



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS RECEPTORES  
PURINÉRGICOS EN EL FOLÍCULO DE *Xenopus*.**

**TESIS**

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

**PRESENTA:**

***Q.F.B. VERÓNICA JANETH ROMERO ROSALES***

***DIRECTOR DE TESIS: DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA.***

Juriquilla, Querétaro. 2006.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

# *Agradecimientos.....*

- ☞ Al Dr. Rogelio Arellano por todo su apoyo, concimientos, consejos y confianza dados durante todo este tiempo....*
- ☞ Ala Dra. Edith Garay y al Dr. Carlos Saldaña por su tiempo, apoyo y consejos .....*
- ☞ A mi comité tutorial Dr. Heimer de la Coterá y Dr. Jesús Colunga por orientación y comentarios durante el desarrollo de este trabajo.....*
- ☞ Al mis compañero de laboratorio Gisela, Ricardo, Víctor, Eunice y Estela por hacer más ligera la cotidianidad.....*
- ☞ A Horacio por todo su apoyo en aquellas pequeñas pero indispensables cosas.....*
- ☞ A Leonor Casanova, Yolanda, Carmelita e Isabel por facilitarme la burocracia del camino.....*

*..... Y por si alguien se me olvida ..... A todos aquellos que en su momento en algo contribuyeron en este proyecto y en mi proyecto de vida que se esta forjando..... Gracias..... Vero.*

*A mi familia .....Papi, Mami, Coco, Mane, Angy , Juan y los 4  
demonios..... que en mucho han contribuido a todo lo que soy y por ser de lo mejor,  
que afortunadamente tengo.*

-----

*Al Dr. Carlos Barraza..... por exorcizar mis demonios.*

-----

*A ti corazón.....por compartir tu tiempo, espacio y cotidianidad conmigo haciéndome  
la vida más feliz.....T.A.A.*

**Ω...Ω**



<b>HIPÓTESIS</b>	.....	36
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	.....	36
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	.....	37
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	.....	37
<b>METODOLOGÍA</b>	.....	38
<b>1. Preparaciones celulares</b>	.....	38
<b>2. Técnicas electrofisiológicas</b>	.....	39
<b>2.1 Técnica de control de voltaje</b>	.....	39
<b>2.2 Construcción de curvas dosis respuesta para</b> la corriente $F_{in}$	.....	41
<b>2.3 Construcción de curvas dosis-respuesta para</b> la inhibición de $I_{K,AMPc}$	.....	41
<b>2.3.1 Protocolo I</b>	.....	41
<b>2.3.2 Protocolo II</b>	.....	42
<b>3. Substancias</b>	.....	43
<b>RESULTADOS</b>	.....	44
<b>1. Curvas dosis-respuesta para la activación de corrientes <math>F_{in}</math></b>	.....	44
<b>2. Inhibición de <math>I_{K,AMPc}</math> por diferentes agonistas purinérgicos</b>	.....	47
<b>DISCUSIÓN</b>	.....	53
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b>	.....	59
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	.....	61
<b>REFERENCIAS</b>	.....	63

## RESUMEN

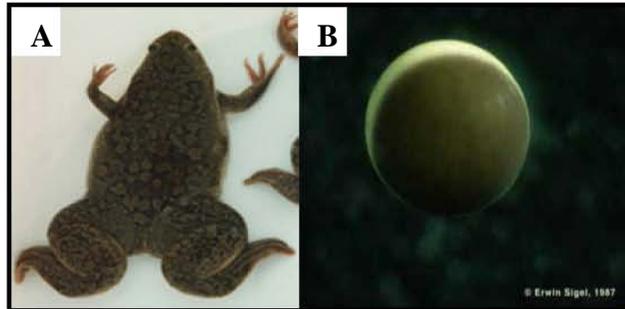
En el folículo ovárico de *Xenopus laevis* se han descrito dos respuestas provocadas por ATP actuando sobre receptores purinérgicos. La primera respuesta corresponde con la apertura de canales de Cl<sup>-</sup>, que genera la corriente denominada  $F_{in}$ . La segunda es la inhibición de la respuesta llamada  $I_{K,AMPc}$ , que es estimulada principalmente por adenosina, a través de un mecanismo que involucra la síntesis de AMPc y la apertura de canales de K<sup>+</sup>. Actualmente no se conocen del todo los mecanismos y tipos de receptores para ATP involucrados en estos dos procesos. En el presente trabajo se llevó a cabo la caracterización farmacológica de los receptores purinérgicos responsables de la activación de la corriente  $F_{in}$  e inhibición de la corriente  $I_{K,AMPc}$ . Utilizando la técnica de control de voltaje con 2 microelectrodos, se obtuvieron las curvas dosis-respuesta para 4 diferentes agonistas, estableciéndose las concentraciones medias efectivas para ambos efectos. Los resultados indicaron que la potencia de estas drogas fue idéntica para ambas respuestas siendo la siguiente: 2-MeSATP>UTP>ATP>BzATP. Esto sugirió que el receptor a ATP involucrado en ambos efectos es el mismo. Además, el orden de potencia de los agonistas estudiados es distinto al descrito para los receptores purinérgicos reportados hasta el momento, sugiriendo que se trata de un nuevo receptor purinérgico o bien alguna variante de esta familia no reportada previamente.

## SUMMARY:

In *Xenopus laevis* follicles, purinergic receptors activation by ATP generates two electrical responses. The first response, is generated by opening of Cl<sup>-</sup> channels eliciting the ionic current named  $I_{in}$ . The second, is a strong inhibition of the current response named  $I_{K,cAMP}$ , this is activated mainly by adenosine via a mechanism that involves cAMP synthesis and opening of K<sup>+</sup> channels. The molecular identity of the purinergic receptors, and the mechanisms involved in both ATP-elicited processes remain unknown. In the present study, we made a pharmacological characterization of the receptors involved in  $I_{in}$  activation and  $I_{K,cAMP}$  inhibition. Using the two-electrode voltage clamp technique, dose-response curves for both effects were made using four different agonists. From this study, it was found that the potency order for the different agonists in both processes was the same: 2-MeSATP>UTP>ATP>BzATP. This result suggested that the same purinergic receptor was involved in the activation of Cl<sup>-</sup> channels and the inhibition of  $I_{K,cAMP}$ . Moreover, the potency order for the different drugs on the receptor of the follicle is distinct to that reported for purinergic receptors known. This suggests that a novel purinergic receptor is expressed in the *Xenopus* follicle or it is expressed an alternative variant with distinct pharmacology..

## INTRODUCCIÓN.

Los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* (*X. laevis*) son células gigantes con un diámetro aproximado de 1 a 1.4 mm (Figura 1). Estas células han sido utilizadas en una gran variedad de estudios fisiológicos, tanto celulares como moleculares (Arellano *et al.*, 1996).



**Figura 1:** A. Rana hembra adulta *Xenopus laevis*. B. Ovocito aislado (Modificada de Sigel, 1987).

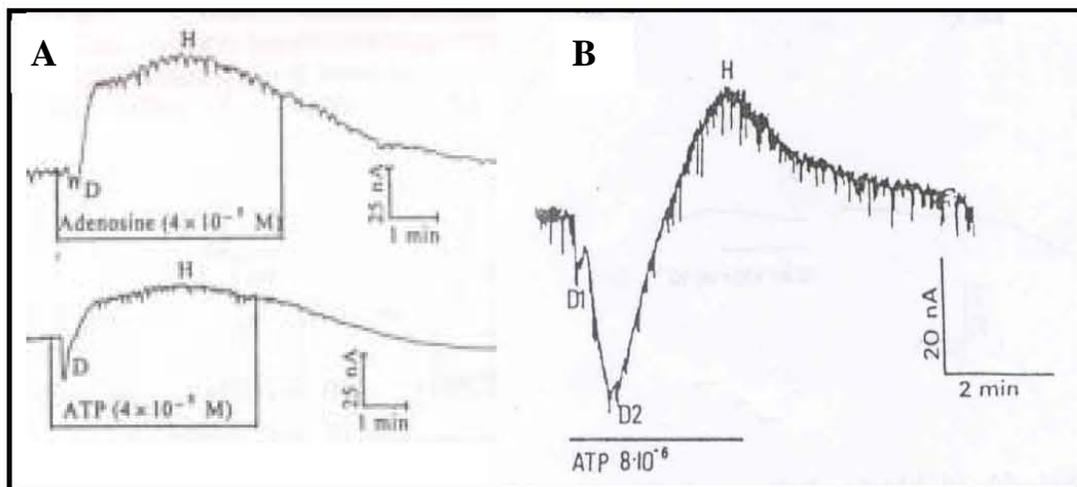
Los ovocitos son generados durante todo el año en los ovarios de la rana por lo que pueden ser disecados con facilidad y obtenerse en grandes cantidades, lo cual también representa una de sus grandes ventajas experimentales. Entre los diferentes fenómenos investigados utilizando esta preparación podemos mencionar los siguientes: foliculogénesis (Wu *et al.*, 2003), división celular, síntesis de proteínas, así como el estudio de receptores membranales a hormonas y neurotransmisores, y de canales iónicos (Miledi *et al.*, 1989).

Así, desde hace poco más de 20 años el ovocito de *X. laevis* ha sido ampliamente usado en laboratorios de todo el mundo para el estudio funcional de proteínas de membrana. Las características de este modelo celular lo convierten en uno de los más útiles en la investigación farmacológica, puesto que permite el análisis electrofisiológico de una gran diversidad de proteínas de membrana expresadas a través de la inyección de su correspondiente ARNm o ADNc. Entre los estudios que pueden ser desarrollados se encuentran, el análisis electrofisiológico de canales iónicos, el análisis de la relación estructura-función de

las diferentes familias de proteínas de membrana y la modulación de la función por segundos mensajeros entre otros (Miledi *et al.*, 1989; Arellano *et al.*, 1996).

Cuando se emplea el ovocito para el estudio de las características de canales y/o receptores heterólogos, el conocimiento de este tipo de proteínas endógenas se convierte en información sumamente importante para lograr un análisis correcto de la expresión. Existen una gran cantidad de estudios que se han enfocado en la tarea de identificar y caracterizar los receptores que posee (Kusano *et al.*, 1977, 1982; Arellano *et al.*, 1998, 1999; Matsuoka *et al.*, 1998; Saldaña *et al.*, 2005). Sin embargo, de igual importancia, estos estudios también son parte fundamental del conocimiento que permitirá comprender el papel que las corrientes iónicas y receptores endógenos tienen en la fisiología del gameto.

Entre los sistemas de transmisión endógenos que son expresados en el ovocito, y en el folículo de *X. laevis*, se encuentra el que utiliza sustancias purinérgicas como transmisores. Algunas características de este sistema fueron reportadas por primera vez por Lotan y colaboradores (1982). En esta primera descripción se caracterizaron dos corrientes designadas como D y H (Figura 2).



**Figura 2:** A. Corrientes H y D evocadas por adenosina y ATP (Modificada de Lotan *et al.*, 1982).

B. Corrientes H, D1 y D2 evocadas por ATP (Modificada de Lotan *et al.*, 1986).

Se trataba de corrientes evocadas por adenosina y por agonistas tales como adenosina 5'-trifosfato (ATP), adenosina 5'-difosfato (ADP) y Adenosina 5'-monofosfato (AMP). Fue identificado que las corrientes D son producidas por la salida de iones  $\text{Cl}^-$ , mientras que las respuestas H era corrientes generadas por el movimiento de iones  $\text{K}^+$ . Las dos corrientes fueron descritas con origen en la membrana del ovocito ya que la defoliculación enzimática no provocaba su eliminación (Lotan *et al.*, 1982). Esta observación al parecer resultó equivocada, ya que se ha demostrado en los últimos años que las corrientes purinérgicas tienen su origen en las células foliculares y no en el ovocito (e.g., Arellano & Miledi, 1993; Arellano *et al.*, 1996; 1998); y no ha sido corroborado un origen en la membrana del ovocito.

Las corrientes D y H promovidas por ATP eran muy semejantes a aquellas promovidas por acetilcolina (ACh) y dopamina en el folículo de *Xenopus*, descritas originalmente por el grupo de Miledi en 1977 (Kusano *et al.*, 1977, 1982). Sin embargo, una aparente discrepancia en el origen de las respuestas comenzaba a ser evidente: mientras que las corrientes de  $\text{Cl}^-$  activadas por ACh eran inequívocamente mantenidas en el ovocito desnudo o defoliculado, algunos resultados mostraron que las acarreadas por  $\text{K}^+$  y activadas por catecolaminas requerían de la integridad del folículo (Kusano *et al.*, 1982).

La participación de las células foliculares en la generación de las corrientes de  $\text{K}^+$  fue demostrada elegantemente en experimentos de defoliculación por Woodward y Miledi (1989). Éste y otros estudios han mostrado que la defoliculación no solo elimina la respuesta activada por catecolaminas sino también aquellas generadas por hormonas y agonistas adrenérgicos y purinérgicos como adenosina (ADO) y ATP (Greenfield *et al.*, 1990b; Arellano *et al.*, 1996; 1998). Las características de esta respuesta serán detalladas un poco mas adelante pero conviene mencionar ahora que la corriente de  $\text{K}^+$  activada por agonistas **purinérgicos, catecolaminérgicos, adrenérgicos**, así como por varios **neuropéptidos y hormonas**, es una respuesta que en realidad tiene origen en las células foliculares y que es transmitida al ovocito a través de comunicación eléctrica mediada por uniones comunicantes.

Debido a la participación del AMP cíclico (AMPc) en su generación, actualmente se le conoce como corriente de  $K^+$  dependiente de AMPc ( $I_{K, AMPc}$ ) (Arellano *et al.*, 1996).

Las respuestas de  $Cl^-$  resultaron ser de una mayor complejidad, Arellano y Miledi, (1993) demostraron que las corrientes generadas por receptores muscarínicos en el folículo, involucra canales de  $Cl^-$  localizados en la membrana del ovocito y canales localizados en la membrana de las células foliculares, provocando que las respuestas fueran multifásicas. Sus estudios demostraron que al menos dos de estas fases son eliminadas por defoliculación y que cada una de ellas dependía de la apertura de canales de  $Cl^-$  con características intrínsecas diferentes, actualmente a estas corrientes se les conoce como  $F_{in}$  y  $S_{in}$ , las características de cada una ellas serán también detalladas más adelante. Después fue demostrado que estos dos tipos de corrientes de  $Cl^-$  son también generadas por ATP y Uridina 5'-trifosfato (UTP) (Arellano *et al.*, 1996, 1998), y de hecho estos dos agonistas parecen compartir la vía de señalización utilizada por los receptores muscarínicos localizados en las células foliculares (Arellano *et al.*, 1998).

Las respuestas foliculares de  $K^+$  y las de  $Cl^-$ ,  $F_{in}$  y  $S_{in}$ , no son los únicos efectos compartidos por la activación de receptores muscarínicos y purinérgicos. El grupo de Van Renterghem en 1985, demostró que ACh era capaz de provocar una fuerte inhibición sobre la  $I_{K,AMPc}$ , y que este efecto se llevaba a cabo por la estimulación de receptores muscarínicos. A su vez en 1996, Arellano y colaboradores demostraron que ATP y UTP también provocan la inhibición de  $I_{K,AMPc}$ . estos resultados ya han sido corroborados en otros estudios (Arellano *et al.*, 1999, Fujita *et al.*, 2001, Saldaña *et al.*, 2005).

Estudios posteriores realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la activación de las corrientes de  $Cl^-$  y la inhibición de  $I_{K,AMPc}$  es llevada a cabo por dos subtipos diferentes de receptores muscarínicos que colocalizan en la membrana de las células foliculares (Arellano *et al.*, 1999). Las características de los mecanismos de la inhibición de  $I_{K,AMPc}$  no han sido por completo dilucidados y requieren de mayor estudio, sin embargo, la importancia de la generación de  $I_{K,AMPc}$  y su inhibición radica en el papel que esta corriente juega durante la maduración del

ovocito. La corriente  $I_{K,AMPc}$  potencia de forma marcada la cinética de maduración del ovocito (Wibrand *et al.*, 1992; Honoré & Lazdunski, 1991), por lo cual ha sido sugerida como un modulador fisiológico de este fenómeno.

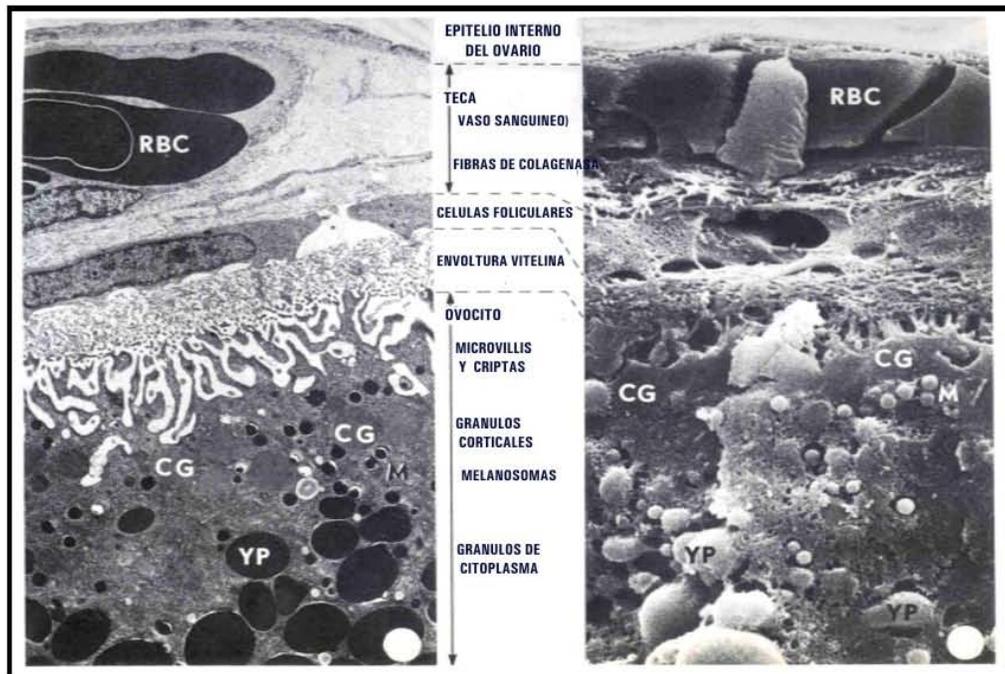
Dado que las características eléctricas del sistema purinérgico folicular tiene múltiples efectos, es importante explorar la posibilidad de la expresión de diferentes subtipos de receptores en las células foliculares. La importancia de esta investigación se centra en dos evidencias fundamentales: 1) la corriente  $I_{K,AMPc}$  ha sido propuesto como un modulador importante de la maduración del ovocito (Wibrand *et al.*, 1992; Honoré & Lazdunski, 1991) y 2) el ovocito de *X. laevis* libera ATP en diversas condiciones (Bodas *et al.*, 2000; Maroto y *et al.*, 2001; Aleu *et al.*, 2003), además esta liberación modula mediante mecanismos parácrinos las propiedades eléctricas del folículo (Saldaña *et al.*, 2005; Reyes, 2005). Por lo tanto, para estudiar la posible diversidad de los receptores purinérgicos en el folículo se propone en la presente tesis el análisis farmacológico de las respuestas  $F_{in}$  y de la inhibición de  $I_{K,AMPc}$  por ATP y otros agonistas purinérgicos.

## ANTECEDENTES.

### 1. EL FOLÍCULO Y EL OVOCITO DE LA DE RANA *Xenopus laevis*:

Los ovarios de una rana adulta se encuentran constituidos por lóbulos separados, con forma piramidal y unidos al mesenterio dorsal, estos lóbulos varían en número pero en promedio para *Xenopus laevis* son de 20 a 23. Los lóbulos contienen miles de folículos en su interior, ordenados en un gradiente donde los más pequeños e inmaduros se encuentran en la parte más externa y los más grandes y maduros en la luz del mismo (Ogielska & Kotusz, 2004).

Se ha establecido que los folículos pasan por seis (I-VI) estadios de desarrollo (Dumont, 1972), en un estudio de microscopía electrónica del ovario de *Xenopus laevis* elaborado por Dumont y Brummett (1978) con la técnica de barrido, mostró que los folículos en los estadios IV al VI de desarrollo son un complejo celular (Figura 3) con los siguientes componentes:

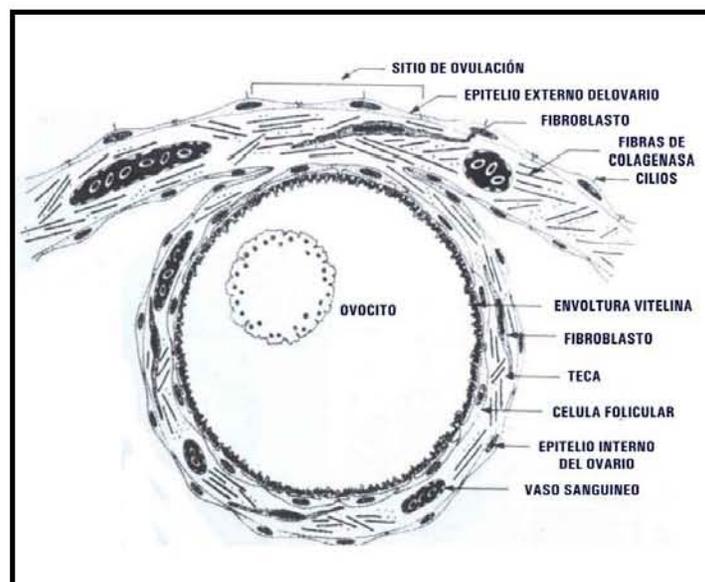


**Figura 3:** Comparación entre TEM y SEM que muestran la relación entre las diferentes estructuras que constituyen un ovocito de estadio VI. RBC: Eritrocito, CG: Gránulos corticales, YP: Gránulos citoplasmáticos, M: Melanosomas (Modificada de Dumont & Brummett, 1978).

En el centro del folículo se encuentra localizado el *ovocito* en desarrollo, éste está rodeado por una capa acelular denominada *capa vitelina*, inmediatamente en la periferia se encuentra una monocapa de *células foliculares*, que están envueltas por una capa de tejido conectivo compuesto principalmente de fibras de colágena, llamada membrana basal, la esta le sigue un complejo celular vascularizado (excepto en el sitio de ovulación) denominado *teca*. El folículo esta unido a la cara del lumen del ovario por el *epitelio interno* (Figura 4), el *epitelio externo* lo une a la cara celómica.

### 1.1 Epitelio interno y Epitelio externo:

El epitelio externo se encuentra en la superficie exterior del ovario y está constituido por una monocapa continua de células escamosas. Estas células forman estrechas asociaciones exhibiendo una apariencia de red, su topografía es lisa con ligeras zonas rugosas (fruncidas) a lo largo de los márgenes. Estas áreas de unión están formadas por desmosomas. Estas células además de exhibir los organelos típicos muestran largos microfilamentos unidos a la membrana plasmática.



**Figura 4:** Esquema de un ovocito de rana *Xenopus laevis* con su recubrimiento folicular (Modificada de Dumont & Brummett, 1978).

El epitelio interno está formado por una capa continua de células escamosas regulares de forma poligonal que dan un revestimiento al folículo en el lumen del ovario, muestran microvillis que se extienden hacia su célula vecina a lo largo de una línea de contacto.

Las áreas de unión de las células son generalmente interdigitadas y se caracterizan por extensos arreglos de desmosomas. En el citoplasma, las células presentan organelos típicos y a partir de la región central de la membrana proyecta un cilio hacia la cara celómica (Dumont & Brummett, 1978).

## **1.2 Teca:**

La teca se encuentra entre el epitelio interno y la membrana basal folicular. Es un estroma de tejido conectivo, colágena, células parecidas a fibroblastos y vasos sanguíneos (capilares y células sanguíneas). Ocasionalmente presenta células nerviosas y células musculares lisas, pero éstas son poco frecuentes.

Las fibras de tejido conectivo se encuentran ordenadas dentro de paquetes que están aleatoriamente arregladas a través del estrato. Los capilares y los fibroblastos se encuentran dispersos entre las fibras de tejido conectivo, los primeros están ausentes en el sitio de ovulación (Dumont & Brummett, 1978).

## **1.3 Células foliculares:**

Son un conjunto de células que se ubica debajo de la teca de cada folículo, formando una monocapa. Son células estrelladas, largas y aplanadas que al parecer se diferencian a partir de las células fibroblásticas de la teca durante el proceso de maduración del folículo. Cada célula folicular se encuentra en contacto con sus células vecinas, estas asociaciones se caracterizan por dos tipos de uniones las de tipo desmosomal y las uniones comunicantes o “gap junctions”. Asociados a los desmosomas encontramos fibrillas que unen una célula a otras y en ocasiones se extienden desde los sitios de unión de una cara hasta las uniones de la cara opuesta.

La superficie superior de las células foliculares tiene una topografía que varía de acuerdo con el estadio de desarrollo del folículo. Hacia el estadio IV al VI muestran un aspecto esencialmente liso. El área desde los márgenes hasta la superficie basal de las células es muy larga y presenta proyecciones anchas denominadas macrovillis. Estas penetran en la envoltura vitelina a través de sus poros y hacen contacto con la membrana plasmática del ovocito. Estos macrovillis frecuentemente terminan en uniones tipo “gap junction” con otras proyecciones del macrovillis, comúnmente hacen contacto con microvilli formado por la membrana del ovocito (ver más adelante) (Dumont & Brummett, 1978). Estas formaciones son la base morfológica de la comunicación eléctrica entre las células foliculares y el ovocito.

#### **1.4 Envoltura vitelina:**

Se ubica entre las células foliculares y la membrana plasmática del ovocito. Se encuentra constituida por conjuntos de miles de filamentos, algunos de los cuales se dirigen de manera tangencial, formando una intrincada red. Esta superficie se encuentra perforada con poros de varios tamaños formando túneles que corren en distintos ángulos (Dumont & Brummett, 1978), a través de los cuales cruzan y hacen comunicación el macrovilli de las células foliculares con el microvilli del ovocito.

#### **1.5 Ovocito:**

Un ovocito completamente desarrollado se encuentra rodeado por la envoltura vitelina, las células foliculares, los componentes de la teca y el epitelio interno del ovario, debido a que crece y se desarrolla en este tejido. Se han descrito VI estadios de maduración del ovocito (Dumont, 1972), en los últimos estadios el ovocito, presenta una polarización que se hace evidente con la presencia de un polo animal y uno vegetal. El polo animal se distingue por la acumulación de pigmento lo que hace que se vea de color café a negro, y es en esta región del ovocito donde encontramos el núcleo del ovocito o vesícula germinal. Por su parte

el polo vegetal es de un color mucho más claro, generalmente amarillo (Robinson, 1979).

Un ovocito de estadio VI de desarrollo está en “arresto meiótico”, en la transición de la fase  $G_2$  del ciclo celular y la profase I de la meiosis. Su transformación a un gameto fertilizable la lleva a cabo cuando el ovocito es estimulado por diferentes transmisores, tales como la progesterona continuando con su “maduración meiótica” y concluyendo su ciclo meiótico. La evidencia morfológica de que el ovocito está maduro, es la presencia de un punto blanco en el polo animal, que se debe a la ruptura del núcleo o vesícula germinal, producto de una reorganización global de la ultraestructura del ovocito (Tunquist & Maller, 2003). Cabe destacar que este proceso de maduración meiótica del ovocito se encuentra estrechamente regulado por la envoltura de células foliculares, por mecanismos que no han sido elucidados por completo. En los que se piensa que las características eléctricas, así como las moléculas que las controlan como receptores y canales iónicos que juegan un papel importante (Robinson, 1979; Mulner & Ozon, 1981; Bluemink *et al.*, 1983; Bement & Capco, 1990; Simoncini & Moody, 1990; Lau *et al.*, 1994; Ferrell, 1999).

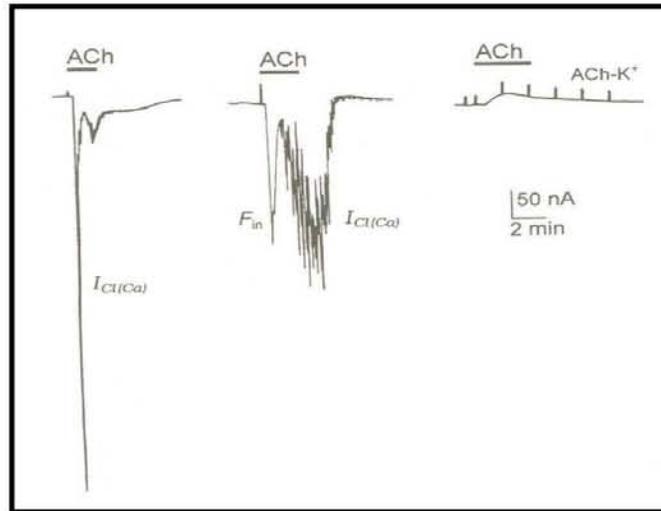
## **2. ELECTROFISIOLOGÍA.**

### **2.1 Corrientes de $Cl^-$ :**

En folículos, la activación de receptores muscarínicos genera corrientes de membrana compuestas de varias fases (Figura 5), cuya amplitud de los distintos componentes varía enormemente entre folículos de diferentes ranas.

A la fecha no se conoce si un solo subtipo de receptor muscarínico es el responsables de esta respuesta tan diversa (Arellano & Miledi, 1993). Un componente de esta respuesta a ACh es una corriente oscilatoria ( $I_{Cl(Ca)}$ ) que es preservada después de la defoliculación del ovocito (Kusano *et al.*, 1977; 1982) y

que corresponde con la apertura de canales de  $\text{Cl}^-$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  localizados en la membrana del ovocito.



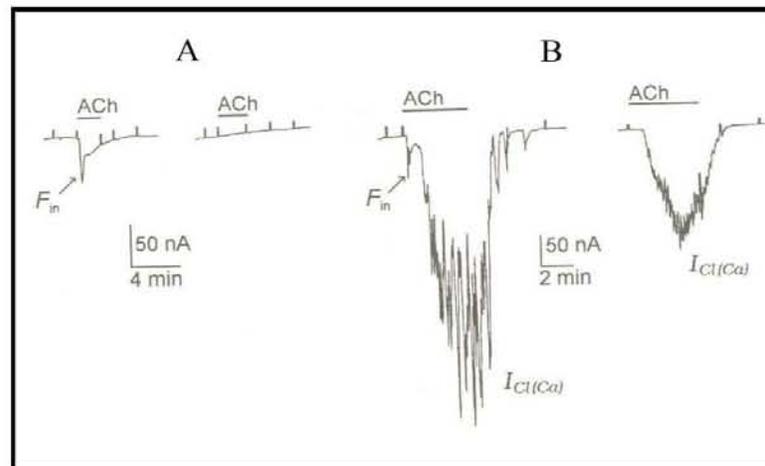
**Figura 5:** Corrientes producidas por ACh en foliculos de diferentes ranas, en los que se muestra la variabilidad de los diferentes componentes. Se muestran las corrientes  $F_{in}$ ,  $I_{Cl(Ca)}$  y la  $I_{K,AMPC}$  (Modificada de Arellano *et al.*, 1996).

La respuesta oscilatoria del  $\text{Cl}^-$  tiene un mecanismo de activación que involucra la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por la vía de activación de la fosfolipasa C (PLC) y la producción de fosfatidil inositol ( $\text{IP}_3$ ). Se ha descrito (Arellano *et al.*, 1996, Figura 6) que después de la defoliculación desaparecen por lo menos 2 componentes de la respuesta a ACh:

- 1.- Una corriente lenta llamada  $S_{in}$  que está asociada con un incremento de la conductancia de la membrana a  $\text{Cl}^-$ .
- 2.- Una corriente rápida llamada  $F_{in}$  que está asociada con un incremento de la conductancia de la membrana a  $\text{Cl}^-$ .

Se ha establecido que las corrientes  $F_{in}$  y  $S_{in}$  son producidas por las células foliculares del ovocito. Estas respuestas se pueden mantener hasta 6 días después

de la obtención de los folículos, si se almacenan en medio Barth's suplementado con glucosa (5 mM) y suero bovino fetal (0.1-0.2%) (Arellano & Miledi, 1993). Una diferencia importante entre las respuestas  $S_{in}$  y  $F_{in}$  es que la amplitud de la primera depende de la osmolaridad del medio. De igual manera, la estimulación por ATP de los receptores purinérgicos evoca estas dos corrientes de  $Cl^-$  (Arellano *et al.*, 1998).



**Figura 6:** Efecto de la defoliculación sobre las respuestas  $F_{in}$  evocadas por ACh. Tanto en A como en B el registro de la derecha corresponde al ovocito defoliculado (Modificada de Arellano *et al.*, 1996).

En ovocitos perfundidos con una solución de Ringer Normal (RN) las respuestas  $F_{in}$  evocadas muestran un potencial de inversión ( $E_{rev}$ ) de -22 mV y en una solución con baja concentración de  $Cl^-$  es de -7 mV. En una solución donde todo el cloro es substituido por yodo (NaI-RN) la amplitud de la corriente se incrementa y el  $E_{rev}$  es de -46 mV. Esto indica que las corrientes  $F_{in}$  producidas por ATP y ACh involucran principalmente el movimiento de iones  $Cl^-$  y que los canales tienen una alta permeabilidad al ión  $I^-$ , mientras que para otros iones como  $Na^+$  o  $K^+$  no se ha encontrado permeabilidad significativa (Arellano *et al.*, 1998).

Las respuestas evocadas por ATP son mimetizadas por otros agonistas de receptores purinérgicos como UTP y 2,metil-tio-ATP (2-MeSATP) (Figura 2). Los pre-tratamientos con la toxina pertusis inhiben ~50% de la respuesta generada por ATP y ACh, apoyando la idea de que el receptor involucrado pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Arellano *et al.*, 1998).

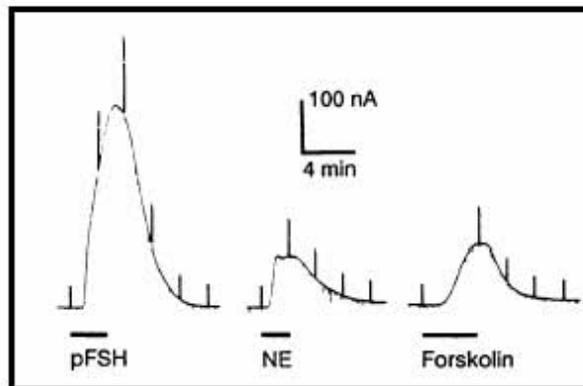
El mecanismo de activación de  $F_{in}$  no está completamente entendido, pero se ha observado que no está relacionado con la síntesis de AMPc o la estimulación de PLC. Las respuestas no son abolidas con la inyección intracelular de quelantes de  $Ca^{2+}$ , tales como el ácido etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraácetico (EGTA) o el ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano—N,N,N',N'-tetraácetico (BAPTA) lo que indica que es estrictamente independiente de  $Ca^{2+}$  intracelular (Arellano & Miledi, 1993; Arellano *et al.*, 1998).

Las respuestas  $F_{in}$  activadas por ATP no son bloqueadas por atropina (10-100 $\mu$ M) o por pirenzipina (1 $\mu$ M), lo que indica que ATP no activa la corriente de forma indirecta a través de receptores muscarínicos. En cambio son inhibidas por suramina, un inhibidor no específico de receptores purinérgicos con el siguiente orden de potencia ATP=2-MeSATP>UTP (Arellano *et al.*, 1998; 1996).

## **2.2 Corrientes de $K^+$ :**

Las corrientes de  $K^+$  pueden ser inducidas por una gran variedad de sustancias (Figura 7) como los agentes  $\beta$ -adrenérgicos y los catecolaminérgicos tales como la noradrenalina y la dopamina (Kusano *et al.*, 1977; 1982), y algunas gonadotropinas como la hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante y la hormona gonadotropina corionica (cGH). Además se ha reportado que algunos péptidos como el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la oxitocina y algunas prostaglandinas son capaces de generar estas corrientes de  $K^+$  (Woodward & Miledi, 1987; 1989).

Se sabe también que la potenciación de la síntesis intracelular del AMPc, o bien la inyección intracelular del AMPc es capaz de mimetizar esta corriente, por lo que se propuso que los diferentes receptores que activaban estos canales lo hacían a través de la síntesis de este segundo mensajero (Van Renterghem *et al.*, 1984; 1985) lo anterior está de acuerdo con el hecho de que los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos son activadores de la adenilato ciclasa dando como resultado la elevación de los niveles intracelulares de AMPc.



**Figura 7:** Corrientes  $I_{K,AMPc}$  generadas en un mismo folículo por 5mg/ml de FSH, 0.1mM de NE y 0.5mg de Foskolina, con 15 minutos de lavado entre la aplicación de cada uno de los agonistas (Modificada de Woodward & Miledi, 1987).

En 1989 Miledi y Woodward, mostraron que cuando se trataba el folículo con algún procedimiento que eliminaba completamente las células foliculares todas las corrientes hiperpolarizantes acarreadas por  $K^+$  dependientes de AMPc eran eliminadas. Esto sugirió que el origen de estas respuestas está en la membrana de las células foliculares que rodean al ovocito (Miledi & Woodward, 1989a). Posteriormente, fue demostrado que los ovocitos completamente defoliculados eran incapaces de acumular AMPc en respuesta a diferentes drogas pero que células foliculares aisladas de los mismos folículos acumulaban AMPc en respuesta a las drogas (Greendfield *et al.*, 1990). Esto apoyaba la idea que los receptores a estas sustancias se encuentran exclusivamente en las células foliculares y que las corrientes de  $K^+$  dependientes de AMPc ( $I_{K,AMPc}$ ) son generadas en las células foliculares. Proponiéndose que esta respuesta era transmitida eléctricamente al ovocito desde las células foliculares a través de la extensa red de uniones comunicantes que se establecen entre ambos tipos celulares.

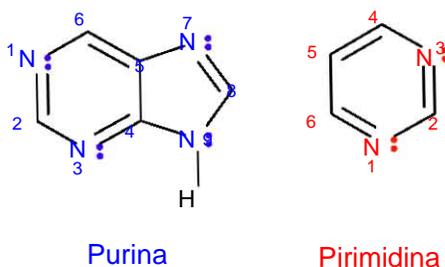
Otra característica importante de estas corrientes es que son inhibidas por la estimulación de receptores a ACh (Van Renterghem *et al.*, 1985). Este efecto de inhibición es mimetizado por los ésteres de forbol, lo que sugería que el mecanismo de inhibición se encontraba relacionado con la activación de una fosfolipasa C (PLC) (Van Renterghem *et al.*, 1985; Dascal *et al.*, 1985). Sin embargo Miledi y Woodward en 1989 plantearon por un lado que el mecanismo de inhibición

provocado por la ACh y otras sustancias que actúan sobre receptores muscarínicos, ocurría en las células foliculares y no en el ovocito como se pensaba. Y que esta inhibición es una propiedad intrínseca de los receptores muscarínicos presentes en las células foliculares, ya que ninguna otra sustancia que generara la hidrólisis del fosfatidil inositol en el ovocito era capaz de mimetizar este efecto, en las células foliculares. De lo que se deriva que quizás otro mecanismo, además de la activación de una PLC se encuentra involucrado, en esta inhibición por ACh (Miledi & Woodward, 1989b).

### 3. SUSTANCIAS PURINÉRGICAS:

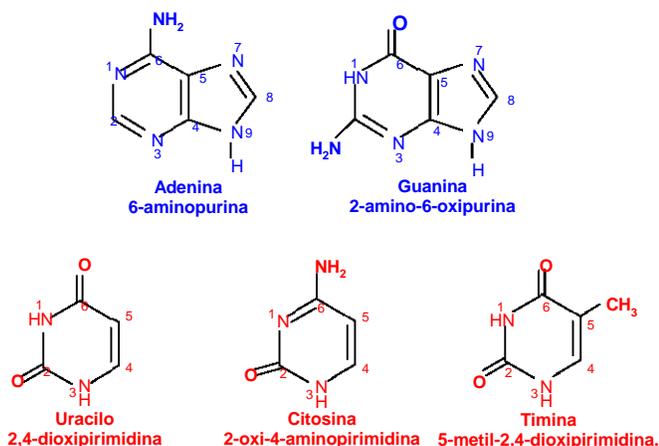
La purina y la pirimidina son aminas heterocíclicas aromáticas (Figura 8). La pirimidina forma un anillo coplanar de 6 átomos presentando en las posiciones 1 y 3 dos átomos de nitrógeno. La purina se encuentra constituida por 2 anillos coplanares de 5 y 6 átomos, fusionados en las posiciones 4 y 5, presenta 4 átomos de nitrógeno en las posiciones 1, 3, 7 y 9. (Wintrobe, 1984; Morrison, 1990).

Presentan un comportamiento de base muy débil, dado que forman sistemas anulares aromáticos heterocíclicos, lo que les proporciona potencial para interaccionar mediante puentes de hidrógeno. La característica aromática de los anillos les confiere además un carácter apolar y esto permite que también participen en asociaciones hidrofóbicas (Bohinski, 1998).



**Figura 8:** Esquema de la estructura de las aminas heterocíclicas purina y pirimidina, en donde se muestra las posiciones de cada uno de los átomos que constituyen los anillos (Modificada de Wintrobe, 1984).

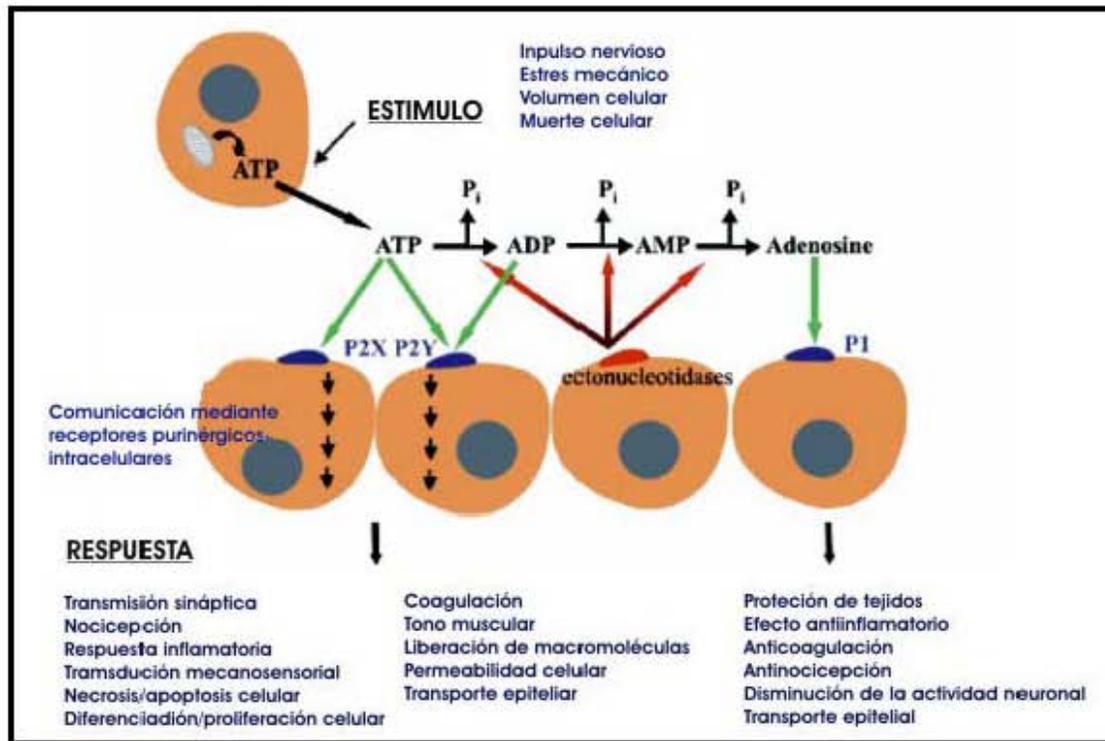
De manera general a los compuestos producto del cambio de algún sustituyente en los anillos se les denomina purinas y pirimidinas respectivamente. Las más comunes son las denominadas bases nitrogenadas (Figura 9), que forman parte de la estructura del ADN y ARN: la adenina, guanina, citosina, timina y uracilo (Bohinski, 1998).



**Figura 9:** Purinas y pirimidinas que constituyen el ARN y el ADN (Modificada de Bohinski, 1998).

Las purinas son moléculas ubicuas encontradas en todas las células, pueden funcionar como acarreadores energéticos, unidades constructoras de los ácidos nucleicos, cotransmisores, segundos mensajeros intracelulares, intermediarios metabólicos y moléculas de señalización extracelular (Illes *et al.*, 2000).

Esto les permite involucrarse en una gran variedad de funciones biológicas mediante mecanismos de señalización autócrino o parácrino (Figura 10), actuando directamente en la membrana celular sobre una familia de receptores específicos denominados receptores purinérgicos. La acción de los nucleótidos sobre sus receptores es determinada también por la localización de una cascada de ectoenzimas hidrolíticas en la superficie externa de la membrana, que secuencialmente pueden degradar los nucleótidos 5'-trifosfato hasta fosfato libre o pirofosfato, pasando por sus respectivos nucleósidos (difosfato y monofosfato).



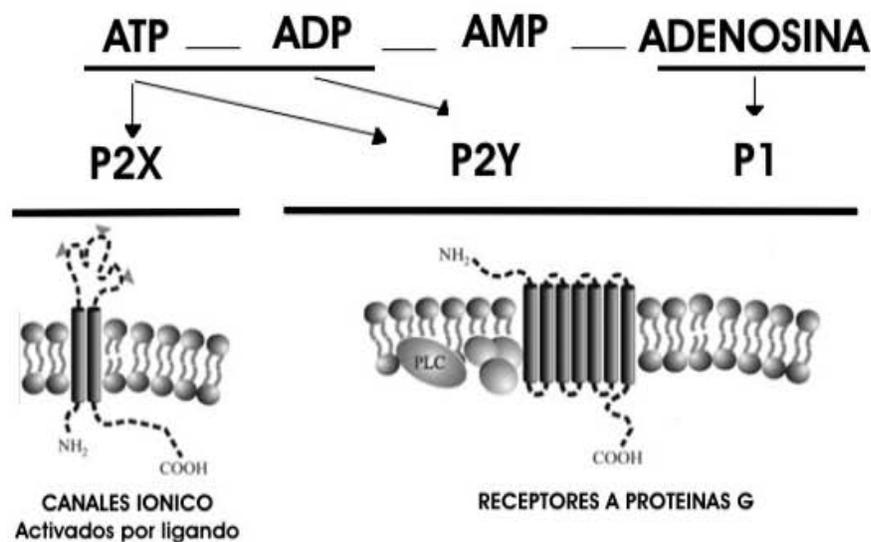
**Figura 10:** Representación esquemática de los diversos efectos que puede tener el ATP en su papel como molécula de señalización (modificada de Novak, 2003).

Estos últimos no solo son intermediarios del metabolismo de la purinas, si no que también pueden actuar como moléculas de señalización actuando sobre distintos receptores purinérgicos, debido a que una célula frecuentemente se encuentra equipada con varios tipos de receptores purinérgicos.

Esto da la posibilidad de que, por ejemplo, el ATP que activa receptores purinérgicos del tipo P2, podría ser degradado hasta adenosina y actuar así, secuencialmente sobre receptores purinérgicos del tipo P1 (figura 11, ver apartado de “receptores purinérgicos”). Aunque también podría ser reciclado por las células vecinas y reutilizado para la síntesis de nucleótidos (Illes *et al.*, 2000, Zimmerman, 2000).

Estas ectoenzimas que son capaces de hidrolizar el ATP y otros nucleótidos, se conocen en general como ectonucleotidasas. Son un grupo de proteínas que generalmente lleva a cabo la catálisis fuera de la célula, sobre la membrana plasmática, cuyo patrón de distribución depende del tipo de célula y del proceso

fisiológico o patofisiológico en el que se encuentre involucradas (Zimmerman, 2000). Son las encargadas de regular estrechamente el tiempo de vida de los nucleótidos en el medio extracelular (Novak, 2003). Hay evidencia de que algunas de estas enzimas pueden ser multifuncionales, y que en adición a su actividad catalítica, podrían estar interviniendo en la adhesión celular o bien como receptor transmembranal (Zimmerman, 2000). Generalmente se encuentran unidas a la membrana plasmática, sin embargo también pueden ser escindidas y existir como una isoforma extracelular soluble, a la que se le ha denominado exonucleotidasa (Novak, 2003; Zimmerman, 2000). Su capacidad catalítica depende del medio ambiente extracelular y requiere de la presencia de cationes divalentes tales como  $\text{Ca}^{+2}$  o  $\text{Mg}^{+2}$ , así como de un pH alcalino. (Zimmerman, 2000).



**Figura 11:** Diagrama en el que se representa los tipos de receptores purinérgicos en que el ATP podría actuar al ser hidrolizado por ectonucleótidasas (modificada de Illes y cols., 2000, Novak I, 2002).

Las ectonucleótidasas poseen una amplia distribución en los tejidos en donde se expresan en íntima asociación con los receptores purinérgicos (Matsuoka, 2004).

Estas enzimas llevan a cabo transformaciones específicas (ver Tabla I), lo que ha permitido establecer los siguientes grupos o familias:

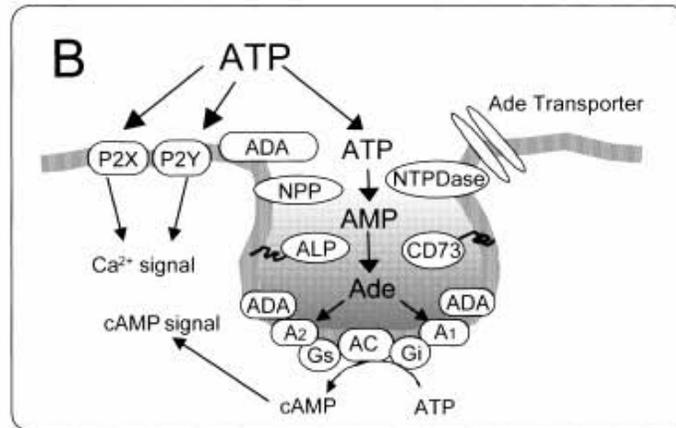
1. E-NTPDasas o ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa.
2. E-NPP o ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa.
3. Fosfatasa alcalina.
4. 5'-ectonucleotidasa.
5. Otras: La ectonucleótido difosfocinasa o miocinasa y ectoenzimas que hidrolizan polifosfatos de diadenosina.

Ecto-enzimas (Nombre alternativo)	Reacción Catalítica
NTPDasa 1 (ecto-apirasa, CD39)	ATP→ADP→AMP
NTPDasa 2 (ecto-ATPasa, CD39L1)	ATP→ADP
NTPDasa (HB6,CD39L3)	ATP→ADP→AMP
NPP1 (PC-1)	ATP→AMP
NPP2 (autotaxin, PD- $\alpha$ )	ATP→AMP (LPC→LPA)
NPP3 (gp130 <sup>RB B-6</sup> , B10,PD- $\beta$ )	ATP→AMP
Ecto-5'-nucleotidasa (CD73)	AMP→Adenosina
Ecto-alcaldina fosfatasa	ATP→ADP→AMP→Adenosina

**Tabla I:** Catabolismo extracelular del ATP que efectúa cada familia de ectonucleotidasas (Modificada de Matsouka & Ohkubo, 2004).

A la fecha se ha encontrado evidencia suficiente para plantear que en ciertas células existen pequeños microdominios en el espacio extracelular en el que coexisten ectonucleotidasas y receptores purinérgicos (Figura 12).

En estos micordominios el ATP es activamente liberado e hidrolizado hasta AMP y adenosina. Lo que permite la activación de respuestas a través de receptores purinérgicos del tipo P1 (Matsuoka. 2004). Lo que sugiere que en realidad se trata de un sistema de regulación tripartita en el que el ATP indirectamente activa los receptores de adenosina a través de una rápida y localizada formación de adenosina, catabolizada por las ecto-nucleotidasas (Kato *et al.*, 2004)



**Figura 12:** Modelo en que se muestra la estrecha asociación entre las ecto-nucleótidasas, los receptores a ADO, el ATP y la adenosina, en los microdominios de la superficie de membrana. ADA: Adenosina desaminasa, AC: Adenilato ciclasa, G<sub>i</sub>: proteína G inhibitoria, G<sub>s</sub>: proteína G estimuladora, NPP, NTPDasa, ALP y CD73: ecto-nucleótidasas, Ade transporter: transportador de adenosina (Modificada de Matsuoka, 2004).

En estudios realizados en el núcleo del tracto solitario y en el hipocampo se ha encontrado que el tiempo de ejecución, la amplitud máxima y rango de concentración efectiva agonista, de una respuesta inducida por el ATP vía la activación de un receptor P1 es muy similar a la inducida directamente la adenosina. Esto sugiere que en estos microdominios se forma un sistema de regulación coordinando que controla el medioambiente y regula el balance entre los efectos del ATP y la adenosina en la transmisión sináptica (Kato *et al.*, 2004).

El mecanismo por el que los nucleótidos son liberados al espacio extracelular es parcialmente conocido (Illes *et al.*, 2000), una de las propuestas más recientes involucra canales que incrementan la conductividad de ATP. Por otro lado se ha sugerido que proteínas del tipo ABC (ABC: ATP-binding cassette protein family) que unen ATP, podrían estar involucradas en su transporte a través de la membrana celular. Tal es el caso de la P-glicoproteína y el CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) que se activan cuando epitelios u otros tipos de células son sometidas a estrés mecánico o hipotónico (Illes, 2000). Aunque para el CFTR se le atribuye, más bien un rol regulador del mecanismo de liberación (Novak, 2003).

En este sentido, se sabe que también los hemicanales de conexina tienen algo que ver con la liberación extracelular del ATP. Se cree que podría estar

perneando ATP o bien podrían estar asociados con la organización y movimiento intracelular de las vesículas (Novak, 2003). Así pues, aunque se han propuesto varios mecanismos de liberación aun no es claro cual es el fisiológicamente relevante, pero los estudios indican que la liberación vesicular de ATP es el mecanismo general para todas las células (Novak, 2003). ya que se ha reportado que en varios tipos celular tales como las neuronas, las adrenales, las plaquetas, los mastocitos y los basófilos son capaces de liberar por exocitosis gránulos que poseen ATP, Guanosina 5'-trifosfato (GTP) y UTP (Illes *et al.*, 2000).

#### **4. RECEPTORES PURINÉRGICOS.**

A la fecha se han descrito 2 familias principales de receptores purinérgicos, los *receptores P1* o *receptores a ADO* y los *receptores P2*, que reconocen principalmente ATP, ADP, UTP y Uridina 5' difosfato (UDP) (Ralevic & Burnstock, 1998).

##### **4.1 Receptores a ADO/P1:**

Estos han sido clasificados de acuerdo con sus similitudes moleculares, bioquímicas y farmacológicas dentro de 4 subtipos: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub>. De manera general se ha establecido que estos receptores son proteínas integrales de la membrana constituidas por 7 pases transmembranales ( $\alpha$ -hélices) que se asocian a proteínas G (Ralevic & Burnstock, 1998). La adenosina es el principal agonista de esta clase de receptores y de ahí la razón de su nombre, aunque también son activados por la inosina y sus derivados (Fredholm *et al.*, 2001). La estructura genómica parece ser similar para todos los receptores humanos. Hay un solo intrón que interrumpe la secuencia en una región correspondiente a la segunda asa intracelular (Fredholm *et al.*, 2001).

Después de la activación, el efecto del receptor esta determinado por el tipo de proteína G que media su efecto. Los receptores A<sub>1</sub> se encuentran acoplados a la proteína G<sub>i</sub> y los receptores A<sub>3</sub> se encuentran acoplados a proteínas G<sub>o</sub>. Por su

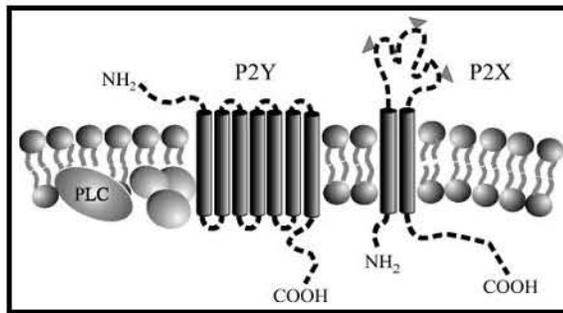
parte los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  están acoplados a proteína  $G_s$ , aunque recientemente hay evidencia de que los receptores  $A_{2A}$  se pueden acoplar a diferentes subtipos de proteínas G dependiendo del tejido ( $G_s$  en tejidos periféricos,  $G_{olf}$  en el estriado (Kull *et al.*, 2000)), en donde además se pueden acoplar a más de una proteína G al mismo tiempo (Fredholm *et al.*, 2001).

Así los receptores  $A_1$  inhiben la adenilato ciclasa, activan varios tipos de canales de  $K^+$  (probablemente vía las subunidades  $\beta,\gamma$  de la proteína G), inactivan canales de  $Ca^{2+}$  tipo N, P y Q, activan la fosfolipasa  $C\beta$ , etcetera. Lo mismo parece ser cierto para el receptor  $A_3$ . Por su parte los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  estimulan la formación de AMPc y movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular (Fredholm *et al.*, 2001).

Al igual que todos los receptores acoplados a proteína G, cuando son expuestos a un agonista, los receptores P1 generan una atenuación o desensibilización de la respuesta. Sin embargo la magnitud de este efecto y el mecanismo que involucra depende del subtipo de receptor. La mayor diferencia se encuentra entre los receptores  $A_1$  y  $A_3$ , que al ser expresados en células CHO, el receptor  $A_1$  parece no desensibilizarse por completo y lo hace de manera más lenta que el receptor  $A_3$ . La diferencia al parecer se debe a varios factores tales como la habilidad de la kinasa para fosforilar la proteína G correspondiente o la línea celular en que se expresa (Fredholm *et al.*, 2001).

## **4.2 Receptores tipo P2:**

El ATP extracelular actúa sobre los receptores de membrana, de acuerdo con su estructura molecular y mecanismo de transducción estos receptores se dividen en 2 grandes familias (Figura 13): los P2X que son receptores canal y los receptores P2Y que se encuentran asociados a proteínas G (Ralevic & Burnstock, 1998). A la fecha en mamíferos, se han descrito 7 receptores del tipo P2X: P2X<sub>1</sub> al P2X<sub>7</sub>. Mientras que para los receptores P2Y se han descrito 8 subtipos: P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> (Marteau *et al.*, 2003) y P2Y<sub>14</sub> (Abbracchio *et al.*, 2003).



**Figura 13:** Representación de los 2 subtipos de receptores P2: Los receptores P2X, receptores canal que se constituyen por subunidades de 2 pases transmembranales y los receptores P2Y constituidos por 7 pases transmembranales y se encuentran acoplados a proteínas G, (modificada de Novak, 2003).

Pertenecientes a los receptores P2Y además existen: el tp2y, P2Y<sub>3</sub> y P2Y<sub>8</sub> que fueron descritos en pavo, pollo y rana *Xenopus laevis* respectivamente. En la actualidad se ha reportado que el P2Y<sub>3</sub> es equivalente al P2Y<sub>6</sub> de mamífero, para el P2Y<sub>8</sub> ya hay descrito un homólogo en humanos, aunque no así para el tp2y (Burnstock, 2004, Kügelgen & Wetter, 2000).

#### 4.2.1 Receptores P2X:

Hay 7 genes para las subunidades de los receptores P2X, estos varían considerablemente en tamaño. Las subunidades formadas de 384 a 595 aminoácidos tienen dos dominios transmembranales separados por un dominio extracelular, cuyos extremos NH<sub>2</sub> y COOH terminal son intracelulares. Presentan en su secuencia 4 sitios para N-glicosilación. (Figura 14). No se ha reportado homología de secuencia de estos receptores con alguna otra familia de proteínas.

Poseen de 11-13 exones y todos forman una estructura bastante bien conservada de uniones intrón/exón. Se han descrito una gran variedad de variantes alternativas, la mayoría son formas donde uno o más exones han sido removidos (North, 2002). Forman receptores-canal multiméricos de varias subunidades, estas pueden ser homoméricas o bien heteroméricas que se generan por combinaciones de las subunidades de estos receptores.

#### 4.2.1.1 Compuestos usados para clasificar receptores P2X:

Aunque muestran un gran polimorfismo farmacológico, de manera general los receptores P2X presentan respuesta a ATP,  $\alpha,\beta$ -metilen ATP ( $\alpha,\beta$ -meATP) y  $\beta,\gamma$ -metilen ATP ( $\beta,\gamma$ -meATP), y son antagonizados por ácido piridoxal-5'-fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfónico (PPADS), ácido 8- (bezamida) naftaleno- 1,3,5-trisulfónico (NF023), ácido 8,8'- (carbonilbis (inimo- 4,1- fenilencarbonilimino- 4,1- fenilencarbonilimino)) bis (1,3,5- naftaltrisulfónico (NF279) y suramina (Lambrecht, 2000; North, 2002).

#### Receptores P2X<sub>1</sub>

Fue clonado por primera vez en rata, aunque también ha sido clonado en humano. Este receptor forma un canal catión selectivo que exhibe una pequeña selectividad a sodio por encima de potasio. Es ligeramente permeable a cationes orgánicos tales como Tris o N-metil-D-glucamina y es muy permeable a Ca<sup>2+</sup>. El Ca<sup>2+</sup> extracelular tiene un ligero efecto inhibitorio, al igual que el pH ácido.

El ATP y  $\alpha\beta$ -meATP son agonistas capaces de generar respuestas de igual magnitud, característica que comparte con el receptor P2X<sub>3</sub> y que los distingue del resto de los receptores homoméricos Otro buen agonista es el 2'-3'-O-(benzoil-4-benzoil)-ATP (BzATP). Una aplicación sostenida de cualquier agonista abre rápidamente el canal, generando una rápida desensibilización e internalización del receptor, reapareciendo el receptor cuando es retirado el agonista (North, 2002).

Este receptor es bloqueado por suramina y análogos, los cuales muestran una alta afinidad por el receptor. El PPADS es un buen antagonista aunque hay otros más selectivos como la piridoxina cíclica- $\alpha$ -4,5-monofosfato-6-azo-fenil-2',5'-disulfonato (MRS2220) que bloquea a una concentración de aproximadamente ~10  $\mu$ M. Los análogos de PPADS bloquean estos receptores a una concentración media de inhibición (IC<sub>50</sub>) de ~10 nM. Otros antagonistas son (2',3'-O-(2,4,6-trinitrofenil)-ATP (TNP-ATP) que tiene un IC<sub>50</sub> de ~1 nM, y algunos derivados como el TNP-ADP, TNP-AMP y TNP-GDP (North, 2002).

## Receptores P2X<sub>2</sub>

En este receptor el  $\alpha\beta$ -metATP no mimetiza la respuesta generada por el ATP. No se conocen agonistas que sean selectivos, pero ciertos iones como el zinc y el cobre potencian la activación del receptor, al igual que los protones. La cinética del canal parece depender de aspectos tales como la unión 3 moléculas de ATP al canal, los pasos de unión al canal posiblemente cooperativos, y los canales sólo se abren cuando se unen todas las moléculas de ligando. (North, 2002).

No existen antagonistas selectivos para este receptor, aunque en general los cationes divalentes causan rápidos bloqueos con el siguiente orden de potencia  $Mn^{+2} > Mg^{+2} > Ca^{+2} > Ba^{+2}$ . Estos canales han sido expresados en células HEK293, en las que mostraron una  $EC_{50}$  para ATP de  $\sim 10 \mu M$  aunque este valor varía de acuerdo con el sistema en que sea expresado, además de que las corrientes generadas por ATP incrementan su tamaño con repetidas aplicaciones. Estos receptores son impermeables a NMDG, Tris y tetraetilamonio (TEA), también presentan permeabilidad a iones monovalentes que acuerdo con la siguiente secuencia  $K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Na^+ > Li^+$ . Estos receptores generalmente se describen como no desensibilizantes, esto en comparación con P2X<sub>1</sub> y P2X<sub>3</sub>, ya que las corrientes generadas sólo declinan un poco durante la aplicación de los agonistas (North, 2002).

## Receptores P2X<sub>3</sub>

Para estos receptores al igual que para el P2X<sub>1</sub>, el  $\alpha\beta$ -meATP, es capaz de mimetizar el efecto del ATP, la respuesta a ATP es potenciada por  $Zn^{+2}$  y azul de cibacron. A bajas concentraciones el ATP (30-300 nM) produce corrientes que son sostenidas por varios segundos pero a altas concentraciones (30  $\mu M$ ) muestran una prominente desensibilización de la cual se recupera muy lentamente y solo se vuelven a obtener respuesta después de un periodo aproximado de 15 minutos. Para este receptor el 2-MeSATP es igual o más potente que el ATP. (North, 2002)

La diadenosina pentafosfato (Ap5A) es un agonista total. Entre sus antagonistas tenemos a PPADS, y TPN-ATP al igual que en los receptores P2X<sub>1</sub>. El

NF023 es ~20 veces menos efectivo en estos receptores que para P2X<sub>1</sub>. Estos receptores son marcadamente insensibles al bloqueo por Ca<sup>2+</sup> extracelular, pero este catión acelera su velocidad de desensibilización. El gadolinio tiene un efecto semejante al del Ca<sup>2+</sup>, lo que nos sugiere que ambos cationes se unen al receptor y aceleran el periodo de recuperación (North, 2002).

### **Receptores P2X<sub>4</sub>**

Estos son activados por ATP pero no por  $\alpha,\beta$ -meATP, la característica más usada para distinguir estos receptores es que el efecto del ATP es potenciado por ivermectina y el azul de cibacron aunque con un menor efecto. Cuando la aplicación ATP es de corta duración estos receptores actúan como canales catiónicos selectivos con una alta permeabilidad a Ca<sup>2+</sup>. Cuando el ATP se aplica de forma continua por varios segundos, incrementa la permeabilidad a cationes orgánicos grandes como el NMDG. Las corrientes de estos receptores declinan típicamente en 5-10 s a concentraciones máximas de ATP de ~100  $\mu$ M. (North, 2002).

Puede ser diferenciado del P2X<sub>2</sub> por el efecto de potenciación del Zn<sup>+2</sup> y el Cu<sup>+2</sup>, cationes que no afectan a los P2X<sub>4</sub>. La acidificación del medio reduce las corrientes de este receptor. Es antagonizado por el PPADS con una IC<sub>50</sub> de ~10 $\mu$ M, efecto que puede ser revertido con 10 min. de lavado. Cuando estos receptores han sido expresados en HEK203 o COS muestran una potente inhibición por Mg<sup>+2</sup>, reduciendo la amplitud de las corrientes y el tiempo que permanecen abiertos, aunque al parecer estos resultados no son específicos para este receptor ya que el P2X<sub>2</sub> también muestra este comportamiento (North, 2002).

### **Receptores P2X<sub>5</sub>**

Receptores P2X<sub>5</sub> de rata en expresión heteróloga solo manifiestan pequeñas corrientes a ATP, en comparación con P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub> y P2X<sub>4</sub> expresados bajo las mismas condiciones (North, 2002).

## **Receptores P2X<sub>6</sub>**

Este receptor parece ser una subunidad silenciosa, ya que cuando es expresado en ovocito y estimulado por ATP o cualquier otro agonista purinérgico, no genera corrientes (Nicholas, 2001).

## **Receptores P2X<sub>7</sub>**

Hay 4 características principales que distinguen las corrientes generadas por este receptor. Primero que requiere de grandes concentraciones de ATP (>100  $\mu\text{M}$ ) para ser activado, segundo que el BzATP es 10-30 veces más potente que el ATP, tercero que la potencia de ATP y BzATP es incrementada por el  $\text{Ca}^{2+}$  o el  $\text{Mg}^{+2}$  extracelular y cuarto, que con repetidas aplicaciones del mismo agonista se incrementa la permeabilidad del receptor y las corrientes generadas muestran cambios en amplitud y cinética (North, 2002).

El ADP y AMP son agonistas muy débiles, sin embargo cuando son aplicados después de una breve exposición a ATP la efectividad de ambos se incrementa, lo que indica que la aplicación de ATP causa un cambio en el receptor que le impide la diferenciación entre ATP, ADP y AMP (North, 2002). Hay 5 tipos principales de bloqueadores, el primero son iones como:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{H}^+$ . El segundo son los genéricos de los receptores P2X, la suramina y el PPADS, además del azul brillante G y el ATP-oxidizado. El tercer tipo contiene grandes cationes como el calmidazolium y KN-62. En el cuarto grupo tenemos  $17\beta$ -estradiol y finalmente anticuerpos monoclonales (North, 2002).

### **4.2.2 Receptores P2Y:**

Estos receptores se caracterizan por responder a nucleótidos de purina y pirimidina. Por ejemplo el P2Y<sub>4</sub> (humano) y el P2Y<sub>6</sub> muestran afinidad por UTP y ADP respectivamente y el P2Y<sub>2</sub> es activado tanto por ATP como UTP. Estos receptores poseen entre 308 a 377 amino ácidos, están constituidos por 7 pasos transmembranales y se encuentran acoplados a proteína G (Ralevic & Burnstock,

1998). Los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>11</sub> están acoplados a proteínas G<sub>i</sub>, activando la fosfolipasa C y movilizándolo Ca<sup>2+</sup> por la vía del IP<sub>3</sub> que activa proteína quinasa C (Nicholas, 2001).

Los receptores P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub> son considerados como una subfamilia de receptores P2Y, ya que son estructuralmente distintos presentando una baja identidad con otros receptores P2Y. Estos se encuentran acoplados a G<sub>i</sub> y responden a nucleótidos difosfato de adenina tales como Adenosina-5'-O-(2-azufre)-difosfato (ADPβS), ADP, 2-MeSADP, (Marteau *et al.*, 2003).

#### **4.2.2.1 Compuestos usados para clasificar los receptores P2Y**

Los receptores P2Y poseen tiempos de respuesta bastante largos en comparación con los receptores P2X debido a que su mecanismo de transducción involucra sistemas de segundos mensajeros y/o conductancias mediadas por acoplamiento a proteínas G (Ralevic & Burnstock, 1998). Los receptores P2Y presentan un gran polimorfismo farmacológico, sin embargo podemos establecer 2 rasgos farmacológicos generales:

- 1) *Tienen una cierta selectividad dirigida hacia la base purinérgica de su agonista.*  
Lo que los dividiría en 2 grandes grupos, los muestran tener preferencia por nucleótidos de adenina, tal es el caso de los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y los muestran tener preferencia por los nucleótidos de uracilo: P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>14</sub>. (Ver Tabla I, Kügelgen & Wetter, 2000, Burnstock, 2004)
  
- 2) *Poseen una cierta selectividad dirigida al tipo de nucleótido, ya sean del tipo difosfato, como es el caso de P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub> o bien trifosfato P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>8</sub>, P2Y<sub>11</sub> (Ver Tabla II, Kügelgen & Wetter, 2000, Burnstock, 2004)*

AGONISTA	P2Y <sub>1</sub>	P2Y <sub>2</sub>	P2Y <sub>4</sub>	P2Y <sub>6</sub>	P2Y <sub>8</sub>	P2Y <sub>11</sub>	P2Y <sub>12</sub>	P2Y <sub>13</sub>	P2Y <sub>14</sub>
ATP	✓	✓✓✓	✓✓		✓✓✓	✓			
ADP	✓✓		✓		✓✓		✓✓	✓✓	
2-MeSATP	✓✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓✓	
PAPET-ATP	✓✓✓								
2-MeSADP	✓✓✓*			✓✓			✓✓✓	✓✓✓	
HT-AMP	✓✓								
ATPγS	✓	✓	✓		✓✓	✓✓✓	✓		
α,β-meATP					✓*				
βγ-meATP					✓✓*				
ADPβS	✓✓					✓	✓✓		
Bz-ATP			✓ (ANTAGONISTA)		✓	✓✓✓			
UDP-glucosa									✓✓✓*
ADPβS				✓✓✓*					
2-dATP						✓✓			
Ap <sub>4</sub> A		✓✓	✓✓		✓				
UTP		✓✓✓	✓✓✓	✓	✓✓✓				
UTPγS		✓✓✓*							
UDP		✓	✓✓	✓✓✓					
CTP			✓✓		✓✓✓				
ARC-C67085-MX						✓✓*			

**Tabla II:** Principales agonista de los receptores purinérgicos del tipo P2Y clonados hasta el 2005, donde \* indica agonista selectivo. (Modificada de Burnstock, 2004, Bogdanov *et al.*, 1997).

## Receptores P2Y<sub>1</sub>

Fue clonado por primera vez de cerebro de pollo (Web *et al.*, 1993), son receptores que responden a ATP, a ADP y a ciertos polifosfatos de diadenosina, sin embargo no son activados por UDP, UTP α,β-meATP y β,γ-meATP los cuales son empleados como evidencia negativa de estos receptores. Generalmente son mucho más sensibles a nucleótidos difosfato de adenina tales como el ADP, ADPβS, adenosina-5'-O-(2-fluor)-difosfato (ADPβF) y 3-dioxiATPαS (dATPαS). Los tioester tales como el 2-MeSATP son potentes y selectivos agonistas, aunque de manera general los nucleótidos trifosfato no muestran gran potencia. Poseen una sensibilidad variable por ATP (Relavic & Burnstock, 1998).

Algunos antagonistas competitivos son la adenosina 3',5'- y 2',5'-bifosfato, son bloqueados por adenosina-3'-fosfato-5'-fosfosulfato (A3P5PS) y 3'-fosfato-5'-fosfato (A3P5P). Se han clonado de diferentes especies y tejidos en los que el ADP y ATP muestran diferente potencia. Son fuertemente antagonizados por suramina y

reactivo azul 2 y PPADS (Relavic & Burnstock, 1998; Kügelgen & Wetter, 2000). El antagonista más específico que se conoce es el MRS2179 (2'-desoxi-N6-metiladenosina 3',5'-bifosfato) (Camaioni *et al.*, 1998).

Se encuentran acoplados a proteínas  $G_{q/11}$  y  $G_s$  principalmente, pero también pueden estar asociados a proteínas  $G_i$ . Muestran sensibilidad total o parcial a la toxina pertusis y del cólera. Los receptores acoplados a proteínas  $G_{q/11}$  y  $G_s$  son bloqueados por PPADS, no así los que están acoplados a proteínas  $G_i$ . Las vías que alteran preferentemente son dos: la del  $IP_3$  y la de adenilato ciclasa. La activación de la vía del  $IP_3$  da como resultado la movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular estimulando una gran cantidad de cascadas incluyendo las de PLC, Fosfolipasa  $A_2$  ( $PLA_2$ ), que llevan a la activación de canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ , entre otros (Relavic & Burnstock, 1998).

## **Receptores $P2Y_2$**

Fue clonado por primera vez de neuroblastoma de ratón (Lusting *et al.*, 1993), son activados principalmente por nucleótidos trifosfato, el ATP y UTP son por lo general equipotentes. Presentan poca afinidad por nucleótidos difosfato tales como el ADP, así como también por 2-MeSATP y  $\alpha\beta$ -meATP, lo que provee una herramienta para su caracterización negativa. (Relavic & Burnstock, 1998).

El Uridina-5'-O-(3-azufre)-trifosfato ( $UTP\gamma S$ ) y el tetrafosfato de diadenosina ( $Ap_4A$ ) son equipotentes a el UTP y ATP (Wildman *et al.*, 2003). No tienen un antagonista selectivo, la suramina y PPADS no son por completo efectivos (Relavic & Burnstock, 1998).

Se encuentran acoplados a proteínas G del tipo  $G_{i/o}$  y  $G_{q/11}$  mediando su efecto a través de la ruptura de fosfolípidos y fosfoinositoles, y la movilización de  $Ca^{2+}$  por la vía de la  $PLC\beta$ . Son sensibles a la toxina pertusis, cuando se encuentran asociados a la fosfolipasa D (PLD). La mayoría de estos receptores no presentan desensibilización (Relavic & Burnstock, 1998).

## **Receptores P2Y<sub>4</sub>**

Fue clonado por primera vez de la placenta humana (Communi *et al.*, 1996) pero también ha sido descrito en pulmón, páncreas y músculo liso vascular de rata. Es un receptor específico a nucleótidos de uridina, prefiriendo al UTP por encima de ATP que actúa como un antagonista o agonista parcial. Recientemente se ha descrito que receptores P2Y<sub>4</sub> clonados de rata muestran equipotencia para ATP y UTP, así como también para Adenosina- 5'-o-(3-azufre)-trifosfato (ATP<sub>γ</sub>S), 2-MeSATP y Ap<sub>4</sub>A pero con una menor potencia (Wildman *et al.*, 2003). En su mayoría estos receptores no son activados por nucleótidos difosfato. No es bloqueado por la suramina, pero si por PPADS en altas concentraciones (Relavic & Burnstock, 1998).

Han mostrado estar acoplado a las proteínas G<sub>i</sub> y G<sub>q/11</sub> a lo largo de la vía de señalización para activar PLC y la síntesis de IP<sub>3</sub>. La respuesta de IP<sub>3</sub> presenta desensibilización unos minutos después de la estimulación del receptor. (Relavic & Burnstock, 1998).

## **Receptores P2Y<sub>6</sub>**

Fue clonado por primera vez del músculo liso de aorta en ratas (Chang *et al.*, 1995), en humanos se ha clonado de placenta y bazo. Es un receptor específico a uridina (Relavic, 1998).

Son activados principalmente por los nucleótidos difosfato de uridina, tales como el UDP que es un potente agonista. El UTP, ATP, ADP o 2-MeSATP son agonistas con poca o nula afinidad. Es insensible a la toxina pertusis, indicando que el mecanismo involucra a la proteína G<sub>q/11</sub> y estimulación de PLC que aumenta la síntesis de IP<sub>3</sub> (Relavic, 1998).

## **Receptores P2Y<sub>8</sub>**

Este receptor fue clonado por primera vez de la placa neural de embriones de la rana *Xenopus*, donde se expresa durante el desarrollo temprano del embrión (Bogdanov *et al.*, 1997), a la fecha ya se reportado el homólogo en humanos

clonado de las células HL60 (Adrian *et al.*, 2000) . El ADP $\beta$ S es muy potente para este receptor, pero su principal característica farmacológica es que puede ser activado de manera equipotente por nucleótidos trifosfato (ATP=UTP=CTP=GTP=ITP) cuando es expresado heterológicamente en ovocitos (Bogdanov *et al.*, 1997).

Responde a bajas concentraciones de ATP (10-300 nM) con una corriente oscilatoria de duración prolongada y a altas concentraciones (1  $\mu$ M) con una corriente bifásica cuyo segundo componente persiste por 40-60 minutos. No es activado por trifosfatos o difosfatos inorgánicos (trisodio trifosfato o pentasodio tripolifosfato), también es activado ligeramente por polifosfatos de adenosina diadenosina (ApxA) con una EC<sub>50</sub> promedio de 100  $\mu$ M. El 2-MeSATP, el  $\alpha\beta$ -MeATP y el BzATP son agonistas poco potentes para este receptor. Es inhibido por suramina con una IC<sub>50</sub> de 27.4  $\mu$ M (Bogdanov *et al.*, 1997).

### **Receptores P2Y<sub>11</sub>**

Este receptor fue clonado de placenta humana (Communi *et al.*, 1997), presenta segmentos de homología con los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>2</sub>. Es selectivo a nucleótidos de adenosina del tipo trifosfato, por lo que no es activado por UTP y UDP.

Son activado por ATP>2-MeSATP>>>ADP con ese orden de potencia. Algunos análogos del ATP como el ATP $\gamma$ S y el 2-propiltio- $\beta,\gamma$  diclorometilen-d-ATP son buenos agonistas de estos receptores (Communi *et al.*, 1999). El receptor se acopla a la estimulación tanto de fosfolipasa y de adenilato ciclasa (Ralevic, 1998).

### **Receptores P2Y<sub>12</sub>**

Es altamente expresado en plaquetas donde fue clonado por primera vez, también se expresa abundantemente en astrocitos. Es activado específicamente por nucleótidos de adenina, aunque presenta cierta selectividad a 2-MeSADP > ADP.

Está acoplado preferentemente a la inhibición de adenilato ciclasa. Muestra muy poca homología con otros receptores P2Y, con el P2Y<sub>1</sub> muestra una homología de 22%. Puede ser diferenciado del P2Y<sub>1</sub> con antagonistas específicos como el ARLC66096, AR-C69931MX, clopidogrel, ticlopidina y 2-MeSATP. Es inhibido por la toxina pertusis, no así por suramina (Nicholas, 2001).

### **Receptores P2Y<sub>13</sub>**

Ha sido recientemente identificado, se ha encontrado alta expresión en el cerebro y el bazo (Marteau *et al.*, 2003). Presenta una homología del 48% con el receptor P2Y<sub>12</sub>. Se encuentra acoplado a la proteína G<sub>i</sub>, Responde a nucleótidos difosfato de adenina tales como ADP, 2-MeSADP, ADPβS, siendo el 2-MeSADP el más potente junto con el ADP y el Ap<sub>3</sub>A. El Ap<sub>4</sub>A, Ap<sub>5</sub>A, y Ap<sub>6</sub>A, son completamente inactivos.

Es menos sensible a la activación por nucleótidos trifosfato que el P2Y<sub>12</sub>, siendo ATP y 2-MeSATP agonistas parciales. El 2-MeSAMP, Ap<sub>4</sub>A y especialmente el ARC69931MX son buenos antagonistas. Metabolitos activos de clopidogrel son antagonistas parciales, el antagonista menos potente es el ARC67085MX (Marteau *et al.*, 2003).

### **Receptores P2Y<sub>14</sub>**

Este receptor ha sido también reportado recientemente y se conocía como receptor de UDP-glucosa, fue clonado en humanos. Se encuentra acoplado a una proteína G<sub>i</sub>, es activado específicamente por UDP-glucosa y nucleótidos relacionados (Abbracchio *et al.*, 2003).

## **HIPÓTESIS.**

En los folículos de la rana *Xenopus*, los efectos provocados por ATP sobre la activación de corrientes de  $\text{Cl}^-$  ( $F_{in}$ ) así como la inhibición de  $I_{K,AMPc}$  son llevados a cabo a través de distintos tipos de receptores purinérgicos o por uno con farmacología atípica.

## **JUSTIFICACIÓN.**

Se sabe que la activación de  $I_{K,AMPc}$  incrementa tanto la velocidad como la eficiencia de la maduración del ovocito es inducida tanto por hormonas gonadotrópicas como por progesterona (Wibrand *et al.*, 1992), a través de un mecanismo aun no determinado. Pensamos que la información referente de cómo la  $I_{K,AMPc}$  es modulada tanto en su activación como en su inhibición serán piezas importantes para esclarecer como esta corriente modula el importante proceso de maduración meiótica.

Se sabe que sustancias purinérgicas en folículos de rana *Xenopus*, tales como el ATP y adenosina, activan corrientes  $I_{K,AMPc}$  y corrientes  $F_{in}$  y que además, el ATP presenta un efecto dual al inhibir también la  $I_{K,AMPc}$ , lo cual sugiere un mecanismo muy elaborado de regulación de los canales involucrados en la generación de  $I_{K,AMPc}$  a través de un mismo transmisor. Dada la diversidad de respuestas y efectos que el ATP produce sobre varios canales iónicos en la membrana de las células foliculares, es razonable pensar que cada una de las acciones puedan ser llevadas a cabo por diferentes receptores, tal y como ha sido demostrado para el sistema muscarínico (Arellano *et al.*, 1999). La identificación de los receptores y sus mecanismos de acción podrían ser de valor para determinar el papel fisiológico de las respuestas que regulan.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Determinar farmacológicamente los tipos de receptores purinérgicos que están involucrados en la activación de corrientes  $F_{in}$  y en la inhibición de  $I_{K,AMPc}$  en folículos de la rana *Xenopus laevis*.

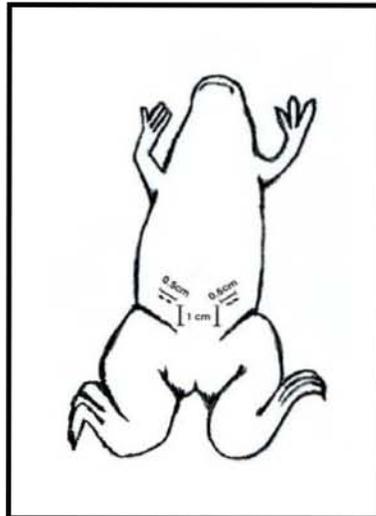
## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Caracterizar mediante estudios farmacológicos el tipo de receptor purinérgico que se encuentra involucrado en la activación de corrientes  $F_{in}$ .  
Caracterizar mediante estudios farmacológicos el tipo de receptor purinérgico

## METODOLOGIA:

### 1. Preparaciones celulares.

Ranas *Xenopus laevis* (*Xenopus* l), fueron anestesiadas por hipotermia, les fueron removidos quirúrgicamente en condiciones estériles, 2 a 3 lóbulos del ovario mediante una pequeña incisión (0.5 cm) realizada en el abdomen (figura 14). La cirugía se realizó con material esterilizado en etanol al 75%. La incisión abdominal fue realizada a 1 cm del pliegue inguinal y posteriormente se cerró suturando músculo y piel con sutura reabsorbible y agujas de 16 mm.



**Figura 14:** Imagen en la que se muestra la región anatómica de la rana en la que se realiza la cirugía para extraer los segmentos de los ovarios para obtener los folículos.

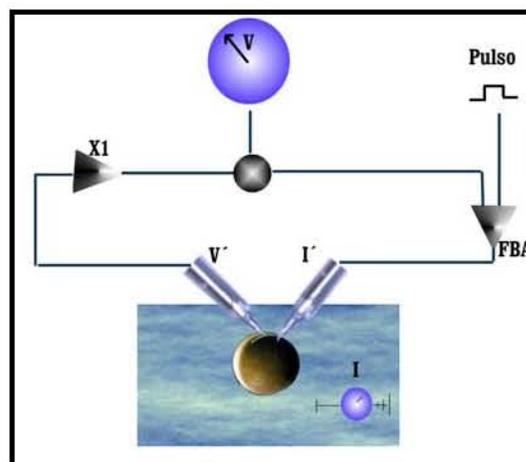
Los segmentos de ovario fueron depositados en medio Barth's modificado esterilizado por filtración, este medio contiene en mM: 8 NaCl, 0.2 KCl, 2.4 NaHCO<sub>3</sub>, 0.33 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.41 CaCl<sub>2</sub>, 0.82 MgSO<sub>4</sub>, 0.88 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.7 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 glucosa y suplementado con gentamicina 70 µg/ml y 0.2% de suero bovino fetal, ajustandose el pH a 7.4. Los folículos completos en estadio VI fueron separados de los lóbulos, la teca y el epitelio interno fueron removidos usando pinzas finas, obteniendo una preparación denominada *e.t.r.* (epitelio y teca removidos; Arellano & Miledi, 1993). Esta preparación nos permitió eliminar la interferencia que pudieran

generar estas capas celulares en la generación de la respuesta  $I_{K,AMPc}$ , y  $F_{in}$  (e.g., *Saldaña et al.*, 2005). La preparación fue incubada en condiciones estériles a una temperatura de 18-20 °C en medio Barth's modificado y utilizada para registros electrofisiológicos dentro de un periodo no mayor a 48 h.

## 2. Técnicas electrofisiológicas.

### 2.1 Técnica de control de voltaje

La técnica de registro utilizada en ovocitos y folículos de este estudio fue el control de voltaje con dos electrodos (Figura 16). El control de voltaje es una técnica ampliamente utilizada, es la mejor técnica biofísica para el estudio de las corrientes que fluyen a través de canales iónicos en una membrana. Con esta técnica se controla a un valor predeterminado el voltaje transmembrana de la célula bajo estudio, de tal forma que se puede medir la corriente requerida para mantener el voltaje constante. De esta forma la corriente que fluye a través de la membrana es proporcional a la conductancia de la membrana que a su vez es determinada por la apertura y cierre de los canales iónicos (Hille, 2001).



**Figura 15:** Esquema de la técnica de control de voltaje, donde  $V'$  es el electrodo de voltaje.  $X1$  es el amplificador.  $V$  es el voltaje de reforzamiento o mantenimiento.  $FBA$ : amplificador de retroalimentación negativa.  $I'$  es el electrodo intracelular de corriente  $I$  es el amperímetro que se encuentra en el baño y censa la corriente transmembranal (Modificada de Hille, 2001)

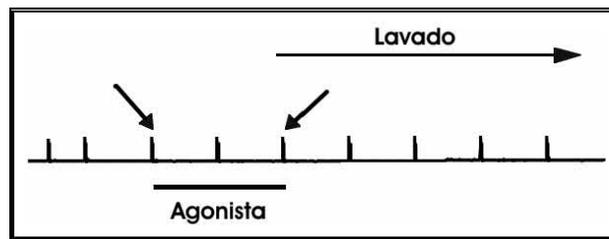
El sistema es un circuito cerrado (Figura 15) que se constituye por 2 microelectrodos intracelulares, uno de los cuales registra el voltaje ( $V'$ ) y otro inyecta corriente ( $I'$ ) a la célula. Debido a que el orden de magnitud de los voltajes registrados es muy pequeño, el electrodo de voltaje se conecta a un amplificador. La señal se compara con un voltaje comando ( $V$ ) que es el voltaje al que se desea mantener la membrana, la diferencia entre ellos es compensada por una inyección de corriente, a través del electrodo  $I'$  cuya magnitud es determinada a través de un circuito de retroalimentación negativo (FBA). En el baño se encuentra un tercer electrodo que mide a través de un amperímetro la corriente ( $I$ ) que cruza la membrana de la célula (Hille, 2001).

Para este proyecto los electrodos usados fueron elaborados con capilares de vidrio de borosilicato con un diámetro interno y externo de 1.2 mm y 2 mm respectivamente (WPI, FI, EUA). Los electrodos fueron llenados con solución de 3 M KCl y tuvieron una resistencia de 1-2 M $\Omega$ . El amplificador de control de voltaje empleado fue el Geneclamp 500B (Axon Inst., CA, EUA). La señal de corriente transmembranal fue registrada utilizando un osciloscopio marca Gould (D50-602), y los datos almacenados digitalmente en una computadora utilizando el convertidor A/D Digidata 1200 y el programa pClamp 8 (Axon Inst.). También fue utilizado un generador de pulsos GRASS (Astro-Med Inc, EUA) para cambiar el voltaje de mantenimiento por periodos breves.

Las respuestas electrofisiológicas fueron observadas a un potencial de -40 mV para los estudios sobre la inhibición de las corrientes  $I_{K,AMPc}$ , y a un potencial de -60 mV para los de activación de la corriente  $F_{in}$ . Los folículos se mantuvieron en una cámara, donde se perfundían continuamente con una solución Ringer Normal (RN) que contenía en mM: 115 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 5 HEPES y pH 7.0 a un flujo de 10 ml/min. Las drogas fueron disueltas en RN y aplicadas a través de la perfusión.

## 2.2 Construcción de las curvas dosis-respuesta para la corriente $F_{in}$

Este protocolo fue llevado a cabo en preparaciones celulares *e.t.r.* y se aplicaron las siguientes drogas: ATP, UTP, 2-meSATP y Bz-ATP. Cada droga por separado fue aplicada por 120 segundos en concentraciones dentro del rango de  $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M. Los intervalos de lavado entre cada aplicación fueron de 15 minutos con solución de RN (Figura 16). Durante el monitoreo se aplicaron pulsos de 20 mV cada 40 segundos, lo que permitió observar los cambios de conductancia durante el experimento e indicó los tiempos para la aplicación de las drogas. Las amplitudes de la corriente fueron analizadas según se explica en la sección de resultados.



**Figura 16:** Protocolo de aplicación de drogas para el estudio de la activación de la corriente  $F_{in}$ . Las flechas indican los cambios de solución, la barra inferior indica los tiempos de aplicación de las drogas y la flecha superior el periodo de lavado del agonista.

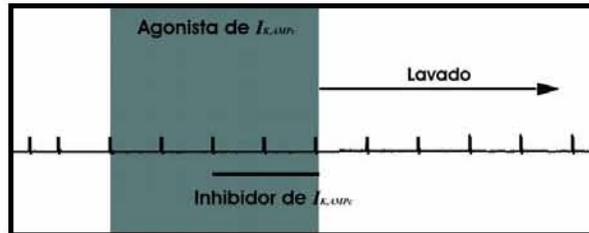
## 2.3 Construcción de las curvas dosis-respuesta para la inhibición de $I_{K,AMPc}$

Se llevaron a cabo dos protocolos de aplicación para las diferentes drogas utilizando preparaciones *e.t.r.* Se utilizó la técnica de control de voltaje a un potencial de mantenimiento de -40 mV.

### 2.3.1 Protocolo I

Este protocolo constó de dos etapas, en la primera se realizó el registro control de la  $I_{K,AMPc}$  activada por ADO 100  $\mu$ M durante 160 s seguida de un periodo de lavado de 15 min. En la segunda etapa, se probaron los diferentes inhibidores para este objetivo, primero se activó la corriente  $I_{K,AMPc}$  con ADO 100  $\mu$ M por aproximadamente 80 s (tiempo en el que regularmente fue obtenida la respuesta

máxima), a continuación se perfundió una mezcla de ADO 100  $\mu$ M junto y el inhibidor de  $I_{K,AMPc}$  a evaluar (ATP, UTP, 2-meSATP, o BzATP) por un periodo de 80 s, finalmente la mezcla fue retirada y la preparación se lavó por un periodo de 15 min (Figura 17).



**Figura 17:** Protocolo de inhibición I para estudiar la inhibición de la respuesta  $I_{K,AMPc}$  por UTP, ATP, 2-MeSATP y BzATP. Los rectángulos grises indican el tiempo de perfusión de ADO, el agonista de la corriente  $I_{K,AMPc}$ , y las barras indican los tiempos de aplicación del inhibidor.

### 2.3.2 Protocolo II

En este protocolo la aplicación de la droga inhibidora de  $I_{K,AMPc}$  (ATP, UTP, 2-meSATP, o BzATP) antecedió por un periodo de 80 s a la coaplicación del inhibidor y del agonista de  $I_{K,AMPc}$  (ADO), la coaplicación se realizó por un periodo de 80 s, y finalmente se perfundió solo ADO por un intervalo de 40 s. Entre cada protocolo completo la preparación fue perfundida con solución RN durante 15 m. Las drogas inhibitorias fueron aplicadas en concentraciones dentro del rango de  $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M (Figura 18).



**Figura 18:** Protocolo de Inhibición II de la respuesta  $I_{K,AMPc}$  por UTP, ATP, 2-meSATP y BzATP. Los rectángulos grises indican el tiempo de perfusión de ADO, el agonista de la corriente  $I_{K,AMPc}$ , y las barras indican los tiempos de aplicación del inhibidor.

### **3. Substancias:**

La solución RN y el medio Barth's modificado, fueron preparadas con NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, HEPES, y NaHCO<sub>3</sub> de JL Baker, mientras que Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, glucosa y gentamicina fueron de Sigma. El pH de las soluciones fue ajustado con soluciones de NaOH o HCl preparadas con reactivos de JL Baker.

Las sustancias purinérgicas tales como Adenosina (ADO), ATP (Adenosina, 5'trifosfato) UTP (Uridina, 5'trifosfato), y Bz-ATP (Benzoil, benzoil ATP) fueron adquiridas de Sigma. El 2-meSATP (2, metil-tio, 5'trifosfato de Adenosina) fue de Calbiochem. De todos los agonistas utilizados, se prepararon alícuotas que fueron guardadas a -20°C.

## RESULTADOS.

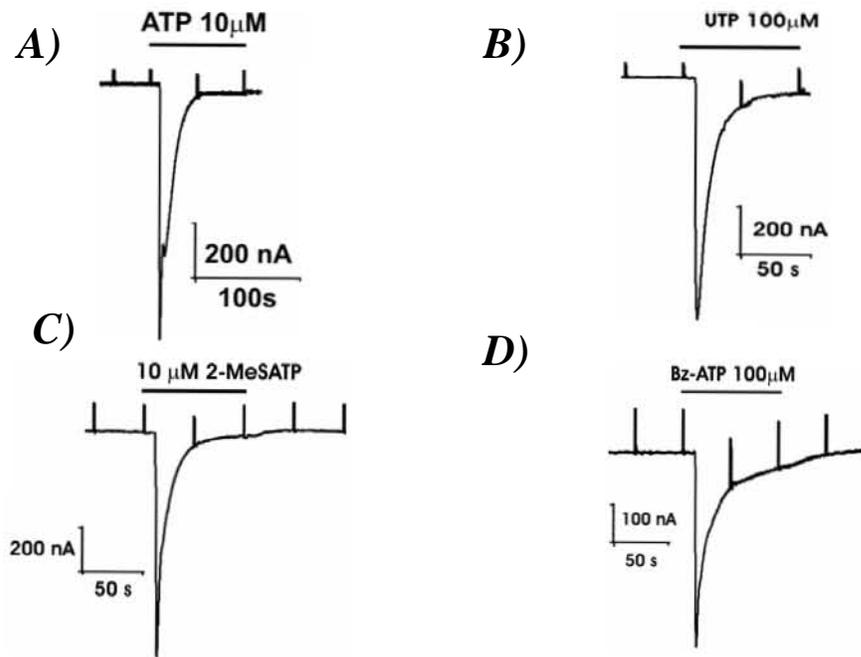
Para el presente estudio se utilizaron 12 ranas, cuyos folículos respondían a la aplicación de ATP y ADO generando respuestas  $F_{in}$  y  $I_{K,AMPc}$  respectivamente. Los folículos presentaron un potencial de reposo promedio de  $39 \pm 1.8$  mV (media  $\pm$  E.S.). La presencia y amplitud de las respuestas mostró un comportamiento estacional, obteniendo las respuestas de mayor amplitud para la  $F_{in}$  en los meses de Marzo y Abril. Para la  $I_{K,AMPc}$  en los meses de septiembre a enero exceptuando el mes de diciembre, en el que no se obtuvieron respuestas.

La amplitud de estas respuestas varía ampliamente, para la corriente  $F_{in}$  se obtuvieron respuestas en un rango de 50 a 1000 nA con una media de  $301 \pm 72$  nA. Para los experimento se seleccionaron aquellos folículos cuya amplitud de la respuesta  $F_{in}$  superaba los 150 nA. La corriente  $I_{K,AMPc}$  mostró un rango de amplitud de 300 a 1500 nA con una amplitud media de  $809 \pm 83$  nA, se seleccionaron los folículos, cuya respuesta superaba los 350 nA de amplitud. Cabe destacar que ambas respuestas se presentaba de forma independiente, es decir la activación de la corriente  $F_{in}$  no necesariamente se correlacionaba a la presencia de la corriente  $I_{K,AMPc}$  y viceversa. Por otro lado el proceso de inhibición de la corriente  $I_{K,AMPc}$ , se generaba siempre independientemente de su amplitud y de la amplitud de la corriente  $F_{in}$ .

### 1. Curvas dosis-respuesta para la activación de corrientes $F_{in}$ .

Se obtuvieron preparaciones celulares *e.t.r.* de folículos en el estadio VI. Estos al ser estimulados por agonistas purinérgicos (2-MeSATP, ATP, UTP y BzATP), activan respuestas del tipo  $F_{in}$  (Arellano *et al.*, 1998). Para cada uno de los agonistas se obtuvieron respuestas de amplitud variable entre folículos de ranas distintas (Figura 19). Las corrientes  $F_{in}$  evocadas por los diferentes agonistas presentaron las mismas características a las descritas originalmente por la aplicación de ACh (Arellano & Miledi, 1993) y por ATP (Arellano *et al.*, 1998), esto es: **1)** Comparativamente con otras corrientes entrantes del folículo la corriente  $F_{in}$

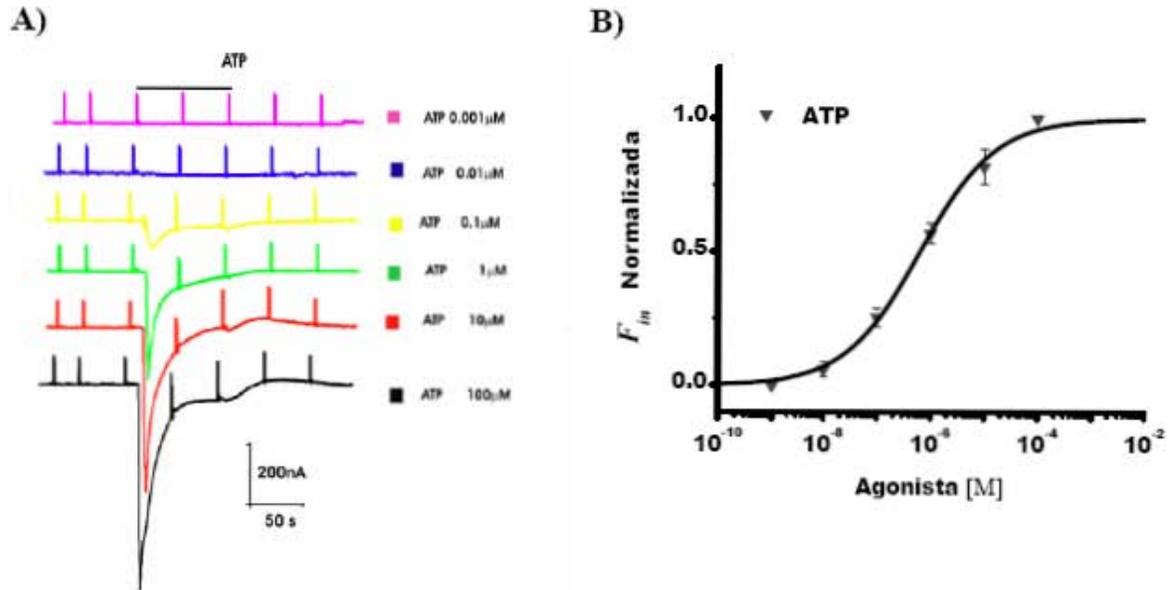
tiene un curso temporal rápido en forma de espiga y retraso de activación de alrededor de 400 ms. **2)** La corriente  $F_{in}$  se origina en la monocapa de células foliculares. **3)** Es una corriente acarreada por  $\text{Cl}^-$  y **4)** Es una corriente independiente del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que no es modulada por la osmolaridad.



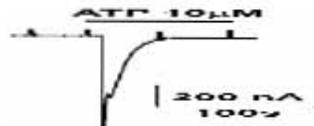
**Figura 19.** Corrientes  $F_{in}$  generadas por agonistas purinérgicos. **(A)** ATP  $10\mu\text{M}$ , **(B)** UTP  $10\mu\text{M}$ , **(C)** 2-MeSATP  $10\mu\text{M}$ , **(D)** BzATP  $100\mu\text{M}$ . Cada uno de los registros corresponde a un folículo distinto, las barras indican el tiempo de aplicación del agonista.

Para evaluar la relación dosis-respuesta de la corriente  $F_{in}$  activada por 2-MeSATP, ATP, UTP y BzATP, el potencial de los folículos fue controlado a  $-60\text{mV}$  y la concentración del agonista se modificó en un rango  $0.001\text{-}100\mu\text{M}$  para el ATP y UTP. En el caso de 2-MeSATP el rango fue de  $10\text{pM}\text{-}10\mu\text{M}$  y para el del BzATP de  $0.01\text{-}100\mu\text{M}$ . La amplitud de las respuestas se normalizaron con respecto a la obtenida en la mayor concentración. Las curvas fueron construidas graficando el logaritmo de la concentración molar (M) aplicada versus la media de la amplitud de la respuesta tal y como se ilustra en la figura 20 para el caso de la activación por ATP. Los datos corresponden al registro de 4-6 folículos en cada concentración, y

fueron ajustados a una curva dosis-respuesta, el valor de la dosis media ( $EC_{50}$ ) fue obtenida de la sigmoide de ajuste (figura 20).



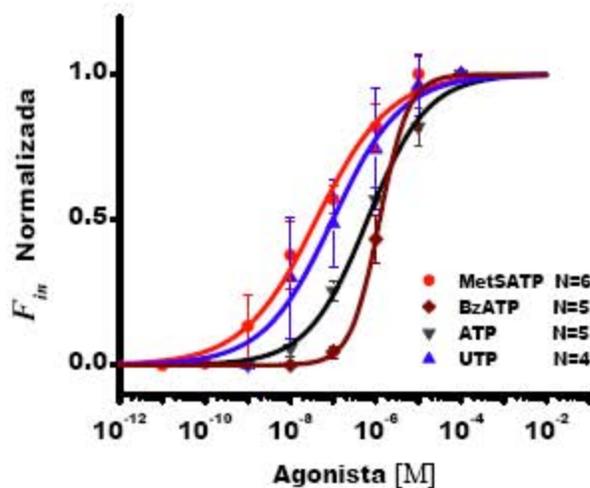
**Figura 20.** Izquierda: registros elaborados por la técnica de control de voltaje a un potencial de -60mV, para ATP en un rango de concentración de 0.001μM-100μM. Derecha: Curva dosis respuesta para ATP, en el eje de las Y se tiene la amplitud de la corriente  $F_{in}$  normalizada y sobre el eje de las X el logaritmo de la concentración molar (M). N = 6. Todos los registros fueron elaborados en un mismo folículo. Los datos de la curva fueron ajustados a la siguiente ecuación:



Donde  $A_1$  y  $A_2$  son los valores inicial y final respectivamente de  $I$  (amplitud de la corriente normalizada),  $X_0$  corresponde a la  $EC_{50}$  y  $P$  al coeficiente de Hill.

Las curvas mostradas en la figura 21 son el resumen de las construidas para cada uno de los agonistas purinérgicos de  $F_{in}$ , utilizando el mismo protocolo experimental. Del ajuste de los datos se obtuvieron los siguientes valores de  $EC_{50}$  (N=número de folículos):  $40.5 \pm 9.2$  nM para el 2-MeSATP (N=4),  $0.1 \pm 0.03$  μM para el UTP (N=6),  $0.64 \pm 0.08$  μM para el ATP (N=5) y de  $1.2 \pm 0.02$  μM para el BzATP (N=4). El coeficiente de Hill fue de 0.5, 0.53, 0.6 y 1.2 para 2-MeSATP, UTP, ATP y BzATP respectivamente (Tabla III). De lo que se establece que el

orden de potencia en estos experimentos fue de 2-MeSATP > UTP > ATP > BzATP (Figura 21).

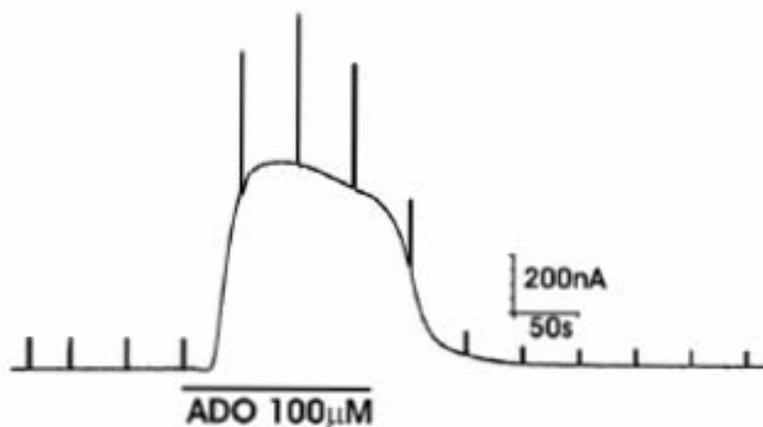


**Figura 21:** Relación dosis-respuesta de  $F_{in}$  generada por agonistas purinérgicos. En las que en el eje de las Y tenemos la amplitud de la respuesta normalizada y en el eje de las X el logaritmo de la concentración molar. Se observa el siguiente orden de potencia: ●2-MeSATP>▲UTP>▼ATP>◆BzATP. Las curvas fueron elaboradas en folículos *e.t.r.* diferentes para cada curva con una n=6, n=4, n=5 y n=5 respectivamente.

## 2. Inhibición de $I_{K,AMPc}$ por diferentes agonistas purinérgicos.

Se sabe que algunas sustancias purinérgicas como la ADO (Kusano y *et al.*, 1982), y hormonas como la FSH (Woodward & Miledi, 1987), son capaces de generar la  $I_{K,AMPc}$  (Figura 22) y que además el ATP tiene un efecto inhibitor sobre estas corrientes (Arellano *et al.*, 1996; Fujita *et al.*, 2001) de forma similar a lo que ocurre con la inhibición provocada por ACh (Van Renterghem *et al.*, 1985; Arellano *et al.*, 1999).

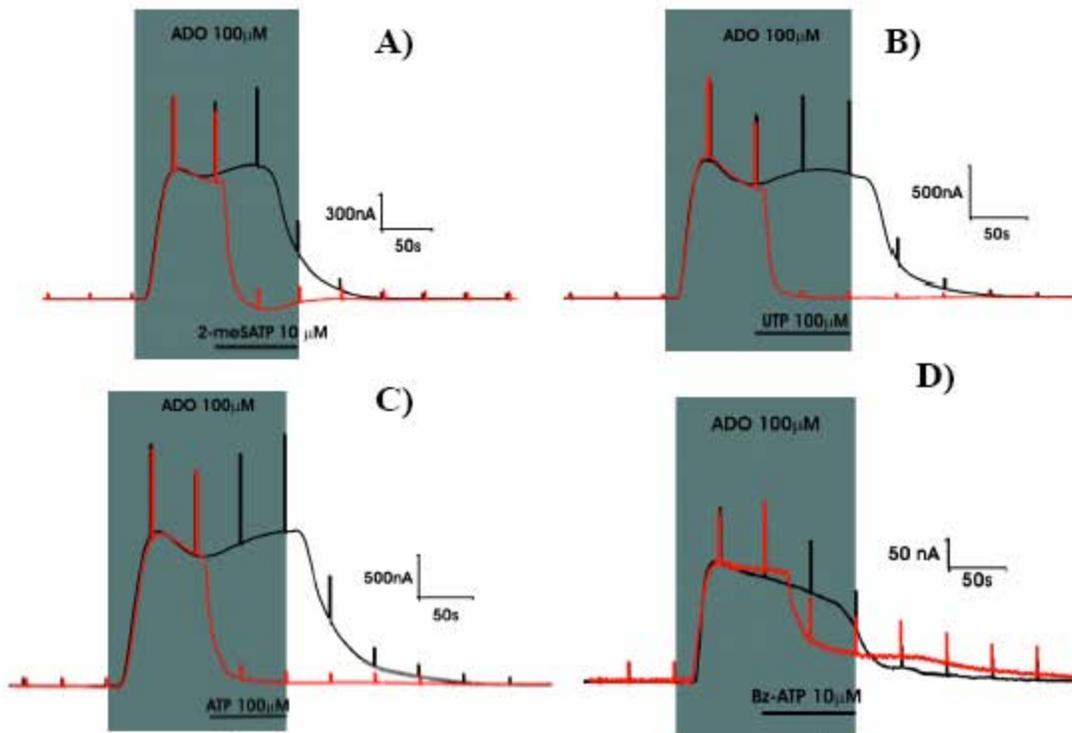
Para caracterizar el tipo de receptor purinérgico que se encuentra involucrado en este efecto de inhibición de  $I_{K,AMPc}$ , además del ATP se evaluaron los efectos que tenían los agonistas de  $F_{in}$  ensayados, es decir el 2-MeSATP, UTP. ATP y BzATP sobre las corrientes  $I_{K,AMPc}$ . Esto fue realizado en preparaciones *e.t.r.* de acuerdo con el protocolo I de inhibición descrito en la sección de metodología.



**Figura 22.** Corriente  $I_{K,AMPc}$  activada por adenosina 100  $\mu\text{M}$ . Registro realizado en foliculos *e.t.r.*, con la técnica de control de voltaje a un potencial de -40 mV.

Al igual que lo observado para las respuestas  $F_{in}$ , esta serie de agonistas también fueron capaces de producir una inhibición potente de la respuesta  $I_{K,AMPc}$  activada por ADO (la figura 23). Para estos experimentos 2-MeSATP o BzATP se aplicaron a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y de 100  $\mu\text{M}$  para ATP o UTP.

Como se sabe el ATP, el 2-MeSATP, el UTP y el BzATP son capaces de generar también las corrientes  $F_{in}$ , por lo que fue necesario distinguir si el efecto de inhibición era independiente de la activación de la respuesta entrante. Para este punto se diseñó el protocolo de inhibición II (ver metodología), que nos permitió separar en el tiempo la activación de las respuestas  $F_{in}$  y la inhibición provocada por el mismo agonista.

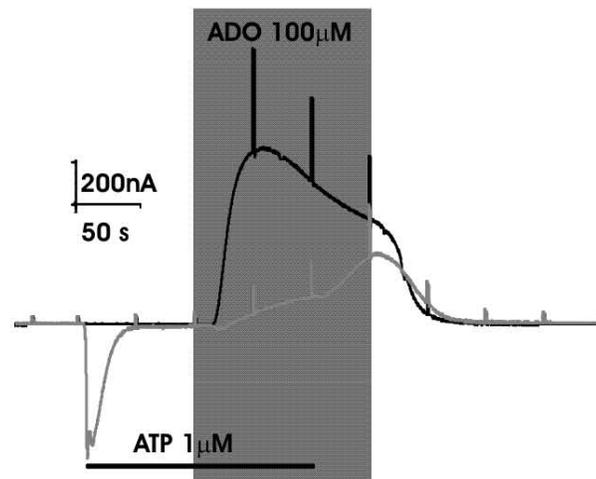


**Figura 23:** Inhibición de corrientes  $I_{K,AMPc}$  por distintos agonistas purinérgicos. En la imagen se muestra la superposición de registros pertenecientes al mismo folículo *e.t.r.* En el fondo (negro) se muestra el trazo correspondiente a la corriente  $I_{K,AMPc}$  activada por ADO  $100\mu\text{M}$ , sobrepuesto (rojo) se muestra el trazo correspondiente a la inhibición de la corriente  $I_{K,AMPc}$  por (A) 2-MeSATP, (B) UTP, (C) ATP y (D) BzATP a una concentración de  $10\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$  y  $10\mu\text{M}$  respectivamente. Los rectángulos grises indican los tiempos de aplicación de ADO y las barras el tiempo de perfusión del inhibidor. Todos los registros fueron elaborados bajo la técnica de control de voltaje a un potencial de  $-40\text{mV}$ .

De esta forma fue eliminada una posible superposición de la respuesta  $F_{in}$  con la inhibición de  $I_{K,AMPc}$  lo que provocaría una sobreestimación de la amplitud de esta última. En el protocolo la corriente  $F_{in}$  fue activada por un tiempo de 80 segundos con los agonistas purinérgicos seleccionados, después fue co-aplicada la ADO. Este tiempo de pre-perfusión con el inhibidor fue suficiente para que se generara la corriente  $F_{in}$  y se desensibilizara a niveles cercanos al control, al mismo tiempo la acción inhibitoria de los agonistas alcanza valores máximos por lo que permanece estable por el tiempo que la droga sea perfundida (figura 24). De esta

manera descartamos que la corriente  $F_{in}$  interfiriera con nuestro valor de inhibición de  $I_{K,AMPc}$ .

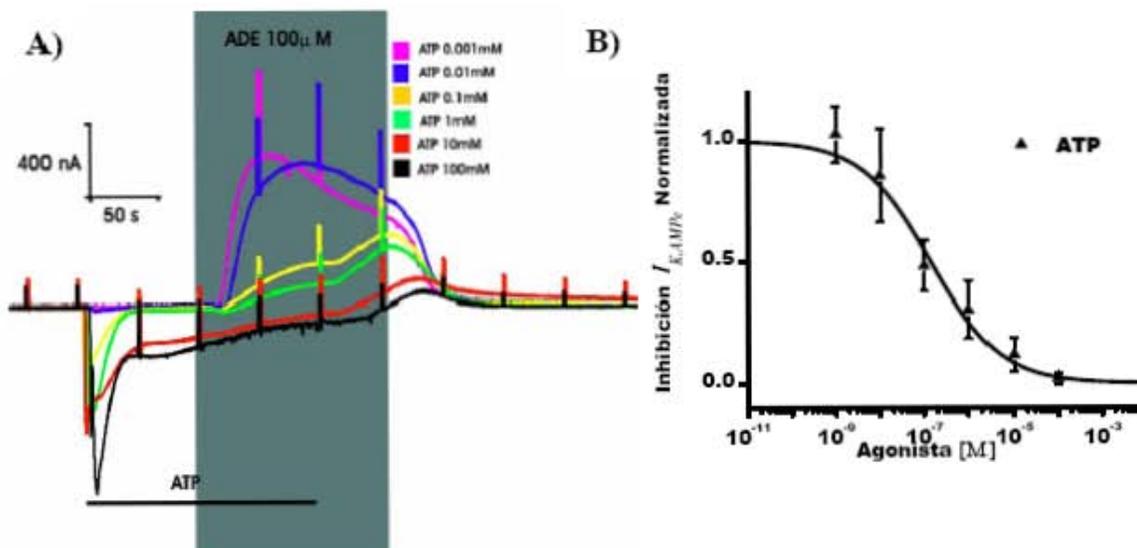
Sin embargo debemos hacer notar que en concentraciones máximas de los agonistas algunos folículos desarrollaron la corriente entrante  $S_{in}$  (Arellano & Miledi, 1993; Pérez-Samartín *et al.*, 2000) que al tener un curso temporal mas lento que las respuestas  $F_{in}$  podrían provocar una sobre estimación de la inhibición (ver e.g., 100 y 10  $\mu$ M ATP en figura 25).



**Figura 24:** Sobreposición de registros, en el que se muestra la (■) Activación de la corriente  $I_{K,AMPc}$  por ADO 100 $\mu$ M (■) Protocolo de inhibición de  $I_{K,AMPc}$ . Los registros fueron elaborados bajo la técnica de control de voltaje a un potencial de -40 mV, la barra superior muestra el tiempo de perfusión de ATP 1 $\mu$ M y el rectángulo gris muestra el tiempo de perfusión de ADO 100  $\mu$ M. Aquí se muestra claramente que la activación de la corriente  $F_{in}$  es independiente del efecto de inhibición sobre  $I_{K,AMPc}$ .

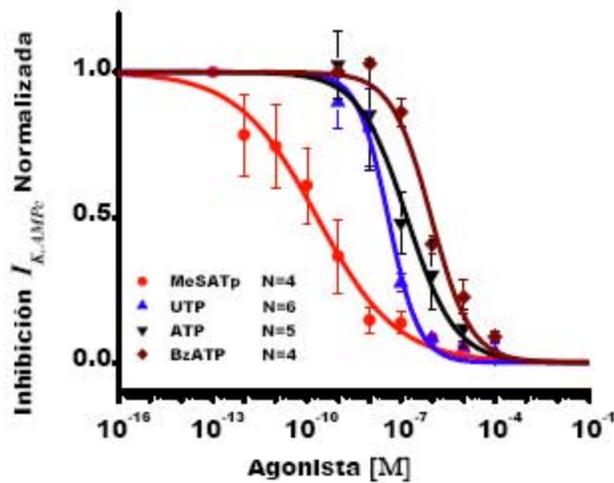
Utilizando este protocolo fue evaluada la relación dosis–respuesta del efecto de inhibición sobre  $I_{K,AMPc}$  (Figura 25). Las curvas fueron entonces construidas aplicando los diferentes agonistas en un rango de 0.001-100  $\mu$ M para el ATP y UTP, en el caso de 2-MeSATP el rango fue de 10 pM-10  $\mu$ M y para el del BzATP de 0.01-100  $\mu$ M. Los resultados obtenidos se normalizaron con respecto a efecto máximo obtenido y se grafico el promedio de la inhibición en diferentes folículos.

Los datos se ajustaron a curvas dosis-respuesta, y de forma semejante al estudio de activación de la corriente  $I_{in}$  (ver figura 20) de la sigmoide de mejor ajuste a los datos se obtuvieron los parámetros correspondientes a la dosis media de inhibición,  $IC_{50}$  y el coeficientes de Hill.



**Figura 25.** Relación dosis-respuesta de la inhibición de  $I_{K,AMPc}$  por agonistas purinérgicos. **A.** Sobreposición de los registros obtenidos en el mismo folículo a diferentes concentraciones de ATP (0.001µM-10µM) en donde el rectángulo gris y la barra indican el tiempo de perfusión de ADO y ATP respectivamente. **B.** Curva dosis- respuesta de la media de la amplitud de la respuesta normalizada  $\pm$  error estándar, con respecto al logaritmo de la concentración molar (n=5).

En este caso las  $IC_{50}$  obtenidas tuvieron los siguientes valores:  $0.2 \pm 0.07$  nM para 2-MeSATP,  $0.04 \pm 0.008$  µM para UTP,  $0.15 \pm 0.05$  µM para ATP y  $0.9 \pm 0.3$  µM para el BzATP, con coeficientes de Hill de:  $0.34 \pm 0.03$ ,  $0.88 \pm 0.13$ ,  $0.56 \pm 0.09$  y  $0.68 \pm 0.13$  para 2-MeSATP, UTP, ATP, y BzATP respectivamente. De los valores se puede establecer que el orden de potencia para la inhibición de la  $I_{K,AMPc}$  es de 2-MeSATP>UTP>ATP>BzATP (Figura 26 y Tabla III).



**Figura 26:** Relación dosis-respuesta de la inhibición de  $I_{K,AMPc}$  generada por agonistas purinérgicos. Comparación de la inhibición de  $I_{K,AMPc}$  por  $\blacktriangle$  ATP,  $\blacksquare$  UTP,  $\bullet$  2-MeSATP  $\blacklozenge$  BzATP en folículos diferentes para cada agonista con N=5, N=6, N=4 y N= 4 respectivamente. Las curvas fueron ajustadas al modelo no lineal logístico, de la que se obtuvieron los siguientes valores para  $IC_{50}$ :  $0.2 \pm 0.07$  nM para 2-MeSATP,  $0.04 \pm 0.008$   $\mu$ M para UTP,  $0.15 \pm 0.05$   $\mu$ M para ATP y  $0.9 \pm 0.3$   $\mu$ M para el BzATP, y un coeficiente de Hill de:  $0.34 \pm 0.03$ ,  $0.88 \pm 0.13$ ,  $0.56 \pm 0.09$  y  $0.68 \pm 0.13$  para 2-MeSATP, UTP, ATP, y BzATP respectivamente

	Inhibición de la corriente $I_{Kc,AMP}$		Activación de la corriente $F_{in}$	
	$IC_{50}$	Coef. de Hill	$EC_{50}$	Coef de Hill
<b>2-MeSATP</b>	$0.2 \pm 0.07$ nM	$0.34 \pm 0.03$	$40.5 \pm 9.2$ nM	$0.5 \pm 0.05$
<b>UTP</b>	$0.04 \pm 0.008$ $\mu$ M	$0.88 \pm 0.13$	$0.1 \pm 0.03$ $\mu$ M	$0.53 \pm 0.08$
<b>ATP</b>	$0.15 \pm 0.05$ $\mu$ M	$0.56 \pm 0.09$	$0.64 \pm 0.08$ $\mu$ M	$0.6 \pm 0.04$
<b>BzATP</b>	$0.9 \pm 0.3$ $\mu$ M	$0.68 \pm 0.13$	$1.2 \pm 0.02$ $\mu$ M	$1.2 \pm 0.03$

**Tabla III:** Valores obtenidos para la  $C_{50}$  y el Coeficiente de Hill, tanto para la inhibición de la corriente  $I_{K,AMPc}$  y como para activación de la corriente  $F_{in}$ , por ATP, UTP, 2-MeSATP y BzATP. Los datos se ajustaron al modelo de logístico en OriginPro 7.  $C_{50}$ : Concentración a la que se obtiene el 50% de la respuesta máxima. *Coef. de Hill*: Coeficiente de Hill.

## DISCUSIÓN:

Los ovocitos y folículos de la rana *X. laevis* son ampliamente usados en la investigación biológica. Su uso más importante en los últimos años ha sido como sistema de expresión heterólogo de proteínas de membrana como receptores membrana, canales iónicos y transportadores, ya que son idóneos para el estudio de los mecanismos funcionales y de traducción asociados a estas proteínas. Sin embargo tanto los ovocitos, como los folículos, se encuentran equipados con un conjunto de proteínas funcionales endógenas, que puede interferir en la interpretación de los datos obtenidos en estudios de expresión.

Estos sistemas endógenos pueden interactuar con las proteínas que expresamos de forma heteróloga, o bien el medio celular del ovocito podría ser distinto al que tendría la proteína exógena en su contexto nativo. Es por ello que es imprescindible conocer las proteínas que los ovocitos son capaces de expresar, así como describir el folículo completo para excluir una posible interferencia (Miledi *et al.*, 1989; Wagner *et al.*, 2000, Saldaña *et al.*, 2005). Por otro lado el ovocito también representa un modelo celular en el que diferentes aspectos de la fisiología celular han sido estudiados en los últimos años utilizando diversas técnicas modernas. Por ejemplo, a la fecha se sabe que el folículo expresa una gran cantidad de canales iónicos, así como también receptores a purinas, acetilcolina, noradrenalina y hormonas gonadotrópicas (Arellano *et al.*, 1996; Webber 1999). Estas moléculas están implicadas en el importante fenómeno de la foliculogénesis, sin embargo su papel específico en este evento se desconoce. Como una primera aproximación a resolver este problema es necesario el conocimiento sobre la expresión y función de estas moléculas (Arellano & Miledi, 1993; 1994; 1995; Arellano *et al.*, 1996; 1998; 1999; Samartín *et al.*, 2000; Saldaña *et al.*, 2005). Éste es uno de los temas generales en los que se circunscribe el presente trabajo.

En este contexto, el presente estudio contribuye a ampliar el conocimiento sobre el sistema purinérgico endógeno del folículo de la rana *X. laevis*. Es poco lo que se ha descrito del sistema purinérgico de la rana *X. laevis*, a la fecha solo se han clonado 2 receptores purinérgicos y ninguno de ellos ha sido del folículo, el

primero es un receptor P2Y<sub>8</sub> clonado de la placa neural del embrión durante el periodo de neurogénesis de la rana (Bogdanov *et al.*, 1997) y el segundo es el receptor P2X<sub>7</sub> que fue clonado del estómago (Paukert *et al.*, 2002). Sin embargo, existen varios reportes que indican la expresión de un sistema de señalización endógeno vía receptores purinérgicos, en el folículo de la rana, Por ejemplo se sabe que el ovocito es capaz de liberar ATP a consecuencia de un estímulo estresante como es un shock osmótico o estimulación mecánica (Aleu *et al.*, 2003; Maroto & Hamill, 2001, Reyes, 2005), o bien por la aplicación de un pulso hiperpolarizante (Bodas *et al.*, 2000).

Por otro lado se sabe que en las células foliculares del ovocito, algunas purinas como el ATP y la ADO son capaces de activar canales de potasio, a través de un receptor del tipo P3 y P1 respectivamente, generando una conductancia a K<sup>+</sup> (Woodwar & Miledi, 1987; Saldaña *et al.*, 2005). En el caso de la activación por medio de ADO se sabe que es dependiente de AMPc ( $I_{K,AMPc}$ ), no así para el caso del ATP donde se sugiere es generada por la activación de una PKC independiente de PLC/PLA<sub>2</sub> (Matsuoka *et al.*, 1998). Por otro lado el grupo de Arellano y colaboradores (1998), describieron de manera detallada que el ATP y otros agonistas purinérgicos eran capaces de activar una conductancia a Cl<sup>-</sup> a la que denominaron  $F_{in}$ .

Antes del presente estudio había sido descrito que estas respuestas están presentes en folículos de estadios V a VI de maduración y que la  $F_{in}$  es activada por diferentes agonistas purinérgicos con el siguiente orden de potencia: 2-MeSATP>UTP>ATP. Se sabe también que mientras las corrientes  $F_{in}$  se generan por la activación de una conductancia a Cl<sup>-</sup> (Arellano *et al.*, 1996, 1998), la  $I_{K,cAMP}$  es evocada por la apertura de canales de K<sup>+</sup> sensibles a sulfonilureas tales como la glibenclamida (Winbrand *et al.*, 1992; Honoré *et al.*, 1991) y que es activada por adenosina y una gran cantidad de otros neurotransmisores y hormonas, entre las que se encuentran: NA, Dopamina, VIP, FSH, PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, Oxitocina, hCG, etc (Lotan *et al.*, 1982; Woodward & Miledi, 1987; 1989; Saldaña *et al.*, 2005). Todos estos transmisores actúan a través de receptores específicos que activan la adenilato ciclasa, incrementando los niveles intracelulares de AMPc que a su vez

provoca la apertura de los canales de  $I_{K,cAMP}$  (Van Reberghem *et al.*, 1984; 1985; Miledi & Woodward, 1989; Greenfield *et al.*, 1990a; 1990b).

En paralelo a esto se ha reportado que el ATP, que por un lado activa la  $F_{in}$ , al mismo tiempo es capaz de inhibir a  $I_{K,cAMP}$  cuando ésta es generada ya sea por adenosina o por algún otro agonista (Arellano *et al.*, 1996; 1999; Fujita *et al.*, 2001; Saldaña *et al.*, 2005). En este efecto el ATP parece actuar de forma similar a lo reportado para ACh, en donde el mismo agonista tiene un efecto dual sobre las propiedades eléctricas del folículo, activando  $F_{in}$  e inhibiendo  $I_{K,cAMP}$  (Arellano *et al.*, 1999). Sin embargo los mecanismos de acción en este efecto inhibitorio aun no han sido esclarecidos por completo, su comprensión cabal requerirá de la identificación del tipo de receptores involucrados en ambos efectos. En el caso del ATP, el o los receptores purinérgicos responsables de estos dos efectos aun no han sido identificados, y es en este sentido que el presente trabajo nos permite plantear algunas hipótesis acerca del tipo de receptores purinérgicos involucrados.

En el presente estudio, los experimentos realizados fueron diseñados para obtener mayor información de las propiedades farmacológicas del tipo de receptor o receptores involucrados. Las características encontradas sugieren fuertemente que ambos efectos tanto la activación de la corriente  $F_{in}$  como la inhibición de la corriente  $I_{K,AMPc}$  fue mediada por un mismo tipo de receptor purinérgico. Esta conclusión se basa en los siguientes datos obtenidos de la evaluación farmacológica: (1) Ambos efectos mostraron el siguiente orden de potencia para los agonistas: 2-MeSATP > UTP > ATP > BzATP. (2) La dosis media requerida de cada agonista mostró valores semejantes; tanto en la activación de  $F_{in}$  como para la inhibición de  $I_{K,AMPc}$ . (3) Los coeficientes de Hill de las curvas dosis-respuesta para todos los agonistas oscilan en todos los casos alrededor de 1. (Ver Figura 21, 26 y Tabla III).

La farmacología mostrada por este receptor sugiere que es del tipo P2Y, ya que fue activado tanto por transmisores purinérgicos (ATP, BzATP y 2-MeSATP) como pirimidérgicos (UTP); ésta es una característica específica de los receptores P2Y (North, 2002; Burnstock, 2004; Katrin & Webb, 2001; Küegelgen & Wetter, 2000; Ralevic & Burnstock, 1998). Además se sabe que el receptor purinérgico que

activa la corriente  $F_{in}$  por la apertura de canales permeables a  $Cl^-$ , es sensible parcialmente a la toxina pertusis (Arellano *et al.*, 1998), lo que indicaría la participación de proteínas G en el mecanismo de acción y por ende de receptores tipo P2Y, y no del tipo P2X que son receptores-canal. Además todas las moléculas del tipo P2X son receptores-canal permeables a pequeños cationes monovalentes (Norht 2002), con la excepción del subtipo P2X<sub>5</sub> que parece también puede permear iones  $Cl^-$ . Sin embargo este receptor presenta la siguiente farmacología ATP, 2MeSAMP, BzATP, ATP $\gamma$ S >  $\alpha\beta$ , meATP,  $\beta\gamma$ -meATP, CTP, UTP > ADP (Ralevic & Burnstock, 2000; Burnstock, 2004), que es muy distinta a la del receptor responsable de la activación de la corriente  $F_{in}$  (Ruppelt *et al.*, 2001).

Al hacer una comparación farmacológica con los 8 subtipos de receptores hasta ahora reportados de la familia de los P2Y (Burnstock, 2004; Kuegelgen & Wetter, 2000), encontramos que el receptor que media tanto la activación de la corriente  $F_{in}$  y la inhibición de la corriente  $I_{K,AMPc}$  comparte características farmacológicas con 4 subtipos de esta familia (ver Tabla IV), el P2Y<sub>2</sub> (Nicholas *et al.*, 1996), el P2Y<sub>4</sub> (Webb *et al.*, 1998), el P2Y<sub>6</sub> (Comunni *et al.*, 1996) y finalmente el P2Y<sub>8</sub> (Bogdanov *et al.*, 1997).

TIPO	ESPECIE	TEJIDO	PRINCIPALES AGONISTAS
Subtipos expresado en humanos			
P2Y <sub>2</sub>	h	Pulmón, corazón, músculo esquelético, bazo y riñón.	UTP = ATP > Ap4A > ATP $\gamma$ S
	r		UTP = ATP > BzATP > CTP > 2MeSAMP > GTP > ATP $\gamma$ S > ITP*
	m		UTP = ATP > Ap4A
P2Y <sub>4</sub>	h	Placenta, pulmón, Músculo liso vascular.	UTP > UTP $\gamma$ S >> ATP, UDP
	r		UTP = ATP = ITP = Ap4A = CTP = GTP* BzATP (Antagonista)*
P2Y <sub>6</sub>	h	Pulmón, corazón, aorta, bazo, placenta, timo, intestino, cerebro.	UDP = 5-Bf-UDP >> UTP > 2-MeSAMP
	r		UDP > UTP > ADP > 2-MeSAMP
Subtipos encontrados exclusivamente en tejidos que no son de mamíferos.			
P2Y <sub>8</sub>	x	Plato neural	UTP = CTP = ATP = ITP = GTP >> 2-meSAMP > BzATP**

**Tabla IV:** Tabla en la que se muestran los principales agonistas de los receptores purinérgicos P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>8</sub>. Abreviaturas: **h**: humano, **r**: rata, **m**: ratón y **x**: rana *Xenopus laevis*. (\*) Wildman *et al.*, 2003 (\*\*) Bogdanov *et al.*, 1997. (Modificada de Kuegelgen & Wetter, 2000)

De estos 4 receptores, el receptor folicular tiene particular similitud con P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>8</sub> ya que son receptores que también pueden ser activados por 2-MeSATP, UTP y ATP, sin embargo, existen diferencias que llaman ampliamente la atención. El receptor P2Y<sub>4</sub> para los mismos agonistas posee el siguiente orden de potencia: ATP>UTP>2-MeSATP, esta secuencia es inversa a la del receptor que se caracterizó en el presente trabajo. Aunado a esto, y de forma muy importante, se ha reportado que BzATP es un potente antagonista para el receptor P2Y<sub>4</sub> (Burnstock, 2004), característica que no comparte nuestro receptor, ya que el BzATP fue capaz de activar tanto la corriente  $F_{in}$ , como inhibir la  $I_{K,AMPc}$  (Figura 19 y 23) actuando como un agonista de ambos efectos

En lo que al receptor P2Y<sub>8</sub> se refiere, el orden de potencia para los mismos agonistas es el siguiente: ATP=UTP>>2-MeSATP>>BzATP. Además se ha reportado que este receptor es activado de manera equipotente por nucleótidos del tipo trifosfato (Bogdanov *et al.*, 1997). Por lo tanto, la farmacología del P2Y<sub>8</sub> también parece ser distinta a la del receptor que nosotros caracterizamos aquí, por un lado el receptor folicular es muy sensible a 2-MeSATP mientras que éste parece no ser un agonista potente para el receptor P2Y<sub>8</sub>, y por otro lado ATP y UTP no fueron equipotentes sobre el receptor folicular. Estos resultados, en conjunto, ponen en evidencia que la farmacología encontrada para el receptor responsable de la activación de la corriente  $F_{in}$  y de la inhibición de la corriente  $I_{K,AMPc}$  es distinta a lo reportado con anterioridad.

Es importante resaltar que esta situación no es particular de los receptores purinérgicos en los folículos de *X. laevis*, ya que existen varios reportes de receptores purinérgicos cuya farmacología al parecer es distinta a la de receptores típicos. Por ejemplo se ha reportado que en células epiteliales de pulmón y en otros tejidos tales como cerebro, corazón y vasos sanguíneos expresan receptores del tipo P2Y con farmacología distinta ya que han mostrado ser específicos a polifosfatos de diadenosina, aspecto inusual para un receptor P2Y (Laubinger *et al.*, 2003). En células acinares de la glándula parótida de ratón también se ha descrito un receptor purinérgico con farmacología inusual, que activa una conductancia a Cl<sup>-</sup> (Arreola & Melvin, 2003), en este caso se ha sugerido que quizás se trata de un

receptor tipo P2X, y lo inusual radica en que es una conductancia de  $\text{Cl}^-$ . Las células PC12 expresan un receptor desconocido del tipo P2Y que muestra cierta similitud farmacológica a los receptores del tipo P2Y<sub>1</sub> (Vartian & Boehm, 2001). En cultivos de neuronas del ganglio cervical superior expresan un nuevo subtipo de receptor P2Y sensible a UTP (Calvert *et al.*, 2004).

Finalmente en neuronas piramidales del hipocampo, el ATP inhibe la liberación sináptica de glutamato por activación directa de un receptor del tipo P2Y que es insensible a la toxina pertusis y a la droga 8 ciclopentil teofilina, lo que sugiere fuertemente que es un receptor purinérgico del tipo P3, que son un grupo de receptores purinérgicos que se caracterizan por no poseer orden de potencia consistente a agonistas típicos para cualquier receptor P2 y que además son activados por  $\beta,\gamma$ -metilen ATP (agonista específico de los receptores P2X) y son antagonizados por  $\alpha,\beta$ -metilen ATP (Werner *et al.*, 2003).

En resumen, nuestros resultados indican que un sólo tipo de receptor P2Y, expresado en la membrana de las células foliculares, es el responsable de un efecto dual sobre conductancias iónicas de estas células; por un lado promueve la apertura de los canales de  $\text{Cl}^-$  responsables de la corriente  $F_{in}$  y por otro inhibe la activación de los canales de  $\text{K}^+$  involucrados en la activación de la corriente  $I_{K,CAMP}$ . El orden de potencia para diferentes agonistas de este receptor fue 2-MeSATP > UTP > ATP > BzATP, secuencia que no corresponde con ninguna reportada hasta ahora para los diferentes receptores P2Y clonados. Cabe la posibilidad de que este receptor presente diferencias farmacológicas marcadas en *Xenopus* pero que sea homólogo de alguno de los ya descritos en otras especies. Alternativamente podría tratarse de un receptor con diferencias farmacológicas que sean producto de la edición de un gen conocido, o por último cabría también la posibilidad de que se tratara de un nuevo receptor aún no clonado.

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1:** Rana *X. laevis* y ovocito
- Figura 2:** Corrientes ( $I$ ) H, D, D1 y D2 evocadas por ADO y ATP
- Figura 3:** TEM y SEM de ovocito en estadio VI.
- Figura 4:** Esquema del ovocito con su recubrimiento folicular.
- Figura 5:** Corrientes  $F_{in}$ ,  $I_{Cl(Ca)}$  y  $I_{K,AMPc}$  generadas por ACh.
- Figura 6:** Efecto de la defoliculación sobre las respuestas  $F_{in}$  evocadas por ACh.
- Figura 7:** Activación de corrientes  $I_{K,AMPc}$  por FSH, NE y forskolina.
- Figura 8:** Estructura química de las purinas y pirimidinas.
- Figura 9:** Purinas y pirimidinas que constituyen el ARN y ADN.
- Figura 10:** Efectos del ATP como molécula de señalización.
- Figura 11:** Posibles efectos del ATP después de ser hidrólisiso por ectonucleótidasas.
- Figura 12:** Interacción de las ectonucleótidasas y los receptores purinérgicos en los microdominios extramembranales.
- Figura 13:** Subtipos de receptores P2: P2X y P2Y
- Figura 14:** Región anatómica de la rana, para la extracción de los ovocitos.
- Figura 15:** Técnica de control de voltaje.
- Figura 16:** Protocolo para la activación de la corriente  $F_{in}$ .
- Figura 17:** Protocolo I para la inhibición de la corriente  $I_{K,AMPc}$ .
- Figura 18:** Protocolo II para la inhibición de la corriente  $I_{K,AMPc}$ .
- Figura 19:** Corrientes activadas por ATP, UTP, 2-MeSATP y BzATP.
- Figura 20:** Curva dosis-respuesta para la activación de  $F_{in}$  activada por ATP. Ecuación para el ajuste de los datos.
- Figura 21:** Curvas dosis respuesta para  $F_{in}$  activada por ATP, UTP, 2-MeSATP y BzATP.
- Figura 22:** Corriente  $F_{in}$  activada por ADO
- Figura 23:** Inhibición de la corriente  $F_{in}$  por ATP, UTP, 2-MeSATP y BzATP.
- Figura 24:** Inhibición por ATP.
- Figura 25:** Curva dosis-inhibición por ATP.
- Figura 26:** Curvas dosis-inhibición por ATP, UTP, 2-MeSATP y BzATP.

- Tabla I:** Familias de ectonucleotidasas.
- Tabla II:** Principales agonistas de los receptores P2Y.
- Tabla III:** EC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> y coeficiente de Hill, para ATP, UTP, 2-MeSATP y BzATP.
- Tabla IV:** Principales agonistas para los receptores P2Y<sub>2</sub> P2Y<sub>4</sub> P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>8</sub>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina 5'-trifosfato.
ADP	Adenosina 5'-difosfato.
AMP	Adenosina 5'-monofosfato.
ACh	Acetil colina.
ADO	Adenosina.
AMPc	Adenosina 5'-monofosfato cíclico.
UTP	Uridina 5'- trifosfato.
PLC	Fosfolipasa C.
EC <sub>50</sub>	Concentración media de activación.
IC <sub>50</sub>	Concentración media de inhibición.
E <sub>rev</sub>	Potencial de inversión.
2-meSATP	2-metil-tio-ATP.
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(β-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraácetico.
BAPTA	Ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano—N,N,N',N'-tetraácetico.
FSH	Hormona folículo estimulante.
cGH	Hormona gonadotropina coriónica.
VIP	Péptido intestinal vasoactivo.
NE	Norepinefrina.
E-NTPDasas	Ectonucleosido trifosfato difosfohidrolasa.
E-NPP	Ectonucleotido pirofosfatasa/fosfodiesterasa.
GTP	Guanosina 5'-trifosfato.
UDP	Uridina 5'-difosfato.
PPADS	Ácido piridoxsal-5'-fosfato-6-azofenil2'.4'-disulfónico.
NF023	Ácido 8-(bezamida)naftaleno-1,3,5-trisulfónico.
NF279	Ácido 8,8'-(carbonilbis(inimo-4,1-fenilencarbonilimino-4,1-fenilencarbonilimino))bis(1,3,5-naftalentrifosfónico)
Bz-ATP	(Benzoil-4-benzoil)-ATP.

MRS2220	Piridoxina ciclica- $\alpha$ -4,5-monofosfato-6-azo-fenil-2',5' disulfonato.
TNP-ATP	2',3'-O-(2,4,6-trinitrofenil)-ATP.
TEA	Tetraetilamonio.
Ap <sub>5</sub> A	Diadenosina pentafofosfato.
Ap <sub>6</sub> A	Diadenosina hexafofosfato.
$\alpha,\beta$ -meATP	$\alpha,\beta$ -metilen ATP.
$\beta,\gamma$ -meATP	$\beta,\gamma$ -metilen ATP.
HEK203	Células "Kidney embrionary human".
ADP $\beta$ S	Adenosina-5'-O-(2-azufre)-difosfato.
UDP-glucosa	Uridina-5'-difosfato- glucosa.
ATP $\alpha$ S	Adenosina-5'-O-(1-azufre)-trifosfato
UTP $\gamma$ S	Uridina-5'-O-(3-azufre)-trifosfato
ATP $\gamma$ S	Adenosina- 5'-o-(3-azufre)-trifosfato
UDP $\beta$ S	Uridina-5'-O-(2-azufre)-difosfato.
2-dATP	2-dioxiATP.
CTP	Citosina-5'-trifosfato.
ITP	Inosina-5'-trifosfato.
ADP $\beta$ F	Adenosina-5'-O-(2-fluor)-difosfato.
dATP $\alpha$ S	3-dioxiATP $\alpha$ S.
A <sub>3</sub> P <sub>5</sub> PS	Adenosina-3'-fosfato-5'-fosfosulfato.
A <sub>3</sub> P <sub>5</sub> P	3'-fosfato-5'-fosfato.
MRS2179	2'-desoxi-N6-metiladenosina 3',5'-bifosfato.
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub> .
PLC $\beta$	Fosfolipasa C $\beta$ .
PLD	Fosfolipasa D.
ApxA	Polifosfatos de diadenosina.
e.t.r.	Epitelio y teca removidos.
HEPES	Acido 2-(4-(2-Hidroxietyl)-1-piperazinil) etanosulfonico
RN	Ringer normal.
pH	Potencial de Hidrogeno.
NA	Noradrenalina.
PGE	Prostaglandina E.

## REFERENCIAS:

- Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, King BF, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA & Burnstock G. 2003. "Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y<sub>14</sub>) add diversity to the P2Y receptor family". Trends Pharmacol Sci. 24: 52-55.
- Adrian K, Bernhard MK, Beitinger HG, Ogilvie A. 2000. "Expression of purinergic receptors (ionotropic P2X<sub>1-7</sub> and P2Y<sub>1-11</sub>) during myeloid differentiation of HL60 cells". Biochim biophys acta. 1492: 127-138.
- Aleu J, Martin-Statue M, Navarro P, Pérez de Lara I, Bahima L, Marsal J & Solsona C. 2003. "Release of ATP induced by hypertonic solutions in *Xenopus* oocytes. J Physiol (London) 547: 209-219.
- Arellano RO & Miledi R. 1993. "Novel Cl<sup>-</sup> currents elicited by follicle stimulating hormone and acetylcholine in follicles-enclosed *Xenopus* oocytes". J gen Physiol. 488: 351-357.
- Arellano RO, Woodward R & Miledi, R. 1996. "Ion channels and membrane receptors in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes". In: Ion Channels vol. 4 (T. Narahashi, ed.) Ed. Plenum Press USA. Pag: 203-259.
- Arellano RO, Garay E & Miledi R. 1998. "Cl<sup>-</sup> currents activated via purinergic receptors in *Xenopus* follicles". Am J Physiol. 274: C333-340
- Arellano RO, Garay E & Miledi R. 1999. "Muscarinic receptor heterogeneity in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes". Journal of Physiology. 521: 409-419.
- Arreola J & Melvin JE. 2003. "A novel chloride conductance activated by extracellular ATP in mouse parotid acinar cells". J physiol. 547(1): 198-208.
- Bement WM & Capco DG. 1990. "Transformation of the amphibian oocyte into the egg: structural and biochemical events". Electron Microsc Tech. 16 (30): 202-234.
- Bluemink G, Hage WJ, Van den Hoef MHF & Dictus WJAG. 1983. "Freeze-fracture electron microscopy of membrane changes in progesterone-induced maturing oocytes and eggs of *Xenopus laevis*". Eur J Cell Biol. 31: 85-93.
- Bodas E, Aleu J, Pujol G, Martín-Satue M, Marsal J & Solsona, C. 2000. "ATP crossing the cell plasma membrane generates anionic current in *Xenopus* oocyte". J Biol Chem. 275: 20268-20273.
- Bogdanov YD, Dale L, King BF, Whittock N & Burnstock G. 1997. "Early expression of a novel nucleotide receptor in the neural plate of *Xenopus* embryos". J Biol Chem. 272: 12583-12590.
- Bohinski RC. 1991. Bioquímica. Addison Wesley Longman. 5ª edición. México. Pag: 229-232.
- Bucheimer ER & Linden J. 2003. "Purinergic regulation of epithelial transport". J Physiol. 555: 311-321.
- Burnstock G. 2004. "Introduction: P2 Receptors". Curr Top Med Chem. 4: 793-803.
- Calvert JA, Atterbury-Thomas AE, Leon C, Forsythe ID, Gachet C & Evans RJ. 2004. "Evidence for P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub> and atypical UTP-sensitive receptor coupled to rises in intracellular calcium mouse cultured superior cervical ganglion neurons and glia". Br J Pharm. 143: 525-532.
- Camaioni E, Boyer JL, Mohanram A, Harden TK & Jacobson KA. 1998. "Deoxyadenosine-biphosphate derivatives as potent antagonists at P2Y<sub>1</sub> receptors. J Med Chem. 41: 183-190.
- Chang K, Hanaoka K, Kumada M, Takuwa Y. 1995. "Molecular cloning and functional analysis of a novel P2 nucleotide receptor". J Biol Chem (Tokyo). 270: 26152-26158.
- Chow SC, Kass GEN, Orrenius S. 1997. "Purines and their roles in apoptosis". Neuropharmacology. 36: 1149-1156.
- Communi D, Parmentier M, Boeynaems M. 1996. "Cloning functional expression and tissue distribution of human P2Y<sub>6</sub> receptor". Biochem biophys Res Commun. 222: 303-308
- Communi D, Govaerts C, Parmentier M & Boeynaems JM. 1997. "Cloning of human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase". J Biol Chem. 272: 31969-31973.
- Communi D, Robaye B & Boeynaems JM. 1999. "Pharmacological characterization of the human P2Y<sub>11</sub> receptor. Br J Pharmacol. 128: 1199-1206.

- Dascal N, Lotan I, Gillo B, Lester HA & Lass Y. 1985. "Acetylcholine and phorbol esters inhibit potassium currents evoked by adenosine and cyclic adenosine monophosphate in *Xenopus oocyte*": Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 6001-6005.
- Dumont JN. 1972. "Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin): I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals". J Morph. 136: 153-180.
- Dumont JN & Brummett AR. 1978. "Oogenesis in *Xenopus laevis* (daudin), relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues". J. Morph. 155: 73-98.
- Ferrell JE. 1999. "Xenopus oocyte maturation: new lessons from a good egg". Bioessays. 21(10): 833-842.
- Fredholm BB, Lizerman AP, Jacobson DA, Klotz KN & Linden J. 2001. "International union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors". Pharmacol Rev. 53: 527-552.
- Fujita R, Kimura S, Kawasaki S, Takashima K, Matsumoto M, Hirano H, & Sasaki K. 2001. "ATP suppresses the K<sup>+</sup> current responses to FSH and Adenosine in the follicular cells of *Xenopus oocyte*". Jpn J physiol. 51: 491-500.
- Greenfield LJ, Hackett JT, Linden J. 1990a. "Xenopus oocyte K<sup>+</sup> current I. FSH and adenosine stimulate follicles cell dependent currents". Am J Physiol. 259: C792-C800.
- Greenfield LJ, Hackett JT, Linden J. 1990b. "Xenopus oocyte K<sup>+</sup> current. II. Adenylyl cyclase-linked receptor on follicles cells". Am J Physiol. 259: C784-C791.
- Hille B. 2001. Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates, Inc. 3a edición. Sunderland, Massachusetts USA. Pag. 33-35
- Honoré E & Lazdunski M. 1991. "Hormone-regulated K<sup>+</sup> channels in follicle-enclosed oocytes are activated by vasorelaxing K<sup>+</sup> channels openers and blocked by antidiabetic sulfonylureas". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 5438-5442
- Illes P, Klotz KN & Lohse MJ. 2000. "Signaling by extracellular nucleotides and nucleosides". Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 362: 295-298.
- Kato F, Kawamura M, Shigetomi E, Tanaka J & Inoue K. 2004. "ATP-and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: synaptic purinoceptors: the stage for ATP to play its dual role". J Pharmacol Sci. 94: 107-111.
- Katrin S & Webb TE. 2001. "A retrospective of recombinant P2Y receptor subtypes". Arch Biochem Biophys. 397: 131-136.
- Kull B, Svenngsson P & Fredholm BB. 2000. "Adenosine A<sub>2A</sub> receptors are co-localized with and activate G<sub>oif</sub> in rat striatum". Mol Pharmacol. 58: 771-777.
- Küegelgen IV & Wetter A. 2000. "Molecular pharmacology of P2Y-receptors". Naunyn-Schmiedeberg's Arch pharmacol. 362: 310-323.
- Kusano K, Miledi R & Sinnkre, J. 1977. "Acetylcholine receptors in the oocyte membrane". Nature. 270: 739-741.
- Kusano K, Miledi R & Stinnakre J. 1982. "Cholinergic and catecholaminergic receptor in the *Xenopus oocyte membrane*". Journal of Physiology. 328: 143-170.
- Lambrecht G. 2000. "Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications". Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 362: 340-350.
- Lau YT, Reynhout JK & Horowitz SB. 1994. "Membrane permability changes during *Rana oocyte maturation*". Experientia. 50 (6): 606-609.
- Lotan I, Dascal N, Cohen S & Lass Y. 1982. "Adenosine induced slow ionic currents in the *Xenopus oocyte*". Nature Lond. 298: 572-574.
- Lotan I, Dascal N, Cohen S & Lass Y. 1986. "ATP-evoked membrane responses in *Xenopus oocytes*". Pflugers Arch. 406:158-162.
- Maroto R & Hamill OP. 2001. "Brefeldin a block of integrin-dependent mechanosensitive ATP release from *Xenopus oocyte* reveals a novel mechanism of mechanotransduction ". J Biol Chem. 276: 23867-23872.
- Marteau F, Le Poul E, Communi D, Labouret C, Savi P, Boeynaems JM, Suarez GN. 2003. "Pharmacological characterization of the human P2Y<sub>13</sub> receptor". Mol Pharmacol. 64: 104-112.
- Matsuoka I & Ohkubo S. 2004. "ATP-and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: Adenosine receptor activation by ATP through rapid and localized generation or adenosine by ecto-nucleotidases". J Pharmacol Sci. 94: 95-99.
- Matsuoka T, Nishizaki T, Nomura T, Mori M, and Okada Y. 1998. "ATP produces potassium currents via P<sub>3</sub> purinoceptor in the follicle cell layer of *Xenopus oocytes*". Neurosci Lett. 248: 130 – 132.

- Miledi R & Woodward RM. 1989a. "The effect of defolliculation on the membrane current responses of *Xenopus* oocytes". J. Physiol. (London). 416: 601-621.
- Miledi R & Woodward RM. 1989b. "Membrane currents elicited by prostaglandins, oxytocin and atrial natriuretic factor in follicle enclosed *Xenopus* oocytes". J Physiol. 416: 623-643.
- Morrison RT & Boyd RN. 1990. Química orgánica. Addison-Wesley Iberoamericana. 5ª edición. USA. Pag. 931-932, 1184-1188.
- Mulner O & Ozon R. 1981. "The roles of follicular envelopes in the initiation of *Xenopus* oocyte maturation". Gen Comp Endocrinol. 44: 335-343.
- Nicholas RA, Watt WC, Lazarowski ER, LiQ, Harden K. 1996. "Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP-and UTP-specific receptor. Mol Pharmacol. 50: 224-229.
- Nicholas RA. 2001. "Identification of the P2Y<sub>12</sub> receptor: A novel member of the P2Y family of receptors activated by extracellular nucleotides". Mol Pharmacol. 60: 416-420.
- North RA. 2002. "Molecular physiology of P2X receptors". Pharmacol Rev. 82: 1013-1067.
- Novak I. 2003. "ATP as signaling molecule: the exocrine focus". News Physiol Sci. 18: 12-17.
- Ogielska M & Kotosz A. 2004. "Pattern and rate of ovary differentiation with reference to somatic development in anuran amphibians". J Morphol. 259: 41-54.
- Paukert M, Hidayat S & Grunder. 2002. "The P2X<sub>7</sub> receptor from *Xenopus laevis*: Formation of a large pore in *Xenopus* oocytes". FEBS lett: 513: 253-528.
- Ralevic V & Burnstock G. 1998. "Receptors for purines and pyrimidines". Pharmacol Rev. 50: 413-491.
- Reyes AL. 2005. Tesis de maestría. "Corrientes iónicas activadas mediante la liberación mecanosensible de ATP en el folículo de *Xenopus*". Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla Querétaro.
- Robinson KR. 1979. "Electrical currents through full-grow and maturing *Xenopus* oocytes". Proc Natl Acad Sci USA. 76: 837-841.
- Ruppelt A, Weiyuan M, Borchardt K, Silberberg SD & Soto F. 2001. "Genomic structure, developmental distribution and functional properties of the chicken P2X<sub>5</sub> receptor". J Neurochem. 77: 1256-1265.
- Saldaña C, Vázquez CF, Garay E & Arellano RO. 2005. "Epithelium and/or theca are required of ATP-elicited K<sup>+</sup> current in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes". J Cell Physiol. 202, 814-821.
- Sigel E. 1987. [www.cx.unibe.ch/~sigel/index.html](http://www.cx.unibe.ch/~sigel/index.html)
- Simoncini L & Moody WJ. 1997. "Changes in voltage-dependent currents and membrane area during maturation of starfish oocytes: species differences and similarities". Dev Biol. 138 (1): 194-201.
- Tunquist BJ & Maller JL. 2003. "Under arrest: cytotstatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs". Genes Dev. 17: 683-710.
- Van Renterghem C, Renit-Soria J & Stinnakre J. 1984. "β-adrenergic induced potassium current in *Xenopus* oocyte: Involvement of cyclic AMP". Biochimie. 66: 135-138.
- Van Renterghem C, Renit-Soria J & Stinnakre J. 1985. "β-adrenergic induced potassium current in *Xenopus* oocyte: role of cyclic-AMP, inhibition by muscarinic agents". Proc. R. Soc. London Ser. B. 223: 389-402.
- Vartian N & Boehm S. 2001. "P2Y receptor-mediated inhibition of voltage-activated Ca<sup>2+</sup> currents in PC12 cells". Eur J Neurosci. 13: 899-908
- Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F & Broer S. 2000. "The Use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins". Cell Physiol Biochem. 10: 1-12.
- Webb TE, Henderson DJ, Roberts JA & Barnard EA. 1998. "Molecular cloning and characterization of the rat P2Y<sub>4</sub> receptor". J Neurochem. 71: 1348-1357.
- Weber WM. 1999. "Endogenous ion channels in oocytes of *Xenopus laevis*: Recent developments". J Membrane Biol. 170: 1-12
- Werner L, Wang H, Welte T and Reiser. 2003. "P2Y receptor specific for diadenosine tetraphosphate in lung: selective inhibition by suramin, PPADS, Ip5I, and not by MRS-2197". Eur J Pharmacol. 468: 9-14.
- Wildman SS, Unwin RJ & King BF. 2003. "Extended pharmacological profiles of rat P2Y<sub>2</sub> and rat P2Y<sub>4</sub> receptors and their sensitivity to extracellular H<sup>+</sup> and Zn<sup>2+</sup>". Br J Pharmacol. 140: 1177-1186.

- Wintrobe AS & Caret RL. 1984. Química orgánica. Harla. México. Pag: 1272-1281: 1457-1463.
- Woodward RM & Miledi R. 1987. "Hormonal activation of membrane currents in follicle enclosed *Xenopus* oocytes". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 4135-4139.
- Woodward RM & Miledi R. 1989. "Membrane currents elicited by prostaglandins, atrial natriuretic factor and oxytocin in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes". J Physiol. 416: 623-643.
- Wu KH, Tobias ML, Thornton J W, Kelley DB. 2003. "Estrogen receptors in *Xenopus*: duplicate genes, splicen variants, and tissue-specific expression". Gen Comp Endocrinol. 133: 38-49.
- Zimmerman H. 2000. "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides". Naunyn-Schemiedeberg's Arch Pharmacol. 362: 299-309.