

**CORRIENTES IÓNICAS ACTIVADAS MEDIANTE LA
LIBERACIÓN MECANOSENSIBLE DE ATP EN EL
FOLÍCULO DE *Xenopus***

Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Neurobiología)

Presenta:

Luis Manuel Reyes Angulo

Director de Tesis:

Dr. Rogelio Arellano Ostoa

**Instituto de Neurobiología
Campus UNAM Juriquilla, julio del 2005**



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.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	4
Resumen	5
Introducción	6-13
Antecedentes	13-18
Hipótesis	19
Objetivos	19
Materiales y Métodos	20-27
Resultados	28-53
a) Características generales de las respuestas eléctricas producidas por estimulación mecánica (I_{mec})	28-30
b) Cinética de activación de la I_{mec}	30-31
c) Papel de las células foliculares (<i>c.f.</i>) en la generación de I_{mec}	31-34
d) Bases iónicas de la I_{mec}	35-37
e) Papel de Ca^{2+} en la generación de I_{mec}	37-42
f) Bloqueo de canales mecanosensibles	42-43
g) Interacción de la corriente folicular F_{in} con la respuesta I_{mec}	43-50
g.1) Paralelismo entre la expresión de F_{in} e I_{mec} en folículos de un mismo donador	44-46
g.2) Interacción de la respuesta I_{mec} con la corriente F_{in} activada por ACh o ATP	46-50
h) Evidencias experimentales para un posible mecanismo de activación de I_{mec} : la liberación mecanosensible de ATP	50-53

Discusión	54-60
Referencias	61-65

Abreviaturas

Corriente entrante rápida (<i>Fast inward</i>).....	F_{in}
Células foliculares.....	<i>c.f.</i>
Corriente mecánica	I_{mec}
Corriente de Cl^- dependiente de Ca^{2+}	$I_{Cl(Ca)}$
Folículos sin epitelio y teca.....	<i>e.t.r.</i>
Potencial de equilibrio	E_{eq}
Potencial de inversión	E_{inv}
Ringer normal	RN
Ringer nitrato.....	RNO_3
Ringer yodo	RI

RESUMEN:

El folículo ovárico de *Xenopus laevis* constituye un modelo adecuado para el estudio de los procesos que ocurren en la comunicación intercelular, ya que entre sus características morfológicas y funcionales, se incluye un alto grado de acoplamiento eléctrico, metabólico y químico entre el ovocito y las diferentes células que lo constituyen.

Tomando en cuenta estudios previos de las características electrofisiológicas del folículo de *X. laevis* en el presente trabajo investigamos las características básicas, y el probable mecanismo de activación, de corrientes iónicas que son activadas ante un estímulo mecánico. A estas corrientes les hemos llamado I_{mec} , parte de los resultados encontrados indican que los canales involucrados en la generación de esta corriente son los mismos que participan en la activación de las corrientes F_{in} descritas previamente en este modelo. Por ejemplo, la I_{mec} comparte con las corrientes F_{in} su permeabilidad a aniones, su independencia a Ca^{2+} intracelular, y su dependencia del acoplamiento entre células foliculares y ovocito. Además, mostramos que los mecanismos celular que generan a I_{mec} interaccionan de diversas formas con los que están involucrados en la activación de la corriente F_{in} . Esto último hizo suponer que el mecanismo de activación de I_{mec} podría ser a través de la participación de un transmisor liberado intrafolicularmente a través de la estimulación mecánica. Nuestros resultados sugieren fuertemente que el probable transmisor es el ATP, ya que el bloqueo farmacológico de las vías purinérgicas inhibe la activación de I_{mec} . Nuestros resultados indican que el ATP podría ser liberado intrafolicularmente y regular a través de receptores purinérgicos las características eléctricas del ovocito y sus células foliculares, los efectos promovidos por ATP incluyen la modulación de canales iónicos que han sido implicados en la regulación del proceso de maduración del gameto; esto sugiere que el sistema purinérgico podría funcionar como un agente parácrino/autócrino importante durante este proceso.

INTRODUCCIÓN

Los estímulos mecánicos están presentes en la naturaleza invariablemente. En particular las células se encuentran sometidas a una amplia variedad de fuerzas mecánicas: desde la agitación molecular térmica, hasta los gradientes de presión osmótica potencialmente destructores. Esto obligó evolutivamente a la membrana celular a desarrollar mecanismos eficientes de protección (para una revisión extensa ver: Hamill & Martinac, 2001). Sin embargo, la energía mecánica no solo resulta ser una agresión a la integridad celular, las fuerzas mecánicas, tanto intracelulares como extracelulares, son el resultado de una serie de eventos físico-químicos, y el procesamiento de dicha información tiene consecuencias en la homeostasis celular.

Al proceso transductor de señales mecánicas se le denomina mecanosensitividad. Las células bacterianas y de plantas se encuentran envueltas por una pared celular rígida que protege sus membranas celulares de hinchamiento excesivo. Sin embargo, esta estrategia no solo excluye de un daño a la membrana plasmática, sino también en un forma amplia limita la mecanosensitividad. En contraste, las células animales desarrollaron estrategias para preservar la integridad celular, permitiendo un alto grado de deformabilidad y mecanosensitividad. La integración de esta información mecánica ha concretado fenómenos como el tacto, la audición, las sensaciones dolorosas, y la osmosensitividad, por mencionar algunos. Esto indica que células especializadas con una localización estratégica dentro del organismo, pueden estar expuestas selectivamente a distintas formas de estimulación mecánica, como por ejemplo estados de deformación de la membrana, vibraciones de alta frecuencia, gradientes de presión osmótica, presión hemodinámica y estrés por extensión de la bicapa lipídica (García-Añoveros & Corey, 1997).

Durante los últimos 20 años, han sido realizados diversos estudios tratando de dilucidar la naturaleza de las moléculas implicadas en la mecanosensitividad. Estas incluyen canales iónicos activados mecánicamente o *MG* (del inglés

mechanically-gated) (Morris, 1990), receptores *MS* (del inglés mechano-sensitive) (Paoletti & Ascher, 1994), enzimas (Lehtonen & Kinnunen, 1995), canales implicados en la liberación de Ca^{2+} intracelular (Jena *et al*, 1997), y en la liberación de transmisores (Chen & Grinnel, 1996).

Para que una molécula proteica pueda ser directamente *MS*, deberá ser sensitiva a propiedades de la membrana que cambien bajo deformación mecánica. Por ejemplo, en el caso de un canal con cinética simple de dos estados, la distribución en el equilibrio entre un estado abierto ó cerrado, puede estar causado por cambios en la tensión, adelgazamiento y/o curvatura local de la bicapa. Más aun, puede estar dado por fuerzas del citoesqueleto que “tiran” directamente sobre la proteína de membrana, o por un anclaje extracelular sobre ésta. Para entender estas interacciones bicapa-proteína, se debe tomar en cuenta que cualquier modificación en el espesor hidrofóbico de la bicapa, tiende a ajustar la longitud de la porción hidrofóbica de la proteína. De otra forma, cualquier desajuste no compensado llevará a aumentar el costo energético en la membrana, al exponer fragmentos hidrofóbicos mayores a moléculas de agua (Mouritsen & Bloom, 1984). Como una consecuencia del desajuste hidrofóbico, se piensa que las proteínas tienden a rodearse por moléculas lipídicas de igual forma y tamaño, para poder minimizar la tensión mecánica en la bicapa (Fattal & Ben-Shaul, 1993). De tal forma que el efecto de lípidos de diferente geometría sobre canales proteicos *MG*, nos da un bosquejo inicial, de que cambios en el espesor de la membrana y/o su curvatura delinean un mecanismo de activación de estos canales (figura A) (Lundbaek & Andersen, 1994). Además de esta interacción bicapa-proteína, se sabe que la unión ligando-receptor, fosforilación, ó polarización de la membrana causan desajustes hidrofóbicos independientes a los evocados por un estímulo mecánico, agregando un grado más de complejidad entre estímulos de diferente índole.

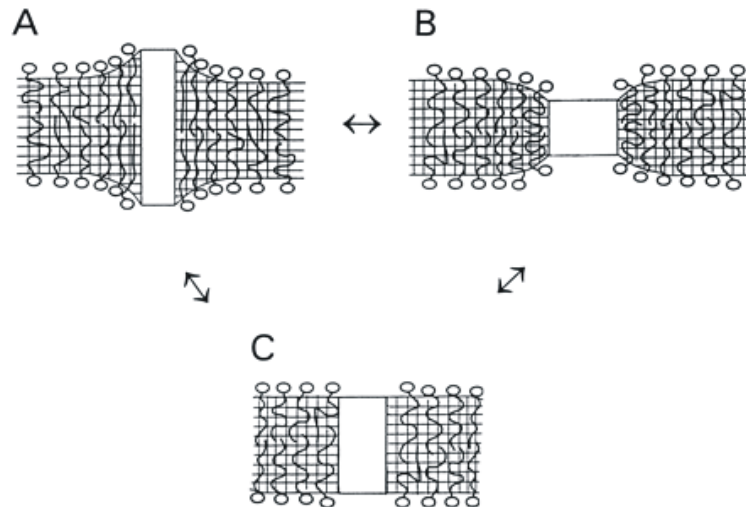


Figura A. Interacción de proteínas con la bicapa lipídica. Los rectángulos representan los cambios dinámicos en una unidad peptídica secundarios a deformaciones en la membrana debidas a cambios en sus componentes hidrofóbicos. En A, variaciones hidrofóbicas “positivas” en la membrana, provocan un curvatura “positiva” en la membrana lipídica. En B, se observa una conformación proteica que promueve una curvatura “negativa”. En C, observamos un equilibrio entre los componentes hidrofóbicos de la proteína y la bicapa, por lo cual no se produce distorsión (Hamill & Martinac, 2001).

El estudio de la mecanosensibilidad en macromoléculas ha avanzado de forma importante describiendo el comportamiento de péptidos simples que forman canales, y que son activados mecánicamente. Dos de estos péptidos son alameticina y gramicidina. Ambas moléculas se encuentran muy bien caracterizadas en términos de su biofísica, relación actividad-estructura, y el diseño de modelos del estado abierto-cerrado del canal. Los dos muestran mecanosensibilidad en sistemas experimentales de bicapas lipídicas puras.

Alameticina es un péptido de 20 aminoácidos que forma canales con estados de multi-conductancia activados por voltaje (Cafiso 1994) Generalmente se explica la conformación de esta proteína con un modelo de “barril”, en el cual, cada duela del barril es formada por un monómero α -hélice. Un incremento en la tensión de la membrana mediante succión, resulta en la incorporación de un monómero α -hélice en la bicapa, subsecuentemente este monómero se asocia al canal que comienza a formarse en la membrana, resultando en un incremento en

el área del poro, hasta que se logra el paso a un estado del canal de alta conductancia (Opsahl & Webb, 1994).

Gramicidina es un péptido de 15 aminoácidos, y muestra dos diferentes tipos de plegamientos: una doble α -hélice, y un dímero helicoidal. Generalmente la formación del canal proviene de reacciones de dimerización entre dos monómeros no conductivos que se insertan en la bicapa como α -hélices (O'Connell *et al.*, 1990). Existe una diferencia en el área de membrana ocupada entre los monómeros y el dímero de gramicidina, y esto podría explicar la sensibilidad a la tensión en la activación del canal. Se ha propuesto que incrementos de tensión, que causan disminución en el espesor de la bicapa, benefician el acoplamiento hidrofóbico entre la bicapa y el dímero (Goulian *et al.*, 1998). Es importante tener en mente que ambos modelos de péptidos mecanosensitivos fueron estudiados en membranas bilipídicas puras, excluyendo todas las interacciones que pueden ocurrir en la complejidad de una membrana celular.

En bacterias los canales iónicos *MS* que son activados bajo tensión, están presentes tanto en gram-positivas, como en gram-negativas (Sukharev *et al.*, 1997). Una característica de los canales *MS* en bacterias es su multiplicidad, y la extremadamente alta conductancia de algunos de ellos. En experimentos de patch-clamp realizados tanto en liposomas de *E. coli*, como en membranas plasmáticas de células gigantes de *E. coli* se han observado rangos de conductancia activados mecánicamente que van de los 100 a los 1500 pS en 0.1 M KCl (Ghazi *et al.*, 1998). Con base en las diferencias en conductancia y cinética estos canales se han clasificado como MscM, MscS, y MscL (M, S y L del inglés mini, small and large, respectivamente) (Berrier *et al.*, 1996). De estos probablemente el mejor estudiado sea el llamado MscL, el cual es un proteína de 136 residuos, con un peso molecular de 15 Kda. Tiene dos segmentos transmembranales α -hélice conectados por una asa periplásmica (Blout *et al.*, 1996). Este canal está ampliamente distribuido en procariotes. Se piensa que la tensión desarrollada en la bicapa activa directamente a estos canales, en una forma análoga a las interacciones bicapa-proteína antes descrita para péptidos como gramicidina. Muy probablemente el papel funcional principal de este canal

MS, al igual que los anteriores mencionados en procariontes, sea la osmoregulación. Las bacterias expuestas a un choque hiposmótico rápidamente liberan contenido citoplasmático hacia el medio externo. Por ejemplo, cambios osmóticos pueden mediar la salida de lactosa y ATP a través de canales aniónicos osmoregulados en *E. coli*, o de ATP de *S. faecalis*, y ambos mecanismos pueden ser inhibidos por Gd^{3+} .

En células eucariotas, las proteínas mecanosensitivas se han estudiado tanto en modelos de invertebrados, como en vertebrados. En *C. elegans*, se han encontrado mutantes que son incapaces de responder a estímulos táctiles. Las mutaciones correspondientes fueron encontradas en un grupo de genes denominados MEC, se piensa, que los productos de estos genes están involucrados en su sistema de mecanotransducción (Ghazi *et al.*, 1998). El mecanismo molecular de transducción del tacto en *C. elegans* propuesto es el siguiente: MEC-4, MEC-6 y MEC-10 son subunidades de un canal iónico presumiblemente mecanosensible. Hacia el lado extracelular, las subunidades del canal están ancladas a la matriz extracelular especializada a través de las proteínas MEC-1, MEC-5 y/o MEC-9. En contraste hacia el interior celular, las subunidades del canal parecen interactuar con microtúbulos, por medio de la proteína de unión MEC-2, la cual tiene sitios de unión específicos para MEC-12 y α -tubulina en su porción citosólica. Para activar el canal, un estímulo táctil podría deformar el complejo del citoesqueleto, abriendo el canal por su porción intracelular, ó un estímulo similar puede perturbar la matriz extracelular abriendo el canal por su cara extracelular. En ambos casos, un influjo de Na^+ en la célula mecanoreceptora, activa a la neurona, y ésta a su vez activa un circuito de relevo involucrado en la locomoción (Driscoll & Tavernarakis, 1997). Sin embargo, aun no existen estudios electrofisiológicos que confirmen estos hallazgos.

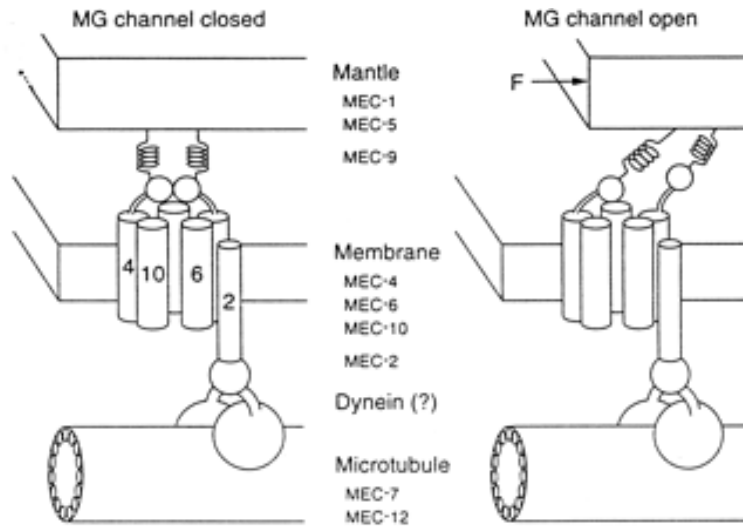


Figura B. Modelo de mecanosensibilidad propuesto de *C. elegans*. (Hamill & Martinac)

Los insectos contienen mecanorreceptores cuticulares que poseen un cilio en su dendrita sensorial. Las puntas ciliares conocidas como cuerpos tubulares, están embebidos en la cutícula y contienen asas de microtúbulos que están conectados con estructuras protéicas de membrana (García-Añoveros & Corey, 1997). Cada cerda externa del insecto está inervada por una sola neurona, cuya terminación nerviosa se encuentra protegida por células de soporte con una disposición en vaina. Las células de soporte secretan una linfa rica en potasio (Grunert & Gnatzy, 1987), lo que resulta en una diferencia del potencial transepitelial. Al movimiento de la cerda en una dirección, la punta del cilio en el cuerpo tubular es comprimida. Esto resulta en un decremento del potencial transmembranal, lo cual se sugiere corresponde con un incremento de corriente entrante en la célula receptor. Movimientos de las cerdas en la dirección contraria, resultan en un decremento en la corriente (Thurm, 1983).

Un conocimiento más detallado de la mecanotransducción, tanto morfológico como fisiológico, proviene del estudio de células ciliadas en vertebrados. En el oído interno, estas células son los componentes del sistema vestibular y coclear,

partes de un epitelio sensorial especializado (García-Añoveros & Corey, 1997). Este epitelio sensorial está compuesto de la célula ciliada con estereocilias y las células de soporte localizadas basalmente. Las fibras nerviosas hacen contacto con las células ciliadas en su porción basal. Cada célula sensorial tiene de 30 a 300 estereocilias. Todas muestran la orientación sobre el mismo eje vertical, y una alineación semejante a una escalera, de tal forma que cada estereocilia, es 0.5-1.0 μM mas alta que su anterior. En su porción apical cada estereocilia se une a la siguiente mediante estructuras filamentosas denominadas uniones en punta (Richardson *et al.*, 1990; Jacobs & Hudspeth, 1990). Se propone que canales iónicos mecanosensibles se encuentran localizados en los sitios de inserción de las uniones en punta sobre las estereocilias, de tal forma que un estímulo mecánico ocasiona una tensión sobre la unión en punta, lo que cerrará o abrirá a los canales (García-Añoveros & Corey, 1997). Cuando la dirección del conjunto ciliado ocurre hacia la localización de la estereocilia de mayor longitud se define como positiva, y provoca apertura de los canales iónicos, el consecuente incremento en la corriente entrante y la despolarización de la célula ciliada (Hudspeth & Corey, 1977). Estos canales tienen una probabilidad de apertura en reposo del 10-20%, de tal forma que una corriente basal fluye dentro de la célula en reposo. Una deflexión en el sentido contrario al antes mencionado se define como negativa y produce el cierre del canal. Estos canales de transducción son canales catiónicos no selectivos, con una alta conductancia a K^+ y menor a Ca^{2+} (Ohmori 1985). La conductancia de un solo canal aparentemente es de 90-100 pS (Denk 1995). La latencia en la activación es del orden de microsegundos, lo cual orienta a pensar que no hay segundos mensajeros involucrados en la apertura del canal. Este canal constituye probablemente la evidencia más sólida de los modelos de activación por anclaje de un canal *MG*, en los cuales, tal como ha sido descrito en invertebrados y en vertebrados, la apertura y cierre del canal *MG* ocurre secundaria a la tracción de una proteína ó un complejo de éstas sobre sitios específicos intra o extracelulares del canal.

A continuación se resumen las características de canales *MG* en la membrana del ovocito de *Xenopus*, un modelo celular que ha sido utilizado ampliamente en el estudio de estos canales.

ANTECEDENTES

El estudio de los canales activados mecánicamente en el ovocito de *Xenopus* ha sido intenso durante los últimos quince años. Las primeras evidencias de un canal *MG* fueron obtenidas con técnicas de patch-clamp (Methfessel *et al.*, 1986). A partir de estos trabajos se hicieron múltiples estudios sobre ovocitos en especies de invertebrados y vertebrados (Wilkinson & Hamill, 1998). Las similitudes encontradas en estos canales *MG* y los de *Xenopus* son numerosos. Un ejemplo de lo anterior es la expresión del canal en una densidad relativamente alta ($0.3-2/\mu\text{m}^2$) sobre la superficie de la membrana (Methfessel *et al.*, 1986). Las características electrofisiológicas de los canales *MG* de *Xenopus* son: canales catiónicos inespecíficos con rectificación entrante, los cuales son permeables a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , son inhibidos por Gd^{3+} y amilorida. Estos canales presentan desensibilización rápida en respuesta a una estimulación mecánica sostenida (Yang & Sachs, 1990; Wilkinson *et al.*, 1998; Saitou *et al.*, 2000).

Además de los datos electrofisiológicos mencionados, ha sido descrito que los canales *MS* en los ovocitos de *Xenopus* muestran una probable modulación a través de cambios en el potencial de membrana. De tal forma que en ausencia de un estímulo mecánico, un protocolo de despolarización desde -50 a $+50$ mV, aparentemente activa canales *MS* después de un periodo largo de decaimiento de entre 1 y 20 seg. Estos canales activados por voltaje fueron catiónicos, y presentan la misma selectividad y niveles de conductancia similares a los canales *MG*. Además se ha observado que un pequeño estímulo mecánico aplicado durante el retardo en la activación de los canales *MS* llevados a valores de $+50$ mV, produce una apertura rápida del canal (Silberberg & Magleby, 1997). En contraste, existen otras conductancias observadas que no parecieran involucrar la activación de canales *MG* (Zhang & Hamill, 2000). Por ejemplo, en estudios realizados con la técnica de control de voltaje con dos microelectrodos, se ha observado que la despolarización a un valor de $+50$ mV activa diversas

conductancias: una selectiva a Na^+ , una selectiva a Cl^- y una conductancia no selectiva. La hiperpolarización en -150 mV activa una conductancia no específica. También la eliminación del Ca^{2+} extracelular induce una conductancia de membrana que difiere en la selectividad iónica y farmacológica con la de los canales *MG* (Arellano *et al.*, 1995; Zhang & Hamill, 2000).

A pesar de las múltiples evidencias obtenidas utilizando técnicas de patch-camp, sobre la existencia de los canales *MG* en el ovocito de *Xenopus*, han prevalecido opiniones en contra de su función en la célula completa. Algunos investigadores han argumentado que la succión con la pipeta de patch podría llevar la membrana cerca de sus límites líticos, sugiriendo que la mecanosensibilidad observada en un canal, podría ser un artificio del registro de patch (Morris, 1990). Con base en lo anterior, ha habido un gran interés en diseñar modelos que permitan observar la activación de los canales *MG* en registros de corrientes celulares no unitarias. Se han sometido ovocitos de *Xenopus* registrados con técnica de control de voltaje, a múltiples estímulos mecánicos como la aspiración mediante una pipeta de succión, la inyección de líquido intracelularmente, indentación de la membrana extracelular mediante un flujo de líquido a presión, sin lograr un aumento en la conductancia de la membrana. Estos cambios ocasionaron daños irreversibles de la membrana plasmática (Zhang & Hamill, 2000).

Sin embargo, Saitou *et al.* (2000), reportaron la activación de canales *MG* en ovocitos completos pretratados con colagenasa. Los estudios fueron hechos utilizando control de voltaje con dos microelectródos y obteniendo las siguientes conclusiones : a) la depresión realizada sobre la membrana plasmática bajo la inyección de un flujo de presión evoca corrientes mecanosensibles; b) esta respuesta muestra una adaptación tiempo-dependiente; c) la relación de la curva corriente-voltaje muestra rectificación entrante y saliente en potenciales de membrana negativos y positivos respectivamente; d) Gd^{3+} y amilorida suprimen significativamente la corriente *MS*; e) los canales mostraron una permeabilidad

inespecífica a cationes (Na^+ , K^+ , y Ca^{2+}); y f) la corriente mecánica incluye una corriente de Cl^- activada por Ca^{2+} . Estos resultados correlacionan bien con los ya mencionados obtenidos mediante técnicas de *patch-clamp*. Sin embargo, las corrientes descritas en este estudio no han sido reproducidas por otros investigadores, inclusive utilizando estrategias semejantes de estimulación (ver por ejemplo: Zhang & Hamill, 2000).

Una vez caracterizados parcialmente los canales *MG*, en forma paralela se ha tratado de dilucidar como impacta su activación o cierre en la función celular. Tomando en cuenta que la liberación secundaria a estímulos mecánicos de transmisores juegan un papel relevante en un amplio espectro de procesos fisiológicos tales como: tacto, dolor, control de presión sanguínea, audición, balance hidroelectrolítico, crecimiento tisular, regulación del volumen celular, etc (Hamill & Martinac, 2001), se justifica el interés en este rubro. En un estudio sobre las implicaciones del bloqueo de los canales *MG* en procesos de crecimiento y desarrollo del ovocito de *Xenopus*, se encontró que los procesos de maduración, fertilización y embriogénesis temprana pueden proceder normalmente en presencia de concentraciones de agentes que bloquean parcialmente (1 mM de Gentamicina) o completamente (10 μM de Gd^{3+}) los canales *MG*. Sin embargo, se argumenta que altas concentraciones de Gd^{3+} , mayores a 50 μM , pueden perturbar la orientación del eje de crecimiento en los embriones (20% de la muestra). Con lo anterior se concluye que no encontraron evidencia que sustenten el papel crítico de los canales *MG* durante el desarrollo de los ovocitos de *Xenopus* (Wilkinson *et al.*, 1998).

Con respecto a la liberación mecanosensible de transmisores, se sabe que este es un evento ampliamente observado en células eucariotas, donde fenómenos de señalización parácrina y autócrina están estrechamente relacionados con liberación de ATP principalmente (Hamill & Martinac, 2001; Romanello *et al.*, 2001). En astrocitos corticales de ratón, la liberación mecanosensible de ATP constituye un mensajero extracelular que regula las ondas de calcio intercelulares (Guthrie *et al.*, 1999). En islotes pancreáticos de

rata, el ATP liberado bajo estímulos mecánicos, tiene una acción autócrina al interactuar con receptores P_{2y} , promoviendo la salida de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, lo que conlleva la regulación de las ondas de Ca^{2+} que coordinan la liberación de insulina en el conjunto de células β -pancreáticas (Cao *et al.*, 1997). También, cambios en la presión hidrostática en el epitelio de la vejiga urinaria de conejo, estimulan la liberación de ATP, el cual se propone como un probable mediador sensorial del grado de distensión de la vejiga (Ferguson *et al.*, 1997).

En *Xenopus*, la primera evidencia de liberación *MS* de ATP fue observada en neuronas sensoriales involucradas con el tacto. En éstas la terminal neuronal aferente libera ATP como respuesta a un estímulo mecánico. El ATP actúa en forma autócrina sobre receptores P_{2Y1} (Nakamura *et al.*, 1996). En el ovocito de *Xenopus* recientemente se ha reportado liberación mecanosensible de ATP. Usando el ensayo de bioiluminiscencia de luciferin-luciferasa, se demostró una liberación basal de ATP en rangos de 0.01 fmol/s, que bajo una estimulación mecánica se incrementa a 50 fmol/s. La aplicación de sustancias con cualidades disruptivas del complejo de Golgi (brefeldina A, nocodazol), que bloquean el tráfico vesicular y la inserción de proteínas en la membrana plasmática, indujeron la supresión de la liberación tanto basal como mecánica de ATP. La utilización de colagenasa, así como péptidos de unión a integrinas y citocalasina D, también producen bloqueo en la liberación de ATP, lo que indica que elementos extracelulares, membranales y filamentos intracelulares, están involucrados en este proceso. La elevación de Ca^{2+} intracelular no produce una liberación de ATP, aunque parece potenciar la estimulación mecanosensible. Con estos resultados los autores postulan que el transporte vesicular de proteínas conlleva la liberación de moléculas de ATP concentradas en dichas estructuras, lo cual constituye un nuevo mecanismo de mecanotransducción por el cual las células podrían regular el transporte y secreción de proteínas en respuesta a un estímulo mecánico (Maroto & Hamill, 2001).

En nuestro laboratorio, hemos observado folículos de *Xenopus laevis* que responden a estímulos mecánicos activando corrientes iónicas, en tanto sorpresivamente encontramos una alta similitud de estas respuestas, con corrientes de Cl^- activadas por agonistas purinérgicos y muscarínicos (Arellano & Miledi, 1993; Arellano *et al.*, 1996, 1998, 1999). Estas respuestas fueron estudiadas registrando corrientes iónicas en condiciones normosmóticas, e hiposmóticas. La aplicación de agonistas muscarínicos o purinérgicos provoca la activación de 2 corrientes en condiciones hiposmóticas, la primera de ellas llamada S_{in} (por sus siglas en inglés “smooth inward”) es osmodependiente y muestra un decremento de más del 70% en medio normosmótico, se asocia a un incremento en la conductancia de la membrana y es acarreada principalmente por Cl^- . A la segunda corriente se le denominó F_{in} (por sus siglas en inglés “fast-inward”). La corriente F_{in} también es acarreada por Cl^- , y tiene un característico curso temporal en forma de espiga que se genera con una latencia de ms. Ambas corrientes son independientes de Ca^{2+} intracelular y son dependientes de la comunicación del ovocito con las células foliculares (Arellano & Miledi, 1993, 1994, Arellano *et al.*, 1996, 1998).

Las corrientes F_{in} presentan las siguientes características: un potencial de inversión de aproximadamente -22 mV, la sustitución externa de Cl^- muestra un decremento en la amplitud de la F_{in} , y desplaza el potencial de inversión de la corriente hacia valores positivos. La aplicación de toxina pertusis inhibe la respuesta en un 50%, lo que sugiere que el receptor purinérgico de las células foliculares podría estar asociado a proteínas-G y en tal caso es probable que se trate de un receptor purinérgico metabotrópico del tipo P_{2Y} . La respuesta F_{in} es activada también por UTP. Es importante mencionar que la aplicación de ACh muestra inactivación cruzada con la aplicación de ATP o UTP, lo que sugiere que estos agonistas activan la misma vía de señalización intracelular (Arellano *et al.*, 1998).

Comparando estos datos con nuestras respuestas estimuladas mecánicamente en el folículo de *Xenopus* y tomando en cuenta la evidencia de liberación mecanosensible de ATP en el ovocito así como la existencia de una gran cantidad

de canales *MS* en su membrana, surge la posibilidad de que el conjunto de todas estas moléculas podrían ser parte de un sistema mecanosensible que esté involucrado en un circuito de comunicación intercelular (i.e., parácrina/autócrina) entre los diferentes componentes foliculares. El presente estudio fue realizado para probar sistemáticamente esta hipótesis.

HIPÓTESIS

La estimulación mecánica en el folículo de *Xenopus laevis* genera corrientes iónicas que son producidas por la liberación parácrina-autócrina de ATP.

OBJETIVOS

1. Caracterización de las corrientes activadas mecánicamente (I_{mec}) en el folículo de *Xenopus*.
2. Estudio de la interacción de las respuestas provocadas por agonistas muscarínicos y purinérgicos con la corriente I_{mec} .
3. Estudiar las posibles vías de activación de la corriente I_{mec} .
 - Dependencia de Ca^{2+} intracelular y extracelular.
 - Identidad de los receptores involucrados.
 - Posibles transmisores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de folículos. Las ranas *Xenopus laevis* utilizadas (Figura 1) fueron obtenidas de Xenopus I (Ann Arbor MI, USA) y mantenidas en una pecera a una temperatura entre los 22 a 24 °C. Para la disección de los lóbulos ováricos (4-8) las ranas fueron anestesiadas por hipotermia. La cirugía se realizó bajo condiciones de esterilidad practicando una incisión abdominal de aproximadamente 1.5 cm (figura 2).



Figura 1. Rana sudafricana *Xenopus laevis*.

Una vez disecados los fragmentos de ovario la herida fue cerrada mediante sutura, y el donador fue colocado en un tanque individual para su recuperación por 15 días en promedio antes de ser reinstalado en la pecera. Las ranas operadas no fueron reutilizadas por lo menos en un lapso de dos meses.

Los lóbulos ováricos (figura 3) fueron depositados en cajas de Petri que contuvieron una solución de Barth cuya composición (en mM) fue la siguiente: 88 NaCl, 0.2 KCl, 2.4 NaHCO₃, 0.33 Ca(NO₃)₂, 0.41 CaCl₂, 0.82 MgSO₄, 0.88 KH₂P0₄, 2.7 Na₂HPO₄, con gentamicina 70 µg ml⁻¹, y pH 7.4.

Posteriormente, los folículos ováricos, que se encuentran dispuestos en forma de racimo en el lóbulo, fueron disecados como folículos desprovistos de epitelio y teca a los cuales llamaremos “folículos *e.t.r.*”. Esta disección se llevó a cabo utilizando un microscopio estereoscópico que permitió discernir el epitelio interno del folículo junto con los vasos de la teca (figuras 4-5), los cuales fueron removidos con la ayuda de pinzas finas. Los folículos *e.t.r.* mantienen la membrana basal de las células foliculares que provee protección y un medio natural a esta monocapa de células adyacente al ovocito (Arellano *et al.*, 1996, 1998; Pérez-Samartín *et al.*, 2000). La remoción del epitelio y la teca facilita la inserción de los electrodos, aumentando la estabilidad del registro electrofisiológico, y simplifica la interpretación de resultados al eliminar la posible participación del epitelio y otras capas tecaes en las respuestas (ver e.g., Saldaña *et al.*, 2005). Los folículos *e.t.r.* fueron incubados (18-20 °C) en medio de Barth suplementado con 5 mM de glucosa y suero bovino fetal al 0.2% entre 4 a 6 horas antes de iniciar los registros.

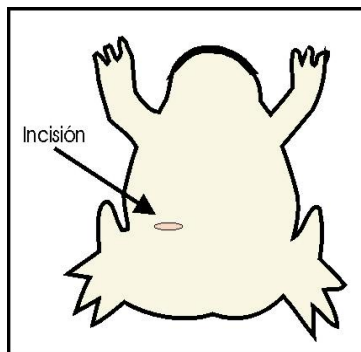


Figura 2. Caricatura donde se muestra una rana *Xenopus* expuesta ventralmente a fin de resaltar el área y las dimensiones que abarca el corte sobre la pared abdominal que permite la obtención de los lóbulos ováricos.

Para algunos experimentos, también obtuvimos ovocitos desprovistos de las células foliculares (ovocitos desnudos o defoliculados), a los que aplicamos los protocolos de estimulación mecánica que serán descritos más adelante. Para la obtención de dichos ovocitos incubamos por 45 minutos folículos ováricos en

presencia de colagenasa con una concentración de 1 mg/ml disuelta en Ringer normal (RN) cuya composición fue la siguiente (en mM): 115 NaCl,

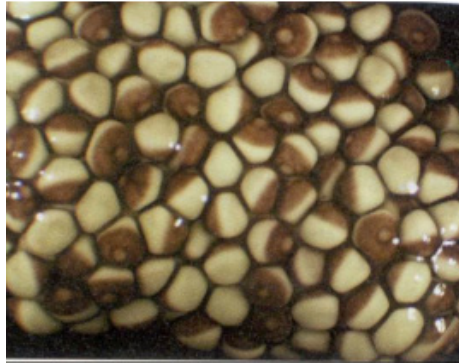


Figura 3. Fotografía de un lóbulo de ovario de *Xenopus* donde se observan los folículos dispuestos en racimo.

2 KCl, 1.8 CaCl₂, 5 HEPES, a pH de 7. Pasados los 45 minutos de incubación, realizamos tres tiempos de lavado de los folículos con RN, y subsecuentemente con ayuda de pinzas finas fueron removidos los remanentes de las capas foliculares.

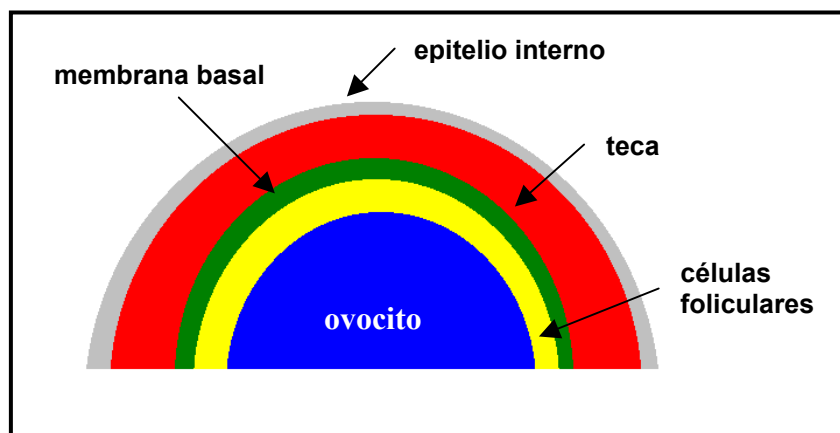


Figura 4. Esquema simplificado que muestra al ovocito y las diferentes capas celulares que lo envuelven.

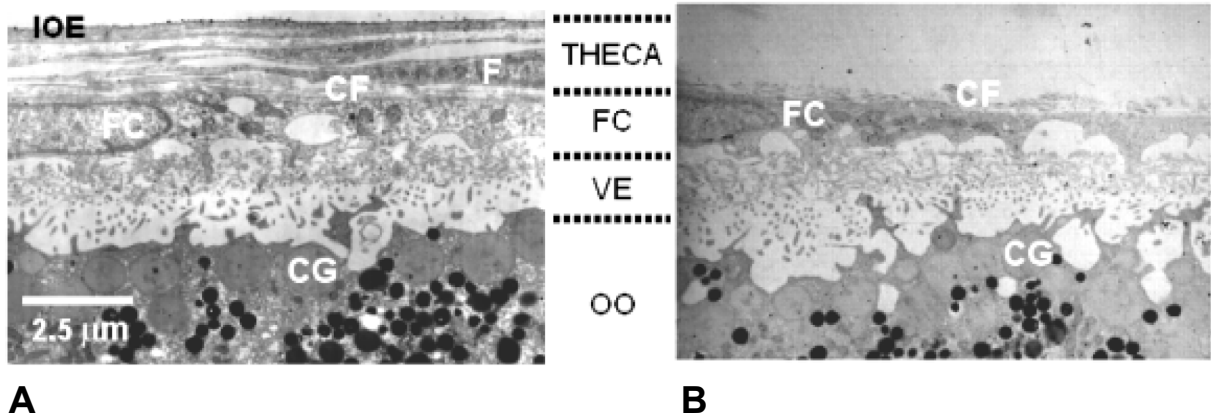


Figura 5. Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión que muestran 2 folículos en un corte tangencial. En **A** se muestra un folículo completo, en **B** la imagen corresponde a un folículo *e.t.r.* **IOE**- epitelio ovárico interno. **F**- células de la teca. **CF**- fibras de colágena de la membrana basal. **FC**- células foliculares. **VE**- envoltura vitelina.. **CG**- gránulos corticales. **OO**- ovocito. (Saldaña *et al.*, 2005).

Estimulación mecánica. La cámara de registro sobre la que colocamos los folículos *e.t.r.* y ovocitos consistió en un canal de 2 cm de largo, 3 mm de ancho y 4 mm de profundidad. En el fondo del canal, se colocó un pequeño receptáculo de cera en el cual se depositó la preparación, esto disminuyó su movilidad durante los protocolos de estimulación mecánica. El flujo de perfusión en la cámara de registro es unidireccional, y está facilitado por un sistema de presión negativa que recoge la solución proveniente de un matraz colocado a mayor altura con respecto a la cámara de registro. La solución usada fue RN (figura 6), durante el experimento las células fueron perfundidas continuamente con esta solución. Algunos experimentos, sin embargo, requirieron de estimular las células provocando el paro del flujo por algunos segundos (ver mas adelante). Utilizamos dos métodos de estimulación mecánica tanto para los folículos *e.t.r.* como para los ovocitos defoliculados, estos métodos son descritos a continuación.

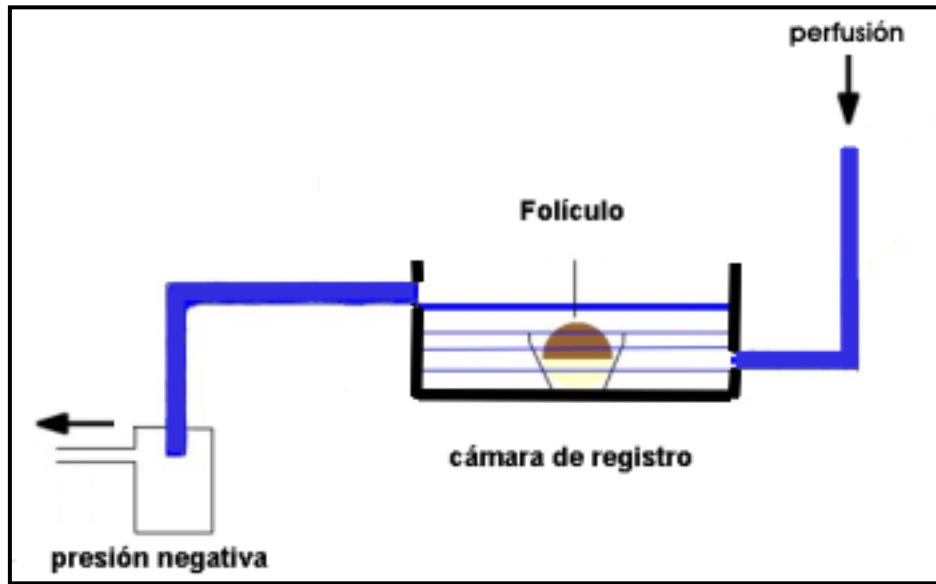


Figura 6. Esquema que muestra el sistema de perfusión que mantiene inmerso el folículo en RN.

Métodos de estimulación mecánica: A) En el primer método para estimular mecánicamente a las células, fue colocada una micropipeta llena con RN cerca (100 a 400 μm) de la superficie de la preparación. El tiempo de eyección de la solución RN desde esta pipeta fue controlada electrónicamente y la presión de salida fue regulada por un manómetro de gases a 15 psi. B). El segundo protocolo de estimulación mecánica consistió en el paro del flujo por algunos segundos (2-10 s) en la cámara de registro. La estimulación en este caso involucró dos componentes, uno al parar el flujo y el segundo al reiniciarlo (figura 7).

Es importante mencionar que en un experimento rutinario en el que se requieren cambios de solución, por ejemplo de RN a solución Ringer conteniendo ATP o ACh (ver figura 15 en resultados), es necesario parar el flujo por algunos segundos para realizar el cambio de la solución. Es decir, los cambios de solución experimental involucran una manipulación similar a la que ocurre cuando utilizamos el método B de estimulación, y de hecho los simples cambios de solución generaron corrientes mecánicas similares a las estudiadas aquí (ver e.g., Figura 16 en resultados).

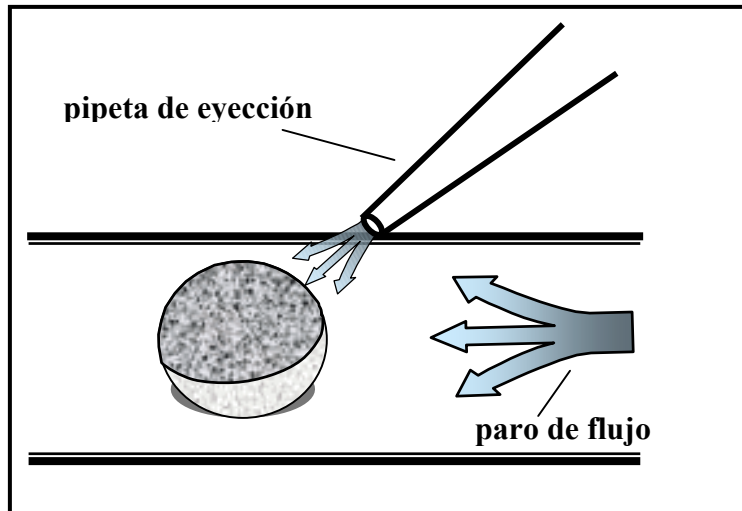


Figura 7. En la figura se esquematizan los dos métodos empleados para generar un estímulo mecánico en el folículo. La pipeta de eyección actúa a corta distancia del folículo afectando a un área delimitada de la preparación, mientras que el paro de flujo involucra una mayor área del folículo.

Registro electrofisiológico de las respuestas mecánicas. La técnica que fue empleada para registrar las corrientes activadas por estímulos mecánicos fue el control de voltaje, desarrollada por Marmont (1949). Esta técnica consiste en medir el flujo de corriente transmembranal en el complejo folicular que resulta de un procedimiento experimental. Para lo cual fueron insertados dos microelectrodos en el ovocito, ya sea en preparaciones de ovocito desnudo o en las de folículos *e.t.r.* Uno de estos electrodos mide constantemente el potencial de membrana, mientras que el otro suministra la corriente necesaria para contrarrestar los cambios de voltaje detectados por el primer microelectrodo, con lo que se constituye un sistema de retroalimentación donde el voltaje transmembranal del ovocito y/o el folículo permanece constante a un valor predeterminado (figura 8), y que es llamado potencial de mantenimiento. Teniendo controlado el potencial de membrana, la variable que se mide es la corriente iónica que atraviesa la membrana de la preparación. Estos cambios son detectados por un amperímetro en el medio externo. Es importante recordar que en el complejo folicular el ovocito y las células foliculares se encuentran altamente acoplados eléctricamente a través de uniones comunicantes, por lo que las respuestas eléctricas generadas

no son solo del ovocito en donde se encuentran insertados los electrodos, sino también aquellas generadas en la membrana plasmática de las células foliculares (Arellano & Miledi, 1993).

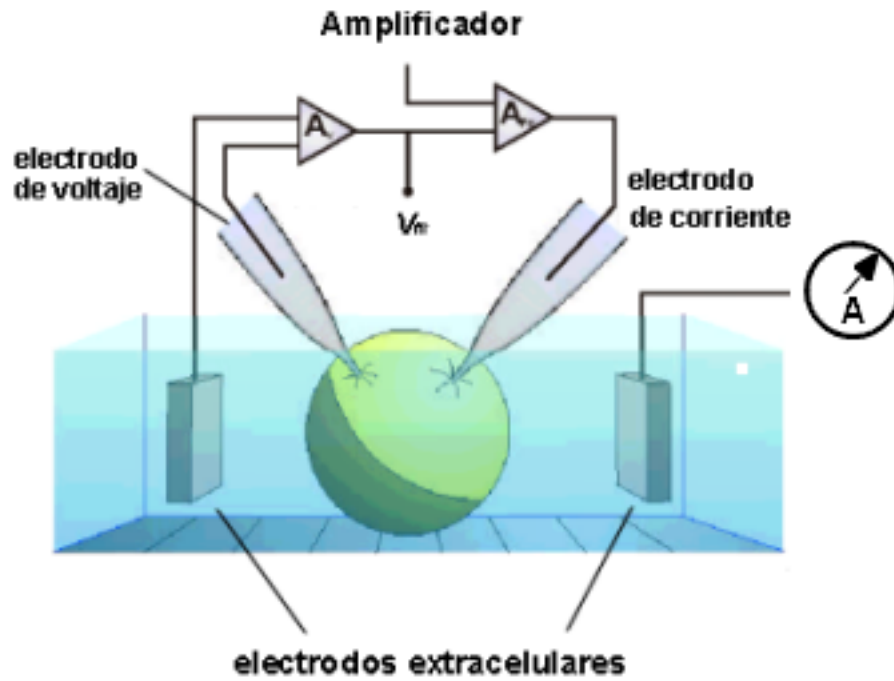


Figura 8. Esquema de la técnica de control de voltaje con dos microelectrodos en un folículo de *Xenopus*. Los electrodos intracelulares forman parte de un sistema de retroalimentación donde el electrodo de voltaje detecta cambios de potencial en el folículo, este valor es comparado con el valor del potencial de membrana preestablecido (potencial de mantenimiento), en caso necesario, el amplificador “inyectará” corriente a través del electrodo de corriente para regresar el potencial de membrana al valor deseado. Los electrodos extracelulares llevan a cabo dos funciones en el sistema, uno es el electrodo de referencia a tierra, y el segundo electrodo se encuentra conectado a un amperímetro.

Debido, al acoplamiento eléctrico es posible controlar el voltaje no solo de la membrana del ovocito sino también el de las células foliculares. De forma rutinaria en este trabajo el potencial de membrana se controló en un potencial de mantenimiento de -60mV , sin embargo diferentes protocolos requirieron el mantener el potencial a distintos valores, o pulsar momentáneamente el potencial a diferentes niveles. Esto se realizó principalmente en aquellos experimentos en lo que se estudió la dependencia al voltaje de las corrientes. Todas las sustancias utilizadas (e.g., ATP, ACh, Ca^{2+} , octanol, La^{3+} , suramina, etc.) fueron aplicadas a

través del flujo de perfusión de la cámara, con la excepción de la aplicación de etilen glicol-bis(2-aminoetil eter)-*N,N,N', N'*-ácido tetraacético (EGTA) que fue microinyectado directamente en el ovocito a través de una pipeta similar a la utilizada para el protocolo A de estimulación.

Substancias. ATP, ACh, apirasa, octanol, lantano y EGTA fueron obtenidas de Sigma Chemical (St. Louis, MO). Suramina se obtuvo de RBI (Natick, MA).

RESULTADOS

a) Características generales de las respuestas eléctricas producidas por estimulación mecánica (I_{mec})

Los folículos ($n=192$, 46 ranas) utilizados en el presente estudio presentaron, en solución de Ringer normal (RN), un potencial de reposo promedio de -36 ± 1.5 mV (todos los datos están expresados como promedio \pm S.E.), y una resistencia de entrada de 519 ± 115 K Ω . Estos valores están dentro de lo reportado previamente en varios estudios (e.g., Kusano et al., 1982; Arellano et al., 1996; Saldaña et al., 2004). A diferencia de estos parámetros observados para los folículos *e.t.r.*, los ovocitos defoliculados por tratamiento con colagenasa presentaron un potencial de reposo de -45.5 ± 10 mV y una resistencia de entrada de 2 ± 0.53 M Ω , el aumento en la resistencia de entrada es una característica asociada a la defoliculación eficiente, debido a la eliminación de las células foliculares que se encuentran en comunicación eléctrica con el ovocito (Arellano & Miledi, 1993; Arellano et al., 1996, 1998).

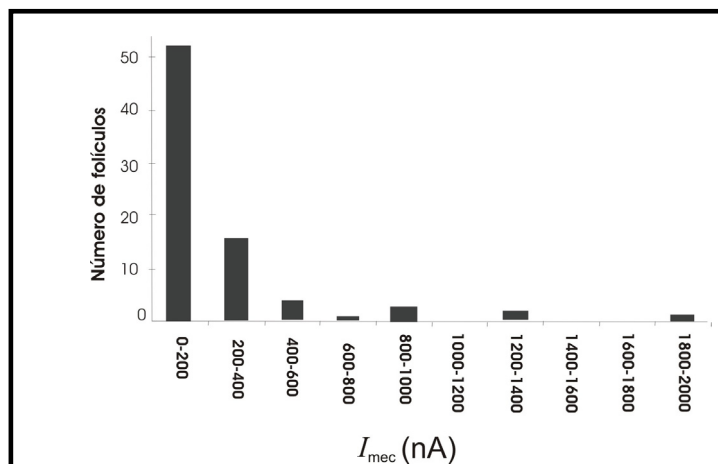


Figura 9. Distribución de los valores de amplitud de I_{mec} . Las barras muestran el número de folículos *e.t.r.* que generaron respuestas entrantes ante la estimulación mecánica.

Todos los folículos *e.t.r.* y ovocitos defoliculados fueron sometidos a estimulación mecánica según los dos protocolos detallados en la sección de métodos. En 41% de los folículos estudiados (79 de un total de 192 folículos), la estimulación mecánica provocó la generación de respuestas eléctricas. La amplitud de estas respuestas fue variable entre folículos provenientes de diferentes donadores. Sin embargo, en todos los casos, las respuestas eléctricas a la estimulación mecánica, correspondieron a corrientes entrantes asociadas con un aumento de la conductancia, en el presente estudio a estas respuestas las denominamos respuestas I_{mec} (corrientes iónicas generadas por estimulación mecánica). La amplitud promedio de las I_{mec} fue de 248.5 ± 223 nA en el total de folículos que generaron respuesta, la corriente mostró una desviación estándar amplia presentando corrientes en el rango de 15 nA a 2 μ A, como puede ser observado en el histograma de la Figura 9 donde fueron graficados el total de folículos que presentaron respuesta I_{mec} dentro de los diferentes rangos de amplitud especificados.

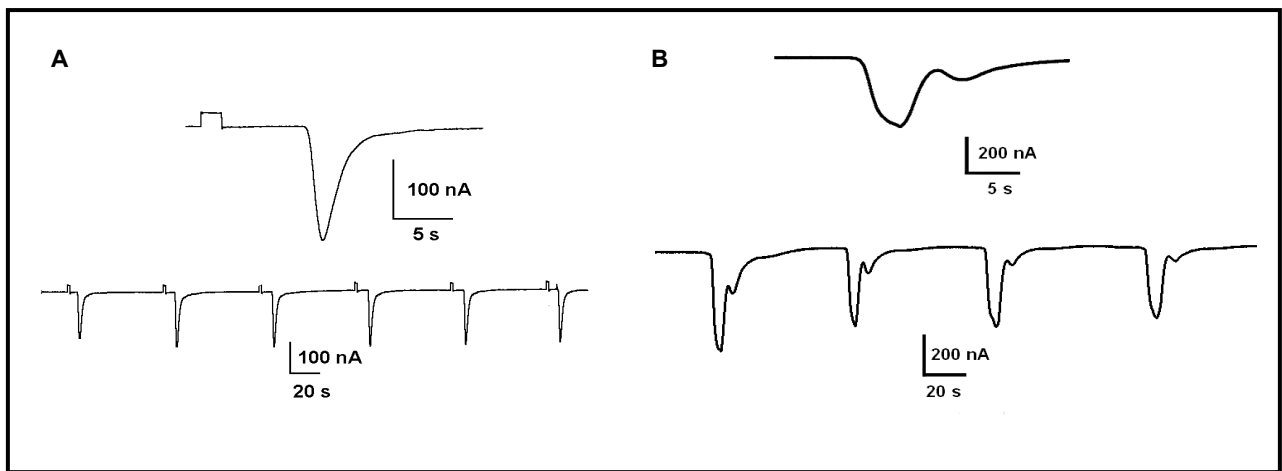


Figura 10. Respuestas I_{mec} típicas. Los trazos superiores en A y B muestran corrientes I_{mec} activadas por la pipeta de eyección y el paro de flujo respectivamente. Los trazos inferiores ejemplifican la consistencia de la respuesta ante estímulo repetitivo durante una ventana temporal de aproximadamente 5 minutos.

Las variaciones en la amplitud de I_{mec} observadas no parecen tener correlación clara con la temperatura, ni con cambios en la osmolaridad del medio externo, sin embargo, fue notorio que la generación de I_{mec} coincidió en la mayoría de los casos con folículos que presentaron corrientes F_{in} de mas de 300 nA (ver sección g.1)

b) Cinética de activación de la I_{mec}

Un segundo parámetro de I_{mec} que presentó marcada variabilidad fue su cinética, en general las respuestas mecánicas presentaron un retardo de varios segundos (1.5-10 s) independientemente del método utilizado para su activación, sin embargo, su generación presentó variaciones claras en el proceso de inactivación y en la presencia de 1 ó 2 componentes. Las variaciones anteriores dependieron claramente del método utilizado para su generación (ver Figura 10), por ejemplo, respuestas con 1 componente y de inactivación rápida (4 s) fueron generadas principalmente utilizando el método de eyección a través de una pipeta (método A) (Figura 10A). Por otro lado, utilizando el método B de paro de flujo, las respuestas generalmente presentaron dos componentes en las cuales, el primero no presentó inactivación o fue de cinética mas lenta (de varios segundos) (Figura 10B), mientras que un segundo componente presentó características similares a la respuesta generada por el método de eyección y correspondió temporalmente con el reinicio del flujo. Estas diferentes cinéticas de activación de I_{mec} están ilustradas en los ejemplos de la Figura 11. Es importante notar que en general, el primer componente en las corrientes generadas por el método B permanece activo por el tiempo que el flujo fue interrumpido, mientras que los componentes que coinciden con cambio en el grado de flujo ya sea por el método A, o en el reinicio del flujo por el método B, fueron de naturaleza transitoria.

Los folículos estudiados presentaron además diferencias en las amplitudes de los dos componentes, existiendo folículos que generaron I_{mec} con los dos componentes de similar amplitud (ver Fig. 11), o que solo presentaron principalmente uno de los dos componentes (folículos de 11 ranas). Estos

resultados sugieren que la generación de los diferentes componentes de las respuestas correspondieron a mecanismos de activación independientes.

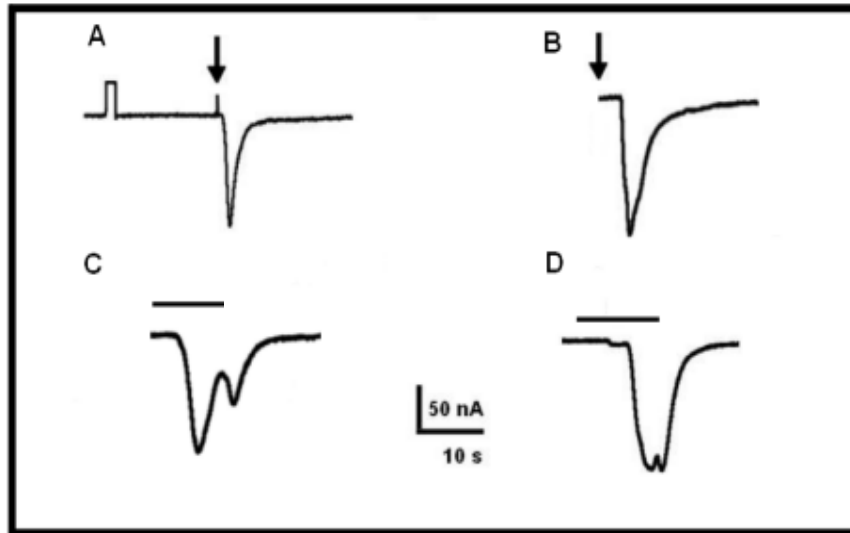


Figura 11. Variabilidad cinética de la I_{mec} producida por los métodos empleados para su activación. Los trazos en A, y B muestran ejemplos típicos de respuestas producidas utilizando el método A de eyección (señalizado por la flecha) mientras que C y D corresponden con I_{mec} generadas por paro de flujo (durante el tiempo señalado por la barra superior).

c) Papel de las células foliculares (c.f.) en la generación de I_{mec}

Las respuestas eléctricas producidas por diferentes estímulos en el folículo de *Xenopus* podrían ser generadas en el ovocito *per se* o en las células foliculares (c.f.). Cuando estas señales son monitoreadas a través de un arreglo que involucra la implantación de electrodos en el ovocito, es necesario discernir el origen de las respuestas. Esto es debido a que el acoplamiento eléctrico existente entre las c.f. y el ovocito provoca que las respuestas monitoreadas utilizando este arreglo son en realidad el resultado de la sumatoria de las corrientes que se generan en ambas membranas celulares (Arellano et al., 1996). Hasta ahora, los métodos mas usados para discernir el origen de las corrientes en el folículo, han sido la eliminación de las c.f. con técnicas enzimáticas o manuales (Miledi & Woodward, 1989; Arellano & Miledi, 1993), y el bloqueo farmacológico de la

comunicación eléctrica (Greenfield et al., 1990). Por ejemplo, es conocido que la respuesta F_{in} provocada por la aplicación de ACh (Arellano & Miledi, 1993) o por ATP (Arellano et al., 1998) se origina en las *c.f.*, ya que la respuesta es eliminada por completo en ovocitos defoliculados utilizando métodos tanto enzimáticos como manuales, y también por la aplicación de octanol, un agente que cierra las uniones comunicantes en un gran número de preparaciones celulares provocando su desacoplamiento (Arellano & Miledi, 1995). Para identificar el origen celular de la I_{mec} registrada en folículos *e.t.r.*, realizamos experimentos en los cuales fue eliminada la capa de *c.f.*, o fue interrumpida la comunicación eléctrica con la perfusión de octanol.

Tratamiento con octanol. En esta serie de experimentos fueron utilizados folículos ($n=3$) que presentaron respuestas I_{mec} de 215 ± 41.5 nA. Un registro típico es mostrado en la Figura 12, después de una serie de estímulos provocados con el método de eyección A y que generaron la I_{mec} control, el agente desacoplante octanol fue aplicado (flechas en el registro) directamente en la solución Ringer en una concentración de 1 mM. La respuesta I_{mec} disminuyó de amplitud hasta alcanzar valores de 36 ± 4 nA. El curso temporal del decaimiento de la corriente fue similar en los tres casos estudiados los cuales son resumidos en el gráfico de la Figura 13. En general, el octanol provocó una inhibición de aproximadamente el 90% de la corriente control en alrededor de 4 min de aplicación, misma que se recuperó hasta en un 83.2% durante el lavado (por 10 min) en solución Ringer.

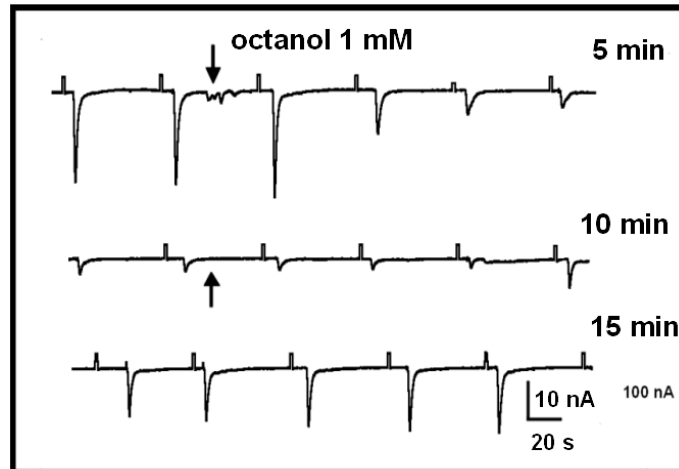


Figura 12. Efecto de octanol sobre la respuesta I_{mec} . Ejemplo de un fólculo con respuestas I_{mec} al estimular utilizando el método A de eyección, antes (registro control) y durante (inicio señalado por la flecha ↓) la aplicación de 1 mM octanol, así como su recuperación parcial durante el lavado (↑ en el segundo trazo) con Ringer normal.

Experimentos similares mostraron que en presencia de octanol la respuesta mecánica estimulada utilizando el método B fue inhibida de forma semejante. Esto último es importante, ya que mostró que si bien las respuestas mecánicas podrían presentar variaciones en los mecanismos de activación, ambos componentes de la respuesta requirieron de la participación de las *c.f.* como lo demuestran las dos técnicas utilizadas.

Defoliculación. Fólculos de donadores que presentaron una robusta respuesta I_{mec} , fueron tratados enzimáticamente y las capas externas removidas utilizando pinzas, la defoliculación lograda por este medio provocó la pérdida total a la sensibilidad a estímulos mecánicos independientemente del método utilizado (Figura 14). Fueron registrados 16 ovocitos defoliculados, de los cuales 14 no mostraron respuesta mecánica, mientras que solo dos mantuvieron corrientes menores a 30 nA. Los fólculos *e.t.r.* (n=17) de las mismas ranas presentaron una I_{mec} promedio de 247 ± 130 nA.

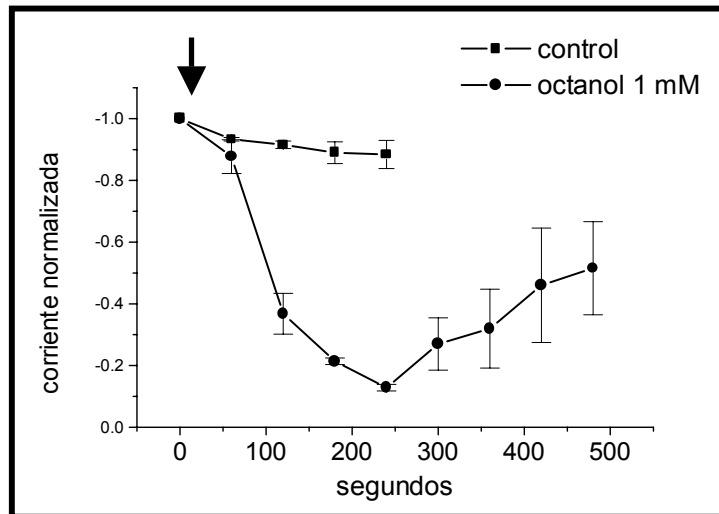


Figura 13. Curso temporal de la inhibición de octanol sobre la I_{mec} . Los cuadros representan la I_{mec} normalizada en condiciones control, y los círculos muestran el comportamiento de I_{mec} en la presencia de 1 mM octanol (aplicado en ↓). Cada punto representa el promedio de 3 folículos de 2 ranas.

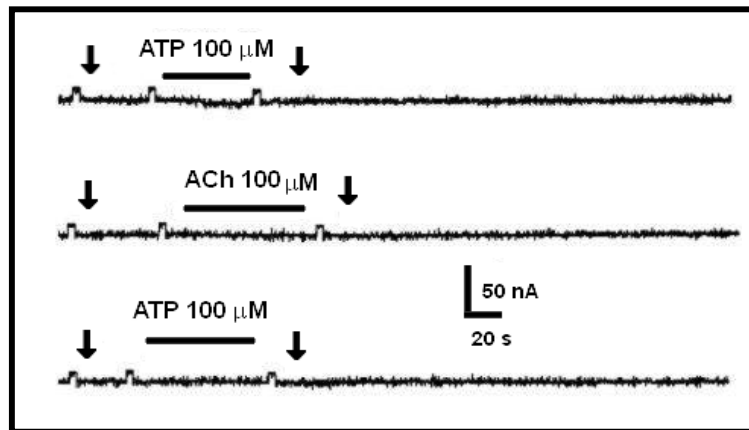


Figura 14. Efecto de defoliculación sobre I_{mec} . Las flechas indican la aplicación de estímulos mecánicos sobre ovocitos defoliculados utilizando el protocolo A. Previamente fue demostrada la presencia de respuestas I_{mec} en folículos *e.t.r.* Las barras negras muestran también el tiempo de aplicación de ATP o ACh, en los ovocitos defoliculados fueron eliminadas tanto las corrientes F_{in} como la respuesta I_{mec} .

d) Bases iónicas de la I_{mec}

Para definir los iones que acarrean la corriente durante la generación de I_{mec} , fueron realizados estudios de dependencia al voltaje de la corriente y de sustitución iónica en el medio externo. La relación que guarda la amplitud de I_{mec} con respecto al voltaje transmembranal (relación I/V) fue construida midiendo la respuesta generada en 26 folículos mientras se mantuvo el potencial en diferentes valores en el rango de -120 a +20 mV como lo muestra la Figura 15A. Todos los valores de amplitud obtenidos en los diferentes potenciales fue promediado y graficado en la curva mostrada en la Figura 15B.

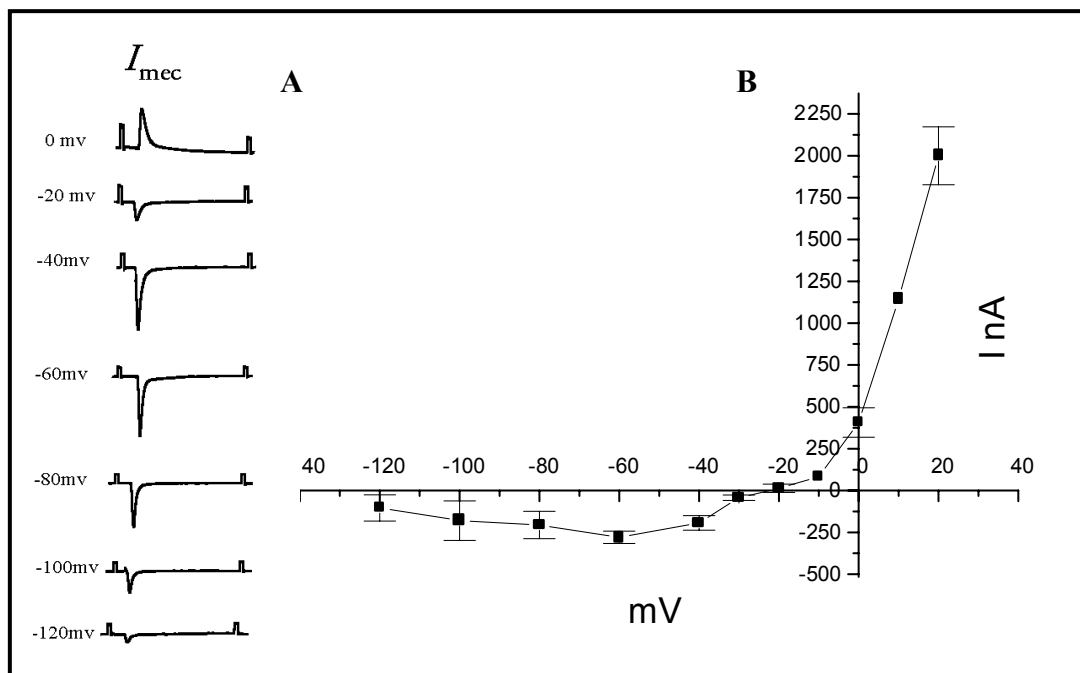


Figura 15. En **A**, Mostramos la secuencias de estimulación llevando al folículo de -120 a 0 mV. En **B**, curva I/V promedio obtenida de 25 folículos. El E_{inv} se localiza alrededor de -20 mV, lo que corresponde con el E_{inv} para Cl^- .

Puede ser observado que la respuesta I_{mec} invirtió de polaridad en potenciales (i.e., potencial de inversión E_{inv}) en el rango de -15 a -25 mV, con un valor promedio de -23.5 mV. La relación I/V muestra una fuerte rectificación en potenciales negativos lo cual indica que existe un componente voltaje-dependiente de la respuesta, sin embargo no fue explorado si esta dependencia fue debida al comportamiento intrínseco de los canales o al mecanismo de generación de I_{mec} . El valor del potencial de inversión de la corriente sugiere que el principal ión involucrado en la generación de I_{mec} fue el Cl^- , dado que el potencial de equilibrio (E_{eq}) para este ión en el folículo de *Xenopus* es de alrededor de -20 mV (Arellano & Miledi, 1993; Arellano et al., 1996), valor que es muy diferente a los E_{eq} de los demás iones importantes en la solución Ringer como K^+ con un valor de -100 mV, el de Na^+ de $+50$ mV, y el de Ca^{2+} de alrededor de $+60$ mV.

Para confirmar esta sugerencia realizamos experimentos en donde los principales iones en la solución Ringer fueron substituidos. En general, estas substituciones resultaron en la modificación de la amplitud de las respuestas I_{mec} . Por ejemplo, el cambio más dramático fue la eliminación total de la respuesta (2 folículos de 1 rana) cuando todo el Cl^- en la solución Ringer fue substituido por iones SO_4^{2-} . Este efecto no es predicho por la ecuación de Nernst ya que lo esperado es un corrimiento del potencial de inversión (E_{inv}) hacia valores positivos. Efectos similares de la eliminación de I_{mec} fueron provocados por otros cambios de iones en el medio, por ejemplo, la substitución de Na^+ por $NMDG^+$ (2 folículos de 1 rana), y en los cambios en la concentración de Ca^{2+} (ver sección siguiente). Estos resultados parecen indicar que el mecanismo de generación de la respuesta I_{mec} tiene un factor sensible a los cambios de ambiente iónico, efecto que no fue explorado con más detalle. Sin embargo, es claro que la corriente presentó pocos cambios al substituir todo el Na^+ por K^+ en el medio extracelular (5 folículos de 2 ranas) lo cual indicaría que el Na^+ no es necesario para la generación de la corriente. Resultados de modificación del E_{inv} por substitución de Cl^- fueron observados en 4 folículos al substituir solo el 50% del Cl^- en la solución Ringer por iones SO_4^{2-} , en estos casos el potencial de inversión cambió de los valores control de -24 mV a valores cercanos de 0 mV, sin embargo, aun la disminución del 50%

de Cl^- afecto de forma importante la amplitud de la respuesta. Resultados más consistentes fueron observados al substituir por diferentes aniones al Cl^- (7 folículos de 3 ranas), en estos casos la eliminación de la respuesta no existió o fue menor y en general iones como I^- y NO_3^- provocaron un cambio del E_{inv} de I_{mec} a valores mas negativos (-60 mV y -48.5 mV, respectivamente) (Figura 16). Estos experimentos fueron realizados controlando el voltaje de los folículos en diferentes valores (-60, -30, -20 y 0 mV) mientras se provocó la generación de I_{mec} en soluciones donde fue substituido todo el NaCl por NaI y NaNO_3 . Los resultados indicaron que estos iones permean mejor a través de los canales activados, reforzando la idea de que durante I_{mec} fueron activados canales aniónicos.

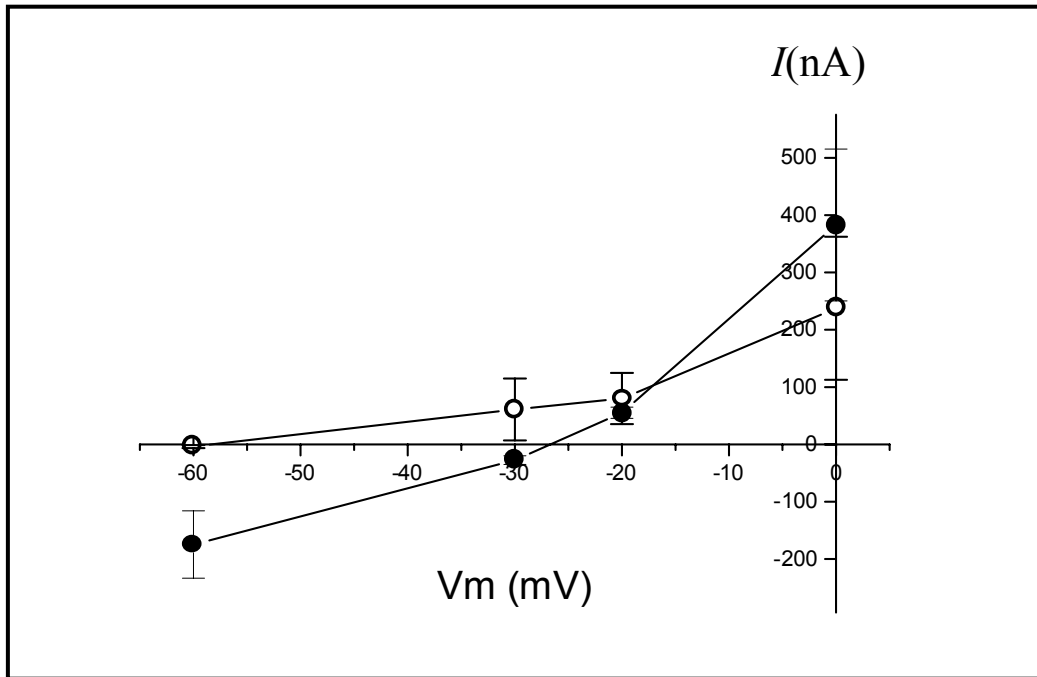


Figura 16. Curvas I/V de I_{mec} en soluciones donde el Cl^- fue substituido por I^- . Círculos negros, folículos estimulados en RN. Círculos vacíos, respuestas activadas en presencia de una solución donde fue substituido el NaCl por NaI.

e) Papel de Ca^{2+} en la generación de I_{mec}

Efecto de variaciones en la concentración de Ca^{2+} extracelular. En varios sistemas celulares sensibles a estímulos mecánicos, los mecanismos de respuesta incluyen eventos que dependen del influjo de Ca^{2+} extracelular hacia el citoplasma (Romero & Romero, 1999; Shen *et al.*, 2003). Este influjo, en algunos casos, ha sido mostrado que involucra la apertura de canales mecanosensibles permeables a este importante catión (Zhang & Hamill, 2000). La expresión endógena de canales mecanosensibles en la membrana del ovocito de *Xenopus* es bien conocida (Methfessel *et al.*, 1986) y ha sido utilizado como modelo para el estudio de estas moléculas (Hamill & Martinac, 2001). Los canales mecanosensibles del ovocito son permeables a Ca^{2+} y podrían estar implicados en la generación de las respuestas I_{mec} . Si esta hipótesis es correcta las variaciones de Ca^{2+} extracelular provocarían cambios en la amplitud de la corriente estimulada mecánicamente, por lo cual realizamos experimentos en los cuales estimulamos los folículos en ausencia de Ca^{2+} (substituido por 11.8 mM Mg^{2+}), y en una solución conteniendo 11.8 mM Ca^{2+} .

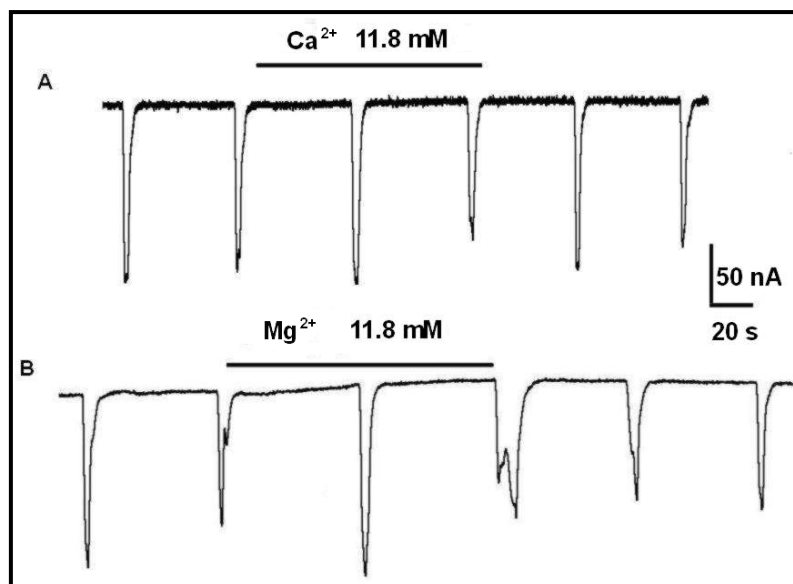


Figura 17. Efecto de alto y cero calcio extracelular sobre I_{mec} . Las líneas horizontales indican el tiempo de aplicación de las dos soluciones en A y B. En estos experimentos no fue observado un efecto importante durante los cambios en la concentración del calcio extracelular en la I_{mec} , resultados similares fueron obtenidos en dos folículos.

Los protocolos típicos de estos experimentos son mostrados en las Figuras 17-18, y consistieron en registrar la respuesta control I_{mec} provocada por alguno de los métodos descritos, después la solución externa fue reemplazada por soluciones conteniendo cero o alto Ca^{2+} , observando las modificaciones en la amplitud de la corriente en estas soluciones de prueba. De un total de 10 folículos en alto Ca^{2+} y de 8 en baja concentración fueron obtenidos los valores mostrados en la gráfica de la Figura 19.

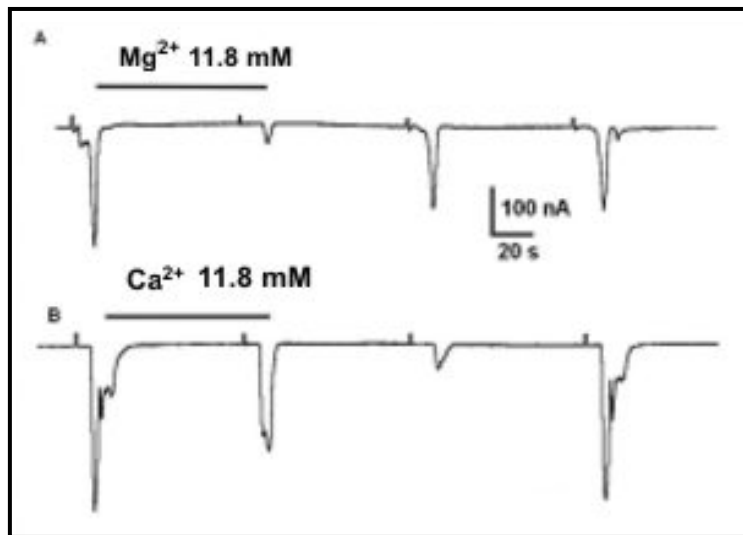


Figura 18. Efecto de calcio extracelular sobre I_{mec} Se ilustran las respuestas en un folículo donde el cambio de la concentración de calcio extracelular en B provocó disminución de la respuesta. Este efecto fue observado en un total de 7 folículos. En A no se observa un efecto importante.

En resumen, los folículos en alto Ca^{2+} mostraron en el 90% de los casos, un aumento en la corriente de aproximadamente el $20 \pm 10.83\%$ del valor control, mientras que las respuestas registradas en bajo Ca^{2+} mostraron una disminución del $56 \pm 21\%$. Sin embargo, en algunos experimentos (2 folículos los cambios en amplitud de la I_{mec} no fueron consistentes con este comportamiento, observando que aumento o disminución de Ca^{2+} provocó cambios opuestos, es decir el aumento de Ca^{2+} provocó disminución de la corriente y la eliminación de Ca^{2+} generó un aumento de I_{mec} . Estos últimos resultados parecen coincidir con aquellos en donde un cambio en la composición de diferentes iones

extracelulares, tiene efectos en la amplitud de la corriente. En conjunto los resultados apoyan la idea de que el Ca^{2+} extracelular podría tener un efecto modulador sobre la corriente I_{mec} pero no parece ser un ión fundamental para la generación de la respuesta.

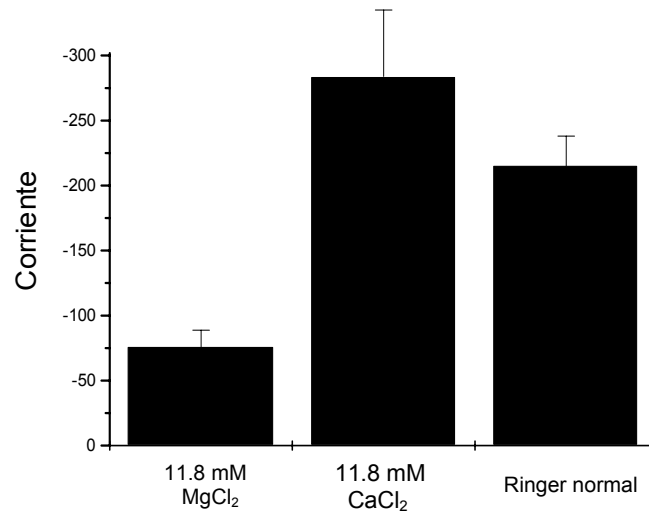


Figura 19. Amplitudes promedio de la I_{mec} obtenida en soluciones conteniendo bajo y alto calcio.

Papel del Ca^{2+} intracelular. Con la finalidad de corroborar los resultados anteriores, la siguiente serie de experimentos fue diseñada para evaluar en forma más directa si un aumento del Ca^{2+} intracelular podría tener algún papel en la generación de I_{mec} . Para estos experimentos fue utilizada una metodología que ha mostrado ser eficiente en la eliminación de corrientes dependientes de Ca^{2+} en el ovocito; principalmente de la corriente de Cl^- dependiente de Ca^{2+} activada a través de receptores de membrana o de la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Arellano *et al.*, 1996). El método consiste en inyectar un quelante de iones Ca^{2+} en el interior del ovocito a través de una micropipeta, esta sustancia quelante evita el aumento de la concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma con la suficiente rapidez para eliminar respuestas que requieren de este ion como segundo mensajero. Por ejemplo, se ha mostrado que la estimulación con ácido lisofosfatídico contenido en el suero (Miledi, 1982) genera

en el ovocito una corriente de Cl^- dependiente de Ca^{2+} . En este caso la aplicación del suero activa receptores endógenos en la membrana que estimulan la liberación de calcio desde reservorios intracelulares, generando la corriente oscilatoria típica del ovocito. Una vez cargados los ovocitos con EGTA la misma aplicación de suero no es capaz de provocar la respuesta, lo cual es debido a la imposibilidad de un aumento de Ca^{2+} (Miledi & Parker, 1984)). Estos mismos efectos pueden ser obtenidos estimulando otros receptores endógenos como los de angiotensina II o activando canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje (Miledi, 1982; Miledi & Parker, 1984). Experimentos similares fueron efectuados registrando la respuesta I_{mec} , en los mismos folículos, antes y después de ser cargados con EGTA. Un ejemplo de estos experimentos es ilustrado en la Figura 20, en el trazo se puede observar la respuesta I_{mec} control, y su generación después de que el folículo fue cargado con EGTA (ca. 500 pmol) a una concentración similar o mayor a la necesaria para eliminar respuestas dependientes de Ca^{2+} , en todos los casos estudiados (3 folículos) el cargado de EGTA no eliminó la respuesta I_{mec} .

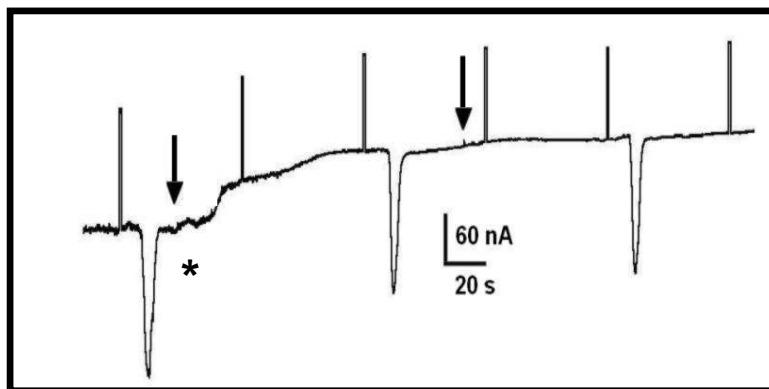


Figura 20. Efecto de EGTA intracelular sobre I_{mec} . Las flechas indican la inyección intracelular de EGTA mediante una micropipeta. Las respuestas mecánicas fueron estimuladas cada 120 s utilizando el método A. En los primeros 70 segundos del registro se observa que la corriente basal oscila (asterisco negro), esto es debido a la corriente espontánea de Cl^- denominada $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$, que fue eliminada segundos después de la inyección del EGTA.

De forma importante, en el mismo registro se observa la disminución de una corriente entrante basal que disminuye substancialmente durante el proceso de

cargado con EGTA (indicado por las flechas) con el quelante, es común que los ovocitos presenten una corriente basal de este tipo, debido a un nivel elevado de activación de corrientes dependientes de Ca^{2+} , el efecto de EGTA sobre esta corriente se evidenció por la disminución de la corriente oscilatoria observada como ruido basal durante el trazo previo a la inyección del quelante. Estas observaciones muestran claramente que el cargado con EGTA eliminó eficientemente corrientes que dependen del Ca^{2+} intracelular, y que en los mismos folículos la I_{mec} no fue afectada.

f) Bloqueo de canales mecanosensibles

Aun y cuando la poco probable participación de Ca^{2+} en la generación de I_{mec} quedó sustentada con el resultado de los experimentos referidos en el apartado anterior, y la naturaleza aniónica de la corriente, fue necesario realizar un estudio farmacológico que pudiera ayudar a definir un posible papel de la activación de receptores mecanosensibles durante el mecanismo que genera la respuestas. Para esto, utilizamos como herramienta farmacológica al catión trivalente La^{3+} que ha mostrado ser un bloqueador efectivo de varios canales mecanosensibles, y en especial los canales nativos del ovocito de *Xenopus* (Hamill & Martinac, 2001). En estos experimentos la respuesta I_{mec} fue generada en la ausencia y en presencia de La^{3+} en concentraciones de 10 a 100 μM . En dos casos estudiados la perfusión de La^{3+} inhibió parcialmente (40%) la generación de I_{mec} , sin embargo, en concentraciones supramáximas de bloqueo de canales mecanosensibles (100 μM) fue incapaz de bloquear la respuesta (Figura 21). Este resultado corroboró que la activación de canales mecanosensibles no fue fundamental para la generación de I_{mec} .

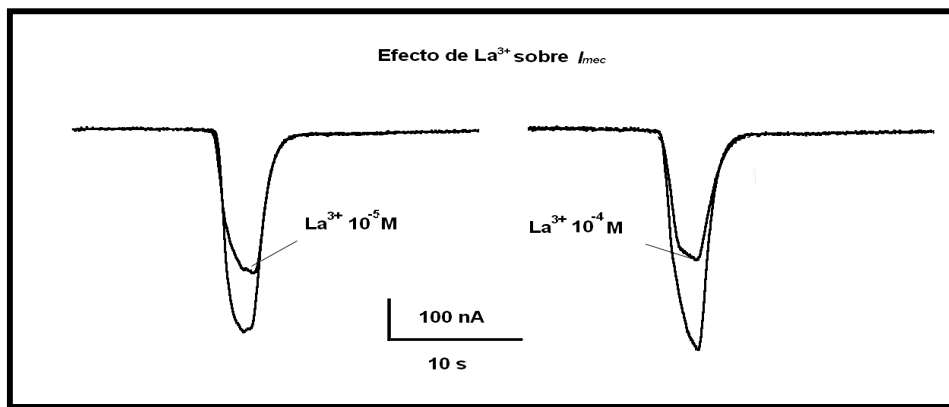


Figura 21. Efecto de La^{3+} sobre la generación de I_{mec} . Los trazos muestran respuestas I_{mec} superimpuestas en condiciones control y en la presencia de dos concentraciones máximas de La^{3+} , los registros controles de cada caso corresponden a las respuestas previas producidas en Ringer normal.

g) Interacciones de la corriente folicular F_{in} con la respuesta I_{mec}

La caracterización de corrientes aniónicas en el folículo de *Xenopus* ha sido tema de investigación por varios años, esto debido a varios factores, principalmente a la pertinencia del ovocito y el folículo como modelos celulares, y a su uso como sistema de expresión a través de la inyección del RNA mensajero que codifica para diferentes proteínas. De esta forma se tiene información de varios de los tipos de canales aniónicos que se encuentran de forma nativa en las membranas del folículo, por ejemplo, es conocida la expresión de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} en la membrana del ovocito (Kusano *et al.*, 1982), de canales de Cl^- sensibles a voltaje (Miledi & Parker, 1986, 1987), y de canales de Cl^- independientes de Ca^{2+} en la membrana de las células foliculares (Arellano & Miledi, 1993). En esta última categoría están incluidos canales de Cl^- cuya apertura genera una corriente rápida y transitoria que fue denominada F_{in} y que se activa por la estimulación de receptores a ACh (Arellano & Miledi, 1993) tipo muscarínico o de receptores purinérgicos (Arellano *et al.*, 1996, 1998). La siguiente serie de experimentos fue desarrollada para conocer la posible relación que guarda la activación y características de la corriente F_{in} con aquellos responsables de la respuesta I_{mec} , ya que como veremos mas adelante la similitud

de las características de estas dos corrientes sugiere la activación de un tipo común de canal aniónico.

g.1) Paralelismo entre la expresión de F_{in} e I_{mec} en folículos de un mismo donador.

Los 196 folículos estudiados fueron estimulados para evaluar la presencia de corrientes F_{in} mediante la aplicación de ACh o ATP (100 μ M). La ACh fue aplicada a 128 folículos (65%), de estos la F_{in} fue generada en 95%, presentando una amplitud promedio de 369 ± 288 nA, distribuidas en el rango de 25 nA a 2.4 μ A. Por su lado, el ATP (Figura 22) fue aplicado a 136 folículos, de los cuales el 89% mostraron respuestas con un promedio de 369 ± 300 nA, en el rango de 30 nA a 1.9 μ A. Del total de datos es claro que aquellos folículos que presentaron las amplitudes mayores de respuesta F_{in} a ACh o ATP generaron también respuestas I_{mec} de mayor amplitud. Por ejemplo, folículos (n=6) con amplitudes promedio de F_{in} provocada por ATP de 421 ± 59 nA, presentaron una I_{mec} promedio de 225 ± 96 nA, mientras que folículos (n=6) con una F_{in} promedio de 198 ± 44 nA presentaron una baja respuesta I_{mec} de 71 ± 29 nA.

También, la baja expresión de respuestas F_{in} puede ser inducida por el mantenimiento de los donadores por debajo de los 15 °C (datos no reportados del laboratorio), utilizando donadores mantenidos en estas condiciones la generación de respuestas I_{mec} también fue reducida de forma importante registrando corrientes no mayores a 20 nA en 4 folículos de 2 ranas. En conjunto estos datos sugieren un paralelismo entre la disponibilidad de los canales F_{in} y la eficiencia con que las respuestas I_{mec} fueron generadas.

Propiedades electrofisiológicas comunes entre las respuestas F_{in} e I_{mec} . Al igual que las corrientes I_{mec} en este estudio corroboramos los datos que muestran que el E_{inv} de la corriente F_{in} en soluciones Ringer normal fue de alrededor de -25 mV (Figura 24), tal y como ha sido mostrado en trabajos previos (Arellano & Miledi,

1993; Arellano et al., 1998), también experimentos realizados en soluciones donde el NaCl fue substituido por las sales correspondientes de I^- y NO_3^- mostraron que el E_{inv} se recorrió a valores mas negativos (alrededor de -60 mV y -40 mV respectivamente), indicando que al igual que los canales de I_{mec} , los involucrados en F_{in} también fueron mas permeables a estos aniones (Arellano et al., 1998) (Figura 23).

Además de la correspondencia en el grado de expresión de las dos respuestas en el mismo folículo y de la similitud en la permeabilidad para diferentes aniones, otras similitudes entre las respuestas F_{in} e I_{mec} incluyen: 1) la dependencia de las dos respuestas a la comunicación entre ovocito y células foliculares, es bien sabido que las corrientes F_{in} son de origen folicular (Arellano & Miledi, 1993), y en el presente trabajo mostramos que las respuestas I_{mec} requieren del acoplamiento entre estos dos tipos celulares (secc. C). 2) las dos respuestas no dependen para su generación de un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular (secc. D), y 3) las respuestas tienen una cinética semejante principalmente en los parámetros relacionados con retardo de generación en la respuesta y activación. Todas estas características comunes sugirieron que existe una relación de identidad entre los canales de Cl^- responsables de la respuesta F_{in} y los de la I_{mec} , la siguiente serie de experimentos fue diseñada para analizar con mayor detalle y de forma más directa si esta relación es verdadera.

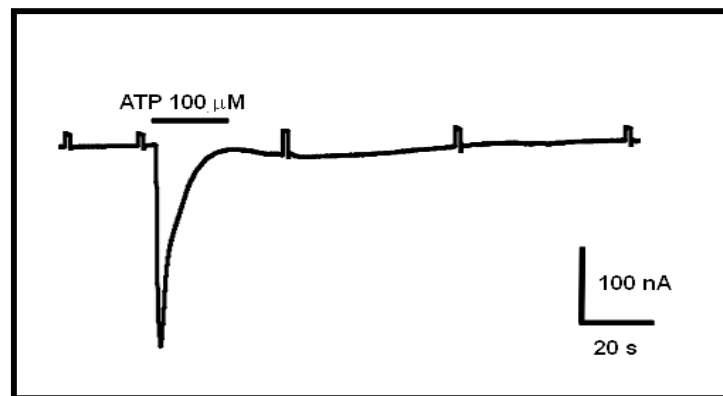


Figura 22. Activación de F_{in} por ATP. Corriente F_{in} típica en un folículo e.t.r. estimulada por ATP. La barra superior señala el tiempo de perfusión del agonista.

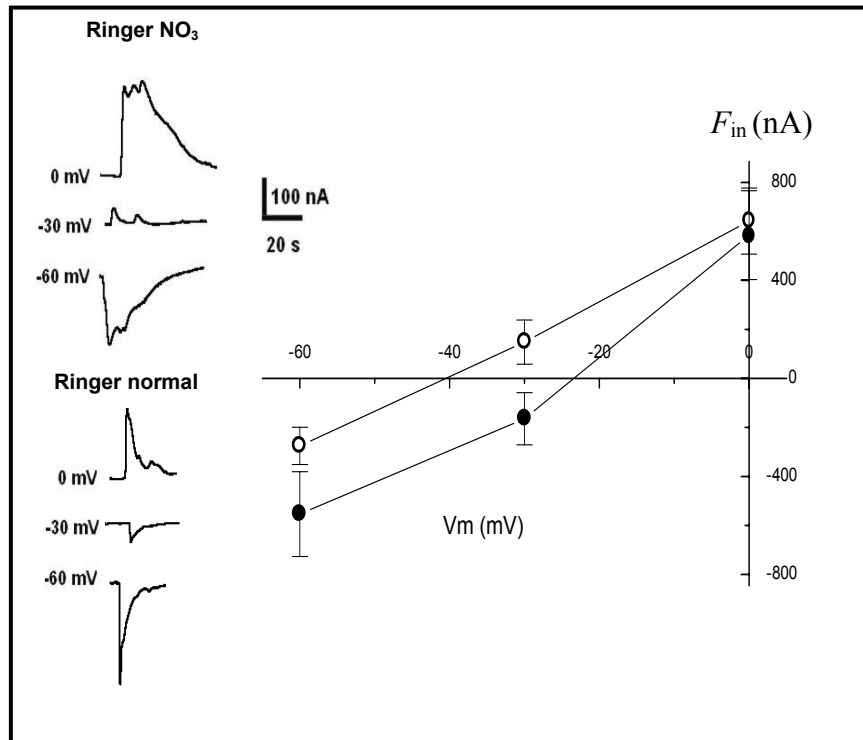


Figura 23. Curvas corriente-voltaje de F_{in} activada por aplicación 100 μ M de ATP. F_{in} generadas en folículos en presencia de Ringer normal (círculos negros) o Ringer NO_3 (círculos vacíos). La gráfica muestra los promedios de las amplitudes de corriente en ambas soluciones para los tres potenciales de mantenimiento.

g.2)- Interacción de la respuesta I_{mec} con F_{in} activada por ACh o ATP

Si el planteamiento anterior sobre la identidad común de I_{mec} y F_{in} es cierta, la primera pregunta que tratamos de resolver fue saber si existen puntos comunes en los mecanismos de activación de ambas corrientes (además de su independencia a Ca^{2+}), que nos permitan sugerir un mecanismo común de generación. Es sabido que la interacción en las cascadas de señalización es algo común sobre todo cuando son activados mecanismos convergentes, así por ejemplo, en el mismo folículo ha sido observado que receptores acoplados a fosfolipasa C presentan potenciación cuando son activados en niveles subumbrales (Miledi et al., 1989), y la facilitación farmacológica de la vía de

síntesis o degradación de AMPc tiene efectos importantes en la activación de corrientes de K^+ que son activadas por esta vía (Arellano et al., 1996). De forma semejante, hemos realizado experimentos de coaplicación de alguno de los agonistas de F_{in} , ACh o ATP, con la generación simultánea de I_{mec} . Por lo tanto, si existe convergencia de las señales que activan a una y otra respuesta es de esperarse que se observen cambios sobre I_{mec} durante su cogeneración.

Inhibición de I_{mec} por F_{in} . El resultado más claro de interacción fue observado en la mayoría de los folículos ($n > 100$) que fueron probados con 10-100 μ M de ACh o ATP en donde la generación de F_{in} produjo una fuerte (100%) y prolongada (2-4 min) inhibición sobre I_{mec} . Este tipo de experimentos es ilustrado en el trazo de la Figura 24 los folículos que presentaron generación de I_{mec} regularmente responden en el momento de cambiar la solución de RN a Ringer conteniendo el agonista por que esta maniobra implica el paro de flujo (método B) por 3-6 segundos, en este lapso entonces se generó una respuesta I_{mec} , de forma inmediata a la generación de la respuesta mecánica fue activada la corriente F_{in} que alcanzó un pico y presentó inactivación en presencia del agonista. Durante el cambio de el Ringer conteniendo el agonista al RN (lavado), maniobra que implicó un segundo paro de flujo, la corriente I_{mec} fue eliminada por completo en la mayoría de los casos, este efecto fue independiente del agonista utilizado para la activación de F_{in} , y sugiere fuertemente una interacción entre los mecanismos de activación que llevan a la apertura de los canales responsables de las respuestas F_{in} e I_{mec} .

Es notorio que la inhibición completa de la respuesta I_{mec} es observada aun y cuando la corriente F_{in} no se ha inactivado por completo, esto sugirió que el mecanismo de inactivación de los canales de Cl^- no es el único mecanismo implicado en el proceso de inhibición de la respuesta mecánica. Resultados semejantes fueron obtenidos en 61 folículos de 27 donadores y fueron independientes del agonista utilizado (ACh o ATP) para la activación de F_{in} . En conjunto el resultado de estos experimentos muestran que existe una clara

interacción entre los mecanismos celulares que subyacen a las respuestas F_{in} e I_{mec} .

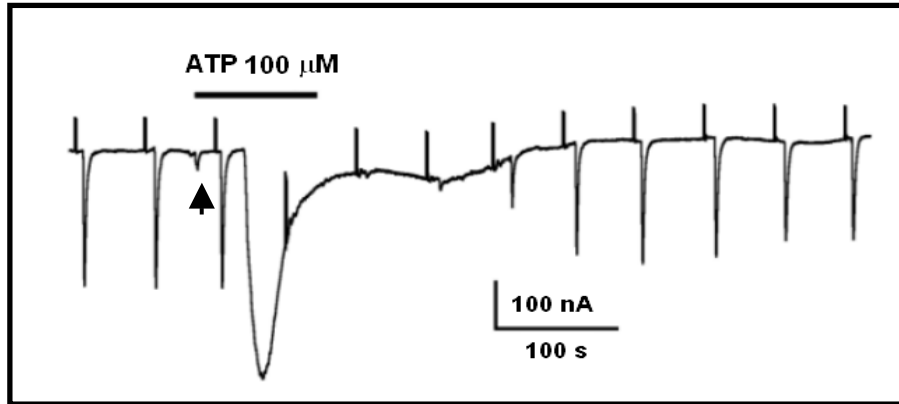


Figura 24. Inhibición de I_{mec} producida por la aplicación de 100 μ M ATP. Respuestas I_{mec} fueron activadas mecánicamente utilizando el método A, el pulso de estimulación fue aplicado 100 ms después de los pulsos a -40 mV cada 60 s. F_{in} fue activada por la aplicación de ATP (indicada por la barra), este cambio de solución generó una corriente I_{mec} señalada con la flecha hacia arriba. Los estímulos mecánicos continuaron durante el desarrollo de la F_{in} , señalados por los pulsos a -40 mV, y es notoria la inhibición producida sobre la I_{mec} durante la fase de inactivación de la corriente F_{in} estimulada por el agonista.

Potenciación de las respuestas I_{mec} por F_{in} . Un segundo tipo de interacción entre los mecanismos de activación de las corrientes en estudio fue la potenciación de las respuestas I_{mec} durante o después de la generación de F_{in} . Cuando las respuestas, tanto I_{mec} como F_{in} , fueron activadas con estímulos subumbrales existió un periodo en el cual fue observada una clara potenciación de la respuesta I_{mec} , estos resultados son ilustrados en la Figura 25. De forma semejante a los experimentos descritos en el apartado anterior, la respuesta I_{mec} fue generada aplicando un pulso de eyección, en esta ocasión el estímulo fue de baja intensidad y provocó una respuesta de pequeña amplitud, después del registro control de esta respuesta fue aplicado en el medio 1 μ M de ACh o de ATP, concentración que está alrededor de la dosis media de activación de los agonistas para F_{in} (Arellano *et al.*, 1998, 1999). La amplitud de la respuesta I_{mec} durante la generación de F_{in} presentó de forma consistente dos efectos. Primero, durante la

fase de activación de F_{in} , la respuesta I_{mec} fue potenciada hasta por más de 10 veces como es el caso del ejemplo mostrado, segundo, durante la fase de inactivación de la corriente F_{in} , nuevamente la respuesta I_{mec} fue inhibida, sugiriendo otra vez que el efecto de inhibición podría no ser solamente debido a la inactivación de los canales aniónicos. Resultados semejantes fueron obtenidos en 3 folículos de 2 ranas.

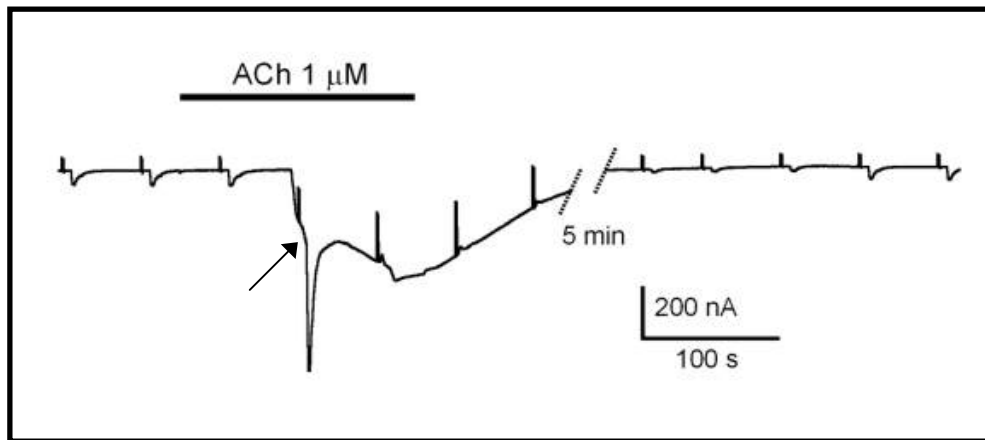


Figura 25. Potenciación de I_{mec} durante el pico de activación de la F_{in} . La respuesta I_{mec} de baja intensidad fue activada en forma semejante a los experimentos de la figura 24. La cuarta estimulación mecánica (flecha) fue aplicada en la primera fase de generación de la F_{in} por ACh, y ésta resultó en una respuesta I_{mec} potenciada varias veces en amplitud. Posteriormente la respuesta mecánica sufrió una fuerte inhibición y no se recuperó hasta después de 5 minutos de lavado. La concentración de ACh utilizada fue de 1 μ M para evitar una rápida inactivación de la corriente F_{in} .

Un segundo tipo de potenciación de I_{mec} fue observado en varios folículos ($n=5$, 3 ranas) después de la aplicación de ACh o ATP y de la consecuente generación y lavado de la respuesta F_{in} , estos resultados son ilustrados en la Figura 26. El trazo muestra la respuesta de un folículo ante la aplicación de 100 μ M ATP mientras que un estímulo mecánico fue aplicado cada 60 s, puede observarse que después de la corriente F_{in} la respuesta I_{mec} fue potenciada 160% y permanece en estos valores por varios minutos, esto sugiere que la activación de las vías promovidas por los agonistas tiene efectos de largo duración sobre los mecanismos de activación de I_{mec} .

En conjunto estos resultados muestran la existencia de interacciones entre los mecanismos de activación de ambas corrientes y sugieren mecanismos de señalización convergentes.

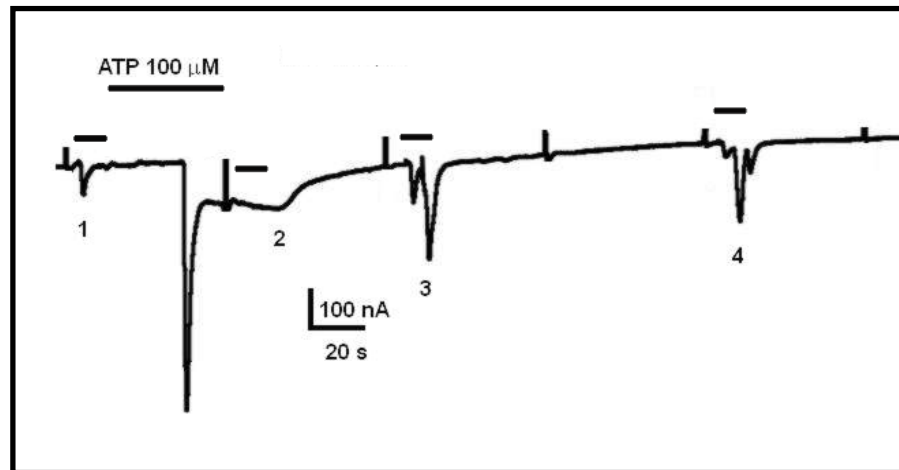


Figura 26. Potenciación de I_{mec} por F_{in} . Los números indican respuestas mecánicas provocadas por paro de flujo por el tiempo señalado con la barra correspondiente arriba del trazo. ATP fue aplicado también por el tiempo señalado por la barra en la parte superior. En el trazo control durante el inicio de la perfusión (estímulo 1) fue generada una I_{mec} de amplitud baja. Posteriormente, durante la fase de inactivación de F_{in} , el estímulo mecánico (2) no provocó respuesta debido a la inhibición por el transmisor. Sin embargo durante el lavado, la I_{mec} se recuperó y se mantuvo potenciada con respecto al control (3-4).

h) Evidencias experimentales para un posible mecanismo de generación de I_{mec} : La liberación mecanosensible de ATP

Los resultados presentados hasta aquí muestran que la estimulación mecánica, a través de dos métodos diferentes, parece activar los canales de Cl^- responsables de la corriente folicular llamada F_{in} . También, los resultados sugieren que los canales mecanosensibles en la membrana del ovocito no participaron en la generación de la respuesta mecánica por lo que las vías de activación permanecen por ser esclarecidas. La hipótesis más directa es que los mismos canales de Cl^- sean sensibles a la estimulación mecánica, sin embargo, se observó consistentemente que las respuestas I_{mec} presentaron un retardo

considerable (varios segundos) entre el estímulo y el inicio de la respuesta, comportamiento que es incompatible con un mecanismo directo que ocurre en el orden de microsegundos (en el caso de canales catiónicos mecanosensibles). El retraso de la respuesta sugirió la participación de mecanismos intermediarios, que involucraran tanto posibles transmisores como vías de señalización. La interacción de I_{mec} con los mecanismos de generación de F_{in} apuntó a la posibilidad de que la sensibilidad mecánica fuera debida a la liberación de alguno de los agonistas que la activan. En este sentido, es sabido que la liberación de ATP promovida por estímulos mecánicos ocurre en varios tipos celulares y funciona en muchos de ellos como una importante molécula señalizadora (Cao *et al.*, 1997; Guthrie *et al.*, 1999.). De hecho como fue anotado en la introducción, ha sido demostrado utilizando varios métodos, que existe la liberación de ATP mecanosensible desde el ovocito de *Xenopus* (Maroto & Hamill, 2001). Siguiendo este razonamiento los siguientes experimentos fueron diseñados para obtener información acerca de una posible participación de ATP durante la activación de la respuesta I_{mec} .

Los experimentos fueron diseñados para bloquear la respuesta mecánica en dos puntos esenciales de un hipotético mecanismo que involucra una señal purinérgica. En el primero, receptores purinérgicos fueron bloqueados utilizando el antagonista suramina, un bloqueador inespecífico de receptores purinérgicos. Segundo, la concentración de ATP fue disminuida en el medio extracelular por la perfusión de la enzima (ectoATPasa) apirasa, que ha mostrado su efectividad en bloquear respuestas debidas a ATP en varios sistemas celulares a través de la degradación enzimática del transmisor (e.g., Kapojos *et al.*, 2004.)

Los trazos mostrados en la Figura 27 ilustran el efecto provocado por la aplicación de suramina 100 μ M durante la generación de I_{mec} . Como puede ser observado, la respuesta I_{mec} fue inhibida de forma potente durante la aplicación del antagonista y la respuesta I_{mec} se recuperó solo varios minutos después del lavado en RN. Al igual que la I_{mec} , la respuesta F_{in} activada por ATP fue inhibida por suramina tal y como había sido mostrado anteriormente (Arellano *et al.*, 1998). Un total de 4 folículos de 2 donadores mostraron resultados semejantes.

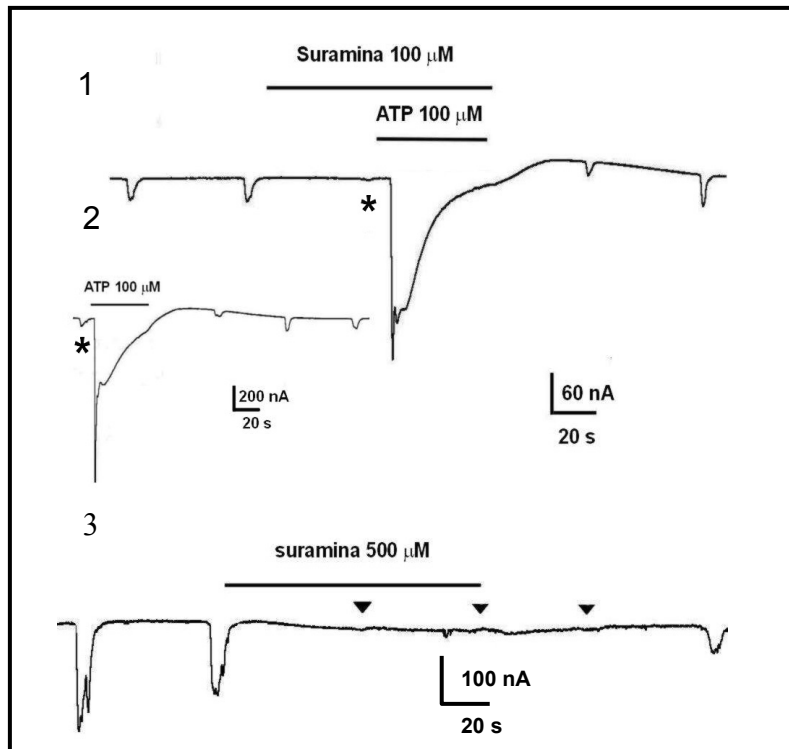


Figura 27. Efecto de suramina sobre I_{mec} . En el registro 1, se muestra que suramina ($100 \mu\text{M}$) inhibe la respuesta mecánica provocada por el método de paro de flujo. Después de dos estimulaciones control, el folículo fue perfundido con suramina, el paro de flujo al cambiar la solución a una que contiene además ATP no provoca la respuesta mecánica esperada (asterisco). La corriente F_{in} activada por ATP, también disminuye 50% en presencia del bloqueador, esto es más evidente al comparar con el registro 2, que corresponde con el registro control del mismo folículo en ausencia de suramina de la respuesta I_{mec} (asterisco) y la F_{in} . En el registro 3, observamos nuevamente la inhibición completa de I_{mec} , utilizando otro protocolo y una concentración mayor de suramina. Después de la segunda estimulación por paro de flujo, la solución fue intercambiada por una conteniendo suramina. Los triángulos en negro señalan estímulos mecánicos por paro de flujo semejantes a los aplicados en las respuestas control, en esta ocasión sin embargo, las respuestas fueron inhibidas y permanecen así por algunos segundos después de comenzar el lavado, la última estimulación muestra ya un grado de lavado de la inhibición.

Los registros en la Figura 28, muestran que en forma similar a los efectos provocados por suramina, la aplicación de apirasa en una concentración de 5 unidades/ml provocó una inhibición del $98.1 \pm 1.5\%$ de la respuesta I_{mec} (3 folículos, 2 ranas). Para ambos fármacos es importante resaltar el hecho de que la inhibición ocurrió sobre las corrientes provocadas por cualquiera de los dos métodos utilizados para la estimulación mecánica.

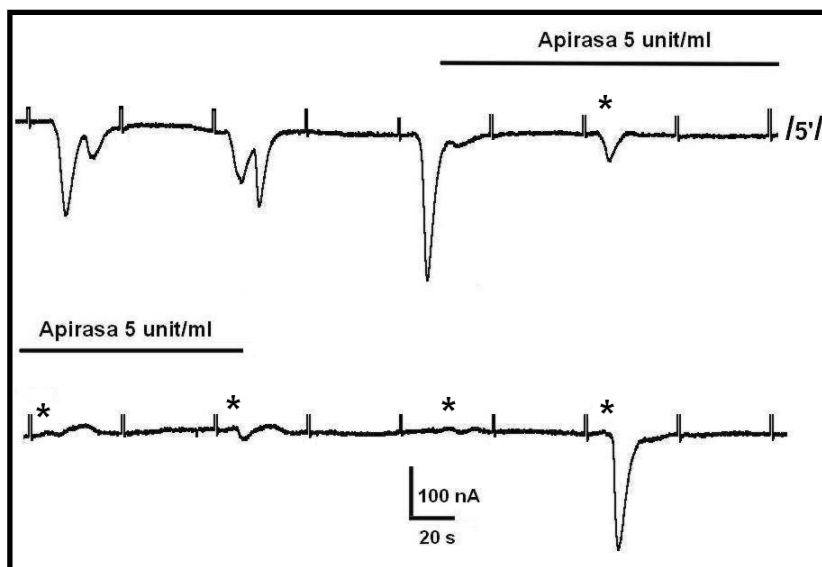


Figura 28. Efecto de apirasa sobre I_{mec} . La barra superior indica el tiempo de aplicación de apirasa, el cual fue de 240 segundos aproximadamente. Los asteriscos negros indican los estímulos mecánicos (paro de flujo) donde la respuesta mecánica está inhibida en más del 90% en presencia de apirasa, y aún después del inicio del lavado. La corriente I_{mec} es recuperada aproximadamente dos minutos y medio posteriores al retiro de la aplicación de apirasa.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demuestra que la estimulación mecánica produce respuestas eléctricas en el folículo ovárico de *Xenopus*, a estas respuestas les hemos llamado I_{mec} . De forma inesperada, la participación de los canales mecanosensibles, que se encuentran en una gran densidad en la membrana del ovocito (Yang & Hamill, 2000), parece no tener un papel central en la generación de estas respuestas. La similitud de las características biofísicas de la respuesta mecánica con las respuestas F_{in} , descritas previamente, sugiere que las respuestas I_{mec} , fueron generadas a través de mecanismos comunes. La primera posibilidad que surge es que los canales iónicos que dan origen a F_{in} son sensibles al estímulo mecánico, esto implicaría un mecanismo directo de activación. Esta idea puede ser descartada a la luz de varias evidencias mostradas en el presente trabajo, sin embargo la más contundente en cuanto al mecanismo de activación es el hecho de que I_{mec} presenta retardos considerables (en algunas ocasiones de varios segundos), que no son compatibles con mecanismos de mecanosensibilidad directa los cuales se encuentran en el orden de microsegundos. Esta observación sugiere más bien que las respuestas I_{mec} son generadas a través de un mecanismo más complejo en el que posiblemente se encuentren involucrados varios elementos. Antes de discutir estos posibles elementos, es preciso dejar asentadas las características que muestran que los canales responsables de I_{mec} , son los mismos que los activados durante la generación de la respuesta F_{in} .

Papel de las células foliculares

Una de las diferencias más importantes entre nuestro estudio y los reportados previamente sobre corrientes mecanosensibles en *Xenopus laevis* (Yang & Sachs, 1989; Lane *et al.*, 1991; Wilkinson & Hamill, 1998; Zhang & Hamill, 2000), es que en éste, la unidad funcional conformada por las células foliculares y el ovocito, fue registrada manteniendo su estructura y comunicación fisiológica (i.e., estudio en folículos). Como en otros estudios de este tipo (Arellano & Miledi, 1993; Arellano *et*

al., 1996), las respuestas eléctricas registradas en el folículo pueden tener su origen tanto en las células foliculares como en el ovocito. Esto se debe al intenso acoplamiento eléctrico a través de uniones comunicantes entre los dos tipos celulares, por lo tanto el registro de corrientes transmembranales que se realiza insertando electrodos en el ovocito, monitorea no solo la membrana del ovocito mismo sino también la de las células foliculares. Es entonces claro que una de las primeras consideraciones en estudios de este tipo es el de reconocer la localización de los diferentes elementos que generan la respuesta. Aquí, demostramos que las respuestas I_{mec} requieren para su generación de la presencia de las células foliculares y de su acoplamiento con el ovocito. Esto fue evidenciado por la ausencia de respuesta mecánica en ovocitos a los cuales les fue removida la capa de células foliculares, así como con los experimentos en los cuales los folículos fueron expuestos a octanol, un agente desacoplante. Estos resultados son la primera característica que comparten las respuestas I_{mec} y las corrientes F_{in} , ambas corrientes parecen depender de la comunicación entre los dos tipos celulares. Aún y cuando estos resultados demuestran el requerimiento para la generación de I_{mec} de mantener la unidad funcional, células foliculares-ovocito, aún no podemos discernir por completo la localización de todos los eventos que participan en las respuestas. Estos resultados, sin embargo, en conjunto con los datos que discutimos en las secciones siguientes, parecen indicar que al menos el canal involucrado en la respuesta I_{mec} , en semejanza al de F_{in} , se localiza en la membrana de las células foliculares.

Bases iónicas de la I_{mec}

Además del requerimiento de la capa de las células foliculares para la generación de la respuesta I_{mec} , ésta también muestra un potencial de inversión similar al mostrado por la corriente F_{in} , las dos corrientes invierten en un potencial cercano a -25 mV. Este potencial corresponde con el de equilibrio para iones Cl^- , y ha sido mostrado que las respuestas F_{in} cambian su potencial de inversión según lo predicho por la ecuación de Nernst dependiendo de la concentración de Cl^-

extracelular (Arellano et al., 1998). Experimentos semejantes de sustitución de iones Cl^- por un anión impermeable y sus efectos sobre la I_{mec} resultaron infructuosos. La razón de esto es que la corriente I_{mec} mostró una gran labilidad en cuanto es modificado el ambiente iónico extracelular. El mecanismo de este comportamiento no puede ser explicado por el momento, sin embargo es claro que la generación de la respuesta I_{mec} depende de las concentraciones iónicas extracelulares de varias especies, incluyendo el mismo ión Cl^- , pero no solamente, ya que la sustitución del Na^+ por NMDG^+ provocó efectos similares de inhibición sobre la I_{mec} . Sin embargo, de forma importante, y que no deja a lugar a dudas de la naturaleza aniónica del canal, es el hecho de que otras sustituciones aniónicas mostraron la secuencia de permeabilidad siguiente: $\text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$, esta secuencia es idéntica a la reportada para la corriente F_{in} (Arellano et al., 1998). Lo cual representa la segunda similitud importante entre estas dos respuestas y permite postular que el canal de Cl^- implicado en ambas corrientes es el mismo.

Papel de Ca^{2+} en la generación de I_{mec}

Los resultados obtenidos modificando las concentraciones extra e intracelulares de Ca^{2+} en el folículo demuestran que la generación de la I_{mec} no es dependiente del aumento de Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, como se ha comentado con anterioridad, observamos variaciones en la amplitud de I_{mec} en las diferentes concentraciones de Ca^{2+} usadas en la solución de prueba, cabe preguntarse si el proceso de activación de I_{mec} presenta una modulación por Ca^{2+} en algún punto de su vía de generación. Sin embargo, resultados de experimentos de quelación del Ca^{2+} intracelular demostraron que un aumento de este ión no es requisito para la generación de I_{mec} . En concordancia, también ha sido demostrado que el mecanismo de activación de la respuesta F_{in} no es dependiente de la movilización de Ca^{2+} intracelular (Arellano & Miledi, 1993). Esto nos lleva a plantear que un posible efecto extracelular de este importante catión podría ser de modulador de otros procesos independientes de la activación del canal, por ejemplo, la mecanotransducción de la señal, la liberación de un posible transmisor, etc.

Aparentemente, alguna región extracelular del mecanismo que censa o traduce la señal mecánica es al mismo tiempo muy sensible a cambios iónicos extracelulares (e.g., fuerza iónica), un efecto que no ha sido observado en la F_{in} . Este efecto de fuerza iónica podría explicar porque variaciones de diferentes iones tienen efectos importantes sobre la amplitud de la respuesta I_{mec} . Sin embargo, es claro que la respuesta no depende de calcio extracelular o intracelular, y serán necesarios futuros experimentos que nos ayuden a esclarecer las bases de la sensibilidad al ambiente iónico.

Interacción de las respuestas I_{mec} con la F_{in} activada por ACh o ATP.

Los resultados mostrados hasta ahora muestran que las características intrínsecas de los canales involucrados, tales como su selectividad y su permeabilidad, fueron idénticas para las respuestas I_{mec} y F_{in} . Esto sugiere que las dos respuestas comparten al menos la activación de un canal aniónico común. Con la finalidad de saber si los mecanismos de activación podrían compartir algunos de sus elementos, realizamos estudios de interacción en los que las respuestas I_{mec} fueron estimuladas mientras las F_{in} fueron generadas aplicando agonistas en el medio extracelular. Es de esperarse que de existir algún tipo de interacción entre estas dos respuestas, su generación se verá afectada según el protocolo de estimulación utilizado. Así, por ejemplo, fue observada una clara inhibición de la respuesta I_{mec} durante la fase de inactivación de la respuesta F_{in} , el curso temporal de esta inhibición fue comparable al periodo refractario de la misma corriente F_{in} (Arellano et al., 1998), lo cual sugiere que comparten los mecanismos relacionados con la inactivación de la corriente y su recuperación. Por otro lado, la activación parcial de los mecanismos de estimulación de F_{in} al perfundir bajas concentraciones de ACh, provocaron una clara potenciación de la respuesta I_{mec} . Este resultado sugiere dos conclusiones importantes: 1) Los mecanismos de activación de los canales de Cl^- , al menos en parte, son compartidos por las dos respuestas, y 2) Este mecanismo involucra una sustancia activa que debe

acumularse para lograr la generación final de la respuesta. Este último punto explica el fenómeno de potenciación de la respuesta y estaría indicando la participación de una misma vía de transducción intracelular en las dos respuestas, aquella estimulada por transmisores (ACh, ATP) y la respuesta I_{mec} .

Bloqueo de canales mecanosensibles.

El retraso existente entre la estimulación mecánica y la generación de la respuesta I_{mec} sugiere que el mecanismo de activación de la corriente no es directo, por lo que la activación de canales mecanosensibles no fue considerada una posibilidad. Además, la existencia de canales de Cl^- sensibles a estímulos mecánicos no ha sido documentada en la membrana del ovocito. En los resultados fue puntualizado que concentraciones supramáximas de La^{3+} no inhibieron la corriente I_{mec} , con lo que descartamos la participación del canal mecanosensible reportado en el ovocito (Hamill & Martinac, 2001), al menos su participación no es fundamental para la generación de I_{mec} . Sin embargo, es claro que La^{3+} disminuyó la corriente I_{mec} por aproximadamente 40%; es posible, que dicha disminución se deba nuevamente a modificaciones en el ambiente iónico extracelular ocasionadas por concentraciones altas de un cation trivalente como La^{3+} .

La liberación mecanosensible de ATP.

La interacción de la respuesta I_{mec} con las respuestas F_{in} provocada por ATP apoyan la idea de que el canal aniónico involucrado y los mecanismos de su activación convergen en uno o varios puntos. Además, los resultados obtenidos en donde la respuesta I_{mec} es inhibida por sustancias como suramina y apirasa que tienen sus efectos sobre respuestas purinérgicas, refuerza la idea de que efectivamente estos receptores están involucrados en la generación de I_{mec} . Basados en este conjunto de datos proponemos entonces que las respuestas I_{mec} son generadas a través de la liberación de ATP ya sea del ovocito o de las propias

células foliculares, el ATP liberado difundiría hasta la membrana de las células foliculares, donde activa los receptores purinérgicos responsables de la generación de la respuesta que involucra canales tipo F_{in} . Tomando en consideración esta hipótesis, en la siguiente sección trataremos de explicar la activación de los diferentes componentes de la I_{mec} .

Hasta aquí, nuestros resultados en conjunto sugieren fuertemente que la señalización purinérgica en el folículo ovárico parece ser parte de un sistema de comunicación paracrina/autocrina entre el ovocito y sus células foliculares.

Cinética de activación.

Con anterioridad hemos mencionado que encontramos dos componentes de I_{mec} dependiendo del protocolo de estimulación mecánica empleado, la pipeta de eyección y el paro de flujo en la cámara de registro. Para tratar de explicar estos componentes de la respuesta debemos de asumir que las corrientes I_{mec} son efectivamente generadas por la activación de canales F_{in} a través de la liberación intrafolicular de ATP. Además de las evidencias planteadas arriba, también es necesario apuntar que el retraso observado en el proceso de activación de I_{mec} , es más cercano al medido en respuestas donde se involucra la participación de segundos mensajeros, como es el caso de la corriente F_{in} (Arellano *et al.*, 1998). En nuestro modelo propuesto, la aplicación de un estímulo súbito con el uso de la pipeta de eyección puede llevar a la liberación mecánica en concentraciones altas de ATP, la fuente de ATP permanece sin ser determinada, podría ser del ovocito o desde las mismas células foliculares. La difusión de este ATP a los receptores purinérgicos involucrados en la activación de los canales F_{in} provocaría la generación de respuestas como las observadas utilizando el método A de estimulación. Por otro lado el método llamado “paro de flujo” o B, produce con frecuencia dos componentes, uno coincide con el tiempo en el que el medio permanece estático y también se genera con cierto retraso, y el segundo se activa cuando se reinicia el flujo en la cámara, este componente es muy similar al

provocado por el método A. Este comportamiento puede ser explicado proponiendo que la substancia transmisora, en este caso el ATP, además de ser liberado de forma aguda ante un estímulo mecánico, parece ser liberado de forma basal. Si este fuera el caso, tendríamos que el ATP, al momento de mantenerse un flujo continuo se lava constantemente del espacio extracelular y no produce respuestas, sin embargo cuando el medio permanece estático, el ATP liberado basalmente se acumula con cierto curso temporal en el espacio extracelular, y activa los receptores purinérgicos con una cinética que dependería de muchos factores, por ello la cinética de estas respuestas resulta tan variable entre folículos de diferentes ranas. Al reanudar el flujo se obtiene el segundo componente por estimulación mecánica directa sobre el folículo en forma semejante a la aplicación del método A.

La hipótesis planteada es apoyada por resultados independientes reportados por Maroto & Hamill (2001) quienes midiendo la concentración de ATP por métodos fluorométricos determinaron que el ovocito desnudo tiene la capacidad de liberar este mensajero tanto de forma basal como estimulada mecánicamente. Apoyados en esta evidencia podemos proponer entonces que el circuito de comunicación purinérgica incluye entonces la señalización desde el ovocito hacia las células foliculares a través de ATP, donde la difusión del transmisor hasta la membrana de las células foliculares estimula los receptores purinérgicos y activa los canales de la respuesta F_{in} . La naturaleza dual de la liberación de ATP plantea nuevas preguntas interesantes acerca de los posibles roles fisiológicos que este sistema de comunicación podría tener en el folículo, especialmente la estimulación continua a través de la liberación basal del ATP. Por otro lado, la respuesta provocada sobre las células foliculares es transmitida a su vez a la membrana del ovocito a través de la activación de la respuesta F_{in} , pero no solamente es esta respuesta eléctrica, ya que ha sido demostrado también que el ATP en folículos completos tiene la capacidad de activar la corriente de K^+ activada por un aumento de AMPc (Saldaña et al., 2005), corriente que ha sido involucrada en la modulación del proceso de maduración.

REFERENCIAS

- Arellano, R.O., and Miledi, R.,** 1993, Novel Cl⁻ currents elicited by follicle stimulating hormone and acetylcholine in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* 102: 833-857.
- Arellano, R.O., and Miledi, R.,** 1994, Osmo-dependent Cl⁻ currents activated by cyclic AMP in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol.Sci.* 258: 229-235.
- Arellano, R.O., and Miledi, R.,** 1995, Functional role of follicular cells in the generation of osmolarity-dependent Cl⁻ currents in *Xenopus* follicles. *J.Physiol.* 488: 351-357.
- Arellano, R.O., Woodward, R., and Miledi, R.,** 1996, Ion channels and membrane receptors in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. In *Ion Channels*, Vol. 4, pp. 203-259. Plenum Press, New York.
- Arellano, R.O., Garay, E., and Miledi, R.,** 1998, Cl⁻ currents activated via purinergic receptors in *Xenopus* follicles. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 274: C333-C340.
- Blout, P., Sukharev, S., Moe, P., Schoreder, M., Nagle, S., and Kung, C.,** 1996, Membrane topology and multimeric structure of a mechanosensitive channel protein of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 15: 4798-4805.
- Cafiso, D.S.,** 1994, Alamethicin: a peptide model for voltage gating and protein-membrane interactions. *Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23: 141-165.
- Cao, D., Lin, G., Westphale, E., Beyer, E., and Steinberg, T.,** 1997, Mechanisms for the coordination of intercellular calcium signaling in insulin-secreting cells. *J.Cell Sci.* 110: 497-504.
- Chen, B.M., and Grinnel, A.D.,** 1996, Kinetics, Ca²⁺ dependence and biophysical properties of integrin mediated mechanical modulation of transmitter release from frog motor nerve terminals. *J. Neurosci.* 17: 904-916.
- Denk, W., Holt, J.R., Shepherd, G.M.G., and Corey, D.P.,** 1995, Localization of hair-cell transduction channels at both ends of tip links shown by calcium imaging of single stereocilia. *Neuron.* 15: 1311-21.

- Driscoll, M., and Tavernarakis, N.,** 1997, Molecules that mediate touch transduction in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Gravitational and Space Biology Bulletin*. 10(2): 33-42.
- Fattal, D.R., and Ben-Shaul, A.,** 1993, A molecular model for lipid-protein interaction in membranes: the role of hydrophobic mismatch. *Biophys.J.* 65: 1795-1809.
- Ferguson, D.R., Kennedy, I., and Burton, T.J.,** 1997, ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes – a possible sensory mechanism? *J. Physiol.* 505: 503-511.
- García-Añoveros, J., and Corey, D.P.,** 1997, The molecules of mechanosensation. *Annu. Rev. Neurosci.* 20: 567-594.
- Ghazi, A., Berrier, C., Ajouz, B., and Besnard, M.,** 1998, Mechanosensitive ion channels and their mode of activation. *Biochimie.* 80: 357-362.
- Goulian, M., Mesquita, O.N., Fygenon, D.K., Nielsen, C., Andersen, O.S., and Libchaber, A.,** 1998, Gramicidin Channel kinetics under tension. *Biophys. J.* 74: 328-337.
- Guthrie, P.B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M.V., and Charles, A.C.,** 1999, ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J.Neurosci.* 19: 520-528.
- Hamill, O.P., and Martinac, B.,** 2001, Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol. Rev.* 81: 685-740.
- Hudspeth, A.J., and Corey, D.P.,** 1977, Sensitivity, polarity and conductance change in the response of vertebrates hair cells to controlled mechanical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 2407-11.
- Jacobs, R.A., and Hudspeth, A.J.,** 1990, Ultrastructural correlates of mechano-electrical transduction in hair cells of the bullfrog's internal ear. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 55: 547-61.
- Jena, M., Minore, J.F., and O'Neil, W.C.,** 1997, A volume-sensitive, IP₃-insensitive Ca²⁺ store in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 273: C316-322.
- Kapojos, J.J., van de Berg, A., Borghuis, T., Banas, B., Huitema, S., Poelstra, K., and Barkker, W.W.,** 2004, Enhanced ecto-apyrase activity of stimulated endothelial or mesangial cell is downregulated by glucocorticoids in vitro. *European j. Physiol.* 501: 191-198

- Kusano, K., Miledi, R., and Stinnakre, J.**, 1982, Cholinergic and catecholaminergic receptors in *Xenopus* oocyte membrane. *J. Physiol. (London)* 328: 143-170.
- Lane, J.W., McBride, D.W., Hamill, O.P.**, 1991, Amiloride block of the mechanosensitive cation channel in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 441: 347-366
- Lehtonen, J.Y.A., and Kinnunen, P.K.J.**, 1995, Phospholipase A2 as a mechanosensor. *Biophys J.* 68: 1888-1894.
- Lundbaek, J.A., and Andersen, O.S.**, 1994, Lysophospholipids modulate channel activity by altering the mechanical properties of the bilayer. *J. Gen. Physiol.* 104: 645-673.
- Marmont, G.**, 1949, Studies on the axon membrane; a new method. *J. Cell Physiol.* 34(3): 351-82.
- Maroto, R., and Hamill, O.P.**, 2001, Brefeldin A block of integrin-dependent mechanosensitive ATP release from *Xenopus* oocytes reveal a novel mechanism of mechanotransduction. *J. Biol. Chem.* 276: 23867-872.
- Methfessel, C., Witzemann, V., Takahashi, T., Mishina, M., Numa, S., and Sakmann, B.**, 1986, Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels. *Pflügers. Arch.* 407: 577-588.
- Miledi, R.**, 1982, A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes, *proc. R. Soc. London Ser. B* 215: 491-497
- Miledi, R., and Parker, I.**, 1984, Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes. *J. Physiol. (London)* 415: 189-210.
- Morris, C.E.**, 1990, Mechanosensitive ion channels. *J. Membr. Biol.* 113: 93-107.
- Nakamura, F., and Strittmatter, S.M.**, 1996, P2Y1, purinergic receptors in sensory neurons: contribution to touch-induced impulse generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:10465-10470.
- O'Connell, A.M., Koeppe, R.E., and Andersen, O.S.**, 1990, Kinetics of gramicidin channel formation in lipid bilayers: transmembrane monomer association. *Science.* 250: 1256-1260.
- Ohmori, H.**, 1985, Mechano-electrical transduction currents in isolated vestibular hair cells of the chick. *J. Physiol.* 359: 189-217.

- Opsahl, L., and Webb, W.W.**, 1994, Transduction of membrane tension by the ion channel alamethicin. *Biophys. J.* 66: 71-74.
- Oron, Y., Dascal, N., Nadler, E., and Lupu, M.**, 1985, Inositol 1,4,5-trisphosphate mimics muscarinic response in *Xenopus* oocyte, *Nature* 313: 141-143.
- Paoletti, P., and Ascher, P.**, 1994, Mechanosensitivity of NMDA receptors in cultured mouse central neurons. *Neuron.* 13: 645-655.
- Parker, I., Gundersen, C.B., and Miledi, R.**, 1985, Intracellular Ca⁺⁺-dependent and Ca⁺⁺-independent responses of rat brain serotonin receptor transplanted to *Xenopus* oocytes. *Neurosci. Res.* 2: 491-496.
- Parker, I., and Miledi, R.**, 1986, Changes in intracellular calcium and in membrane currents evoked by injection of inositol trisphosphate in *Xenopus* oocytes, *proc. R. Soc. Londo Ser. B.* 228: 307-315.
- Parker, I., and Miledi, R.**, 1987, Inositol trisphosphate activates a voltage-dependent calcium influx in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. London. Ser. B.* 232: 27-36.
- Perez-Samartin A., Miledi, R., and Arellano, R.**, 2000, Activation of volume-regulated Cl⁻ channels by Ach and ATP in *Xenopus* follicles. *J. Physiol.* 525: 721-734.
- Richardson, G.P., Bartolami, S., and Russel, I.J.**, 1990, Identification of a 275-kD protein associated with the apical surface of sensory hair cells in the avian inner ear. *J.Cell. Biol.* 110: 1055-66.
- Romanello, M., Pani, B., Bisego, M., and D'Andrea, P.**, 2001, Mechanically induced ATP release from human osteoblastic cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 289: 1275-81.
- Romero, P.J., Romero, E.A.**, 1999, Effect of cell ageing on Ca²⁺influx into human red cells. *Cell Calcium* 26: 131-37.
- Saitou, T., Ishikawa, T., and Obara, K.**, 2000, Characterization of whole-cell currents elicited by mechanical stimulation of *Xenopus* oocytes. *Pflügers. Arch – Eur J. Physiol.* 440: 858-65.
- Saldaña, C., Vazquez-Cuevas, F., Garay, E., and Arellano R.O.**, 2005, Epithelium and/or theca are required for ATP-elicited K⁺ current in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *J. Cell. Physiol.* 202(3): 814-21.
- Shen, M.R., Chou, C.Y., and Chiu, W.T.**, 2003, . Streptomycin and its analogues are potent inhibitors of the hypotonicity-induced Ca²⁺ entry and Cl⁻ channel