCx38) para Cx38, 5'-GCT TTA GTA ATT CCC ATC CTG CCA TGT TTC-3' y 2) oligonucleótido control (38X) 5'-CTT TTG ACC GCT CAT CCC TAT AGT ATT TGC-3'. Una vez inyectados, tanto e.r. como w.f., fueron incubados durante 24 hrs. a 22°C, los w.f. fueron tratados con colagenasa como lo describimos anteriormente. Posteriormente fueron realizados registros eléctricos a las 48 y 72 h después de la inyección.

Electrofisiología.

Los registros de corriente transmembranal se hicieron mediante la técnica de fijación de voltaje. La esencia de esta técnica es el poder mantener el potencial de membrana constante a cualquier valor deseado, esto se logra con un circuito de retroalimentación que compensa los cambios de voltaje producidos por la corriente iónica que cruza la membrana en un tiempo dado.

Para nuestros registros utilizamos la técnica de control de voltaje con dos microelectrodos, tanto e.r. como c.t. fueron mantenidos con perfusión continua de solución RN. Las hormonas y los neurotransmisores fueron administrados a través de la perfusión, diluyéndolos a las diferentes concentraciones expresadas para cada caso en la solución RN.

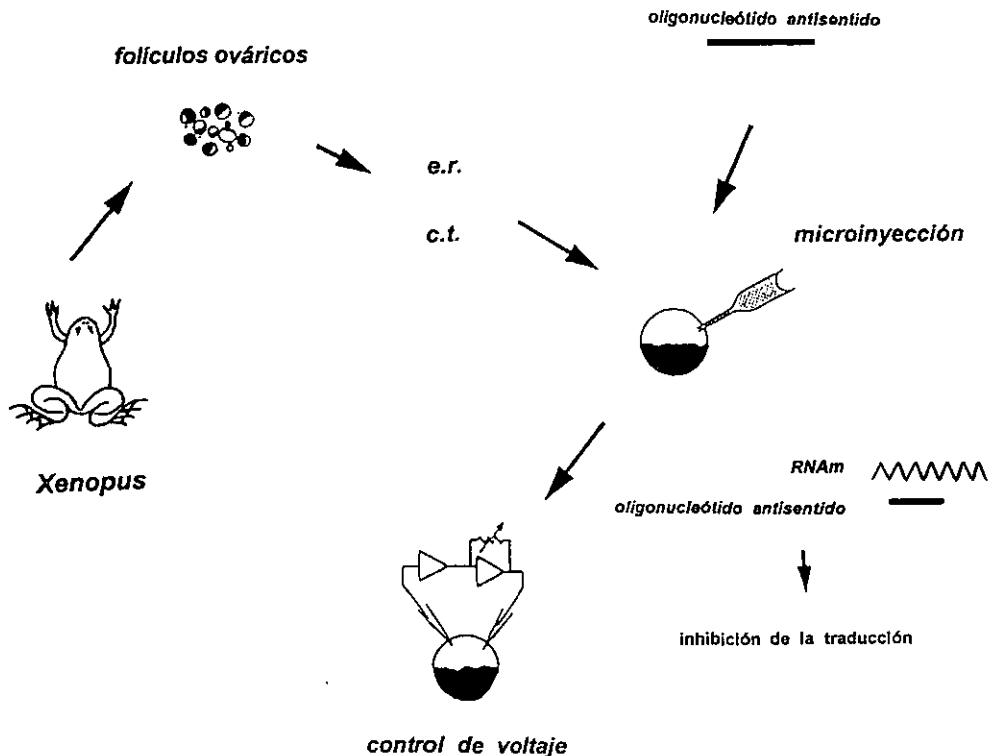


Figura 8.- Esquema del método a seguir para cubrir los objetivos del presente estudio.

Síntesis del ADN complementario (ADNc)

La transcripción reversa es una reacción enzimática que es catalizada por la enzima transcriptasa reversa, esta es un tipo de ADN polimerasa que parte de un molde de ARN, deoxinucleótidos trifosfatos (dNTP's) y un cebador que puede ser oligo dT y/o hexanucleótidos al azar para sintetizar una copia de ADN (ADNc).

En este caso se utilizó la enzima transcriptasa reversa (TR) superscript, la cual carece de la actividad de ARNasa H. Esta actividad permite la degradación de ARN que se encuentra formando híbridos con el ADN, y con frecuencia impide la síntesis de ADNc completos. Además fueron empleados como cebadores oligo dT y hexanucleótidos, los cuales garantizaron la síntesis completa de los extremos 5' de los ADNc complementarios a los extremos 5' de los ARN mensajeros.

Protocolo. El ADN contaminante presente en las muestras de ARN fue eliminado antes de la síntesis del ADNc, para esto alícuotas de ARN fueron tratadas con ADNasa como se describe a continuación.

Alicuotas de 1 μg de ARN_{Tot} fueron llevadas a un volumen final de 10 μl con 1 μl de buffer para ADNasa 10X (conteniendo en mM : 200 Tris-HCl pH 8.4, 20 MgCl_2 , 500 KCl), 2 μl de ADNasa (120 U/ μl) y agua estéril e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente se adicionó 1 μl de EDTA 25 mM y se calentó a 65 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos.

Para sintetizar el ADNc, fue adicionado un μl de oligo dt ($0.5 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$) y 0.5 μl de hexanucleótidos ($62.5 A_{260} \text{ml}^{-1}$) y se incubó a 65 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, posteriormente las mezclas de reacción se pusieron en hielo y les fue adicionado 0.5 μl de inhibidor de ARNasas ($10 \text{U} \mu\text{l}^{-1}$), 10 μl de buffer %X (contenido en mM : 250 Tris-HCl (pH 8.3), 375 KCl, 15 MgCl_2), 5 μl de DTT (0.1 M) y 5 μl de dNTP's (2.5 mM). De esta mezcla se recuperaron 15 μl que sirvieron como controles sin TR en los ensayos de amplificación. Al resto de la mezcla, le fue agregado 1 μl de TR e incubado a 42 $^{\circ}\text{C}$ por una hora.

El ADNc sintetizado fue conservado a -20 $^{\circ}\text{C}$ para evitar su degradación.

Ampliación de secuencias de ADN por RCP (reacción en cadena de la polimerasa).

Este método está basado en la actividad que tiene la ADN polimerasa en la replicación del ADN, para obtener una nueva cadena de ADN sintetizada en dirección 5' \rightarrow 3', utilizando como molde una de las cadenas, a partir de un cebador de ADN o ARN.

La PCR tiene la ventaja de que no es necesario aislar el gen o secuencia, ya que se parte de ADN y el producto de amplificación que se obtenga corresponderá al ADN que quede limitado por los sitios donde se complementen los oligonucleótidos (cebadores) seleccionados. Esto se logra al mezclar en el mismo tubo el ADN, dNTP's, cebadores y polimerasa. Inicialmente debe

desnaturalizarse el ADN a 95 °C, para separar las dos cadenas, ADN-ARN producto de la TR, después se baja la temperatura (esta es variable dependiendo de la T_m de los oligonucleótidos) para que los cebadores se unan al ADN y finalmente se aumenta la temperatura a 72 °C que es una temperatura óptima para que actúe la ADN polimerasa (Taq polimerasa). Este proceso debe repetirse por varios ciclos. La ADN polimerasa empleada es la Taq polimerasa, una enzima obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus* la cual vive a temperaturas superiores a los 75 °C y por lo tanto su polimerasa es muy estable a estas altas temperaturas.

Protocolo.

Los cebadores que utilizamos para la reacción fueron los siguientes :

1) Oligonucleótidos para la conexina 38

38 5' 5'-CTG CAG TTT CTC TTT GTC AGT A-3'

38 3' 5'-CCC AGA CAT TTT GTT ATA AGC T-3'

2) Oligonucleótidos para proteína S5 ribosomal

63 P15 5'-TGG TAA CAG GGG AGG TTT CCG C-3'

63 P13 5'-ATA CCA GCC ATC ATG AGC AGC-3'

La reacción de amplificación de secuencias de ADNc, provenientes por una parte de ovocito desnudo y la otra muestra de células foliculares, se realizó en un volumen final de 20 µl de agua estéril, 0.5 µl de MgCl₂ (25 mM), 2 µl de buffer 10X (10mM Tris-HCl pH 8.4, 25 mM KCl), 2 µl dNTP's (2.5 µM), 2 µl cebadores (2.5 µM), 1 µl de ADNc y 0.5 µl de la Taq polimerasa (5 U/µl). Como controles se empleo 1 µl de agua en lugar de ADNc y 1 µl de la mezcla de reacción para la síntesis de ADNc sin TR.

Las condiciones de amplificación fueron : 94 °C por 30 seg, 55 °C por 50 seg durante 30 ciclos con una extensión final a 72 °C por 5 minutos.

Las muestras de ADN fueron analizadas en geles de agarosa al 1% conteniendo TBE 1X (0.04 M Tris-base, 0.04 M ácido bórico, 0.001M EDTA) y

BrEd ($2.5 \times 10^{-5} \%$). La electroforesis se llevó a cabo a 60-80 V durante 1 a 2 horas. Los geles fueron visualizados en un transiluminador de luz UV y fotografiadas empleando una cámara Polaroid 34-33 con película instantánea Polaroid 667 (ISO 3000) o bien imágenes de los mismos fueron recuperadas con una cámara digital Kodak *ds*.

RESULTADOS.

Los folículos utilizados en este estudio (n=270, 25 ranas) presentaron, en solución RN, un potencial de reposo de -37 ± 0.94 mV (todos los datos están expresados como promedio \pm error estándar) y tuvieron una resistencia de entrada de 1.24 ± 0.07 M Ω . En general, entre los diferentes grupos experimentales, no fueron observadas diferencias en estos dos parámetros lo cual es un indicador de que las inyecciones tanto de agua como de los oligonucleótidos utilizados no parecen provocar cambios inespecíficos en la conductancia basal de las preparaciones.

Identificación de las respuestas.

Un paso importante en la realización del presente trabajo fue la identificación de las respuestas foliculares ya descritas en la literatura, y su apropiado registro electrofisiológico durante el tiempo en que los ovocitos fueron mantenidos en cultivo. Así, los folículos control e inyectados con agua estudiados aquí mantuvieron acoplamiento entre células foliculares y ovocito por más de 72 h. Por ejemplo folículos control (n=6) presentaron respuestas F_{in} provocadas por ACh a las 48 h de incubación de 1566 ± 30 nA, mientras que folículos de la misma rana después de 72 h en incubación presentaron respuestas de 1220 ± 36 nA (n=6). De igual forma, las respuestas K^+ -AMP_c activadas por ADE fueron mantenidas en ambos controles por tiempos de al menos 72 hrs. Por ejemplo, en folículos de un donador (n=6), la aplicación de adenosina provocó respuestas de 562 ± 63 nA en folículos mantenidos por 48 h, mientras que a las 72 h presentaron respuestas de 450 ± 10 nA. En ambos casos se mantuvieron también las características promedio del potencial de membrana y resistencia de entrada -35 ± 2 mV y 1.28 ± 0.12 M Ω a las 48 h y -38 ± 2 mV y 1.65 ± 0.17 M Ω a las 72 h. Estos resultados fueron confirmados en 18 folículos de 3 ranas.

Tanto las respuestas F_{in} como las respuestas K^+ -AMP_c registradas aquí cumplieron con las características generales descritas con anterioridad (ver

Arellano et al, 1996) para estas corrientes iónicas. Por ejemplo en folículos controlados a -60 mV F_{in} se desarrolla como una corriente entrante con un retraso de activación de alrededor de 500 ms, las respuestas se inactivan aún en presencia del agonista en pocos segundos, lo que provoca que la corriente tenga un curso temporal semejante a una espiga. El potencial de inversión de estas corrientes fue de alrededor de -25 mV (no mostrado) y las dosis utilizadas tanto de ACh como de ATP provocan máximas respuestas como las reportadas anteriormente (Arellano & Miledi, 1993 ; Arellano et al 1998). En los folículos controlados a -40 mV la corriente de K^+ -AMP_c se desarrolló después de un retraso mayor a 20 s como una corriente saliente, la respuesta creció lentamente y alcanzó un pico que se mantuvo por varios segundos, después del pico la corriente se inactivó lentamente (varios segundos) en la presencia del agonista, el rango de las respuestas al pico al aplicar ADE fue de 60 a 330 nA y presentaron un potencial de inversión cercano a -95 mV (no mostrado) de acuerdo con corrientes acarreadas principalmente por K^+ en las células foliculares (Woodward & Miledi 1987 ; Arellano et al, 1996). Tanto con respecto a las corrientes F_{in} como para K^+ -AMP_c la defoliculación de los ovocitos provocó su completa eliminación (n=9, 3 ranas), lo cual confirmó su dependencia de las células foliculares también propuesto con anterioridad.

La respuesta a AII tiene especial interés en la comunicación entre ovocito y células foliculares porque es un buen ejemplo del intercambio de información entre estos dos tipos celulares a través de acoplamiento metabólico. La corriente $I_{Cl(Ca)}$ que fue generada como respuesta a AII es el resultado de la activación de receptores acoplados a proteínas G localizadas en la membrana de las células foliculares, esto promueve la síntesis de IP_3 que difunde al citoplasma del ovocito a través de uniones comunicantes, donde produce un incremento en Ca^{++} resultando en la activación de canales de Cl^- en la membrana del ovocito. Es decir en este caso la generación de $I_{Cl(Ca)}$ depende fundamentalmente de la difusión del segundo mensajero IP_3 de las células foliculares al ovocito.

La corriente $I_{Cl(Ca)}$ generada por AII tuvo las siguientes características, fue una corriente entrante oscilatoria con un retraso en la respuesta de 5-10 s que se mantiene varios segundos después de haber retirado el agonista. El potencial de inversión para estas corrientes fue de alrededor de -25 mV el cual corresponde al potencial de inversión del Cl^- en ovocitos, estas características concuerdan con las anteriormente descritas para esta respuesta (Woodward & Miledi, 1991 ; Sandberg et al 1990). El rango de las respuestas fue de solo unas decenas de nA 1110 a 1440 nA. Las repuestas a AII fueron por completo eliminadas en ovocitos defoliculados lo cual confirma que los receptores membranales se encontraban localizados principalmente en las células foliculares (18 ovocitos de 3 ranas), además las respuestas a AII fueron eliminadas al cargar los ovocitos con un quelante de Ca^{++} , confirmando la dependencia a Ca^{++} de estas corrientes.

Finalmente, en ovocitos control la corriente I_C fue generada por la perfusión con solución ringer sin Ca^{++} (Arellano et al., 1995). Los registros se realizaron controlando el voltaje a -60 mV, I_C se generó como una corriente entrante que se desarrolló lentamente, alcanzó un nivel máximo y no presentó inactivación, la I_C se cerró por completo pocos segundos después de regresar a la solución RN. En folículos (n=6) de un donador que fueron mantenidos por 48 y 72 hrs presentaron respuestas semejantes de 1704 ± 87 nA y 2034 ± 141 respectivamente. También confirmamos que las respuestas fueron mantenidas en ovocitos defoliculados, por ejemplo ovocitos desnudos presentaron I_C de 2677 ± 496 y folículos e.r del mismo donador presentaron I_C de 3223 ± 243 . El pequeño aumento en amplitud en e.r. no fue consistente y en algunos casos inclusive los folículos e.r. presentaron I_C de menor amplitud que los ovocitos desnudos.

Es importante mencionar que todas las respuestas presentaron una amplia variación entre los folículos de diferentes donadores, sin embargo las amplitudes fueron más consistentes entre folículos de un mismo donador. El análisis con mayor detalle de una de estas variaciones es importante para el problema que nos ocupa. Suponiendo que la amplitud de I_C es un índice del número de hemicanales de Cx38 disponibles para acoplarse con las células foliculares uno esperaría que sus niveles pudieran tener alguna correlación directa con la amplitud de las

respuestas de origen folicular. Así, por ejemplo, a amplitudes mayores de I_C podría corresponder con respuestas foliculares también máximas. La figura 9 muestra los resultados obtenidos para un grupo de 12 folículos provenientes de 4 donadores, en donde fueron graficadas las amplitudes de las respuestas F_{in} activadas por ACh Fig. 9 (A) y las respuestas K^+ -AMP_c generadas por ADE Fig. 9 (B) versus la amplitud de I_C en el mismo folículo. Los resultados muestran que no existió una correlación sistemática entre la amplitud de I_C y las respuestas foliculares. Este resultado indica que los niveles de Cx38 no guardan relación con los niveles de acoplamiento ovocito-células foliculares. Por ejemplo en un donador con una I_C de 940 ± 45 nA presentó corrientes F_{in} y K^+ -AMP_c de 1710 ± 244 nA y 47 ± 7 nA respectivamente, mientras que otro donador con I_C de 2667 ± 84 nA presentó corrientes F_{in} de 287 ± 54 nA y las respuestas K^+ -AMP_c no se generaron

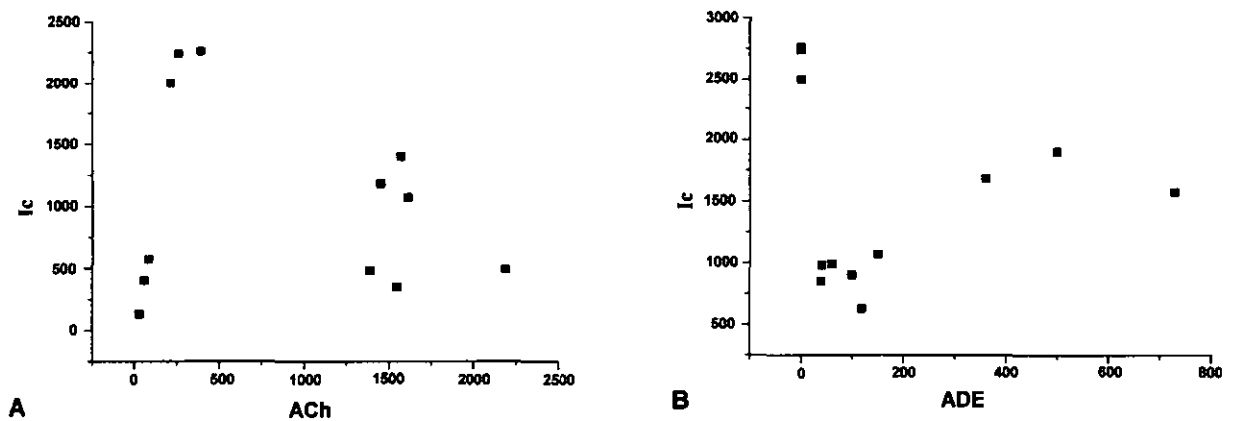


Figura 9.- Gráficas que contrastan la corriente I_C generada en 1 ovocito con la respuesta a ACh (A) y ADE (B) en el mismo ovocito (12 ovocitos de 4 donadores).

Inhibición de la expresión de la Cx38.

Dado que las respuestas (F_{in} , K^+ -AMP_c e $I_{Cl(Ca)}$) foliculares que requieren de la comunicación vía uniones comunicantes pudieron ser mantenidas por lo

menos hasta 72 h procedimos a inhibir la expresión de la Cx38 inyectando en folículos e.r. oligonucleótido antisentido a la Cx38. Como primer paso en esta serie de experimentos verificamos la efectividad del oligonucleótido antisentido, inyectándolo en ovocitos y monitoreando la amplitud de I_C a las 48 y 72 h posteriores a la inyección. Los ovocitos fueron controlados a -60 mV y la I_C fue activada perfundiendo los ovocitos con solución Ringer sin Ca^{++} (R0Ca⁺⁺). El efecto del oligonucleótido aCx38 sobre I_C fue claro ; la corriente fue inhibida por más de 95 % a las 48 y 72 h de la inyección, comparando siempre la amplitud de I_C con aquella de ovocitos control o inyectados con agua y el mismo tiempo de incubación. Por ejemplo en un donador, los ovocitos control (no inyectados) tuvieron respuestas de I_C de 1717 ± 97 nA a las 48 h mientras que en los inyectados con el antisentido la I_C fue reducida a 37 ± 15 nA, corrientes similares fueron registradas a las 72 h cuando los ovocitos control generaron I_C de 2020 ± 187 nA mientras que los inyectados con antisentido Cx38 32 ± 11 nA.

Inhibición de I_C por aCx38 y su relación con las respuestas foliculares.

En resumen, los resultados anteriores muestran que : 1) Las respuestas estudiadas corresponden con las corrientes iónicas de origen folicular ; 2) Que las respuestas foliculares pueden ser mantenidas por al menos 72 h en los folículos e.r. en cultivo ; y 3) El oligonucleótido aCx38 efectivamente reduce en forma importante la amplitud de I_C , un índice de la presencia de Cx38 en la membrana del ovocito. A continuación fue evaluado el efecto producido por la inhibición de I_C sobre la generación de las respuestas foliculares. Los folículos e.r. fueron separados en cuatro grupos : 1) Folículos control ; 2) Folículos inyectados con agua ; 3) Folículos inyectados con oligonucleótido control (38x) ; 4) Folículos inyectados con oligonucleótido antisentido (aCx38).

La comparación entre los diferentes grupos permitió distinguir posibles efectos inespecíficos de la inyección per se o por la adición de algún oligonucleótido. Los folículos control nos proporcionaron el índice de referencia contra el cual comparamos las amplitudes de las respuestas foliculares. Las respuestas, F_{in} , K^+ -AMP_c, $I_{Cl(Ca^{++})}$ e I_C fueron medidas en folículos (60 folículos de

20 ranas) de cada grupo a las 48 h de inyectados, utilizando los mismos parámetros de control de voltaje y activación descritos en las secciones anteriores

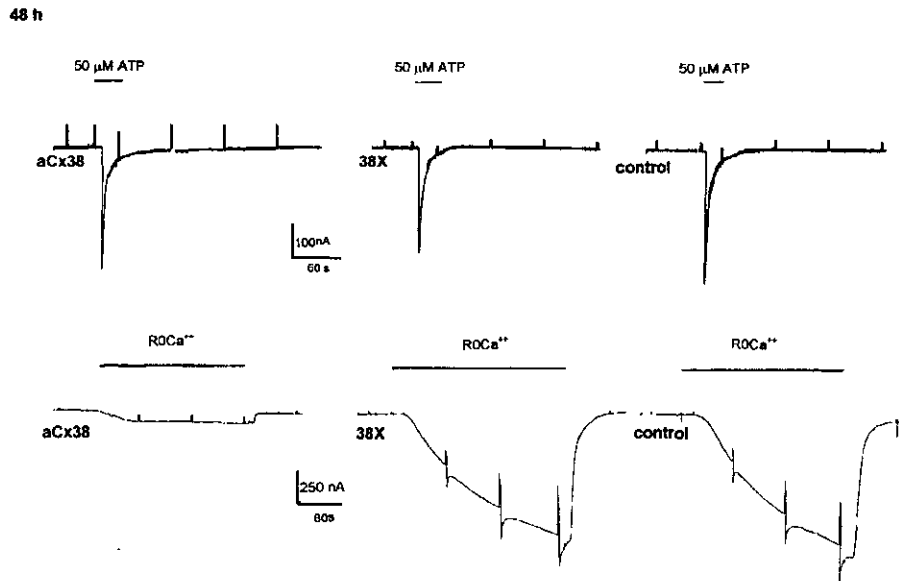


Figura 10.- Esquema que muestra las respuestas F_{in} e I_C 48 h después de la inyección en los grupos aCx38, 38X y control en el mismo donador.

Como puede ser observado en las figuras 11 a 13, las amplitudes de las respuestas F_{in} provocadas por ACh o ATP así como la respuesta K^+ -AMP_C generada por adenosina, no presentaron cambios cuando fueron comparadas entre los diferentes grupos de folículos e.r. En contraste, la respuesta I_C fue inhibida por al rededor del 95% en folículos aCx38, en todos los casos estudiados (fig 14). Por ejemplo en un grupo de folículos F_{in} tuvo respuestas de 680 a 730 nA en contraste con las corrientes I_C generadas en el mismo donador con el antisentido que fueron de 40 a 60 nA, esta clara diferencia sugiere que la presencia de la Cx38 en la membrana del ovocito no es fundamental para el mantenimiento de la comunicación eléctrica entre ovocito y células foliculares. Del grupo de respuestas estudiadas la única que presentó una disminución consistente de 70 % (39 folículos de 13 ranas), fue la $I_{Cl(Ca)}$ generada por AII fig

15. En estos casos, por ejemplo, folículos del grupo 3 inyectados con el oligonucleótido 38X presentaron respuestas a AII de 1568 ± 213 nA a las 48 hrs, mientras que los inyectados con el aCx38 la $I_{Cl(Ca)}$ tuvo una amplitud de 623 ± 52 nA (39 folículos de 13 ranas). Como en los casos anteriores la I_C en folículos inyectados con aCx38 fue inhibida por 95 % aproximadamente. La disminución de $I_{Cl(Ca)}$ observada en los folículos aCx38 sugiere que la participación de Cx38 podría tener una participación importante en la comunicación metabólica.

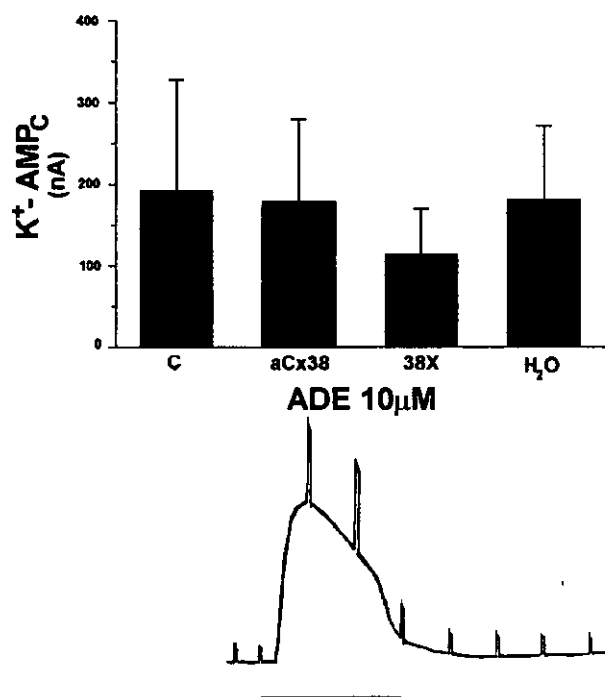


Figura 11.- A Gráfica que muestra la media y el error estandar de las respuestas a ADE generadas por 60 ovocitos por grupo de un total de 20 donadores. B Corriente típica generada por el ovocito en respuesta a ADE.

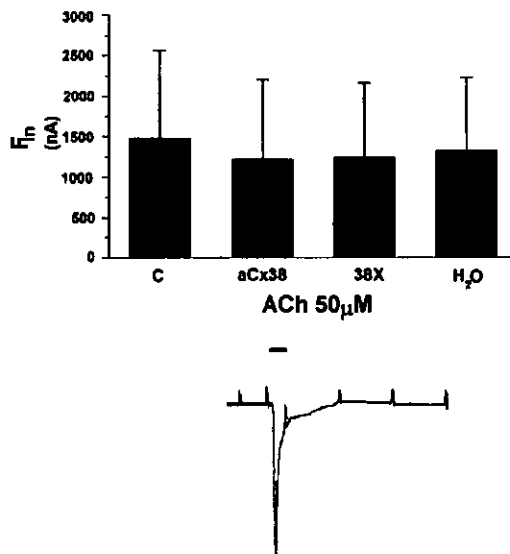


Figura 12.- A Gráfica que muestra la media y el error estandar de las respuestas a ACh generadas por 60 ovocitos por grupo de un total de 20 donadores. B Corriente típica generada por el ovocito en respuesta a ACh.

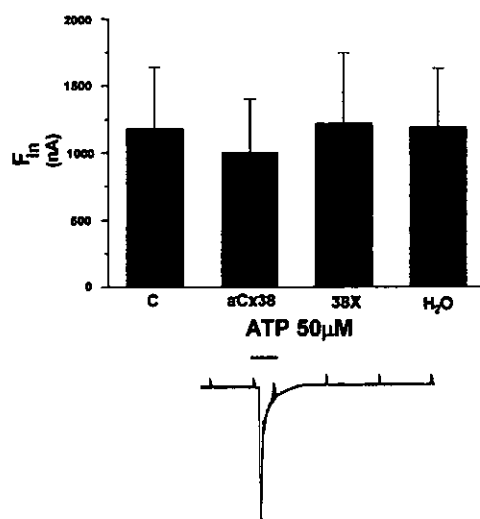


Figura 13.- A Gráfica que muestra la media y el error estandar de las respuestas a ATP generadas por 60 ovocitos por grupo de un total de 20 donadores. B Corriente típica generada por el ovocito en respuesta a ATP.

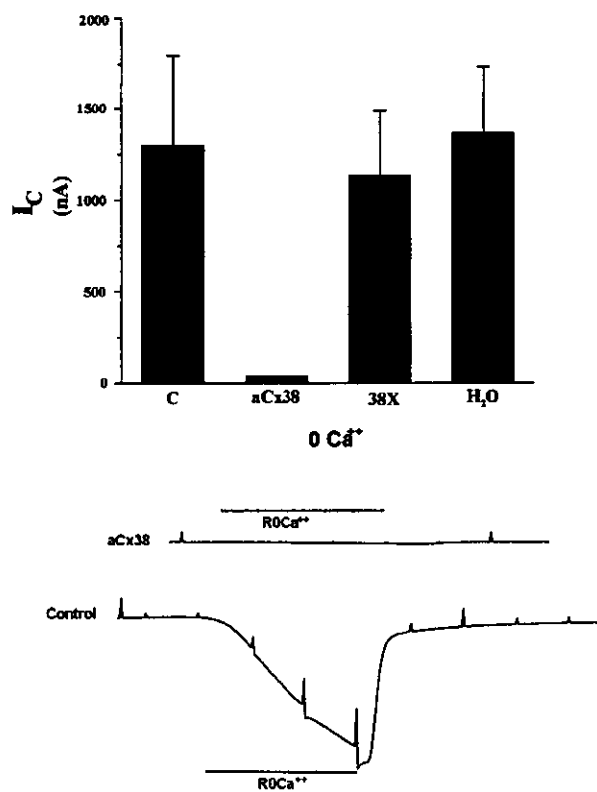


Figura 14.- A Gráfica que muestra la media y el error estandar de las respuestas a ringer sin Ca^{2+} generadas por 60 ovocitos por grupo de un total de 20 donadores. **B** Corriente típica generada por el ovocito en respuesta a solución ringer sin Ca^{2+} .

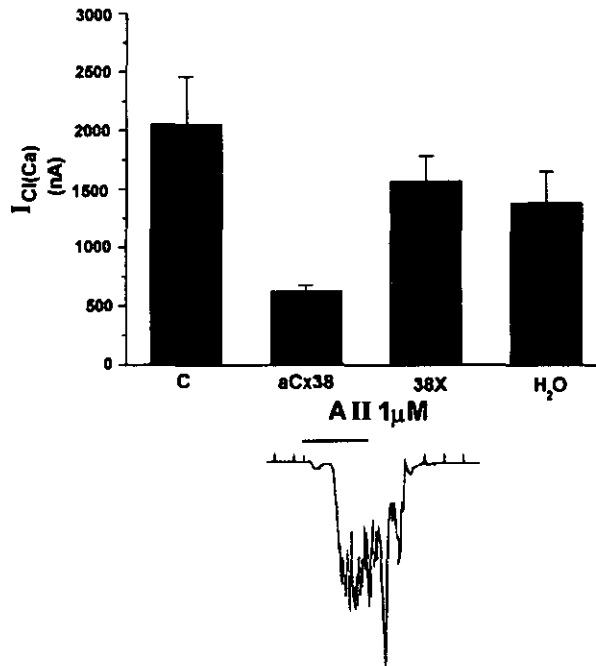


Figura 15.- A Gráfica que muestra la media y el error estandar de las respuestas a AII generadas por 39 ovocitos por grupo de un total de 13 donadores. B Corriente típica generada por el ovocito en respuesta a AII.

Reacción en cadena de la polimerasa

Con el fin de determinar si las CF expresan Cx38, decidimos hacer ensayos de RCP empleando oligonucleótidos específicos complementarios al ARNm.

Para sintetizar el ADNc se empleó la enzima Super Script RTII, como se describe en materiales y métodos. Los cebadores utilizados fueron oligo dt y hexanucleótidos al azar, lo que garantiza una síntesis de ADNc complementario conteniendo los extremos 5' y 3' complementarios al ARNm. El ADNc así sintetizado se empleó en ensayos de RCP empleando oligonucleótidos específicos para Cx38.

Los productos de amplificación fueron posteriormente analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.1 % y los resultados obtenidos se muestran en la fig. 16 :

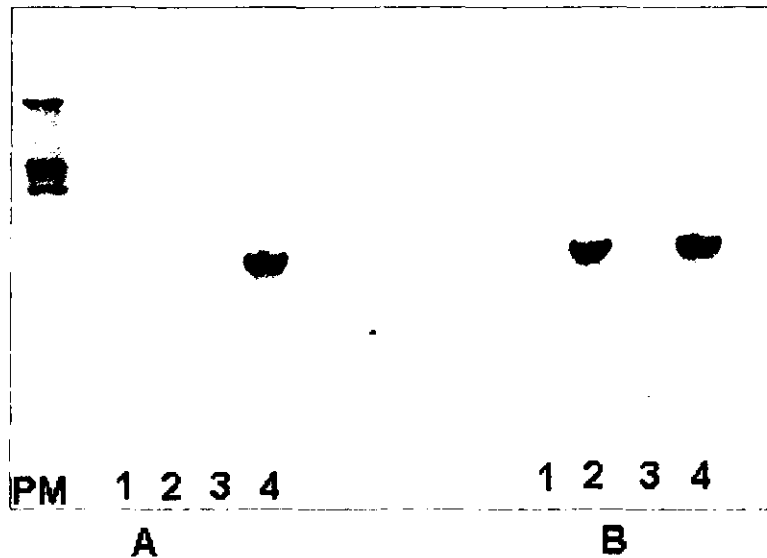


Figura 16.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos obtenidos por RCP a partir del ADNc de ovocito y células foliculares empleando oligonucleótidos específicos para Cx38 (A) y de la proteína ribosomal S5 (B). P.M. - marcador de peso molecular. A - 1) control, 2) ADNc de células foliculares, 3) control, 4) banda de amplificación de ADNc proveniente de ovocitos defoliculados estadio VI. B - 1) control, 2) banda de amplificación de ADNc proveniente de células foliculares, 3) control, 4) banda de amplificación de ADNc proveniente de ovocitos defoliculados estadio VI.

Como se puede observar en el carril 4A, una sola banda de ADN de aproximadamente 500 pares de bases fue amplificada, a partir del DNAc de ovocitos estadio VI defoliculados. El tamaño del fragmento amplificado corresponde con el esperado. Además ninguna banda de amplificación fue observada cuando se amplió el DNAc proveniente de células foliculares, lo que sugiere que la Cx38 solo se expresa en el ovocito y no en las células foliculares. Este producto de amplificación se generó a partir del DNAc y no de DNA

contaminante como lo corroboran los controles de los carriles 1 y 3 donde no se observa ninguna banda de amplificación.

Con el fin de corroborar que esta expresión diferencial de la Cx38 entre el ovocito y las células foliculares es real y no debido a la ausencia de DNAc en la muestra de las células foliculares, se realizó una amplificación empleando oligonucleótidos específicos dirigidos contra el DNAc de la proteína ribosomal S5 la cual se expresa en todos los tipos celulares. Como se puede observar en la figura 17B, existe una banda de amplificación en los carriles 1 y 3 correspondiente al DNAc proveniente de ovocitos estadio VI y de células foliculares respectivamente. Lo cual confirma los datos anteriormente descritos.

DISCUSION.

Un paso importante en nuestro trabajo, fue la inhibición de la expresión de Cx38, objetivo que logramos alcanzar como lo muestran nuestros registros de I_C , como ya lo mencionamos anteriormente esta corriente es generada por la apertura de los hemicanales de Cx38. La importancia de esto radica en que las variaciones en la amplitud de I_C fueron para nosotros un índice de los hemicanales de Cx38 disponibles, de tal forma que ante registros de I_C pequeños como resultado de la inhibición de Cx38, sería de esperarse una disminución en los registros de las respuestas de origen folicular si Cx38 está participando en la comunicación entre los dos tipos celulares.

Los resultados del presente estudio nos sugieren las siguientes posibilidades:

1) Conexina 38 no es la principal conexina involucrada en el establecimiento de uniones comunicantes entre ovocito y células foliculares en *Xenopus*. Esta propuesta la hacemos basados en los siguientes resultados : A) Los ovocitos inyectados con oligonucleótido antisentido generaron respuestas semejantes a los ovocitos control, tanto en las respuestas K^+ -AMP_c activadas por ADE (10 μ M) como en las respuestas F_{in} activadas por ACh (50 μ M) y ATP. (50 μ M) Estos resultados muestran que el acoplamiento entre células foliculares y el ovocito se mantiene a pesar de que la expresión Cx38 se encuentra fuertemente inhibida. Tal y como lo indicaron los registros de la corriente I_C , donde fue notoria la disminución de la corriente en los ovocitos inyectados con el antisentido.

2) El ovocito compensa la inhibición de la expresión de la Cx38 por otra conexina. Desde los primeros estudios de uniones comunicantes, se sabe que un tipo celular determinado puede expresar una diversidad de distintas conexinas. En el caso del folículo de *Xenopus*, sabemos que Cx43 se expresa en el ovocito en los estadios I al VI y que se encuentra en una proporción 10 veces menor que Cx38. Basado en el patrón de recambio de Cx43, Gimlich (1992) propone que esta conexina participa en los eventos de comunicación intrafolicular regulada por hormonas durante la ovogénesis y la maduración temprana del ovocito. Al estar también Cx43 presente en la membrana del ovocito podemos suponer que en las placas de unión se encuentran conexiones

formados tanto por la Cx43 como por la Cx38. Cuando inhibimos la expresión de Cx38, la presencia de Cx43 permitiría mantener la comunicación entre los dos tipos celulares, aún con un alto grado de acoplamiento eléctrico. Ha sido mostrado que los canales de unión formados por diferentes conexinas pueden permitir la discriminación de segundos mensajeros (Kumar y Gilula 1996). Así, podría ser que los hemicanales de Cx43 favorecen el paso de iones que nos permiten los registros de las corrientes F_{in} y K^+ -AMP_c pero no el paso de IP₃ necesario para la generación de la corriente $I_{Cl(Ca)}$. Esto explicaría el que las respuestas F_{in} y K^+ -AMP_c se mantengan mientras que $I_{Cl(Ca)}$ disminuyera hasta en un 70 %.

3) Si Cx38 se encuentra formando canales de unión entre células foliculares y ovocito estos deben ser heterotípicos. Esta propuesta la hacemos basados en los resultados de RCP que nos indican que Cx38 se expresa en el ovocito pero no en las células foliculares. Estudios previos indican que en la fracción de células somáticas están presentes Cx41 y Cx43, y sería con los hemicanales de estas conexinas con los que se aparearía el conexón formado por Cx38 del ovocito.

4) Cx38 no está involucrada en la formación de los canales de uniones comunicantes entre ovocito y células foliculares, sino que podría tener un papel como hemicanal en la membrana del ovocito. Existe evidencia acumulada que indica que los hemicanales pueden funcionar de manera independiente como canales iónicos no selectivos en la membrana de las células en donde se encuentran. Cabe mencionar que la lista de tipos celulares que presentan hemicanales de conexina en sus membranas en condiciones fisiológicas es ya muy importante con respecto a las posibles funciones que pudiera tener (Pfahnl and Dahl, 1999 ; Scott and Kondo, 1999 ; Quist et al, 2000).

Se ha propuesto por ejemplo, que los hemicanales puedan proveer una vía directa para el incremento de volumen isosmótico en células que expresan conexinas pero no expresan un número suficiente de aquaporinas (Quist et al 2000).

El ovocito de *Xenopus* parece no expresar aquaporinas (Preston et al 1992). Esto nos lleva a suponer que posiblemente Cx38 cubra esa función y esto posiblemente podría explicar el que su expresión sea mayor a la de Cx43.

Si bien los resultados hasta ahora obtenidos en relación con las respuestas foliculares F_{in} , K^+ -AMP_c e $I_{Cl(Ca^{++})}$ nos permiten sugerir algunas posibilidades en la

participación que Cx38 tiene en la comunicación, consideramos que para apoyar a estas propuestas es necesaria la realización de futuros estudios que muestren la presencia de Cx38 en las placas de unión tanto en condiciones control como en ovocitos inyectados con aCx38. Esto podría lograrse a través de estudios de ultraestructura del folículo, mediante la técnica de inmunocitoquímica. Previo al estudio de ultraestructura, los ovocitos serían sometidos a estudios electrofisiológicos para registrar la generación de la corriente I_C asociada a la presencia de hemicanales de Cx38. De esta manera contrastaríamos la presencia o ausencia de I_C con la presencia o ausencia de Cx38 en las placas de unión.

CONCLUSIONES.

Los estudios electrofisiológicos nos muestran que :

1) El oligonucleótido α Cx38 efectivamente reduce en forma importante la amplitud de la corriente I_C , la cual es un índice de la presencia de Cx38 en la membrana del ovocito.

2) Las respuestas de las corrientes de Cl^- llamadas F_{in} provocadas por ACh o ATP, así como la respuesta de la corriente de K^+ llamada K^+-AMP_c generada por ADE, que involucran comunicación eléctrica, no presentaron cambios en ovocitos donde la I_C fue inhibida en alrededor del 95 %.

3) La corriente $I_{Cl(Ca)}$ generada por la activación de receptores a AII localizados en las células foliculares tuvo una disminución consistente de 70 % en ovocitos inyectados con α Cx38, en este caso la comunicación es principalmente metabólica.

Los resultados de RCP nos muestran que Cx38 se expresa en ovocito y no en células foliculares.

BIBLIOGRAFÍA.

Arellano, R., and Miledi, R. (1993). Novel Cl⁻ currents elicited by follicle stimulating hormone and acetylcholine in follicle-enclosed *Xenopus* follicles. *J. Gen. Physiol.* 102 :833-857.

Arellano, R., and Miledi, R. (1994). Osmo-dependent Cl⁻ currents activated by cyclic AMP in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 258 : 229-235.

Arellano, R.; Woodward, M.R., and Miledi, R. (1995). A monovalent cationic conductance that is blocked by extracellular divalent cations in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 484.3 : 503-604.

Arellano, R.; Woodward, M.R., and R. Miledi. (1996). Ion Channels and Membran Receptors in Follicle-Enclosed *Xenopus* Oocytes. In: *Ion Channels, Volume 4*. Plenum Press. New York.

Arellano, R.; Garay, E. and R. Miledi.(1998). Cl⁻ currents activated via purinergic receptors in *Xenopus* follicles. *Am. J. Physiol.* 274: C333-C340.

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

Barr, L., Dewey, M. and W. Berger. (1965). Propagation of Action Potentials and the Structure of the Nexus in Cardiac Muscle. *J. Gen. Physiol.* 48 : 797-823.

Barrio, C.L. ; Suchyna, T. ; Bargiello, T. ; Xian, X.L. ; Roginski, R.S. ; Bennett, M.V.L. and Nicholson, B.J. (1991). Gap junctions formed by connexins 26 and 32 alone and in combination are differently affected by applied voltage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88 :8410-8414.

Bellé, R. ; Mulner-Lorillon, O. ; Marot, J. and Ozon, R.(1986). A possible role for Mg⁺⁺ ions in the induction of meiotic maturation of *Xenopus* oocyte. *Cell Dif.* 19 : 253-26.

Bennett, M.V.L.(1997). Gap junctions as electrical synapses. *J. Neurocytol.* 26 : 349-366.

Berthoud, V.M. ; Tadros, P.N. and Beyer, E.C. (2000). Connexin and Gap Junction Degradation. *Methods*. 20 :180-187.

Beyer E.C. and R.D. Veenstra.(1994). Molecular Biology and Electrophysiology of Cardiac Gap Junctions. In: *Handbook of Membrane Channels*. Academic Press. pp. 379-401.

Browne, C.L. and Werner, W. (1984). Intercellular junctions between the follicle cells and oocytes. *J. Exp. Zoo.* 230 :105-113.

Buccione, R. ; Schroeder, A.C. and Eppig, J.J.(1990). Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol. Reprod.* 43 : 543-547.

Cooper, C.D. ; Solan, J.L. ; Dolejsi, M.K. and Lampe, P.D. (2000). Analysis of connexin phosphorylation Sites. *Methods*. 20 :196-204.

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. ; Beyer, E.C. ; Swenson, K.I. ; Paul. D.L. ; and Goodenough, D.A.(1989). Cloning and expression of a *Xenopus* embryonic gap junction protein. *Science*. 243 : 1194-1195.

Ebihara, L. (1996). *Xenopus* connexin 38 forms hemi-gap-junctional channels in the nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 71 : 742-748.

Eppig, J.J..(1979). A comparison between oocyte growth in co-culture with granulosa cells-oocyte junctional contact maintained *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 26 : 349-366.

Eppig, J.J. (1993). Regulation of Mammalian Oocyte Maturation . In: *The Ovary*. Raven Press. New York. Pp 185-207.

Fritz, S. ; Föhr, K.J. ; Boddien, S. ; Berg, U. ; Brucker, C. and Mayerhofer, A. (1999). Functional and Molecular Characterization of a muscarinic receptor type and evidence for expression of choline-acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in human granulosa-Luteal cells. *JCE & M.* 84 : 1744-1750.

Garfield, R.E. ; Merrett, D. and Grover, A.K. (1980). Gap junctions formation and regulation in myometrium. *Am.J. Physiol.* 239 : 217-228.

Greenfield, L.J. ; Hackett, J.T. and Linden, J. (1990). *Xenopus* oocyte K⁺ current.II. Adenylyl cyclase-linked receptors on follicle cells. *Am.J. Physiol.* 259 : C784-791.

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

Hillensjö, T. ; Pomerantz, S.H. ; Schwartzkripner, A. ; Anderson , L.D. and C.P. Channing.(1980). Inhibition of Cumulus Cell Progesterone Secretion by Low Molecular Weight Fractions of Porcine Follicular Fluid Which Also Inhibit Oocyte Maturation. *Endocrinol.*106 : 584-591.

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

Kumar, N.M. and Gilula, N.B. (1996). The gap junction communication Channel. *Cell.* 84 :381-388.

Kusano, K., Miledi, R. and Stinnakre, J.,(1977). Acetylcholine receptors in the oocyte membrane. *Nature.* 270 :739-741.

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

Laird, D.W.(1996). The Life Cycle of a Connexin : Gap Junction Formation, Removal, and Degradation. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28 : 311-318.

Matzuk, M.M. (2000). Revelations of ovarian follicle biology from gene knockout mice. *Mol. Cel. Endocri.* 163 :61-66.

Mayerhofer, A. ; Smith, G.D. ; Danilchik, M. ; Levine, J.E. ; Wolf, D.P. ; Dissen, G.A. and Ojeda, S.R. (1998). Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary : Evidence for a cell-cell regulatory loop. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 :10990-10995.

Merriam, R.W. (1971). Progesterone-induced maturational events in oocytes of *Xenopus laevis*. *Exptl Cell Res.* 61 :81-87.

Miledi, R. (1982). A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 215 : 491-497.

Miledi, R. and Woodward, R.M. (1989). The effect of defolliculation on the membrane current responses of *Xenopus* oocyte. J. Physiol. (London). 416 : 601-621.

Mulner, O., Thibier, C. and Ozon, R. (1978). Steroid biosynthesis by ovarian follicles of *Xenopus laevis* in vitro during oogenesis. Gen. Comp. Endocrinol. 34 : 287-295.

Mulner, O. and Ozon, R. (1981). The roles of follicular envelopes in the initiation of *Xenopus* oocyte maturation. Gen. Comp. Endocrinol. 44 : 335-343.

Parker, I. and Miledi, R. (1986). Changes in intracellular calcium and in membrane currents evoked by injection of inositol triphosphate into *Xenopus* oocytes. Proc. R. Soc. London Ser. B 228 : 307-315.

Parker, I. and Miledi, R. (1987). Inositol triphosphate activates a voltage-dependent calcium influx in *Xenopus* oocyte. Proc. R. Soc. London Ser. B 232 : 27-36.

Peracchia, C., Wang, X., Li, L. and L. Peracchia. (1996). Inhibition of calmoduline expression prevents low-pH-induced gap junction uncoupling in *Xenopus* oocytes. Eur. J. Physiol. 431 : 379-387.

Peracchia, C. ; Wang, X.G. and Peracchia, L.L. (2000). Chemical gating of gap junction channels. Methods. 20 :188-195.

Pfahnl, A. and Dahl G. (1999). Gating of Cx46 gap junction hemichannels by calcium and voltage. Eur. J. Physiol. 437: 345-353.

Preston, G.M. ;Carroll, T.P. ; Guggino, W.B. and Agre, P. (1992). Appearance of water channels in *Xenopus* Oocytes expressing red cell CHIP28 protein. Science. 256 :385-387.

Quist, A.P. ; Rhee, S.K. ; Lin, H. and Lal, R. (2000). Physiological role of gap-junctional hemichannels : extracellular calcium-dependent isosmotic volume regulation. J. Cell Biol. 148 : 1063-1074.

Robertson, J.D. (1963). The Occurrence of a Subunit Pattern in the Unit Membranes of Club endings in Mauthner Cell Synapses in Goldfish Brains. J. Cell Biol. 19 : 201-221.

Saez, J.C. (1996).Uniones Intercelulares. Universidad de Sevilla. España. 416-424.

- Salustri, A. ; Hascall, V.C. ; Camaioni, A. And M. Yanagishita.**(1993). Oocyte-Granulosa Cell Interactions. The Ovary. Raven Press. New York. Pp 209-225.
- Sandberg, K. ; Ji, H. ; Iida, T. and Catt, K.J.** (1992). Intercellular communication between follicular angiotensin receptors and *Xenopus laevis* oocytes : mediation by an inositol 1,4,5-triphosphate-dependent mechanism. J. Cell. Biol. 262 : 289-290.
- Scott, A.J. ; Kondo, R. ; Wang, S.Y. ; Goldhaber, J.I. and Weiss, J.N.** (1999). Connexin-43 hemichannels opened by metabolic inhibition. J. Biol. Chem. 117 :157-167.
- Schorderet-Slatkine, S. ; Schorderet, M and Baulieu, E.E.** (1976). Initiation of meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes by lanthanum. Nature. 262 : 289-290.
- Shultz, R.M.** (1985). Roles of cell-to-cell communications in development. Biol. Reprod. 32 : 27-42.
- Simon, A.M. ; Goodenough, D.A. ; Li, E. and Paul, D.L.** (1997). Female infertility in mice lacking connexin 37. Nature. 385 :525-529.
- Swenson, K.I. ; Jordan, J.R. ; Beyer, E.C. and Paul, D.L.** (1989). Formation of gap junctions by expression of connexins in *Xenopus* oocyte pairs. Cell. 57 :145-155.
- Tamargo, J. y E. Delpon.**(1992). Electrofisiología cardiaca. Fisiología Humana. Tresguerres. España Pp. 539-549.
- Trosko, J.E. ; Madhukar, B.V. and C.C. Chang.** (1993). Endogenous and Exogenous Modulation of Gap Junctional Intercellular Communication : Toxicological and Pharmacological Implications. Life Sciences. 53 : 1-19.
- Van den Hoef, M.H.F. ; Dictus, W.J.A.G. ; Hage, W.J. and Bluemink, J.G.** (1984). The ultrastructural organization of gap junctions between follicle cells and the oocyte in *Xenopus laevis*. Methods. 33:242-247.
- Van Slyke, J.K. and Musil, L.S.** (2000). Analysis of connexin intracellular transport and assembly. Methods. 20 :156-164.
- Van Voorhis, B.J.** (1999). Follicular Development. Encyclopedia of reproduction. Vol. 2 :376-389.
- Veenstra, R. D.** (1996). Size and selectivity of Gap Junction Channels Formed from Different Connexins. J. Bioenerg. Biomembr. 28 : 327-337.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Verselis, V.K. ; Trexler, E.B. and Bukauskas, F.F. (2000). Connexin hemichannels and cell-cell channels : comparison of properties. *Braz. J Med. Biol. Res.* 33 : 379-389.

Weidmann, S. (1952). The Electrical Constants of Purkinje Fibres. *J. Physiol.* 118 : 348-360.

White, R.L., Doeller, J.E., Verselis, V.K. and B.A. Wittenberg. (1990). Gap Junctional Conductance between Pairs of Ventricular Myocytes Is Modulated Synergistically by H⁺ and Ca⁺⁺. *J. Gen Physiol.* 95 :1061-1075.

White, T.W. and R. Bruzzone. (1996). *J. Bioenerg. Biomembr.* 28 : 339-350.

Woodward, R.M. and Miledi, R. (1987). Membrane currents elicited by porcine vasoactive intestinal peptide (VIP) in follicle enclosed *Xenopus* oocyte. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 231 : 489-497.

Woodward, R.M. and Miledi, R. (1991). Angiotensin II receptors in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 244 : 11-19.

Wright, C.S. ; Becker, D.L. ; Lin, J.S. ; Warner, A.E. and Hardy, K. (2001). Stage-specific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary : connexin-specific roles in follicular regulation. *Rep.* 121 :77-88.

Yoshizaki, G. and Patiño, R. (1995). Molecular cloning, tissue distribution, and hormonal control in the ovary of Cx41 mRNA, a novel *Xenopus* connexin gene transcript. *Mol. Rep.& Develop.* 42: 7-18.

Zampighi, G.A. ; Loo, D.D.F. ; Kreman, M. ; Eskandari, S. and Wright, E. M. (1999). Functional and morphological correlates of connexin50 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Gen. Physiol.* 113 : 507-523.