

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Identificación molecular de las isoformas del receptor a inositol-1,4,5-trisfosfato en células de la granulosa y en ovarios de ratón.

T e s i s

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

Patricia De la Rosa Santander

MÉXICO, D.F.

AÑO 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.

Dedico este trabajo

A mi Papá Layo(†), un ejemplo de vida.

A mi madre, mi guerrera invencible.

A mi padre.

A mis Hermanos: Vero y Berna.

A mis hijos: Omar, Brenda y Jimena.

A Rodrigo por haber sido motivo para lograrlo.

A mi gran familia materna y paterna

A mi tía Nisha, gracias por estar siempre presente en los momentos más importantes de mi vida.

Al alma de ángel contenida en un cuerpo mortal, el Dr. Mauricio Díaz Muñoz.

A la Dra. Verónica Morales Tlalpan, por su asesoría, su apoyo, su gran paciencia e invaluable amistad.

A mis amigos de la licenciatura: Eu, Liz, Lius Jesús, Pily, Lupita, Martita, Susi, Vero Ramos, Claus, Vero Aguilar, Fausto, Asustin, Karl, Ricardo, Mónica, Dea, Tere, Gerardo Cossú, Omar, Luis G. Amador.

A mis compañeros de laboratorio: Gustavo, Dalia, Adrián, Sabina y Olivia.

Al L.A.E. Jorge Segura del Río, por su apoyo y confianza.

A Mireya por nuestras des-veladas.

A Roger por su apoyo incondicional.

Agradecimientos:

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología bajo la asesoría de la Dra. Verónica Morales Tlalpan.

Al Dr. Mauricio Díaz Muñoz por sus comentarios durante la realización de este trabajo.

A los miembros del Jurado: Dr. Homero Hernández Montes, Dr. Ignacio Camacho , Dra. Verónica Morales Tlalpan, Dra. Martha Alicia Menjívar Iraheta, M en C. Euclides Ávila Chávez. Por sus valiosos comentarios al escrito de esta tesis.

A Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos, por su asesoría en el uso del microscopio confocal, Unidad de Análisis de Imágenes del INB-UNAM.

INDICE

Resumen	1
Introducción	3
El Ovario	3
Maduración folicular	3
El Calcio (Ca^{2+})	5
Homeostasis de Ca^{2+}	5
Cascada de fosfoinosítidos-Ca^{2+}	8
Receptores acoplados a proteínas G (GPCR)	9
Receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK)	10
Fosfolipasa C	10
El Receptor a Inositol 1,4,5-Trisfosfato (IP_3R)	11
Dominios de IP_3R	13
Estructura tridimensional de IP_3R	15
Isoformas	16
Planteamiento del Problema	19
Hipótesis	21
Objetivo Principal	21
Objetivos Particulares	21
Materiales y Métodos	22
Reactivos	22
Medios de cultivo y soluciones	22
Preparación de rebanadas de ovario y cultivo celular	24
Inmunohistoquímica e inmunohistoquímica	25
Marcaje con sondas fluorescentes	26
Medición de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)	27
Captura de imágenes	27
Resultados	29
Detección del receptor a IP_3	29
Identificación de las isoformas de IP_3R en las CG	31
Movilización de Ca^{2+} en las CG	33
El aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ proviene de depósitos intracelulares	34
Expresión de IP_3R en las rebanadas de ovario de ratón	36
Discusión	39
Conclusiones	43
Perspectivas	44
Referencias	45

RESUMEN

El ovario, es un órgano en donde constantemente se lleva a cabo la proliferación y la diferenciación celular, así como la producción de esteroides (Bootman *et al.*, 1995; Agoston, 2004). Su unidad funcional es el folículo, el cual está constituido de células de la teca (CT), células de la granulosa (CG) y un ovocito. Estas estructuras se encuentran en diferentes etapas de maduración.

Evidencias indican que la maduración depende de la comunicación intercelular establecida entre los oocitos y las CG, además de otros factores que aun son desconocidos (Klinger *et al.*, 2002). Esta comunicación bidireccional influye para una adecuada maduración meiótica del oocito (Eppig *et al.*, 2005). Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales la maduración se lleva a cabo son aun desconocidos.

Existen reportes que indican por un lado que este proceso es regulado por AMPc debido a que altos niveles de AMPc impiden la maduración del ovocito y cuando los niveles decaen el ovocito sale del arresto. Por otro lado, se ha propuesto que el calcio (Ca^{2+}) también influye en la regulación de la maduración folicular. Existen evidencias de receptores que responden a hormonas y neurotransmisores que modulan éste proceso folicular. Activan cascadas de señalización involucradas en la producción de segundos mensajeros y que culminan actuando sobre proteínas que están implicadas con la homeostasis de Ca^{2+} (Mehlmann, 2005).

La concentración de Ca^{2+} intracelular está regulada por diversos mecanismos (Berridge *et al.*, 1995). Cambios en la concentración de Ca^{2+} se logran por el ingreso y/o liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares. En este último caso, están involucrados principalmente los canales liberadores de Ca^{2+} , el receptor a ryanodina (RyR) y el receptor a inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3R), los cuales se han encontrado localizados principalmente en retículo sarco-endoplásmico (RSE).

Este trabajo se realizó en cultivos primarios de CG provenientes de folículos ováricos de ratón. Usando microscopia confocal, encontramos que en este sistema se expresa el receptor a IP_3R , utilizando un inhibidor acoplado a una sonda fluorescente.

Experimentos realizados con anticuerpos específicos demostraron la coexistencia de las isoformas I, II y III del IP₃R en estas células y en rebanadas de ovario. Haciendo uso de un espectrofluorómetro, estudiamos la movilización de Ca²⁺ intracelular, en respuesta a la aplicación de ATP para demostrar la funcionalidad de estos receptores.

Estos resultados, demuestran que las isoformas del IP₃R, se expresan en CG y en otros componentes de los folículos ováricos, además de folículos en diferentes etapas de maduración. Lo cual sugiere que los componentes fundamentales del ovario requieren de una regulación espacial y temporal de la [Ca²⁺]_i muy controlada.

INTRODUCCION

EL OVARIO

El ovario es un órgano fundamental del sistema reproductivo. Está constituido por tres regiones: corteza externa, médula central y un hilum. Es un órgano muy dinámico, ya que en pocos días es capaz de generar folículos maduros (dependiendo de la especie serán uno o varios).

La unidad funcional del ovario es el folículo, el cual está constituido por diferentes tipos celulares (ovocito y células foliculares). Este complejo transita por diferentes etapas lo cual estimula la maduración folicular y la diferenciación celular. El principal objetivo de estas continuas transiciones es generar óvulos maduros (capacitados para ser fertilizados), y posteriormente dar origen a un cuerpo lúteo o más, según la especie. En la siguiente sección se presentará brevemente las etapas del desarrollo folicular.

MADURACION FOLICULAR

El desarrollo de los folículos se divide en diferentes períodos cuyas características se mencionan a continuación:

- Folículos primordiales: Constituidos por un ovocito, células foliculares y una membrana basal. El ovocito se encuentra en profase I (diploteno de la meiosis I). Durante esta fase ocurre la duplicación longitudinal de cada cromosoma homólogo y las células foliculares permanecen sin dividirse.
- Folículos primarios: El ovocito continúa en diploteno, mientras que, la capa de células foliculares se duplica. Cuando el ovocito está rodeado por dos capas, de células foliculares se distingue la zona pelúcida (formada por microvellosidades, glicoproteínas del ovocito y por proyecciones citoplasmáticas de la primera capa de células foliculares). La capa externa folicular se recubre por una membrana vítrea, adosada a esta aparecen un grupo de células alargadas, denominadas CT.
- Folículos secundarios: El ovocito continúa en la misma fase, mientras que, las células foliculares se separan. Esta separación provoca que se forme una

estructura conocida como antro que en etapas tempranas es de forma irregular. La formación del antro provoca la separación de células foliculares en CG del cúmulo y murales (CG). Los espacios recientemente formados contienen líquido folicular rico en hormonas como la hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), estrógenos, progesterona, androstenediona y prostaglandinas; además de agua, electrolitos y sustancias inhibitoras de la meiosis.

- Folículos terciarios: en esta etapa los folículos poseen un antro bien definido, (la característica estructural más evidente en esta fase). La capa de CG que rodea al ovocito se denomina cúmulo oóforo. Las células externas al cúmulo oóforo contienen receptores para FSH, producen estrógenos y líquido folicular. La teca folicular se diferencia en capa interna y externa. La interna está altamente vascularizada, y contiene receptores para LH. Por otra parte, la capa externa está formada por fibroblastos y fibras de colágena.
- Folículo pre-ovulatorio: La conexión entre el cúmulo oóforo y la membrana granulosa se desestabiliza hasta que la comunicación se pierde. Durante las últimas etapas de la maduración las células del cúmulo forman la corona radiada. Estos cambios están relacionados con la reanudación y término de la meiosis I. Como resultado el ovocito I evoluciona a ovocito II y se produce el primer corpúsculo polar. Después de la expulsión del corpúsculo, el ovocito II inicia la segunda meiosis, y permanece en metafase. Bajo el estímulo de la LH, la teca interna sintetiza andrógenos y pequeñas cantidades de estradiol. La actividad de aromatasas de las CG convierten a los andrógenos en estrógenos, de tal manera que el ambiente resulta más estrogénico.
- Folículos atrésicos: En los folículos maduros la granulosa involuciona y las CT se retraen. El cúmulo se disocia y se reanuda la meiosis en el ovocito.
- Cuerpo Lúteo. Una vez que se libera el ovocito maduro (óvulo), las células somáticas del folículo forman el cuerpo lúteo. En mamíferos, el cuerpo lúteo sintetiza progesterona. En presencia de embarazo, esta hormona lo estabiliza y mantiene. En ausencia de embarazo las células lúteas experimentan el proceso apoptótico (muerte celular programada), este proceso es llamado luteólisis estructural (Peter C.K., The ovary 2° ed.).

En la Figura 1 se esquematizan las etapas de maduración folicular.

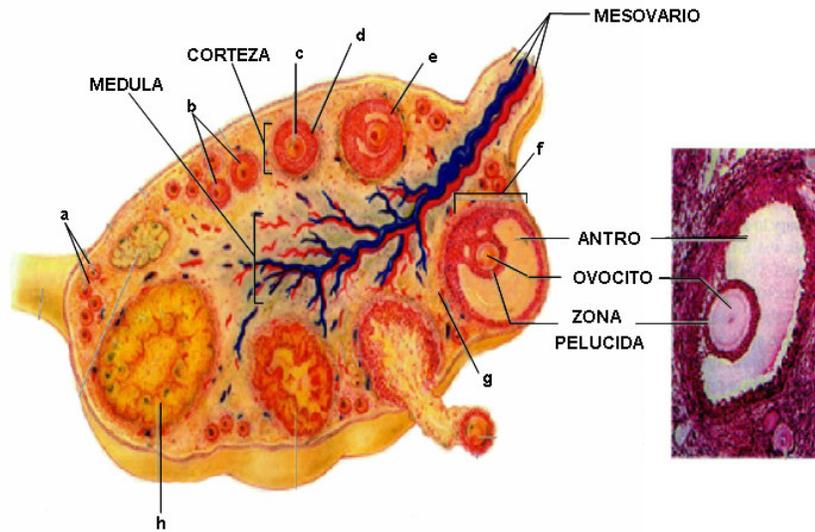


Figura 1. Corte transversal del ovario. En la Figura podemos observar representados en (a) folículos primordiales, (b) folículos primarios, (c) folículo secundario, (d) células de la granulosa, (e) folículo terciario, (f) folículo pre-ovulatorio, (g) folículo atrésico, (h) cuerpo lúteo. Imagen modificada de www.colorado.edu/epob/epob4480tsai/ovary.jpg

Aún se desconoce los mecanismos involucrados en la maduración del folículo; sin embargo se sabe que segundos mensajeros como el AMPc y el Ca^{2+} tiene una participación fundamental en este proceso (Amireault *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004). A continuación se describe algunos de los mecanismos donde el Ca^{2+} participa en la foliculogénesis.

EL CALCIO

HOMEOSTASIS DE Ca^{2+}

El Ca^{2+} es un ión muy versátil, interviene como segundo mensajero y regula múltiples procesos celulares como fertilización, proliferación, diferenciación celular, apoptosis, y muchos otros. (Berridge *et al.*, 1999; Carafolli *et al.*, 2001). Los mecanismos moleculares mediante los cuales el Ca^{2+} regula toda esta gama de funciones están aun en estudio. Está bien documentado que este catión puede servir como señalizador celular a través de su movilización hacia el citoplasma desde el medio extracelular y/o los compartimentos intracelulares. De esta forma los cambios locales o generales de Ca^{2+}

son señales que promueven la activación de los mecanismos involucrados en la homeostasis de este ión (Bootman *et al.*, 2001).

El flujo de Ca^{2+} es dependiente de la concentración de este ión en los diferentes compartimentos. Como la concentración de Ca^{2+} en el espacio extracelular, en el citosol y en los depósitos internos no es homogénea, se forma un gradiente de Ca^{2+} . Mantener la proporción de Ca^{2+} en cada uno de los reservorios es fundamental, debido a que una alterada elevación de Ca^{2+} conduciría a la célula a un estado de necrosis o apoptosis. (Berridge *et al.*, 2003).

La concentración de Ca^{2+} en el espacio extracelular oscila entre $1\text{-}2 \times 10^{-3}$ M. Mientras que en el citosol esta concentración varía alrededor de $1\text{-}2 \times 10^{-7}$ M. Por otra parte en el RSE la concentración de este ión es cercana a $1\text{-}2 \times 10^{-4}$. La diferencia entre el espacio extracelular y el citosol es de 4 órdenes de magnitud. El contraste entre las concentraciones en el citosol y los depósitos internos es de 3 ordenes de magnitud (ver Figura 2) (Berridge *et al.*, 2000). Mantener estas concentraciones entre los diferentes compartimentos es esencial para la célula. En este proceso intervienen una gran cantidad de proteínas las cuales se discutirán mas adelante.

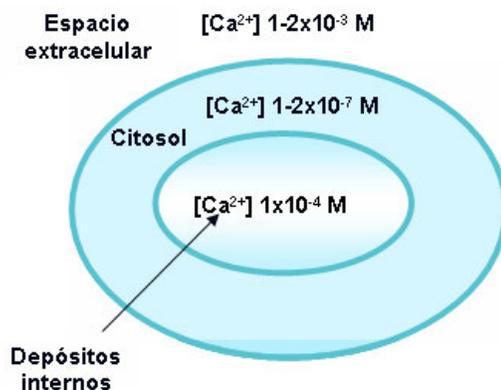


Figura 2. Esquema de las concentraciones de Ca^{2+} en diferentes compartimentos

Las células regulan la concentración de Ca^{2+} intracelular mediante la participación coordinada de proteínas especializadas. Estas proteínas pueden unir Ca^{2+} o desplazarlo de un lado a otro de la membrana. Las proteínas que unen o fijan Ca^{2+} tienen como función principal amortiguar la concentración de este catión. De tal manera que captan Ca^{2+} cuando su concentración se incrementa más allá del nivel basal (Clapham *et al.*,

1995). Existen otra clase de proteínas las cuales se encargan de movilizar Ca^{2+} al citoplasma o hacia reservorios intracelulares. Estas proteínas se caracterizan por estar embebidas en las membranas, entre las cuales se encuentran las ATPasas de Ca^{2+} (localizada en la membrana plasmática y en el retículo), el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (limitado a la membrana plasmática y la membrana mitocondrial) y los canales iónicos. Los cuales pueden ser clasificados en dos superfamilias: los que controlan la entrada de Ca^{2+} extracelular y los que liberan Ca^{2+} de almacenes intracelulares hacia el citosol (Berridge *et al.*, 2003).

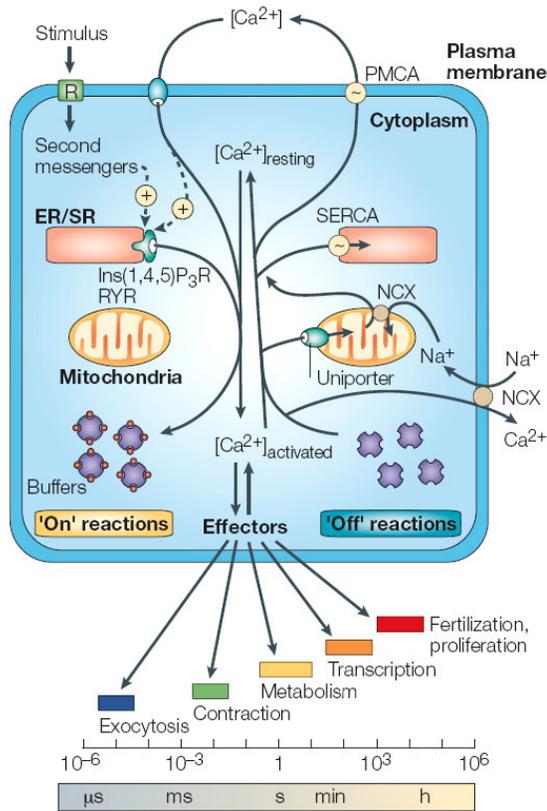


Figura 3. En esta Figura se indican los diferentes mecanismos que mantienen la homeostasis de Ca^{2+} en los diferentes compartimentos, además, se resaltan proteínas que participan en mantener el gradiente de Ca^{2+} . Imagen tomada de Berridge *et al.*, 2003.

Algunos de los canales que controlan la entrada se clasifican en canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Los cuales se han subdividido en canales de bajo umbral (tipo T) y de alto umbral (tipos L, N, P, Q y R) (Catterall, 2000). Estos se activan en respuesta a cambios de voltaje (Catterall, 2000).

Otros permiten la entrada de Ca^{2+} en respuesta al vaciamiento de reservorios intracelulares, entre los cuales podemos nombrar a los canales del potencial transitorio (TRP, *transient receptor potencial*) (Pedersen *et al.*, 2005). Esta superfamilia de proteínas ha sido subdividida en múltiples subfamilias tomando como base la similitud en su secuencia (Venkatachalam *et al.*, 2002).

Una categoría aparte son los receptores ionotrópicos que en respuesta a la unión de neurotransmisores, hormonas u otros ligandos permiten el paso de Ca^{2+} a favor de gradiente hacia el interior celular, como la familia de receptores a glutamato y receptores GABA A (Illes *et al.*, 2004; Fumagalli *et al.*, 2003; Bockaert *et al.*, 1999).

En la superfamilia de canales que está implicada en la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares, se han descrito 2 familias, la de los receptores a ryanodina (RyR) y los receptores a inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3R). Esencialmente se han ubicado en la membrana del RSE, y comúnmente se han denominado canales liberadores de Ca^{2+} (Berridge *et al.* 2000, Berridge *et al.*, 1999; Carafoli, 2002).

La familia de canales liberadores comparten una gran cantidad de características estructurales (organizados en tres dominios) y de regulación (dependencia a Ca^{2+}). A pesar de compartir varias características, ambos canales son activados por diferentes mecanismos. En las siguientes secciones se consideraran las vías de señalización en las que interviene el IP_3R y sus reguladores (Bezprozvanny, 2005).

CASCADA DE FOSFOINOSÍTIDOS- Ca^{2+}

Las cascadas de señalización involucran la participación de una enorme cantidad de proteínas, péptidos, lípidos, iones y moléculas de bajo peso molecular. Las moléculas (agonistas o ligandos) que activan a tales vías provienen de diversos puntos y son de naturaleza variada, desde la temperatura, la luz, los olores, hormonas, neurotransmisores entre otros.

Existen una gran cantidad de rutas de señalización, relacionadas con diversas respuestas. Una de las rutas más estudiadas es la cascada de fosfoinosítidos- Ca^{2+} , la cual es una vía de señalización muy importante para la célula. Esta vía es activada por la unión de ligandos, los cuales reconocen a dos grandes superfamilias de receptores

localizados en la membrana plasmática. La familia de receptores de 7 cruces transmembranales y la familia de receptores con actividad de cinasas de tirosina. Estas dos superfamilias de receptores son las entidades moleculares que se encargan de censar cambios en el medio externo y de transducir los mensajes al interior celular (Landry *et al.*, 2006; Karnik *et al.*, 2003) (Ver Figura 4).

RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCR)

En la superfamilia de receptores de 7 cruces transmembranales se han descrito más de 800 miembros (se ha estimado que más del 2% del genoma humano codifica para esta clase de receptores) (Landry *et al.*, 2006). Las características estructurales para incluir a proteínas dentro de este grupo, está basado en la presencia de 7 dominios hidrofóbicos los cuales forman los 7 cruces transmembranales. Estos cruces están unidos por cadenas polipeptídicas (“loops”), 3 en la región extracelular y 3 en la porción intracelular (Karnik *et al.*, 2003). La interacción del ligando en su extremo amino terminal (extracelular), provoca interacciones intramoleculares las cuales inducen cambios conformacionales en la proteína (Pérez *et al.*, 2005; Kanik *et al.*, 2003). El cambio conformacional que sufren específicamente los “loops” intracelulares del receptor provocan la unión y la activación de una proteína Gq (Landry *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2005).

La proteína G es un complejo multiproteico formado por 3 subunidades α , β y γ . Este complejo heterotrimérico oscila entre dos estados: el activo y el inactivo. La activación se lleva a cabo mediante el desplazamiento de GDP por GTP, este proceso se realiza subunidad α . El intercambio de nucleótido induce que el heterotrímico se disocie en dos complejos. La subunidad α permanece unida a GTP (α -GTP) y las subunidades $\beta\gamma$ forman un dímero. De tal manera que ambos complejos transmiten la señal, desencadenada por la previa activación del receptor, a proteínas cascada abajo. La inactivación de la proteína G es determinada por la actividad de GTPasa de la subunidad α la cual hidroliza el GTP por GDP y regresa a la proteína en su estado inactivo (Hubbard *et al.*, 2006; Landry *et al.*, 2006).

Las proteínas G se han dividido en varias familias, y, estas a su vez en subfamilias. Estas divisiones han permitido identificar a las familias de acuerdo al tipo de moléculas efectoras. En el caso de la familia Gq (Gq α , G11 α , G14 α y G15/16 α) se ha demostrado que activan directamente a la fosfolipasa C (PLC) (Hubbard *et al.*, 2006).

RECEPTORES CON ACTIVIDAD DE CINASA DE TIROSINA (RTK)

Los receptores a factores de crecimiento que poseen actividad intrínseca de cinasas de tirosina, como el receptor al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el receptor al factor de crecimiento neuronal (NGF), pueden activar a la PLC (isoforma γ). Estos receptores se dimerizan después de la unión de sus ligandos, desencadenando su autofosforilación. Los receptores autofosforilados (en residuos de tirosina) proveen sitios para el anclaje de proteínas específicas. La activación de estos receptores promueve el reclutamiento de diversas proteínas y la activación de vías de señalización entre las que destaca la cascada de fosfoinosítidos Ca²⁺ (Rebecchi *et al.*, 2000).

FOSFOLIPASA C

Las fosfolipasas C, son una familia de proteínas solubles con una masa molecular de 80-150 kDa, constituidas de varios dominios. La PLC hidroliza el fosfatidil inositol, un lípido localizado en la membrana plasmática. Con la activación de la PLC se producen dos segundos mensajeros el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5 trisfosfato. En mamíferos, se han identificado a 10 isoformas: PLC β (4 miembros), PLC γ (2 miembros), y PLC δ (4 miembros) (Rebecchi *et al.*, 2000).

En la Figura 4 se muestra un resumen de la activación del receptor a IP₃ por las diversas vías de señalización. La producción de IP₃ por la activación de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y por la activación a receptores con actividad de cinasas de tirosina (RTK). También se ejemplifican la actividad de la fosfolipasa C y las diferentes isoformas de esta enzima.

EL RECEPTOR A INOSITOL 1,4,5-TRISFOSFATO (IP₃R)

La familia del IP₃R en vertebrados es codificada por tres genes diferentes que dan origen a las tres isoformas de IP₃Rs: IP₃R tipo I (IP₃RI), IP₃R tipo II (IP₃RII), e IPR tipo III (IP₃RIII). Estas proteínas se expresan abundantemente en mamíferos (Sugawara *et al.*, 1997), en aves se demostró la presencia del IP₃RI (Sacchetto *et al.*, 1995), en *Xenopus*, y en algunos invertebrados como la *Drosophila. melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* se ha reportado la presencia de sólo un receptor a IP₃ (Sorrentino *et al.*, 2000).

Se han clonado y secuenciado a las tres isoformas, IP₃R I (2479 aminoácidos (aa)), IP₃R II (2701 aa), y el IP₃R III (2670 aa). El IP₃RI comparte una identidad del 70 % con el IP₃R II, mientras que, IP₃R III es idéntico a IP₃R I en un 64%. Por otra parte, la secuencia de aminoácidos del IP₃R I de humano tiene una identidad del 99% con las secuencias de ratón y rata (ver Figura 4). Análisis de similitud han demostrado que los IP₃Rs están constituidos por regiones altamente conservadas (70%), y por regiones variables (50%). Las regiones mas conservadas entre los IP₃Rs de mamífero se localizan en la región amino terminal y carboxilo terminal. La región variable se localiza en el centro de la proteína entre la región II y IV, la cual contiene los sitios reguladores (Bezprozvanny, 2005).

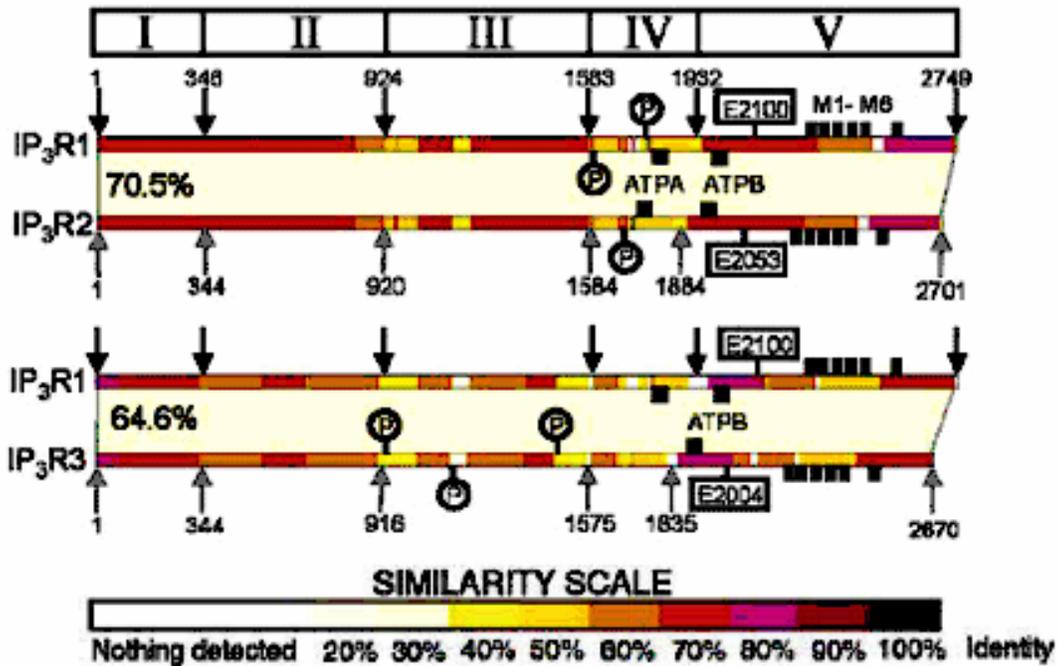


Figura 4. Escala de similitud entre las isoformas de IP₃R de rata. Imagen tomada de Bezprozvanny *et al.*, 2005

Tanto la diversidad como el nivel de expresión de cada una de las isoformas del IP₃R que presentan las células o tejidos suele ser diferente. Se ha reportado que varios sistemas poseen más de una isoforma del receptor a IP₃. Sumado a esto, se han descrito isoformas generadas por empalme alternativo para cada una de las 3 isoformas. En la Tabla 1 se muestran los diversos tejidos donde se ha demostrado la presencia de al menos una de las isoformas del receptor a IP₃ utilizando técnicas de biología molecular e inmunológicas (Bezprozvanny, 2005).

Tabla 1: Expresión de las tres isoformas de IP₃R en diferentes tejidos.

IP₃R I	IP₃R II	IP₃R III
Células de Purkinje (Matsumoto <i>et al.</i> , 1999) Músculo liso Epitelio de arterias (Grayson, <i>et al.</i> , 2004)	Células de músculo cardiaco Células de la glía Glándulas submandibulares Células tubulares de riñón Células epiteliales de ductos epididimales CG en ovario (Fujino, I et al., 1995) Células de músculo esquelético (De Smedt, H et al., 1997) Hígado	Células gástricas Células salivares Células acinares pancreáticas Células epiteliales del intestino delgado (Fujino, I et al., 1995)

La variedad de estas proteínas complican su estudio, y otro factor adicional sobreviene cuando se demuestra que estas proteínas pueden ensamblarse como homotetrámeros y heterotetrámeros (este tópico será abordado en secciones posteriores).

DOMINIOS DEL IP₃R

Clásicamente se ha dividido a los IP₃Rs en tres regiones (Ver Figura 5). En la primera sección se encuentra el sitio de unión a IP₃ que se localiza en el extremo amino-terminal. En la segunda sección, se encuentra la región reguladora o moduladora, situada en la región central. La tercera sección comprende la región transmembranal que incluye a la región de poro y el carboxilo terminal (Bosanac *et al.*, 2005).

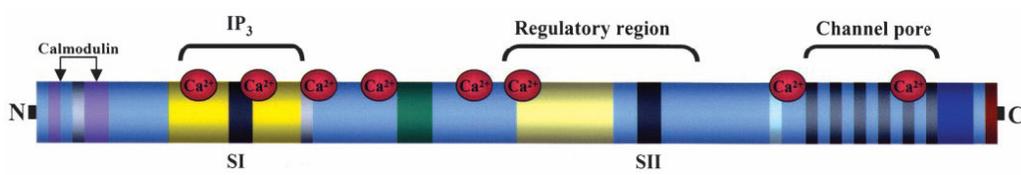


Figura 5. Estructura Primaria del Receptor a IP₃. La estructura primaria del prototipo del IP₃R. El extremo NH₂ terminal comprende los sitios de unión a calmodulina, a IP₃ y Ca²⁺. El dominio regulador se ubica en la parte central del receptor. La última región comprende la zona transmembranal, la región de poro y el extremo carboxilo terminal (-COOH terminal). SI y SII indican sitios de empalme alternativo. Imagen tomada de Patterson, *et al.*, 2004

Trabajos recientes encaminados a demostrar la funcionalidad de cada uno de los tres dominios han arrojado nueva información. En estos experimentos, el receptor de IP₃R I fue sometido a proteólisis con tripsina, una proteasa que reconoce secuencias muy específicas dentro de una proteína. Como resultado de esta digestión fue posible dividir

al receptor en 5 dominios compactos, numerados del I al V (Yoshikawa *et al.*, 1999). Algunos de estos hallazgos son resumidos en la tabla 2 (Bezprozvanny, 2005).

Tabla 2. Características de los dominios obtenidos por proteólisis con tripsina del IP₃R I de rata

Dominio	Posición	Estructura	Sitios de unión a:	Splicing
I	1-345	β-plegada triple	Homer TPRC 2- CaM CaBP1 InsP₃R_{sup} (1–223aa dominio supresor de unión a IP ₃) Primera parte del sitio de unión a RACK1 PKC	S1 (aa 318 - 332 inserto)
II	346-923	amino terminal consiste (aa 224 – 436) en “β-trefoil-type” y del carboxilo-terminal una estructura de alfa hélice (aa 437 – 604) conteniendo una estructura semejante a “armadillo repeat”.	InsP₃ (gran parte del centro de unión a InsP ₃) Dos sitios de unión a Ca²⁺ Dos sitios de asociación con el canal TRPC3 IRBIT La segunda parte del sitio de unión para RACK1	SIII (9 aa inserto entre G917 y S918)
III	924-1583	Contiene un motivo Leucina – isoleucina zipper (LIZ)	Ca²⁺ - CaM CARP GAPDH AKAP9	
IV	1584-1932		Dos sitios de fosforilación por PKA/PKG Sitio de unión de alta afinidad para 2 ATP Caspasa 3	SII (inserto de aa 1692 – 1731)
V	1933-2749	(aa 2590-2749) codifica para la región IC (cola citosólica del IP ₃ R I), la región formadora del poro. Contiene los 6 dominios transmembranales	Cas Anquirina (proteína de adhesión) 4.1N (proteína de unión a citoesqueleto) Citocromo C (asociado a apoptosis) PP1α es importante para el control del estado de fosforilación por PKA del IP ₃ R I neuronal) Huntingtina (HAP1A, conexión potencial entre la señalización de Ca ²⁺ mediada por IP ₃ R I)	

Este tipo de acercamiento permitió estudiar con más detalle el sitio de unión de calmodulina, IP₃, Ca²⁺ y de otros factores que están involucradas en la regulación de este canal. Además, se obtuvo información de la disposición tridimensional del extremo amino terminal, región de unión a IP₃. Estos experimentos y otros experimentos han demostrado que el receptor a IP₃ además de ser un canal liberador de Ca²⁺, también es un integrador de señales extracelulares (Patterson *et al.*, 2004).

ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL IP₃R.

En 1991 el grupo de Mikoshiba demostró que el IP₃R I (tipo neuronal) está compuesto de 4 subunidades idénticas unidas de manera no covalente. En estudios realizados en bicapas planas, se demostró que se necesitan 4 subunidades para formar un canal funcional (Bosanac *et al.*, 2005). Recientemente varios grupos de investigación han demostrado que las subunidades pueden ensamblarse en heterotetrámeros (Joseph, *et al.* 1995). Este resultado da como resultado canales funcionales con propiedades biofísicas diferentes, lo cual hace más complejo su estudio (ver Figura 6).

El estudio de la estructura tridimensional del receptor a IP₃, se ha dificultado debido a que es una proteína que se localiza en la membrana, además de su alto peso molecular (1,200,000 kDa). Se estima que un porcentaje muy alto, entre el 70 y el 80% de la proteína se localiza en la región citosólica, mientras que el restante 20-30% se encuentra embebido en la membrana (Bezprozvanny, 2005). Algunos grupos han utilizado diferentes técnicas para determinar la estructura tridimensional del receptor. Del estudio de análisis de partículas se determinó que el receptor a IP₃ es estructuralmente similar al RyR (Da Fonseca *et al.*, 2003). Utilizando microscopía electrónica se demostró el cambio conformacional que induce la unión de Ca²⁺ y del IP₃ al receptor (Hamada *et al.*, 2003). La combinación de dos técnicas, la de análisis de partículas con la de criomicroscopía electrónica se muestra el sitio de unión del IP₃ en la porción citoplasmática de la proteína en una región cercana a la zona transmembranal de la proteína (Serysheva *et al.*, 2003). Sin embargo, otro grupo ha reportado que la estructura del receptor a IP₃ es diferente a la del RyR (Jiang *et al.*, 2002) (Ver Figura 7). También se han reportado estructuras cristalográficas parciales de los dominios de unión a IP₃ (Bosanac *et al.*, 2002) y del dominio supresor (Bosanac *et al.*, 2005). A pesar de la gran cantidad de información que existe acerca de la estructura tridimensional del IP₃R I, aun se desconoce la estructura tridimensional de las otras dos isoformas.

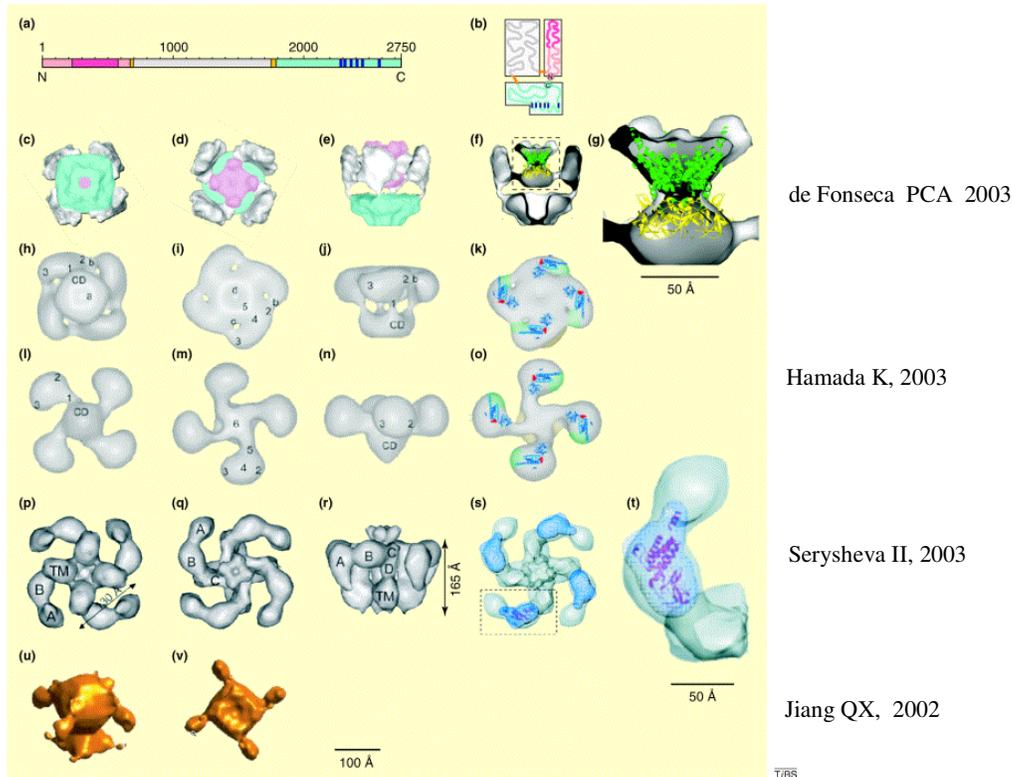


Figura 6: Estructura tridimensional del IP₃R.

En (a) se muestra la estructura lineal del receptor, el extremo amino Terminal (en rosa), el dominio regulador (gris), la región transmembranal y carboxilo terminal (verde) y los pases transmembranales (azul). En (c) hasta (v), las imágenes obtenidas por diferentes métodos de la estructura tridimensional de receptor, reportado por varios grupos. Imagen tomada de Da Fonseca *et al.*, 2003.

ISOFORMAS

IP₃R I

La isoforma del IP₃R I es el prototipo de la familia de receptores a IP₃. Esta isoforma fue inicialmente localizada en el cerebelo y ha sido la más estudiada. Recientemente, se ha demostrado que la actividad anormal de este receptor está involucrado con enfermedades neurodegenerativas (Banerjee *et al.*, 2005). En humanos se ha reportado la presencia del receptor en oviducto/útero (2695 aa), en células T (2713 aa) y en cerebelo (2743 aa). En cerebelo de ratón y cerebro de rata (2749 aa) también se ha demostrado la presencia de esta proteína (Patel *et al.*, 1999).

El IP₃R I tiene una afinidad por IP₃ de 200 nM (EC₅₀), una alta afinidad por Ca²⁺ y por ATP. El canal es inactivo a bajas concentraciones de Ca²⁺ (10⁻⁷M) con una probabilidad

de apertura muy baja (menor a 0.1 %). La probabilidad de apertura de canal aumenta (0.5%) a medida que las concentraciones Ca^{2+} alcanzan un valor de 10^{-6} M. Mientras que a concentraciones mayores de Ca^{2+} (10^{-6} M) la probabilidad disminuye nuevamente (Ramos-Franco *et al.*, 1998).

IP₃R II

La isoforma IP₃R II ha sido descrita en miocitos cardiacos ventriculares de rata y hurón (Pérez *et al.*, 1997) y ratón (García *et al.*, 2004). Se ha especulado que esta isoforma está involucrada en mantener la tensión diastólica y modular la contracción en respuesta a drogas y hormonas (Sharovsky *et al.*, 2002). Esta proteína contiene 2701 aminoácidos en humanos, rata (Patel *et al.*, 1999) y ratón (Iwai *et al.*, 2005). Esta isoforma tiene una muy alta afinidad por IP₃ (EC₅₀ de 60 nM). La probabilidad de apertura del canal aumenta hasta 0.7 % cuando la concentración de Ca^{2+} es de 10^{-7} M. Este receptor no se inactiva a concentraciones altas de Ca^{2+} (μM) (Ramos Franco *et al.*, 1998).

IP₃R III

La isoforma III del receptor a IP₃, es la proteína menos estudiada de esta familia de receptores. En fechas recientes ha atraído la atención porque se ha implicado en la generación de ondas globales de Ca^{2+} (O'Neill *et al.*, 2002). Este receptor es una proteína de 2670 aa en rata y de 2761 aa en humano (Bezprozvanny, 2005), y recientemente ha sido clonado de ratón (Iwai *et al.*, 2005).

La afinidad de este receptor es 10 veces menor a lo reportado para la isoforma I, lo cual la convierte en el menos sensible a IP₃. Además, a concentraciones altas de Ca^{2+} no muestra inhibición como lo muestra la isoforma I (Hagar *et al.*, 1998).

Las tres isoformas de receptor son diferencialmente expresadas en varios tejidos, con diferentes localizaciones subcelulares, y en estados específicos del desarrollo. Se han encontrado distribuidas las tres isoformas en diferentes tejidos y tipos celulares como en el riñón (Monkawa *et al.*, 1998), en islotes pancreáticos (Lee *et al.*, 2001) en células B DT40 (Sugawara *et al.*, 1997) y en músculo liso se identificó el RNAm de los tres tipos (Morgan *et al.*, 1996) Además, son reguladas por diversas proteínas, aunado a esto las tres proteínas muestran diferencias en su sensibilidad a IP₃ y Ca^{2+} . El esquema no es lo suficientemente claro y se requiere de mucho tiempo para comprender su importancia funcional como integradores de señales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En todas las especies de mamíferos analizadas, el ovocito que es removido del ambiente folicular madura. Esto sugiere que factores que se encuentran dentro del folículo previenen la maduración del ovocito. Entre los factores que afectan al proceso de maduración sobresalen las células de la granulosa. Estas células interactúan físicamente con el ovocito manteniendo el arresto meiótico, indicando que la comunicación intercelular entre ambas células es indispensable. Esta comunicación se lleva a cabo debido a la presencia de uniones comunicantes entre los dos tipos celulares (gap-junctions) (Conti *et al.*, 2002). El grupo de Tsafirri en 1994, encontró que la comunicación entre las células somáticas y el ovocito no es necesaria, debido a que el líquido folicular inhibe el reinicio de la meiosis. De estas observaciones se ha postulado la hipótesis de la existencia del inhibidor meiótico del ovocito, el cual es producido por las células de la granulosa. Varios candidatos se han propuesto para llevar a cabo esta actividad inhibidora, sin embargo aun es desconocida la identidad de tal agente. A la fecha, el grupo de Tsafirri ha propuesto que esta molécula es un péptido de 2000 Da, Eppig en 1985 propuso que la hipoxantina cumple completamente con las características del inhibidor. Finalmente, Granot en 1998, propuso que la otra molécula es el AMPc, el cual puede ser producido o transferido al ovocito a través de uniones comunicantes (“gap-junctions”), y puede funcionar como la señal inhibidora producida por las células de la granulosa (Conti *et al.*, 2002).

La hormona LH activa a un receptor miembro de la superfamilia de GPCR. La unión de la LH a su receptor produce la activación de la adenilato ciclasa y el aumento en los niveles de AMPc, además, en algunos casos se ha propuesto que desencadena la producción de IP₃. Existen dos modelos para inducir la maduración del folículo: el primero involucra al AMPc, el cual es capaz de reestablecer la meiosis del ovocito, sin embargo, a pesar de ser un modulador positivo de este proceso su papel no ha sido bien determinado. En el segundo modelo se propone al Ca²⁺, se plantea que los transitorios de Ca²⁺ generados en la granulosa pueden difundir hasta el ovocito. En experimentos libres de Ca²⁺ la adición de LH no produjo transitorios de Ca²⁺. Estos datos sugieren fuertemente que las oscilaciones de Ca²⁺ generadas en la granulosa desempeñan un papel fundamental en la maduración del folículo (Webb *et al.*, 2002).

La comunicación bidireccional que se establece entre el ovocito y las células de la granulosa es esencial para el desarrollo y la función de ambos tipos celulares. Una comunicación coordinada es importante para el desarrollo del folículo (Eppig, 2001). Sin embargo, las células de la granulosa también establecen un contacto muy estrecho entre ellas, mediado por uniones tipo gap-junctions (hemicanales, constituidos por la unión de varias conexinas). Estas conexiones entre células desempeñan funciones de gran relevancia en la regulación de reacciones como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (Ngezahayo *et al.*, 2005). A través del poro de estas proteínas las células pueden intercambiar metabolitos y segundos mensajeros, con un peso molecular de 1000 Da, entre las que se incluyen AMPc, Ca^{2+} e IP_3 (Webb *et al.*, 2002).

Entre los segundos mensajeros descritos con anterioridad, el IP_3 es de especial interés para nuestro sistema experimental. Existen reportes donde se ha demostrado la expresión de más de una isoforma del receptor IP_3 en algunas líneas celulares y sistemas neuronales. La diversidad de proteínas involucradas con la dinámica de Ca^{2+} intracelular permite modular específicamente y temporalmente la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a una amplia diversidad de estímulos a los que están sujetos las células. Esta regulación permite controlar procesos celulares entre los que se incluyen el control de la expresión de genes, el metabolismo, el progreso del ciclo celular, la proliferación celular y la apoptosis.

Nuestro modelo de estudio, las CG, se ha demostrado que reciben información del líquido folicular, de las mismas granulosas y del ovocito. Esta información es descifrada por receptores membranales, y la información es transmitida a proteínas efectoras que activan cascadas de transducción señales, algunas de estas provocan la producción de IP_3 y culminan con la liberación de Ca^{2+} de pozas intracelulares.

HIPÓTESIS

Las células de la granulosa expresan más de una isoforma del receptor a IP₃ para dar respuesta a una amplia diversidad de estímulos que permitan modular la concentración intracelular de Ca²⁺.

OBJETIVO PRINCIPAL

Demostrar la presencia y distribución de las diferentes isoformas del receptor a IP₃ en cultivos primarios de células de la granulosa provenientes de folículos ováricos. Así como su funcionalidad.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar la presencia y caracterizar la distribución de las isoformas del receptor a IP₃ en cultivos primarios de células de la granulosa por medio de técnica inmunocitoquímica.
- Identificar la presencia y caracterizar la distribución de las isoformas del receptor a IP₃ en rebanadas de ovario de ratón por medio de técnica inmunohistoquímica.
- Determinar la respuesta de los receptores a IP₃ través de la estimulación purinérgica (ATP).

MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVOS

Medio Leibowitz (L-15), α -medio esencial mínimo (α -MEM, adicionado con: L-glutamina, ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos, sin bicarbonato de sodio), apotransferrina, penicilina, estreptomina, suero fetal de bovino (FBS) provenientes de GIBCO. Hormona folículo estimulante (FSH) de Calbiochem. BODIPY heparina, FL-Heparina (Hep-FITC), TO-PRO 1 iodide y Fura-2 AM de Molecular Probes. Anticuerpos primarios IP₃R I, IP₃R II e IP₃R III IgG policlonales levantado en cabra y anticuerpo secundario anti-cabra IgG acoplado a Rojo Texas levantado en conejo Santa Cruz Biotechnology. Dimetil sulfóxido (DMSO), piruvato de sodio, insulina bovina, D-glucosa, poli-D-lisina NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂HPO₄, NaHCO₃, NaOH, N-[2-hidroxi-etil]-piperazina-N'-[2-acido etanosulfónico] (HEPES), albúmina de suero bovino (BSA), ácido plurónico, ATP, EGTA, de SIGMA. Gelatina de Baker. Paraformaldehido de Mallinckrodt Baker. Glutaraldehido solución al 50% de Electron Microscopy Sciences.

MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

MEDIO L-15

El medio L-15, se diluyó en 900 mL de agua bidestilada estéril, se ajustó el pH a 7.2 con NaOH y se filtro en condiciones estériles. Posteriormente fue complementado con 5% de FBS, 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomina.

MEDIO α -MEM

El medio α -MEM se diluyó en 900 mL de agua bidestilada estéril, se adicionó a la solución 4 mM de glucosa y 4 mM de NaHCO₃. Posteriormente se ajustó el pH a 7.2 con NaOH y se filtro en condiciones estériles. El medio fue complementado con 10% de suero fetal de bovino (FBS), 100 ng/mL de FSH, 1mM de piruvato de sodio, 10 μ g/mL insulina de bovino, 10 μ g/mL de apotransferrina, 100 U/mL penicilina, 100 μ g/mL estreptomina.

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS (PBS)

El amortiguador de fosfatos tiene la siguiente composición: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, el pH de esta solución se ajustó a 7.4 con NaOH.

PARAFORMALDEHÍDO AL 4% EN PBS.

Se diluyeron 4g de paraformaldehído (PFA) en 80 mL de PBS, se ajustó el pH de la solución a 7.4 y se aforó a 100 mL.

SOLUCION DE KREBS (KS)

KS fue utilizada para la determinación de Ca²⁺. Contiene las siguientes sales en concentración mM: 150 NaCl, 1 KCl, 1 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 4 Glucosa, 10 HEPES, y 0.1 % de albúmina de suero bovino; se ajustó a 7.4 el pH con NaOH. En la solución libre de Ca²⁺ el CaCl₂ fue sustituido con 4 mM MgCl₂, y 4mM EGTA fue incluido como se reporta previamente por Martínez-Francois *et al*, 2002.

GELATINA 0.25 % CROMOALBÚMINA 0.025 %

Se hidrataron 2g de gelatina en 100 mL de agua destilada. Se pesó 0.2 g de cromoalbúmina y se disolvió en 140 mL de agua destilada (40-60°C). Ambas soluciones se mezclaron con 160 mL de etanol absoluto.

TRATAMIENTO DE PORTA OBJETOS CON POLI-D-LISINA

El tratamiento de los portaobjetos con poli-D-lisina tiene como objetivo anclar a las células a un soporte sólido. Esta unión se establece porque el compuesto posee una carga positiva, de tal manera que atrae a la membrana celular proporcionando el soporte requerido.

Los portaobjetos se trataron siguiendo el protocolo descrito a continuación: se realizaron dos lavados con etanol al 70% por 15 min, inmediatamente se efectuaron dos lavados con agua estéril por 15 min, para eliminar el exceso de etanol. Posteriormente se incubaron dos horas con poli-D-Lisina y finalmente se realizaron dos lavados con agua destilada para eliminar el exceso de poli-D-Lisina.

GELATINIZACIÓN DE PORTAOBJETOS.

Los portaobjetos previamente lavados con etanol absoluto fueron colocados en una canastilla y sumergidos en la solución de gelatina 0.25 %- cromoalbúmina por 3 min en agitación constante, se dejaron a secar por 24 horas. Este proceso se repitió en dos ocasiones.

PREPARACIÓN DE REBANADAS DE OVARIO Y CULTIVO CELULAR

Todos los experimentos reportados en este trabajo se realizaron con ratones hembra de la cepa C57B entre 2-3 meses de edad en diferentes estados del ciclo estral. La técnica para obtener rebanadas de ovario y el cultivo celular primario se describen a continuación:

REBANADAS DE OVARIO. Los ratones hembra se anestesiaron con cloroformo, a continuación se realizó una punción cardiaca, se perfundió con PBS para eliminar los restos de sangre. Posteriormente el tejido se fijo con PFA al 4% en PBS. El siguiente paso fue realizar un corte a la altura del abdomen para localizar a los ovarios y extraerlos de la cavidad abdominal. Inmediatamente, los ovarios se limpiaron para eliminar grasa y el exceso de tejido conectivo adyacente. Rápidamente se colocaron en PFA al 4% en PBS por 4 horas a temperatura ambiente. A continuación se incubaron 12 horas en solución de PBS con 30% de sacarosa a 4°C. Al día siguiente, se colocaron en medio Jun Tissue freezing y se congelaron a -20°C hasta su uso. Las muestras se seccionaron en cortes secuenciales de 8-10µm en un criostato. Los cortes se recolectaron en portaobjetos previamente tratados con gelatina 0.25 % cromoalúmina 0.025 %. Estos cortes fueron almacenados a -80°C.

CULTIVO CELULAR

Los ratones hembra se sacrificaron por dislocación cervical, los ovarios fueron aislados y colocados en medio L-15 (complementado como se mencionó anteriormente). El tejido conectivo y la grasa adyacentes se retiraron rápidamente utilizando pinzas (con punta muy fina), bajo un microscopio estereoscópico (Leica ZOOM 2000). Posteriormente se localizaron los folículos antrales, se aislaron del ovario y se transfirieron a medio α -MEM (complementado como ya se describió en la sección de

medios y soluciones). Las CG fueron disgregadas mecánicamente y se transfirieron a portaobjetos previamente tratados con poli-D-Lisina. Las CG fueron cultivadas en medio α -MEM en presencia del 5% de CO₂ a 37 °C durante 24 a 48 h.

INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOCITOQUÍMICA

Ambas técnicas se basan en un mismo principio, la aplicación de un anticuerpo primario (a tejidos y/o células). Los anticuerpos son moléculas proteicas solubles (inmunoglobulinas): Están constituidos por cuatro cadenas polipeptídicas (dos pesadas y dos ligeras). En cada cadena se distinguen una región variable (V) en el extremo NH₂-terminal y otra constante (C) en el extremo COOH-terminal. La región V se unirá al antígeno (fragmento o región Fab) y la C a los receptores de inmunoglobulinas de las células y al complemento (fragmento o región Fc).

En esta técnica el anticuerpo primario reconoce un epítoto, región del antígeno (IP₃R, localizado en el tejido y/o en la célula). Posteriormente se aplica un anticuerpo secundario, el cual reconocerá al anticuerpo primario en su región Fc. El anticuerpo secundario contiene un marcador que facilita su observación (Figura 7).

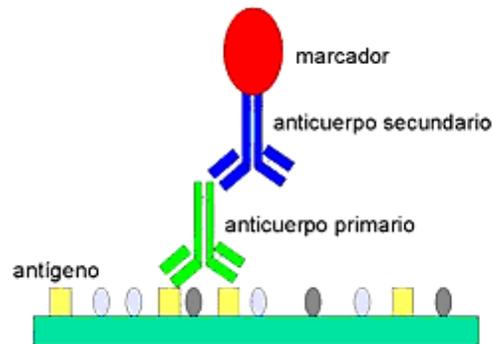


Figura 7. En amarillo se encuentra representado el receptor a IP₃R, en verde se representa a el anticuerpo dirigido al carboxilo terminal del IP₃R (anticuerpo primario), en azul se representa al anticuerpo dirigido contra el anticuerpo primario (anticuerpo secundario) asociado con el fluoróforo

Para identificar la presencia de las isoformas del receptor a IP₃ en CG y en rebanadas de ovario, las muestras fueron tratadas con anticuerpos policlonales obtenidos de Santa

Cruz Biotechnology. Para las rebanadas seguimos el siguiente protocolo: a) los tejidos congelados se dejaron una hora a temperatura ambiente (TA). Después se fijaron con PFA 4% en PBS por 7 min y se realizaron 2 lavados con PBS de 3 min cada uno. b) En el caso de células en cultivo: las muestras se lavaron tres veces con PBS por 1 min para eliminar el medio de cultivo. Posteriormente se fijaron con una solución de glutaraldehído al 4% en PBS por 10 min a 40 °C. Después del proceso de fijación, se realizaron 3 lavados con PBS por 3 min. Posterior al proceso de fijación las rebanadas y las CG fueron tratadas con el protocolo descrito por Rosado et al., 2000 y que a continuación se detallará:

Las muestras se incubaron 1 hr en presencia de PBS: Leche (baja en grasas) al 4%, a TA. Para bloquear los grupos reactivos presentes en la muestra que pudieran originar interacciones inespecíficas entre antígeno y el anticuerpo. A continuación se realizaron 3 lavados con PBS de 3 min cada uno para eliminar el exceso de proteína de la leche. Los anticuerpos fueron diluidos en PBS: leche 4 % en una relación ión 1:100. En seguida, se incubaron en cámara húmeda a 4°C por 17 h, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS tres veces por 3 min para eliminar el anticuerpo no unido. Inmediatamente, las muestras se pusieron en contacto con el anticuerpo secundario PBS: leche 4 % en una relación ión 1:100 por 1 h a TA. Al finalizar las muestras se lavaron 3 veces con PBS por 3 min. Por último, se agregó 20 µl de DAPCO (para prevenir la pérdida de fluorescencia), se colocó el cubreobjetos y al finalizar se protegió la muestra sellándola con barniz.

MARCAJE CON SONDAS FLUORESCENTES

Posterior al proceso de fijación las células fueron tratadas con los marcadores fluorescentes que a continuación se mencionan: 2 µM Hep-FITC (494 nm Ex/ 518 Em), un marcador genérico de los IP₃Rs (Morales-Tlalpan *et al.*, 2005), anticuerpo secundario acoplado a Rojo Texas (TX-Red) (596 nm Ex/ 615 nm Em) y 50 nM TO-PRO iodide (515 nm Ex/ 531 Em) como marcador de núcleo.

Las células se incubaron con las sondas fluorescentes (diluidas en PBS), a la concentración mencionada en el párrafo anterior, por un periodo de 60-90 min a TA. Al término se lavaron con PBS 3 veces por 5 min cada vez. Para determinar la unión no específica de Hep-FITC, las muestras fueron incubadas previamente con 100 µM heparina (Morales-Tlalpan *et al.*, 2005).

MEDICIÓN DE $[Ca^{2+}]_i$

Para determinar el cambio en la concentración de Ca^{2+} intracelular utilizamos un indicador fluorescente llamado, Fura-2 acetoximetil ester (Fura-2 AM). Este fluoróforo es muy utilizado por diversas ventajas. Es permeable a la membrana, une Ca^{2+} con gran afinidad, la constante de asociación (K_d) oscila entre 150-250 nM. La longitud de onda de excitación se alterna entre 340/380 nm y la emisión se registra a 510 nm. Para que el indicador ingrese al interior celular, las células se incubaron con Fura-2AM (5 μ M) en KS (con 0.05% BSA y ácido plurónico al 0.01%) por 30-45 min. Posteriormente se realizaron lavados con KS libre de Fura2-AM, para remover el indicador fluorescente. Las células se colocaron en un aditamento especialmente diseñado para medir células adheridas a vidrio. La movilización de Ca^{2+} intracelular se determinó en el espectrofluorómetro SLM Aminco Bowman Series 2. La onda de excitación de 340 nm (indicador unido a Ca^{2+}) y 380 nm (indicador libre de Ca^{2+}) nm se alterno cada 2 s y el radio (R) de la fluorescencia emitida fue registrada a 510 nm. Las sustancias utilizadas para movilizar el Ca^{2+} intracelular fueron disueltas en KS y aplicadas con un sistema de perfusión (~1mL/min) a través de micropipetas independientes y con agitación constante.

CAPTURA DE IMÁGENES

Para capturar las imágenes utilizamos como reporteros a sondas fluorescentes; el principio de este método se discute enseguida. La fluorescencia es una herramienta que permite comparar la señal fluorescente proveniente de una muestra. Se han utilizado diferentes técnicas y microscopios para observar señales fluorescentes. La microscopia epifluorescente, permite la detección *in situ* de moléculas conjugadas con fluoróforos excitables con luz UV, verde y naranja-rojo. Sin embargo, la relación señal/ruido es muy alta, debido a que capta la fluorescencia de todo el campo. Este tipo de fenómenos dificulta el procesamiento de imágenes. Otra técnica que permite eliminar con mayor eficacia la relación señal/ruido es la microscopia confocal. Esta microscopia, al igual que la epifluorescente, permite el estudio de muestras fluorescentes. Una de las características más distintivas de esta técnica es que permite hacer secciones ópticas de la preparación. Cada una de estas secciones es expuesta a una energía de excitación, punto a punto por medio de un láser. La longitud de onda emitida pasa por un diafragma

(pinhole), lo cual permite que se detecte la luz de un solo plano focal. Con esta técnica es posible reconstruir tridimensionalmente las muestras.

RESULTADOS

DETECCION DEL RECEPTOR A IP₃.

Para determinar la presencia de los IP₃R en las CG, utilizamos heparina. La heparina es un glucosaminglucano sulfatado que tiene una masa molecular de 6 kDa. Es un antagonista competitivo del IP₃ con una K_i de 2.7 nM (Ghosh *et al.*, 1988). El sitio de unión de IP₃ y de heparina se ha reportado que se encuentra en la región amino terminal del receptor, ésta es una región altamente conservada entre las tres isoformas (Bezprozvanny, *et al.*, 2005). La heparina ha sido utilizada para estudiar al IP₃R y la dinámica de Ca²⁺ intracelular en células permeabilizadas como plaquetas (Authi *et al.*, 1993), ovocitos de *Xenopus* (Parys *et al.*, 1992), además de microsomas de hígado de rata (Tones *et al.*, 1989). Tomando en cuenta estas consideraciones, decidimos utilizar una heparina modificada, acoplada a isotiocianato de fluoresceína (Hep-FITC) para determinar la presencia de los receptores.

Cultivos de CG se fijaron en glutaraldehído, se permeabilizaron y se incubaron con Hep-FITC por 1 h. Posteriormente el exceso de Hep-FITC se retiró lavando con PBS. Con esta molécula utilizada como reportero, encontramos una señal intensa fluorescente, ver Figura 8-1A. Para determinar la especificidad de este marcaje decidimos preincubar a las células con altas concentraciones (10 mg/mL) de heparina no marcada para desplazar la señal de la heparina fluorescente, en la Figura 8-1B se observó una disminución significativa en la señal fluorescente. En la Figura 8-1C, se presenta la gráfica obtenida a partir del análisis de varios experimentos similares (n=3), en los que se comparan las diferencias entre los dos tratamientos. Como se puede observar estos experimentos muestran que el marcaje obtenido con Hep-FITC es específico, debido a que la incubación previa con heparina provocó una pérdida de la señal.

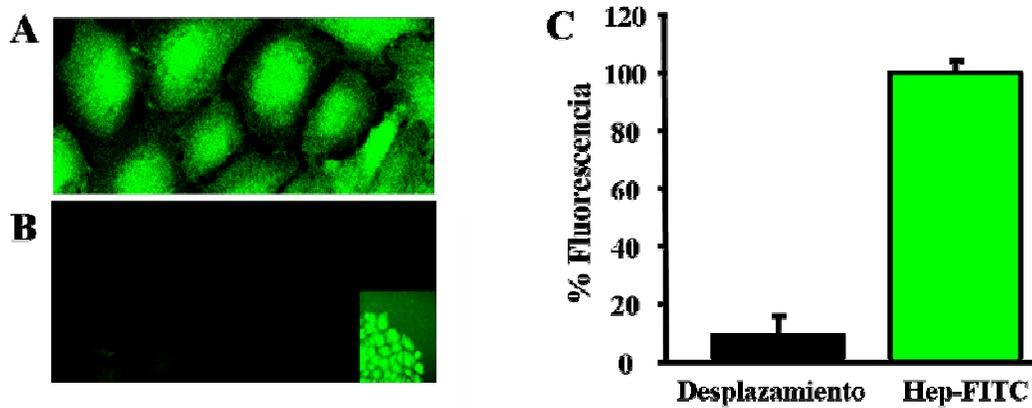


Figura 8-1. Localización de IP₃R en cultivos primarios de CG. Imágenes de confocal de células de la granulosa. **A**, se observa la señal fluorescente emitida por Hep-FITC indicando la presencia de IP₃R en células de la granulosa. **B**, la señal se desplaza al incubar con heparina (10mg/mL). Se duplicó el porcentaje de la potencia del láser para evidenciar la presencia de células de la granulosa en el campo. **C**, los datos se analizaron estadísticamente encontrando una diferencia altamente significativa ($p < 0.05$),

Al analizar estos experimentos encontramos que la señal mayoritaria proviene del núcleo. Para determinar el porcentaje de la señal obtenida en esta zona y en el citoplasma decidimos, cuantificar la fluorescencia de estas zonas y lo comparamos con la fluorescencia total. Para realizar la grafica 8-2D, la fluorescencia total se tomo como 100% y posteriormente a la señal obtenida en estas zonas se le restó la señal obtenida en el citoplasma alcanzando esta última un $30\% \pm 2$ y en el núcleo un $70\% \pm 3$. El análisis estadístico corroboró una diferencia significativa entre el control y la muestra ($p < 0.05$). Ver la Figura 8-2D. Tomando en consideración esta observación, decidimos utilizar TO-PRO 1 iodide, una molécula fluorescente que reconoce al DNA y que se ha utilizado ampliamente para marcar núcleos. Las imágenes obtenidas con este fluoróforo se muestran en la Figura 8-2E. Los resultados obtenidos muestran que probablemente la señal de la heparina colocaliza con la señal generada por TO-PRO 1. Lo que sugiere que los receptores a IP₃ se localizan tanto en el núcleo, como en el citoplasma.

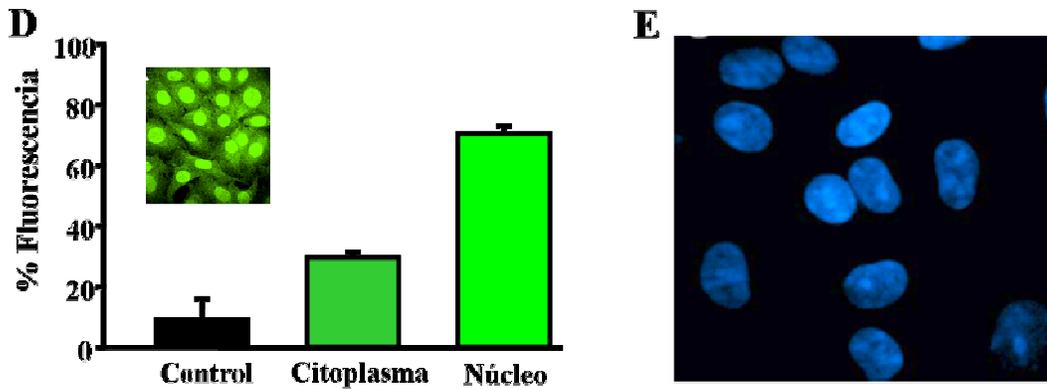


Figura 8-2. El porcentaje de fluorescencia emitida por el control, citoplasma y núcleo se muestran graficado en **D**. Se utilizó TO-PRO 1 para marcar los núcleos de las células de la granulosa, las imágenes de confocal se muestran en **E**.

Con este tipo de ensayos de desplazamiento identificamos la presencia de IP₃R en células de la granulosa, sin embargo esta metodología no permite identificar el tipo de isoforma localizada.

IDENTIFICACION DE LAS ISOFORMAS DE IP₃R EN LAS CG

Para identificar las isoformas presentes en las células de la granulosa utilizamos la técnica de inmunocitoquímica. En este caso, los anticuerpos primarios que se emplearon reconocen a la región carboxilo terminal de cada una de las isoformas de los IP₃Rs (anti-IP₃R). Como reportero, usamos un anticuerpo secundario acoplado a Rojo Texas (TX-red), el cual reconoce la región Fc del anti-IP₃R. La captura de las imágenes se realizó en el microscopio confocal.

Las imágenes obtenidas, empleando TX-red como reportero, nos mostraron una señal distribuida heterogéneamente en las CG para las tres isoformas de IP₃R, Figura 9A. En los ensayos realizados para la identificación de la isoforma I, la fluorescencia emitida en el citoplasma muestra un patrón de distribución reticular y la intensidad de la fluorescencia fue de 34%, para la isoforma II fue de 19%, y para la isoforma III de 47%, ambas con un patrón de distribución similar al de la isoforma I. Los datos presentan una diferencia significativa con respecto al control y entre isoformas ($p < 0.05$), ver la Figura 9B. Estos datos indican que las tres isoformas se encuentran presentes en los cultivos

primarios de CG. Sin embargo difieren en su localización, ya que la marca correspondiente a la isoforma III se encuentra en el citoplasma, la isoforma II se distribuye en el área perinuclear y la isoforma I presenta una distribución intermedia entre las dos anteriores, ver Figura 9A.

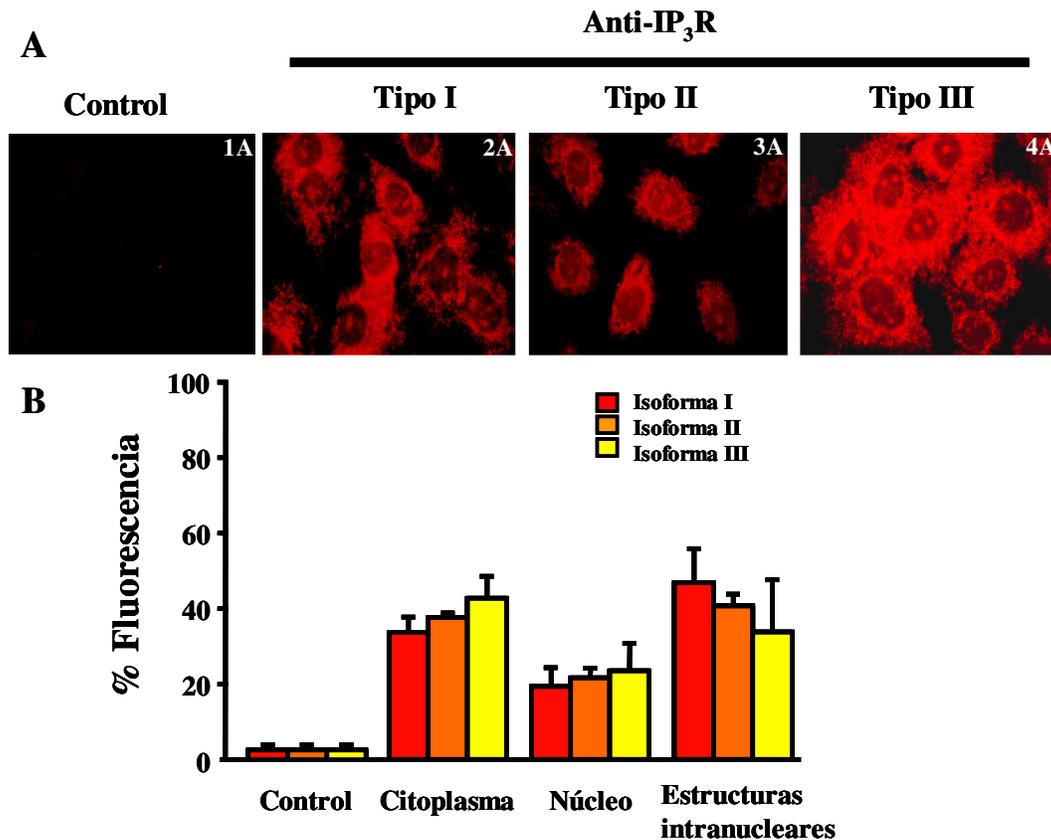


Figura 9. Immunolocalización de las isoformas tipo I, tipo II y tipo III de IP₃R en cultivos primarios de CG. En el panel A se muestran imágenes de confocal. La fluorescencia inespecífica observada en color gris en el control se muestra en 1A, la señal emitida por las isoformas tipo I, II y III se indican en 2A, 3A y 4A respectivamente en color rojo. La intensidad de la fluorescencia de las diferentes regiones celulares es comparada en la gráfica B. Los datos se normalizaron tomando como unidad el control.

Para demostrar la presencia de las diferentes isoformas del IP₃R en el núcleo, decidimos cuantificar la fluorescencia emitida para cada uno de los anticuerpos. Encontramos para la isoforma I una señal del $37\% \pm 1.2$, para la isoforma II de $22\% \pm 2.6$ y para la isoforma III de $41\% \pm 3$. Así mismo, se observa dentro de esta estructura una señal

puntual para la isoforma I de $34\% \pm 4\%$, para la isoforma II de $23\% \pm 2\%$ y para la isoforma III de $43\% \pm 1\%$, ver Figura 9B

MOVILIZACIÓN DE Ca^{2+} EN LAS CG

Con el fin de determinar la presencia funcional de los receptores a IP_3 en las CG, decidimos medir la movilización de Ca^{2+} utilizando como agonista ATP. El ATP promueve la elevación de Ca^{2+} , debido a la activación de receptores acoplados a proteínas G, y la producción de IP_3 . La unión de IP_3 a su receptor provoca que la concentración de Ca^{2+} intracelular incremente (Morales-Tlalpan *et al.*, 2005).

Realizamos curvas dosis-respuesta al ATP para estudiar la movilización de Ca^{2+} intracelular. El ATP es utilizado como una herramienta farmacológica que nos permite mostrar la producción de IP_3 y la consecuente liberación de Ca^{2+} a través de la activación de los IP_3R en nuestro sistema. En la Figura 10 se muestra un ejemplo representativo de una serie de curvas dosis-respuesta a ATP en CG. El eje X representa el tiempo en min y en el eje Y se muestra el nivel de fluorescencia arbitraria (cociente entre 340/510 y 380/510). Las líneas sólidas muestran la duración del pulso (60 seg) y la concentración de ATP (μM). Después de cada estímulo las células se perfundieron con KS para eliminar el agonista previamente aplicado y esperamos 12-15 min antes de aplicar otro estímulo. Al inicio del experimento, las células no mostraron oscilaciones considerables en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que indique un mal funcionamiento celular. Al ser estimuladas con bajas concentraciones de ATP (0.1 a 1 μM), no se observó cambio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Concentraciones mayores de 10 μM y hasta 200 μM de ATP provocaron una elevación en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transitoria. Después de retirar el ATP el nivel de la fluorescencia regresó al nivel basal indicando que la integridad celular no está comprometida. Con altas concentraciones de ATP desde 50 y hasta 200 μM se obtuvo la respuesta máxima. El análisis de las curvas dosis-respuesta muestran una $\text{EC}_{50} = 6.4 \pm 1.9 \mu\text{M}$.

Estos resultados demuestran que las CG responden a ATP, provocando la producción de IP_3 , el cual a su vez induce el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La magnitud de la respuesta es dosis-dependiente, es decir, concentraciones por debajo de 1 μM ATP no producen oscilaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y el cambio máximo en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se obtiene a partir de concentraciones de 50 μM de ATP. Por otra parte, la presencia de ATP es indispensable

para mantener la formación de IP₃ y la elevación de la [Ca²⁺]_i, ya que al retirar el estímulo las células regresan a su nivel basal.

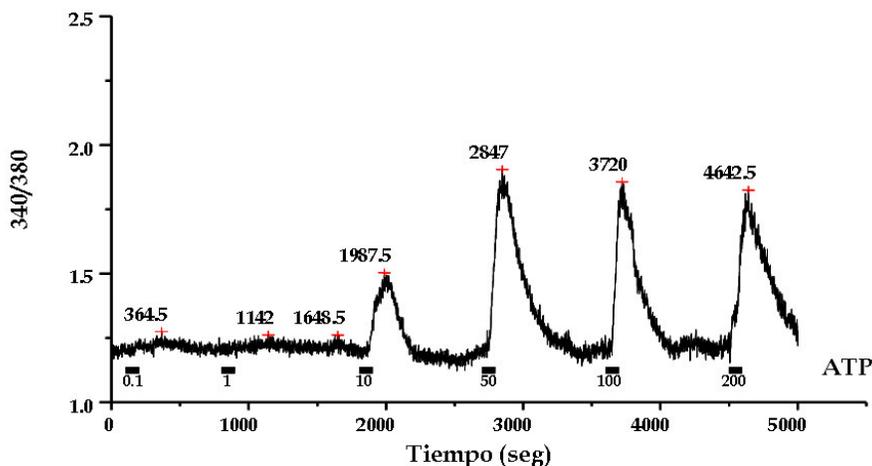


Figura 10 Movilización de Ca²⁺ inducida por ATP. Las células de la granulosa fueron cargadas con Fura-2 AM (5 μM) y estimuladas a diferentes concentraciones de ATP. La Figura es representativa de un total de 10 experimentos

EL AUMENTO EN LA [Ca²⁺]_i PROVIENE DE DEPOSITOS INTRACELULARES.

Con la finalidad de determinar la participación de las pozas intracelulares de Ca²⁺, en respuesta a la producción de IP₃ inducida por la aplicación de ATP, decidimos realizar experimentos en ausencia de Ca²⁺ extracelular. En la Figura 11 se muestra un ejemplo representativo (n=10) de la liberación de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares utilizando diferentes concentraciones de ATP. Los experimentos se realizaron con células que fueron cultivadas y cargadas en condiciones similares a lo descrito en la sección anterior. Los experimentos se iniciaron con la concentración normal de Ca²⁺ (1.8 mM), posteriormente se añadió 4 mM de EGTA, un secuestrador de Ca²⁺, con esta maniobra farmacológica disminuimos la concentración de Ca²⁺ extracelular ([Ca²⁺]_e) (Martinez-Francois *et al.*, 2002). Una vez estabilizado el sistema, la aplicación de 1 μM de ATP produjo una elevación en la [Ca²⁺]_i transitorio y discreto. A medida que incrementamos la concentración de ATP (10 y 50 μM) la liberación aumentó de acuerdo a lo esperado y

regreso al nivel basal después de 2-3 min. Sin embargo, a concentraciones de 100 y 200 μM la respuesta al igual que en las otras condiciones es transitoria pero la liberación de Ca^{2+} disminuyó, debido a que el contenido de Ca^{2+} de las pozas se ha reducido. Mientras que, el nivel basal cambió considerablemente con respecto a los trazos anteriores aunque se recuperó gradualmente después de varios min. Al finalizar el experimento, añadimos 1.8 mM de Ca^{2+} y observamos un aumento en la fluorescencia que indica la entrada de Ca^{2+} , probablemente a través de canales localizados en la membrana plasmática.

Estos datos indican que la presencia de ATP en las CG produce una liberación transitoria de Ca^{2+} que proviene de depósitos internos. Esta liberación es dependiente de la dosis aplicada del agonista y en consecuencia de la cantidad de IP_3 producido.

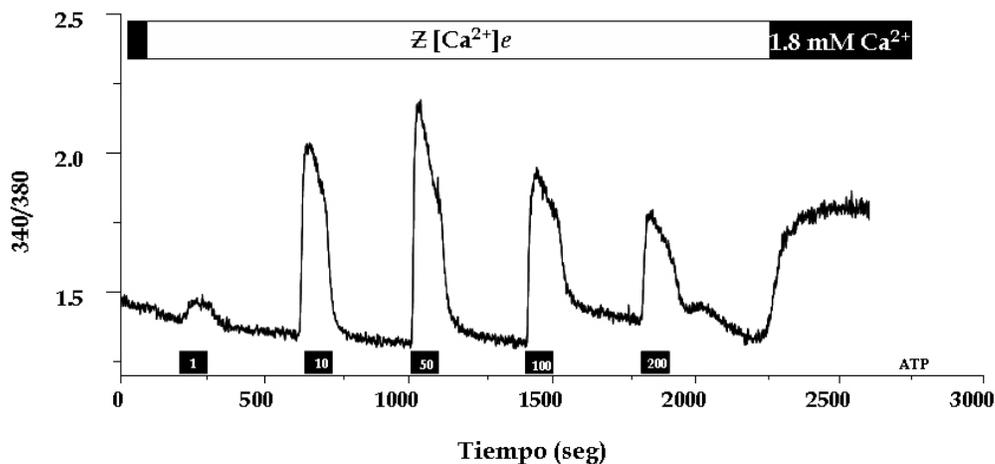


Figura 11. Movilización de Ca^{2+} de los depósitos internos inducida por ATP.

EXPRESIÓN DE IP_3R EN REBANADAS DE OVARIO DE RATÓN

Para determinar la presencia y localización de las isoformas del IP_3R en rebanadas de ovario, decidimos utilizar inmunohistoquímica. Utilizando los anticuerpos descritos en la secciones anteriores.

Las inmunofluorescencias de las rebanadas de ovario obtenidas a 4X se presentan en la Figura 12. Las imágenes son ejemplos representativos de un total de $n=3$. En el panel 12A1, se muestra el experimento control, en el cual las rebanadas se incubaron con TX-red para observar fluorescencia inespecífica. La fluorescencia emitida por el control fue

del 11% con respecto a la fluorescencia total. En el panel 12A2 se muestra un ejemplo representativo de la distribución encontrada para isoforma I. En este caso, la señal observada fue del 44 % \pm 10%, la señal muestra una distribución homogénea a lo largo de la rebanada. Se distinguen estructuras que corresponden a folículos en diferentes estados de maduración: folículos primarios, secundario, preovulatorios, Ver Figura 12B. Las zonas oscuras que se observan en los folículos preovulatorios corresponden al espacio que contiene líquido folicular. Las imágenes obtenidas para la isoforma II, se muestran en la Figura 12A3. Para esta isoforma encontramos que el patrón de distribución es similar al encontrado para la isoforma I, sin embargo la fluorescencia disminuyó a un 35% \pm 9% con respecto a la fluorescencia total. Por último, en la imagen 12A4 se observa el marcaje obtenido para la isoforma tipo III. En este caso el patrón de distribución es equivalente a lo observado para las otras isoformas, sin embargo, la intensidad de la señal disminuyó considerablemente a un 21% \pm 5% con respecto a la fluorescencia total.

En este ensayo identificamos la presencia de las tres isoformas del receptor a IP₃ con un patrón de distribución similar. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia mostró diferencias entre cada una de las isoformas. En la Figura 12C se muestra graficado el análisis de la intensidad de la fluorescencia emitida para cada isoforma en las rebanadas de ovario. Los valores se obtuvieron tomando en cuenta el nivel de fluorescencia del experimento control normalizando los datos del grupo experimental. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con la prueba t. Se encontró diferencia significativa entre el grupo control y el experimental, así como entre isoformas ($p < 0.05$)

Encontramos que el mayor nivel de fluorescencia corresponde a la isoforma I, seguida en orden descendente por la isoforma II y en menor proporción la isoforma III. Este resultado sugiere fuertemente que la abundancia de los receptores a IP₃ en el ovario no es proporcional para cada isoforma, y concuerdan con lo reportado por Fissore *et al*, en 1999 y por Fujino *et al* en 1995.

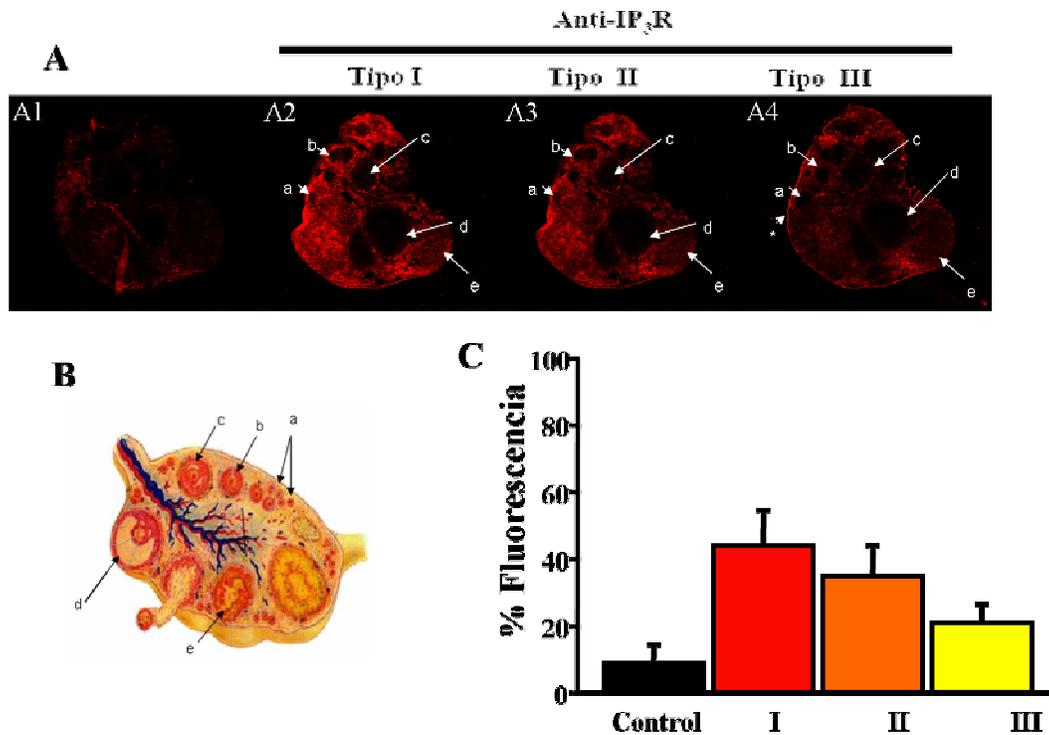


Figura 12. Immunolocalización de las isoformas tipo I, tipo II y tipo III de IP₃R en cortes histológicos de ovario de ratón (4X). La fluorescencia (en gris) indica la presencia de cada isoforma de IP₃R y es mostrada en el panel A. La imagen A1 muestra a la fluorescencia inespecífica emitida por el control. Las imágenes A2, A3 y A4 corresponden a las señales colectadas para, IP₃R I, IP₃R II e IP₃R III respectivamente. Se detectaron estructuras señaladas de la a a la e que por su forma y localización corresponden a folículos en diferentes estados de maduración. Haciendo referencia a B se observan: (a) folículo primordial, (b) folículos primarios, (c) folículo secundario, (d) folículo preovulatorio, (e) cuerpo lúteo. Con un asterisco (*) se indica la localización de la isoforma III en epitelio del ovario. En C, la gráfica es representativa de un total de 3 ensayos, la escala de Y corresponde al tratamiento de normalización de los datos. (p < 0.05)

Para determinar los tipos celulares que inmuno-reaccionan a los anti-IP₃Rs en los folículos, decidimos utilizar un objetivo de 100 X. lo que permitió observar con mayor precisión los diferentes componentes celulares. Con este aumento fue posible distinguir la distribución en la teca y la granulosa, ver Figura 13. La señal en las CG para el control fue de 11% ± 4%, para la isoforma I fue de 27% ± 6%, para la isoforma II la señal fue de 29% ± 9%. La señal correspondiente a la isoforma III fue de 44% ± 11%. Cuando este procedimiento se realizó en las CT se obtuvo una señal de fluorescencia para la isoforma I es de 16% ± 5%, para la isoforma II es de 21% ± 7% y la isoforma III presenta una señal de 63% ± 21%, como se ve en la Figura 13B. Con esta amplificación encontramos que en las CG, la abundancia de las diferentes isoformas del IP₃R no corresponde a lo descrito para el ovario completo. En estas condiciones

encontramos una mayor abundancia para la isoforma III, seguida en orden descendente por la isoforma II y en menor proporción la isoforma I tanto en células de granulosa como en teca. Los datos presentan una diferencia significativa con respecto al control y entre isoformas ($p < 0.05$)

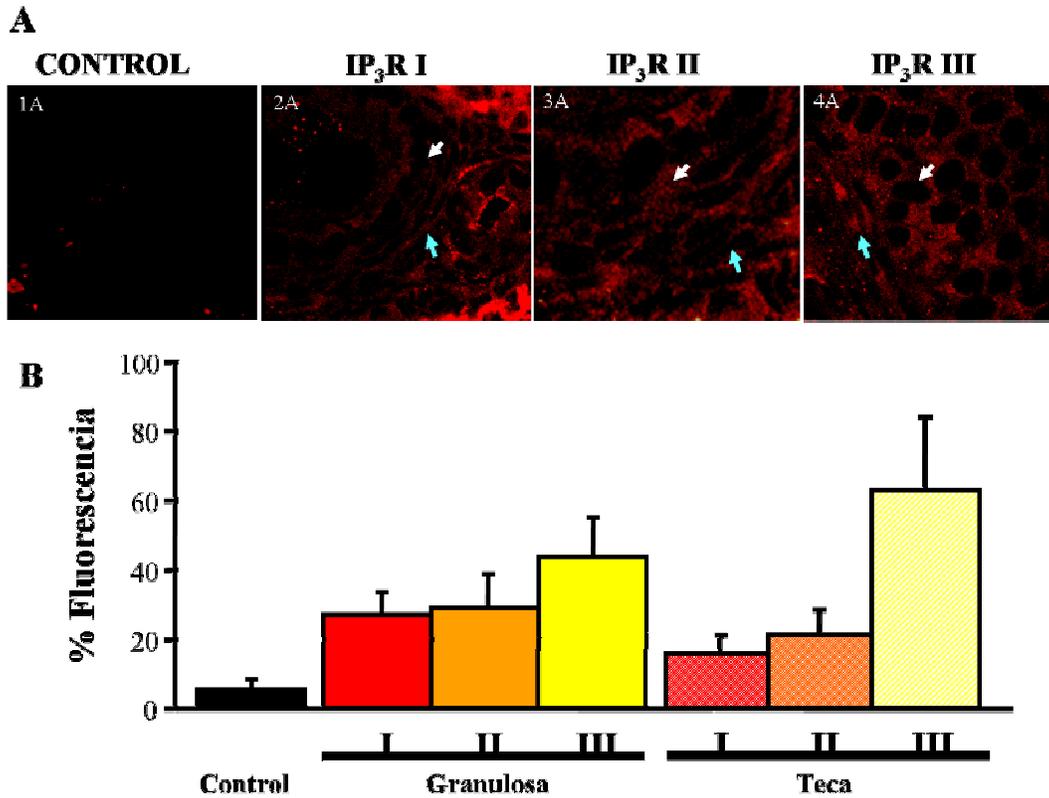


Figura 13 Inmunolocalización de las isoformas tipo I, tipo II y tipo III de IP₃R en cortes histológicos de ovario (100X). La presencia de las tres isoformas y la fluorescencia inespecífica del control se denota en color gris, con las flechas blancas se señalan CG y con flechas grises CT en el panel A. A1 muestra la fluorescencia inespecífica del control. A2, A3 y A4 corresponden a los tipos I, II Y III del receptor respectivamente. Destaca la fluorescencia colectada para isoforma tres tanto en CG como en CT, como se muestra en el panel B ($p < 0.05$)

DISCUSION

Uno de los canales liberadores de Ca^{2+} de pozas intracelulares es el receptor a IP_3 . En los mamíferos, se expresan tres isoformas de este receptor y estudios realizados previamente han reportado que la presencia y la cantidad de una isoforma sobre otra en las células es propia del tipo de tejido (Vermassen *et al.*, 2004), pero también obedece al estado de maduración de la célula (Fissore *et al.*, 1999). Las técnicas inmunohisto y citoquímicas, así como de biología molecular han contribuido a la identificación *in situ* de estas proteínas en diferentes sistemas.

En el ovario, los folículos se encuentran en constante maduración. En este proceso las células de la granulosa reciben información tanto del líquido folicular como del ovocito, algunos de estos mensajes actúan sobre receptores que activan cascadas de transducción y que culminan con la liberación de Ca^{2+} de pozas intracelulares.

En el presente estudio se identificó la presencia del IP_3R en las células de la granulosa, por medio de una heparina modificada (unida a FITC). Con ésta detectamos la presencia de IP_3R en las CG, el marcaje mostró un patrón de distribución reticular. La presencia de IP_3R en los cultivos de las CG se ajusta a lo reportado por Morales-Tlalpan *et al* (2005). Además se observó una acumulación de la señal fluorescente en el núcleo, el cual fue localizado utilizando TO-PRO 1. Con respecto a la ubicación de los receptores en el núcleo, el IP_3R fue previamente descrito por Malviya *et al* (1990) en núcleos aislados de hepatocitos de rata utilizando IP_3 [^{32}P] en la técnica de unión (“binding”) sustrato-receptor.

Nuestros resultados mostraron que el uso de la heparina fluorescente puede ser utilizado como reportero de la presencia del receptor para IP_3 . Sin embargo, esta metodología no permite distinguir el tipo de isoforma presente en el citoplasma o en el núcleo de las células de la granulosa. Para ello se aplicaron técnicas de inmunocitoquímica, las cuales revelaron que las células de la granulosa expresan las tres isoformas del receptor y que la proporción de la expresión de esas isoformas tanto en el citoplasma como en el núcleo es $\text{IP}_3\text{R III} > \text{IP}_3\text{R II} > \text{IP}_3\text{R I}$. Como dato adicional se observó una señal fluorescente puntual en la región intranuclear donde la proporción de las isoformas es $\text{IP}_3\text{R I} > \text{IP}_3\text{R II} > \text{IP}_3\text{R III}$. En células neuroendocrinas y no neuroendocrinas, se ha

demostrado la localización de las isoformas de IP₃R en retículo nucleoplásmico (estructura formada por invaginaciones de la membrana nuclear interna (Echevarria *et al.*, 2003), a través de la técnica de inmunotinción con oro (Varndell *et al.*, 1982)). En este estudio utilizaron anticuerpos policlonales para cada una de la isoformas y la micrografía reveló la presencia de los receptores en el retículo endoplásmico, en los gránulos secretores y en el núcleo (Huh *et al.*, 2003). La presencia de estos receptores en estructuras nucleares coincide con reportes previos de la literatura en otros sistemas (Leite *et al.*, 2003). En células de hígado se ha reportado la presencia del IP₃R en la membrana nuclear interna y externa, se le ha atribuido la movilización de Ca²⁺ que existe en el núcleo (Humbert *et al.*, 1996). También se encuentra publicado la existencia un retículo nucleoplásmico (Huh *et al.*, 2003) y de depósitos de Ca²⁺ en el núcleo, las mitocondrias y citoplasma de las CG de folículos de ovario de cerdo en diferentes estados de maduración (Rozinek *et al.*; 2006), así como toda la maquinaria necesaria para la movilización de Ca²⁺ en el núcleo de otros tipos celulares. Nuestros datos confirman las observaciones previas sugiriendo que la fluorescencia intranuclear observada en nuestro estudio puede corresponder a IP₃R anclado en una matriz membranosa nuclear.

Para determinar la funcionalidad de los receptores a IP₃R presentes en las CG se realizó una curva dosis respuesta a ATP. El análisis de la curva dosis-respuesta muestran una EC₅₀ = 6.4 ± 1.9 μM. Las CG responden a ATP, provocando la producción de IP₃, el cual a su vez induce el aumento de la [Ca²⁺]_i. Por otra parte, la presencia de ATP es indispensable para mantener la producción de IP₃ y la elevación de la [Ca²⁺]_i, ya que al retirar el estímulo las células regresan a su nivel basal. En otro ensayo se estimuló con ATP en ausencia de [Ca²⁺]_e con la finalidad de determinar la participación de las pozas intracelulares. En la curva dosis respuesta se observa una elevación de Ca²⁺ transitoria y discreta. Al aumentar la concentración de ATP (10 y 50 μM) la liberación de Ca²⁺ aumentó de acuerdo a lo esperado y regresó al nivel basal. A las concentraciones 100 y 200 μM la respuesta fue transitoria pero la liberación disminuyó, esto se debe a que las pozas intracelulares se depletaron. Sin embargo al incrementar la concentración de [Ca²⁺]_e se observó un incremento en la fluorescencia, probablemente debida al ingreso de Ca²⁺ a través de canales iónicos. Los resultados de movilización de Ca²⁺ se indican la funcionalidad de los receptores a IP₃R. Sin embargo, no podemos definir la

contribución de cada una de las isoformas, ni tampoco si los receptores localizados en el retículo o en el núcleo son los responsables de la respuesta a ATP.

Estos receptores se han descrito como integradores de señales celulares, es decir se activan por IP_3 , que es generado por diversos estímulos, y responden liberando Ca^{2+} de depósitos intracelulares (Bezprozvanny *et al*, 2005). Asociado a lo extensamente reportado sobre las diferencias entre cada isoforma respecto a su afinidad a IP_3 (Ramos-Franco *et al*, 1998; Miyakawa *et al*, 1999; Hagar *et al*, 2000., Thrower *et al.*, 2001) y también en la sensibilidad a Ca^{2+} (Joseph *et al.*, 2005). El encontrar en una célula las tres isoformas del IP_3R , sugiere fuertemente, que estas células necesitan mantener una fina regulación en la homeostasis de Ca^{2+} . Los cultivos primarios de las células de la granulosa son uno de los sistemas que nos brinda la oportunidad de estudiar las tres isoformas de IP_3R y su papel en la movilización de Ca^{2+} .

Los estudios de inmunofluorescencia efectuados en rebanadas del ovario permitieron identificar las tres isoformas del receptor a IP_3 , su localización y la predominancia en los diversos tipos celulares del tejido. Las tres isoformas se localizaron tanto en el epitelio germinal como en la corteza y la médula, y en los folículos de diferentes estadios de maduración. Las observaciones realizadas con un aumento de 4X, en el objetivo, muestra que la proporción de las isoformas fue $IP_3R\ I > IP_3R\ II > IP_3R\ III$. Sin embargo, si el aumento para la observación cambia a 100X, la proporción cambia a $IP_3R\ III > IP_3R\ II > IP_3R\ I$ específicamente en células de la granulosa y células de la teca, similar a lo observado en cultivos primarios de CG. Estos resultados indican que la proporción de los receptores a IP_3 en el ovario permanece constante al pasar estas células a cultivo (2 a 10 días). En otros sistemas se ha detectado la presencia de las 3 isoformas del IP_3R . En ovarios y ovocitos bovinos se utilizó la técnica de Western blot, y se demostró que la isoforma I la más abundante (He *et al*, 1999), en ovario de cerdo se ha encontrado que el IP_3R tiene una participación importante en la iniciación y propagación de las señales intracelulares de Ca^{2+} durante el desarrollo folicular y por medio de Western blot se determinó la expresión de esta proteína en CG y CT (Steffl *et al.*, 2004).

En este estudio, reportamos la presencia de las tres isoformas en las CG y teca por inmunofluorescencia en folículos de ratón. La relación que guardan los receptores en el

tejido se conserva al pasar las CG a cultivo. Interesantemente estos receptores se expresan en diferentes compartimentos de las CG. Sugiriendo que la participación de los receptores a IP_3R en la homeostasis de Ca^{2+} debe ser fundamental para la comunicación celular entre lo diferentes tipos celulares que forman al folículo y los mecanismos moleculares que permiten su maduración.

CONCLUSIONES

- Las isoformas I, II y III de IP₃R están presentes en citoplasma y núcleo de cultivos primarios de CG.
- Las isoformas de IP₃R no difieren en proporción y localización en cultivos primarios de CG
- Las CG movilizan Ca²⁺ en respuesta a agentes purinérgicos.
- Las isoformas I, II y III de IP₃R están presentes en CG, CT, ovocito, células epiteliales, tejido conectivo del ovario de ratón.

PERSPECTIVAS

- Identificar las isoformas presentes en CG y núcleos aislados de CG por medio de Western-blot.
- Estudiar la movilización de Ca^{2+} en núcleo y citoplasma.
- Identificar la participación de cada una de las isoformas de IP_3R en respuesta a agentes purinérgicos en CG

REFERENCIAS

- Agoston, A.** , Kunz, L. Krieger, A., Mayerhofer, A. Two types of calcium channels in human ovarian endocrine cells: involvement in steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004. 89(9):4503-4512.
- Amireault, P.**, Dubé, F. Intracellular cAMP and calcium signaling by serotonin in mouse cumulus-oocyte complex. *Mol. Pharmacol.* 2005. 68(6): 1678-1687.
- Authi, K. S.**, Bokmala, S., Patel, Y., Kakkar, V. V., Munkonge, F. Ca^{2+} release from platelet intracellular stores by thapsigargin and 2,5-di-(t-butyl)-1,4-benzohydroquinone: relationship to Ca^{2+} pools and relevance in platelet activation. *Biochem. J.* 1993. 294:119-126.
- Banerjee, S.**, Hasan, G. The $InsP_3$ receptor: its role in neuronal physiology and neurodegeneration. *BioEssay.* 2005. 27: 1035-1047.
- Berridge, M. J.** Capacitative calcium entry. *Biochem. J.* 1995. 312: 1-11.
- Berridge, M.J.**, Lipp, P., Bootman, M. Calcium signaling. *Curr. Biol.* 1999. 9(5): R157-R159.
- Berridge, M. J.**, Lipp, P., Bootman, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000. 1(1):11-21.
- Berridge, M.J.**, Bootman, M.D., Roderick, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003. 4(7):517-29.
- Bezprozvanny, I.** The 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium.* 2005. 38:261-272.
- Bockaert, J.**, Pin, J. P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 1999. 18(7):1723-1729.
- Bootman, M.D.**, Berridge, M.J. The elemental principles of calcium signaling. 1995. *Cell.* 83:675-678.
- Bootman, M. D.**, Lipp P, Berridge MJ. The organisation and functions of local Ca^{2+} signals. *J Cell Sci.* 2001 114(Pt 12):2213-22.
- Bosanac, I.** Allatia, J-R., Mal, T. K., Chan, J., Talarico, S., Tong, F. K., Tong, K. I., Yoshikawa, F., Furuchi, T., Iwai, M., Michikawa, T., Mikoshiba, K., Ikura, M. Structure of the 1, 4, 5-trisphosphate receptor binding core in complex with its ligand. *Nature.* 2002. 420: 696-700.
- Bosanac, I.**, Yamazaki, H., Matéu-ura, T., Michikawa, T., Mikoshiba, K., Ikura, M. Crystal structure of the ligand binding suppressor domain of type 1 inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor. *Molec. Cell.* 2005. 17: 193-203.
- Carafoli, E.**, Santella, L., Branca, D., Brini, M. Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2001 36(2):107-260.
- Carafoli, E.** Calcium signaling: a tale for all seasons. *PNAS.* 2002. 99(3): 1115-1122.

- Catterall, W., A.** Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2000. 16:521-55.
- Clapham, D., E.** Calcium signaling. *Cell.* 1995.;80(2):259-268.
- Conti, M.** Specificity of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signal in granulosa cell function. *Biol. Reprod.* 2002. 67: 1653-1661.
- Da Fonseca, P. C.,** Morris, S.A., Nerou, E.P., Taylor, C.W., Morris, E. P. Domain organization of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor as revealed by single-particle analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003. 100(7):3936-3941.
- De Smedt, H.,** Missiaen, L., Parys, J. B., Henning, R. H., Sienaert, I., Vanlingen, S., Gijssens, A., Himpens, B., Casteels, R. Isoform diversity of the inositol trisphosphate receptor in cell types of mouse origin. *Biochem J.* 1997. 322(Pt2): 575-583.
- Echevarria W,** Leite, M.F., Guerra, M.T., Zipfel, W.R., Nathanson, M.H. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol.* 2003. 5(5):440-446.
- Eppig, J. J.** Oocyte-somatic cell interactions during oocyte growth and maturation in the mammal. *Dev Biol.* 1985. 1:1 313-347.
- Eppig, J. J.** Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction.* 2001. 122: 829-838.
- Eppig, J. J.,** Pendola, F. L., Wingleworth, K., Pendola, J. K. Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport. *Biol. Reprod.* 2005. 73:351-357.
- Fissore, R.A.,** Longo, F.J., Anderson, E., Parys, J:B., Ducibella, T. Differential distribution of inositol trisphosphate receptor isoforms in mouse oocytes.
- Fujino, I.,** Yamada, N., Miyawaki, A., Hasegawa, M., Furuichi, T., Mikoshiba, K. Differential expression of type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mRNAs in various mouse tissues: in situ hybridization study. *Cell Tissue Res.* 1995. 280(2): 201-10
- Fumagalli, M.,** Brambilla, R., D'Ambrosi, N., Volonte, C., Matteoli, M., Verderio, C., Abbraccio, M. P. Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: role of P2X and P2Y receptors. *GLIA.* 2003. 43:218-230.
- García, K. D.,** Shah, T., Gracia J. Immunolocalization of type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in cardiac myocytes from newborn mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004. 287: C1048-C1057.
- Ghosh, T. K.,** Eis, P.S., Mullaney, J. M., Ebert, C. L., Gill, D.L. Competitive, reversible, and potent antagonism of inositol 1,4,5-trisphosphate-activated calcium release by heparin. *J. Biol. Chem.* 1998. 263(23): 11075-11079.

- Granot, I.,** Dekel, N. Cell-to-cell communication in the ovarian follicle: developmental and hormonal regulation of the expression of connexin43. *Hum Reprod.* 1998. 13(4): 85-97.
- Grayson, T. H.,** Haddock, R.E., Murray, T. P., Wojcikiewicz, R. J., Hill, C. E. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtypes are differentially distributed between smooth muscle and endothelial layers of rat arteries. *Cell Calcium.* 2004. 36(6):447-58.
- Hagar, R.E.,** Burgstahler, A.D., Nathanson, M.H., Ehrlich, B. E. Type III InsP3 receptor channel stays open in the presence of increased calcium. *Nature.* 1998. 396(6706): 81-84.
- Hagar, R. E.,** Ehrlich, E. B. Regulation of the type III InsP(3) receptor by InsP(3) and ATP. *Biophys J.* 2000. 79(1): 271-8.
- Hamada, K.,** Terauchi, A., Mikoshiba, K. Three-dimensional rearrangements within inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor by calcium. *J. Biol. Chem.* 2003. 278(52): 52881-52889.
- He, C. L.,** Damiani, P., Ducibella, T., Takahashi, M., Tanzawa, K., Parys, J. B., Fissore, R. A. Isoforms of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are expressed in bovine oocytes and ovaries: the type-1 isoform is down-regulated by fertilization and by injection of adenophostin A. *Biol. Reprod.* 1999. 61: 935-943.
- Hubbard, K. B.,** Hepler, J.R. Cell signaling diversity of the Gq family of heterotrimeric G proteins. *Cell Signal.* 2006. 18: 135-150.
- Huh, Y. H.,** Yoo, S.H. Presence of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms in the nucleoplasm. *FESB.* 2003. 555: 411-418.
- Humbert, J-P.,** Matter, N., Artault, J-C., Köppler, Malviya, A.N. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 1996. 271(1):478-485.
- Illes, P.,** Ribeiro, J. A. Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* 2004. 483:5-17.
- Iwai, M.,** Tateishi, Y., Hattori, M., Mizutani, A., Nakamura, T., Futatsugi, A., Inoue, T., Furuichi, T., Michikawa, T., Mikoshiba, K. Molecular cloning of mouse type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and identification of a novel type 2 receptor splice variant. *J Biol Chem.* 2005. 280(11):10305-10317.
- Jiang, Q-X.,** Thower, E.C., Chester, D.W., Ehrlich, B.E., Sigworth, F. J. Three-dimensional structure of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor at 2.4 Å resolution. *EMBO J.* 2002. 21(14): 3575-3581.
- Joseph, S. K.,** Lin, C., Pierson, S., Thomas A. P., Maranto, A.R. Heterooligomers of type I and type III inositol trisphosphate receptors in WB rat liver epithelial cells. *J. Biol.Chem.* 1995. 270(40): 23310-23316.

- Joseph, S. K.,** Brownell, S., Khan, M. T. Calcium regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium*. 2005. 38:539-546.
- Karnik, s. s.,** Gogonea, C., Patil, S., Saad, Y., Takezako, T. Activation of G-protein-coupled receptors: a common molecular mechanism. *Trends Endocrinol. Metab.* 2003. 14(9): 431-437.
- Klinger, F.G.,** De Felici, M. In Vitro Development of growing oocytes from fetal mouse oocyte: stage-specific regulation by stem cell factor and granulosa cells. *Dev. Biol.* 2002. 244: 85-95.
- Landry, Y.,** Niederhoffer, N., Sick, E., Gies, J.P. Heptahelical and other G-protein-coupled receptors (GPCRs) signaling. *Curr Med Chem.* 2006. 13(1):51-63.
- Lee, B.,** Laychock, S. G. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoform expression in mouse pancreatic islets: effects of carbachol. *Biochem Pharmacol.* 2001. 61(3):327-36.
- Lee, J-H.,** Yoon S-H., Bae, I-H. Studies on Ca²⁺-channel distribution in maturation arrested mouse oocyte. *Mol. Reprod. Dev.* 2004. 69: 174-185.
- Leite, M.F.,** Thower, E.C., Echeverría, W. Koulen, P., Hirata, K., Bennett, A.M., Erlich, B.E., Nathanson, M.H. Nuclear and cytosolic calcium. *PNAS.* 2003. 100(5): 2975-2980.
- Malviya, A. N.,** Rogue, P., Vincendon, G. Stereospecific inositol 1,4,5-[³²P]trisphosphate binding to isolated rat liver nuclei: evidence for inositol trisphosphate receptor-mediated calcium release from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990. 87(23): 9270-4.
- Martinez-Francois, J. R.,** Morales-Tlalpan, V., Vaca, L. Characterization of the maitotoxin-activated cationic current from human skin fibroblasts. *J Physiol.* 2002. 538(Pt 1):79-86.
- Matsumoto ,M.,** Nagata, E. Type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor knock-out mice: their phenotypes and their meaning in neuroscience and clinical practice. *J Mol Med.* 1999. 77(5):406-11.
- Mehlmann, L. M.** Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction.* 2005. 130: 791-799.
- Meter, C. K.** The ovary. 2^o ed.
- Miyakawa, T.,** Maeda, A., Yamazawa, T., Hirose, K., Kurosaki, T., Iino, M. Encoding of Ca²⁺ signals by differential expresión of IP₃ receptor subtypes. *Acta Histochem.* 1999. 18(5): 1303-1308.
- Monkawa, T.,** Hayashi, M., Miyawaki, A., Sugiyama, T., Yamamoto-Hino, M., Hasegawa, M., Furuichi, T., Mikoshiba, K. Saruta, T. Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the rat kidney. *Kidney Int.* 1998. 53(2):296-301.
- Morales-Tlalpan, V.,** Arellano, R. O., Díaz-Muñoz, M. Interplay between ryanodine and IP₃ receptors in ATP-stimulated mouse luteinized-granulosa cells. *Cell Calcium.* 2005. 37:203-213.
- Morgan, J. M.,** De Smedt, H., Gillespie, J. I. Identification of three isoforms of the InsP₃ receptor in human myometrial smooth muscle. *Pflugers Arch.* 1996. 431(5):697-705.

- Ngezahayo, A.,** Altmann, B. Steffens, M., Kolb, H.-A. Gap junction coupling and apoptosis in GFSHR-17 granulosa cells. *J. Membrane Biol.* 2005. 204:137-144.
- O'Neill, A.F.,** Hagar, R.E., Zipfel, W.R., Nathanson, M.H., Erlich, B.E. Regulation of the type III InsP(3) receptor by InsP(3) and calcium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. 294(3): 719-725.
- Parys, J. B.,** Sernett, S. W., DeLisle, S., Snyder, P.M., Welsh, M.J., Campbell, K.P. Isolation, characterization, and localization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor protein in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 1992. 267(26): 18776-18782.
- Patel, S.,** Joseph, S. K., Thomas, A. P. Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium.* 1999. 25(3):247-264.
- Patterson, R. L.,** Boehning, D., Snyder, S. H. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu. Rev. Biochem.* 2004;73:437-465.
- Pedersen, S., F.,** Owasianik, G., Nilius, B. TRP channels: an overview. *Cell Calcium.* 2005. 38:233-252.
- Pérez, D.N.,** Karnik, S.S. Multiple signaling states of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Rev.* 2005. 57(2): 147-161.
- Pérez, P. J.,** Ramos-Franco, J., Fill, M., Mignery, G.A. Identification and functional reconstitution of the type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 1997. 272 (38): 23961-23969.
- Ramos-Franco, J.,** Fill, M., Mignery, G. A. Isoform-specific function of single inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channels. *Biophysical J.* 1998. 75: 834-839.
- Rebecchi, M. J.,** Pentylala, S.N. Structure, fuction, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Rev.* 2000. 80(4): 1291-1335.
- Rozinek, J.,** Rajmon, R., Petr, J., Rohlík, J., Jeřeta, M., Sedmíková, M., Řehák, D., Jílek, F. Ultrastructural localisation of calcium deposits in pig ovarian follicles *Animal Reprod. Sci.* 2006. 91: 123-132.
- Sacchetto, R.,** Cliffer, K. D., Podini, P., Villa, A., Christensen, B. N., Volpe, P. Intracellular Ca²⁺ stores in chick cerebellum Purkinje neurons: ontogenetic and functional studies. *Am J Physiol.* 1995. 269(5):C1219-C1227.
- Serysheva, I. I.,** Bare, D. J., Ludtke, S.J., Kettlun, C. S., Chiu, W., Mignery, G.A. Structure of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor revealed by electrón cryomicroscopy. *J. Biol. Chem.* 2003. 278(24):21319-21322.
- Sharovsky, R.,** Cesar, L. A. Increase in mortality due to myocardial infarction in the Brazilian city of Sao Paulo during winter. *Arq Bras Cardiol.* 2002. 78(1): 106-9.

- Sorrentino, V.**, Barone, V., Rossi, D. Intracellular Ca(2+) release channels in evolution. *Curr Opin Genet Dev.* 2000. 10(6):662-667.
- Steffl, M.**, Schweiger, M., Amselgruber, W. M. Oestrous cycle-regulated expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2 in the pig ovary. *Acta Histochem.* 2004. 106:137-144.
- Sugawara, H.**, Kurosaki, M., Takata, M., Kurosaki, T. Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *EMBO J.* 1997. 16(11):3078-88.
- Thrower, E. C.**, Hagar, R. E., Ehrlich, B. E. Regulation of Ins(1,4,5)P3 receptor isoforms by endogenous modulators. *Trends Pharmacol Sci.* 2001.22(11): 580-6.
- Tones, M. A.**, Bootman, M. D., Higgins, B. F., Lane, D. A., Pay, G. F., Lindahl, U. The effect of heparin on the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in rat liver microsomes. *FEBS.* 1989. 252: 105-108.
- Yoshicawa, F.**, Iwasaki, H., Michikawa, T., Furuchi, T., Mikoshiba, K. Trypsinized cerebellar inositol 1, 4,5-trisphosphate receptor.. *J. Biol. Chem.* 1999. 274(1): 316-327.
- Varndell, I. M.**, Tapia, F. J. Probert, L., Buchan, A. M., Gu, J., De Mey, J., Bloom, S.R., Polak, J. M. Immunogold staining procedure for the localisation of regulatory peptides. *Peptides.* 1982. 3(3):259-72
- Venkatachalam K.**, van Rossum, D. B., Patterson, R L., Ma, H. T., Gill, D. L. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nat Cell Biol.* 2002 4(11):E263-E272.
- Vermassen, E.**, Parys, J.B., Mauger, J-P. Subcellular distribution of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: functional relevante and molecular determinants. *Biol. Cell.* 2004. 96:3-17.
- Webb, R.J.**, Bains, H., Cruttwell, C., Carroll, J. Gap-junctional communication in mouse cumulus-oocyte complexes: implications for the mechanism of meiotic maturation. *Reproduction.* 2002. 123: 41-52.