



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

CAMPUS UNAM JURIQUILLA

Definición de estilo: TDC 2:
Justificado, Interlineado: 1,5
líneas, Tabulaciones: 16 cm,
Derecha, Relleno: ... + No en 15
cm

**DEPENDENCIA DE LA RESPUESTA PURINÉRGICA
DEL FOLÍCULO OVÁRICO DE *Xenopus laevis* A Ca^{2+}**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA

Biól. LETICIA ROBLES MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA

JURIQUILLA, QUERÉTARO 2011



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Leticia Robles Martínez, cuyo título es: "Dependencia de la respuesta purinérgica del folículo ovárico de *Xenopus laevis* a Ca^{2+} ", se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente:

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Secretario (Tutor):

Dr. Rogelio Arellano Ostoa

Vocal:

Dra. Gloria Patricia Pérez Cornejo

Suplente:

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo

Suplente:

Dr. Daniel Reyes Haro

Aprobado por el Comité Académico

Dra. María Teresa Morales Guzmán
Coordinadora del Programa
Maestría en Ciencias (Neurobiología)

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología Celular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Rogelio Arellano Ostoia, y fue apoyado con recursos financieros de CONACyT (No. 82340) y PAPIIT-UNAM (No. IN214409).

RESUMEN

El folículo ovárico (el ovocito acoplado a sus células foliculares) de *Xenopus laevis* expresa receptores específicos a ATP y a angiotensina II (AII). Ambos receptores son del tipo metabotrópico y se encuentran localizados en la membrana de las células foliculares. Su estimulación genera corrientes acarreadas por Cl^- que difieren en sus características; la evocada por ATP presenta cinéticas de activación e inactivación rápidas (F_{Cl}) y es independiente de la concentración de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) en el ovocito, mientras que la generada por AII es de cinética oscilatoria y estrictamente dependiente de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el ovocito. Ésta última, se genera por activación de la fosfolípasa C (PLC) folicular y síntesis de IP_3 , mensajero que difunde al ovocito provocando la respuesta oscilatoria en su membrana. Debido a estas diferencias y a que los receptores a ATP en otros sistemas parecen acoplarse preferentemente a la PLC, aquí estudiamos con detalle el papel del Ca^{2+} tanto extracelular como intracelular durante la estimulación purinérgica, utilizando para esto técnicas de fluorescencia funcional y electrofisiológicas. Mostramos que la F_{Cl} es generada por la apertura de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} localizados en la membrana de las células foliculares ($fI_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) debido a la liberación de Ca^{2+} a través de la participación de la PLC. Demostramos también, que relacionada con la F_{Cl} , fue inducida una corriente entrante de larga duración que es dependiente de Ca^{2+} extracelular ($I_{\text{iw,Ca}}$), ésta corriente es debida a la apertura de los canales $fI_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ y es específica de la estimulación purinérgica.

SUMMARY

The ovarian follicle (oocyte-enclosed by follicular cells) of *Xenopus laevis*, expresses receptors to ATP and angiotensin II (All). Both receptors are metabotropic and locate at the plasma membrane of follicular. Activation of any of these receptors generates Cl^- currents with different characteristics; the ATP-elicited response has a rapid activation and inactivation time-course (F_{Cl}) and does not dependent on Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]$) in the oocyte cytoplasm, while All-generated response presents an oscillatory kinetics and is strictly dependent on $[\text{Ca}^{2+}]$. The later response is generated by activation of follicular phospholipase C (PLC) and subsequent synthesis of IP_3 , which diffuses to the oocyte generating the oscillatory response in its membrane. Due to these differences, and to the fact that ATP receptors in other systems seem to act mainly via PLC, we studied in detail the role of Ca^{2+} during follicular purinergic stimulation using fluorescence and electrophysiological techniques. We show that F_{Cl} response was generated by opening of Ca^{2+} dependent Cl^- channels located in the membrane of the follicular cells ($f I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) due to Ca^{2+} release through PLC activation. We also demonstrated, that in conjunction with F_{Cl} response, purinergic stimulation induced a long-lasting inward current that is dependent on extracellular Ca^{2+} ($I_{\text{iw,Ca}}$), and is also generated by $f I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ channel activation.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (becaria No: 229134), así como a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (cuenta No: 508001611) por el apoyo económico otorgado durante la realización de este proyecto.

Así mismo, agradezco al Dr. Rogelio Arellano Ostoa, por todo su apoyo para la realización de esta investigación y por permitirme ser parte de su grupo de trabajo del laboratorio D-13 del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

Agradezco además al Dr. Ataúlfo Martínez Torres y al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo miembros del comité tutorial, por sus críticas y comentarios en cada uno de los tutorales y por ser pieza clave en la corrección del presente escrito.

De la misma manera agradezco al Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez por el apoyo brindado durante el primer semestre de la maestría, así como por sus comentarios y críticas durante la realización del proyecto.

A los miembros del jurado de examen de grado, el Dr. Mauricio Díaz Muñoz, la Dra. Gloria Patricia Pérez Cornejo, al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo y al Dr. Daniel Reyes Haro, por servirse a leer y comentar este escrito y a sus atinadas observaciones al mismo.

También agradezco a la Biol. Bárbara Pamela Serrano Flores por todo su apoyo, participación, críticas y comentarios en la realización de este proyecto.

Además, agradezco el apoyo técnico a la M. en C. Leonor Casanova Rico, por su ayuda en todos los trámites administrativos durante la maestría; al Ing. Ramón Martínez Olvera; al Sr. Horacio Benjamín Ramírez Leyva, auxiliar de laboratorio, así como a la Dra. Edith Garay, al Dr. Francisco Vázquez Cuevas y a mis compañeros del laboratorio D-13, por toda la ayuda técnica y académica que recibí durante la realización de este proyecto.

DEDICATORIAS

A mis Padres

Porque creyeron en mí, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver culminada una de mis metas, ya que siempre estuvieron apoyándome e impulsándome incondicionalmente en los momentos más difíciles, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo llegar hasta el final. Y principalmente por quererme tanto como nadie.

A mis hermanos

Por acompañarme en cada momento brindándome todo su apoyo, amor sincero e incondicional, alegrías y ser la luz en mi vida, muchas gracias.

A mi tutor

Por su guía a lo largo de la realización de esta meta, brindándome su apoyo y principalmente por ser una de las personas que creyeron en mí, aun en los momentos más difíciles. Por sus consejos y su paciencia, gracias.

A mi familia y a mis verdaderos amigos Ana, Bárbara, Mike, Erika, Aro y Joel

Gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfar en la vida. Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo sincero e incondicional, por su comprensión y consejos en los momentos difíciles.

ÍNDICE

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La comunicación celular y el ión Ca^{2+} como segundo mensajero.....	1
1.2 Mecanismos de elevación de Ca^{2+} intracelular.....	3
1.3 Determinantes moleculares de SOCE y ROCE.....	6
2. ANTECEDENTES	11
2.1 El folículo de <i>Xenopus laevis</i>	11
2.2 Estructura del folículo de <i>Xenopus laevis</i>	13
2.3 Origen folicular de las corrientes iónicas provocadas por ATP, ACh y All en <i>Xenopus</i>	14
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVO GENERAL	22
6. MATERIAL Y MÉTODOS	23
6.1 Obtención de folículos.....	23
6.2 Técnica de control de voltaje	25
6.3 Soluciones externas e inyección intracelular de quelantes de Ca^{2+}	26
6.4 Obtención de cultivo primario de células foliculares.....	28
6.5 Determinación de Ca^{2+} por Microscopía de Fluorescencia	29
7. RESULTADOS	30
7.1 La corriente F_{Cl} generada por ATP en los folículos <i>e.t.r.</i>	30
7.2 Estandarización del cargado con Fluo 4-AM de las células foliculares aisladas de <i>Xenopus</i>	31
7.3 Aumento de Ca^{2+} intracelular provocado por ATP en células foliculares.....	34
7.4 Participación del Ca^{2+} extracelular en la respuesta folicular F_{Cl}	36

7.5	La respuesta $I_{iw,Ca}$ permanece activada por periodos prolongados de tiempo.....	39
7.6	$I_{iw,Ca}$ depende de la concentración de ATP y de Ca^{2+}	40
7.7	Relación entre las amplitudes de las respuestas $I_{iw,Ca}$ y F_{Cl}	43
7.8	Las respuestas $I_{iw,Ca}$ y F_{Cl} no dependen de un aumento de Ca^{2+} en el citoplasma del ovocito	45
7.9	Bases iónicas de $I_{iw,Ca}$	49
7.10	La generación de las respuestas F_{Cl} e $I_{iw,Ca}$ es dependiente de la actividad de PLC.....	52
8.	DISCUSIÓN	55
8.1	Sobre la generación de influjo de Ca^{2+} a través de la estimulación de receptores purinérgicos en las células foliculares de <i>Xenopus</i>	57
8.2	Sobre la participación de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} en la generación de F_{Cl}	61
8.3	Sobre la posible diversidad de las células foliculares en comunicación con el ovocito	64
9.	CONCLUSIONES	66
10.	BIBLIOGRAFÍA	67
	ÍNDICE DE FIGURAS	76
	LISTA DE ABREVIATURAS.....	78

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La comunicación celular y el ión Ca^{2+} como segundo mensajero

La comunicación intracelular e intercelular son procesos fundamentales en todos los organismos; a través de estos dos procesos son integradas todas las funciones del organismo, permiten el control y la regulación de las respuestas ante la gran diversidad de estímulos tanto endógenos como exógenos. Su deficiencia o mal funcionamiento en los diferentes niveles de integración celular suelen ser la causa de patologías. El ejemplo más complejo del papel de la comunicación celular que conocemos, es sin duda el que ocurre entre los diferentes tipos celulares del sistema nervioso, cuya máxima expresión está claramente representado en la formación de complejas redes celulares que controlan las diversas funciones vitales del organismo y son el sustrato de las funciones cognitivas. Los mecanismos a través de los cuales las células se intercomunican involucran tanto mecanismos químicos como eléctricos.

La comunicación química puede ser clasificada como comunicación autócrina, parácrina, o endócrina; esta clasificación se basa en la distancia que recorre la señal química para alcanzar a su célula diana. En la comunicación tipo autócrina, la señal química actúa sobre la misma célula que la produce, mientras que en la comunicación de tipo endócrina la molécula señal es secretada al torrente sanguíneo y actúa sobre una célula diana alejada del sitio de producción. En la comunicación de tipo parácrina, las moléculas señal tienen una vida media corta, y ejercen sus efectos sobre células vecinas al sitio de producción (Lodish & Darnell, 2002).

La señal química es reconocida por la célula diana a través de receptores específicos localizados en la membrana plasmática o en su interior, la unión de la señal al receptor desencadena una serie de eventos que culminan con la respuesta de la célula a través de la activación de moléculas efectoras. Los receptores celulares son por lo tanto los elementos moleculares claves que conectan el entorno celular externo con su medio intracelular, generando o modificando respuestas

celulares que tienen la notable característica de ser específicas (Lodish & Darnell, 2002).

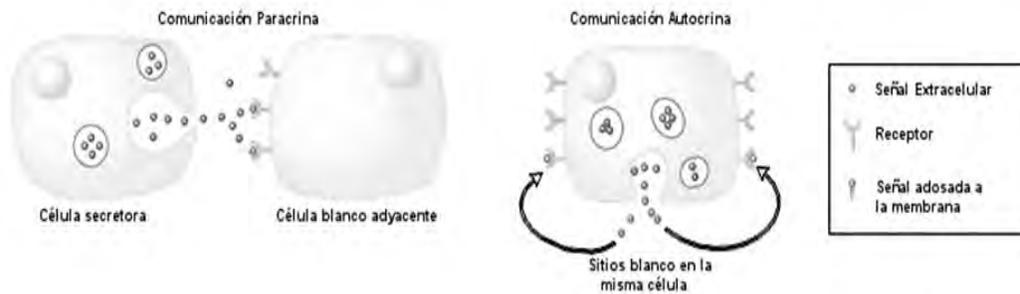


Figura 1. Ejemplos de comunicación química celular. Los esquemas ilustran dos de los sistemas de comunicación química así como los principales elementos moleculares que los componen; las señales químicas y los receptores. En el primer ejemplo la señal actúa sobre una célula adyacente, mientras que en el segundo, la señal actúa sobre si misma activando auto-receptores.

Una vez que la señal es reconocida por su receptor, estos pueden actuar de forma directa, tal es el caso por ejemplo de los receptores-canal, o pueden hacerlo a través de mecanismos indirectos, que se caracterizan por desencadenar procesos fisiológicos a través de una cascada de señalización. Entre las moléculas de señalización intracelular más utilizadas se encuentra el ión Ca^{2+} , en general, los niveles de este ión en el citoplasma se encuentra en concentraciones 100 a 200 nM es conveniente especificar un rango, su elevación hasta concentraciones en el rango de cientos de μM señala a diversos elementos funcionales sensibles a Ca^{2+} que provocan una gran variedad de respuestas esenciales para la vida celular (Berridge, 1997, 2004; Skupin *et al.*, 2010). Existen dos mecanismos principales a través de los cuales las células aumentan los niveles del Ca^{2+} citoplásmico (Berridge *et al.*, 2000): 1) liberación desde reservorios intracelulares de Ca^{2+} (organelos que pueden acumular concentraciones en el rango de cientos de μM del ión) a través de canales específicos y, 2) entrada desde el medio extracelular, que por lo general contiene Ca^{2+} en el rango mM, permeando a través de la membrana plasmática utilizando para esto vías conductivas o transportadores.

1.2 Mecanismos de elevación de Ca^{2+} intracelular

Uno de los mecanismos mas comunes utilizados por las células para provocar aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplásmico, es la vía mediada por estimulación de receptores acoplados a proteínas G, los cuales activan la vía de la fosfolipasa C (PLC) y la producción de IP_3 . El IP_3 aumenta los niveles de Ca^{2+} libre en el citosol a través de la unión a sus receptores-canal que se encuentran localizados en la membrana del retículo endoplásmico (RE), dando como resultado la apertura del canal de IP_3 y la salida de Ca^{2+} del reservorio intracelular hacia el citoplasma. Aún y cuando el RE es el principal organelo celular que funciona como reservorio de calcio (contiene una concentración de Ca^{2+} que es 20,000 veces mayor que la del citoplasma), existen otros organelos que pueden funcionar como reservorios de Ca^{2+} tales como la mitocondria y el núcleo (Clapham, 1995). Por ejemplo, el núcleo se había considerado hasta hace algún tiempo como un compartimiento celular que adopta de manera pasiva la dinámica del calcio citosólico (Lipp *et al.*, 1997). Sin embargo, recientemente se ha acumulado evidencia que indica que el núcleo puede comportarse como un organelo movilizador de calcio en algunos tipos celulares (Gerasimenko & Gerasimenko, 2004). Estudios realizados en núcleos aislados de células pancreáticas y hepatocitos, han demostrado que en estos, el ión es captado por bombas específicas llamadas SERCA (por sus siglas en inglés *sarcoplasmic and endoplasmic reticulum calcium ATPasa*) y liberado por medio de canales iónicos similares a los expresados en el RE (Butanda-Ochoa *et al.*, 2006). Siendo que el Ca^{2+} no puede ser metabolizado como ocurre con otras moléculas señales que actúan como segundos mensajeros (e.g., AMPc, GMPc, IP_3), las células deben regular estrictamente la concentración intracelular de este ión. Es sabido que una gran variedad de respuestas producidas por los iones Ca^{2+} , requiere de un control local muy fino de su concentración; ya que elevaciones prolongadas de su concentración sobrellevaría a la muerte celular; de hecho este parece ser uno de los mecanismos mas comunes que llevan a la muerte celular programada. Esto último provoca la necesidad de un sistema complejo de control de la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular (Verhratsky & Toescu, 1998).

Los niveles de Ca^{2+} libre en el citoplasma pueden también ser aumentados por el influjo del Ca^{2+} extracelular (Parekh & Penner, 1997). Existe una variedad de canales permeables a Ca^{2+} que se encuentran en la membrana plasmática, al ser operados estos canales, el Ca^{2+} extracelular que normalmente se encuentra en concentraciones mM difunde a favor de su gradiente hacia el citoplasma celular. Entre los canales de Ca^{2+} en la membrana citoplásmica podemos encontrar los canales dependientes de voltaje (VOC) que son activados en general por la despolarización de la membrana. Otro tipo de canales son los operados por segundos mensajeros (SMOC) que se encuentran distribuidos en algunos tipos celulares tanto excitables como no excitables, y que son activados por pequeñas moléculas mensajeras como nucleótidos y derivados de lípidos (e.g., los canales catiónicos sensibles a nucleótidos cíclicos). De forma muy importante para el presente proyecto, otras vías de influjo de Ca^{2+} al citoplasma se producen a través de canales permeables de Ca^{2+} operados por reservorios (SOCE, por sus siglas en inglés *store-operated Ca^{2+} entry*), estos son activados cuando los reservorios de Ca^{2+} , especialmente el RE, son vaciados o alcanzan concentraciones muy bajas del ión en su interior (Parekh & Putney, 2005). En cambio, existe otro fenómeno de entrada de Ca^{2+} , que no involucra las señales generadas cuando los reservorios se vacían pero requiere de la activación de receptores específicos membranales, a estas vías se les conoce como entrada de Ca^{2+} dependiente de receptor (ROCE, por sus siglas en inglés *receptor-operated Ca^{2+} entry*). Estas dos últimas vías serán descritas con detalle más adelante, ya que fisiológicamente ambas requieren de la activación de vías de segundos mensajeros a través de la estimulación de receptores membranales, una acción que es motivo de estudio en la presente tesis. Finalmente, también el Ca^{2+} puede entrar a las células a través de un intercambiador de Na-Ca^{2+} (NCX) que bajo ciertas condiciones opera en modo reverso, introduciendo Ca^{2+} a la célula y acarreando Na^+ hacia fuera (e.g., Supplisson *et al.*, 1991).

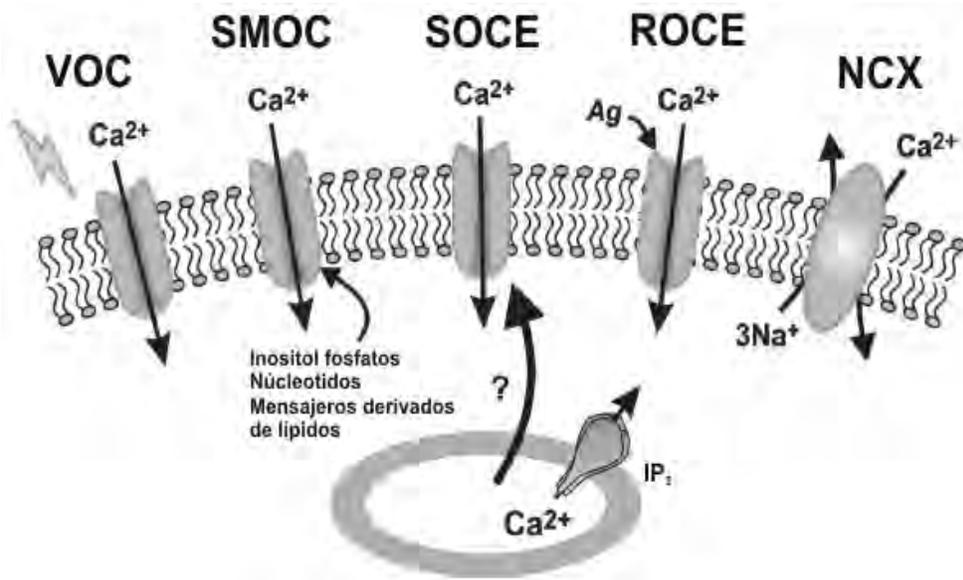


Figura 2. Canales permeables a Ca^{2+} en la membrana plasmática. Canales dependientes de voltaje (VOC); Canales operados por segundos mensajeros (SMOC); Canales operados por reservorios de Ca^{2+} (SOCE); Canales operados por receptor (ROCE); Intercambiador de Na^+ - Ca^{2+} (NCX) (Modificado de Parekh & Putney, 2005).

SOCE y ROCE se generan en prácticamente todas las células eucariotas, desde las levaduras hasta las humanas, representando las vías primordiales para la entrada de Ca^{2+} . La existencia de SOCE fue primero postulada en 1976 a partir de una serie de experimentos en células acinares de la parótida donde fue estudiada la relación entre la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares y la entrada de Ca^{2+} a la célula (Putney 1976, 1977), sugiriendo que cambios en la concentración de Ca^{2+} en los reservorios controlan el influjo de Ca^{2+} a través de la membrana citoplasmática (revisado en Parekh & Penner, 1997). Una gran cantidad de estudios ha mostrado también que al estimular receptores membranales, en varios tipos celulares, la activación de vías de entrada de Ca^{2+} suele ocurrir sin la intervención o estado de los reservorios intracelulares, y en condiciones adecuadas inclusive, SOCE y ROCE pueden ser co-activadas en la célula. Sin embargo, SOCE y ROCE presentan algunas diferencias biofísicas y farmacológicas que permiten su distinción, por ejemplo, es notorio que los canales involucrados en SOCE presentan una de las mayores selectividades por Ca^{2+} conocidas entre los canales permeables a este ión, siendo miles de veces mayor a la de Na^+ , esta selectividad es inclusive mayor a la de los propios canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje. Por otro lado, los canales

involucrados en ROCE por lo general presentan una selectividad menor a Ca^{2+} , y en algunos casos son activados canales catiónicos inespecíficos (e.g., los canales tipo TRP). Otra característica importante es que las vías del tipo ROCE parecen ser insensibles a Gd^{3+} en el rango μM (0.5 – 1 μM), esta característica ha sido utilizada en estudios que tratan de definir con mayor exactitud los determinantes moleculares de los canales en cada condición (Liao *et al.*, 2008, 2009). Es importante mencionar, sin embargo, que aun y cuando no se conocen en detalle todos los elementos moleculares involucrados en una y otra vía, es posible que los mecanismos de generación de SOCE y ROCE compartan al menos parte de la maquinaria de activación en diferentes tipos celulares, por lo que las características de estas posibles combinaciones y sus consecuencias en la señalización por Ca^{2+} aun no son del todo entendidas en los diferentes tipos celulares.

1.3 Determinantes moleculares de SOCE y ROCE

Recientemente, han sido identificados los elementos moleculares que están involucrados en la operación de al menos algunos tipos de SOCE, y ha sido mostrado su papel esencial en eventos fisiológicos de importancia tales como la traducción de señales en células del sistema inmune (Feske, 2001, 2009; Lewis, 2001). La corriente generada por SOCE mejor estudiada es la acarreada a través del canal que subyace a la corriente CRAC (por sus siglas *Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel*) que fue inicialmente descrita en linfocitos y otras células hematopoyéticas, y es requerida para la activación de las células T por el antígeno (Fahrner *et al.*, 2009). Las propiedades biofísicas del canal incluyen: una alta selectividad a Ca^{2+} (>1000 mayor a la de Na^+), una baja conductancia del canal unitario (aproximadamente de 0.02 pS), y una pronunciada rectificación dependiente del voltaje. Los componentes moleculares que subyacen a la activación de la corriente CRAC fueron recientemente identificados, las proteínas STIM (por las siglas en inglés de su nombre original SIM, *stromal interacting molecule*) y Orai (conocida previamente como *olf186-F* y *CRACM*). STIM es una molécula localizada en la membrana del retículo endoplásmico preferentemente (hasta 25% de la proteína ha sido reportada en la membrana plasmática de algunos tipos celulares), en mamíferos han sido reportadas dos proteínas STIM1 y 2. STIM actúa como un sensor de los niveles de Ca^{2+} en el retículo y de activador del canal de Ca^{2+} en la

membrana plasmática que está formado por subunidades de Orai, de las que se han identificado tres homólogos en mamíferos llamados Orai1 al 3. Estas proteínas contienen 4 segmentos transmembranales con ambos extremos amino y carboxilo localizados intracelularmente, mas allá de esta estructura con múltiples pases transmembranales, Orai no presenta homología con ningún otro tipo de canal, sin embargo su participación como la molécula formadora del canal CRAC fue mostrada a través de estudios de mutación puntual en la región predicha del poro (Frischauf *et al.*, 2008; Fahrner *et al.*, 2009; Cahalan, 2009; Kurosaki & Baba, 2010).

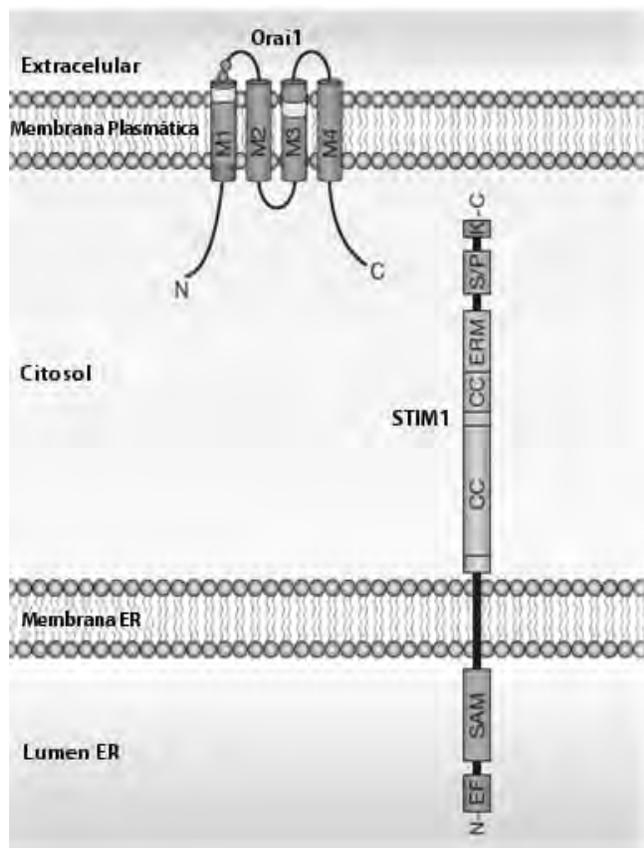


Figura 3. Estructura molecular de STIM y Orai. Los esquemas representan las características esenciales de las proteínas STIM1 y Orai1. Stim1 está localizada principalmente en la membrana del retículo endoplásmico. En la figura se observa la organización de los dominios principales de la molécula, incluyendo el brazo EF y el motivo SAM (steril-a-motif) del lado del lumen del retículo endoplásmico, y del lado del citosol, se encuentran los dominios CC (coiled-coil) y ERM (ezrin-radiximoesin), y regiones ricas en serina-prolina (S/P) y otra rica en lisina (K). Orai1 es una proteína de la membrana plasmática con cuatro pases transmembranales, los extremos amino y carboxilo son intracelulares (Modificado de Lewis, 2007).

El sensor STIM1 fue inicialmente caracterizado como una fosfoproteína localizada en el RE de las células, su estructura incluye un dominio EF típico en el lumen del RE, el cual es el sitio sensible a Ca^{2+} , además presenta un dominio denominado SAM que también reside en el lumen del retículo, éste tiene una participación en la oligomerización de STIM1. En el lado citoplasmático STIM1 presenta un dominio ezrina/radixina/moesina (ERM), incluido en dos dominios *coiled-coil* (CC), predichos en los segmentos comprendidos de los residuos 251 al 343 el primero, y del 383 al 389 el segundo, en éste último se encuentra el dominio SOAR, el cual media la interacción de STIM1 con el extremo carboxilo de Orai lo que permite la apertura del canal (Lee *et al.*, 2010; Frischauf, 2008; Hogan, 2010; Lewis, 2007).

El mecanismo de activación de la corriente SOC requiere de la oligomerización de moléculas de STIM (STIM1 principalmente) y su translocación hacia sitios con una gran cercanía a la membrana plasmática de aproximadamente 10 a 25 nm, por lo cual se le han llamado uniones RE-membrana citoplásmica. La translocación es dependiente de la oligomerización de STIM1, ésta comienza cuando la concentración de Ca^{2+} en el lumen del RE cae por debajo de los 300 μM , un valor que coincide con la afinidad del sitio EF de STIM1 que está en el orden de los cientos μM . La función de STIM1 en la generación de la corriente SOC es única en el sentido que además de ser el sensor de Ca^{2+} conlleva el mensaje que produce el re-arreglo y la organización de dímeros de Orai formando un canal tetramérico en la membrana que permite el influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular (Penna *et al.*, 2008).

En sistemas de expresión heteróloga, STIM1 puede acoplarse funcionalmente con cualquiera de las tres proteínas Orai descritas, generando corrientes del tipo CRAC con algunas diferencias biofísicas. Las evidencias experimentales que demuestran la interacción directa entre estas proteínas incluyen; co-inmunoprecipitación y estudios de FRET que permite determinar interacciones moleculares en el rango nanométrico. La región del carboxilo terminal de STIM1 ha sido mostrada es esencial para esta interacción con Orai, una secuencia de aproximadamente 100 aminoácidos conteniendo esta región parece ser suficiente para activar las corrientes CRAC (Cahalan, 2009).

Entre las primeras propuestas de proteínas que podrían formar el canal responsable de SOCE sobresalen las proteínas TRP del tipo “C” (por las siglas en inglés “transient receptor potential”; TRPC) de las cuales han sido reportadas 7 subtipos. Sin embargo, debido a que estos canales catiónicos no selectivos presentan solo una moderada selectividad a Ca^{2+} sobre Na^+ (de 1 a 40 entre los diferentes tipos de canales TRPC) y conductancias unitarias mayores (> 100 veces) a las esperadas para el canal de la corriente CRAC, es claro que los canales TRPC no son esenciales para formar parte de SOCE. Lo anterior no excluye que canales heteroméricos formados por proteínas Orai y ciertos subtipos de TRPC sean responsables de algunas de las respuestas SOCE nativas (Liao *et al.*, 2008, 2009; Naylor *et al.*, 2008). Evidencias para apoyar esta posibilidad incluyen la demostración de que proteínas TRPC interactúan directamente con moléculas STIM1 y Orai, así como cambios en las propiedades de las respuestas SOCE y ROCE en diversos sistemas de expresión heteróloga (Huang *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2009). Algunas de las respuestas ROCE son mas compatibles con la activación de canales TRPC, sin embargo aún en estos casos se ha propuesto que ROCE es modulada por la interacción con proteínas Orai (Liao *et al.*, 2009). Es preciso recordar que la diferencia operacional fundamental de ROCE con respecto a SOCE es que el primero no requiere del vaciado de los reservorios, bajo estas condiciones los canales TRPC posiblemente involucrados en ROCE pueden ser activados a través de varios mecanismos: 1) activación por diacilglicerol, a través de la estimulación de la proteína Gq y de fosfolipasa C (especialmente los subtipos TRPC3, 6 y 7; e.g., Hofmann *et al.*, 1999); 2) a través de la activación por su interacción con lisofosfolípidos (e.g., Flemming *et al.*, 2006); 3) por la fusión de vesículas conteniendo canales TRPC (e.g., Bezzerides *et al.*, 2004); y 4) una posible interacción directa entre receptores a IP_3 y canales TRPC (e.g., Kiselyov *et al.*, 1998; Boulay *et al.*, 1999).

La diversidad de proteínas involucradas en la activación de SOCE y ROCE se ve reflejada en la diversidad de las propiedades de las respuestas descritas en diferentes tipos celulares, y sugiere un posible requerimiento de las señales de Ca^{2+} de ser controladas de forma estrecha en su rango dinámico y en su localización subcelular, lo que determinaría al menos en parte la especificidad de la señal que es transmitida a través de este segundo mensajero en los diferentes tipos celulares.

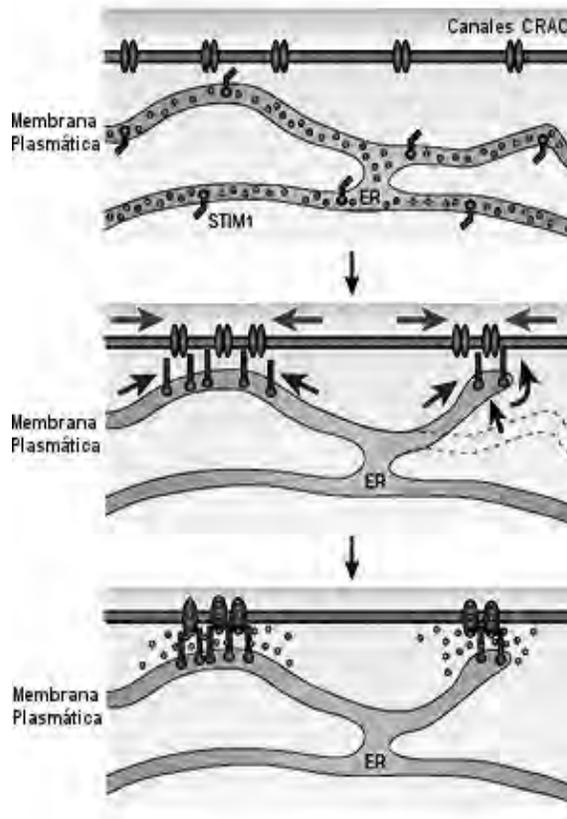


Figura 4. Unidades funcionales del canal SOC ensambladas en respuesta al vaciado de Ca²⁺ de los reservorios. STIM1 y Orai1 están dispersos alrededor del retículo endoplásmico y la membrana plasmática respectivamente. El vaciado del retículo endoplásmico provoca que STIM1 se agrupe y se yuxtaponga a la membrana plasmática. Al mismo tiempo Orai1 se acumula en regiones de la membrana plasmática directamente opuesta al agrupamiento de STIM1. La colocalización de ambas moléculas permite la activación del canal (Modificado de Lewis, 2007).

2. ANTECEDENTES

2.1 El folículo de *Xenopus laevis*

El folículo ovárico de la rana *Xenopus laevis* ha sido utilizado por más de 30 años como un modelo celular para el estudio de la comunicación inter e intracelular. Sus características morfológicas y las ventajas que representan, ha provocado su uso extensivo como modelo celular en una gran diversidad de estudios de las moléculas involucradas en la comunicación así como de los mecanismos que activan. Por ejemplo, su uso como sistema de expresión heterólogo para diversas proteínas de señalización tales como receptores membranales, canales iónicos, transportadores y bombas iónicas, lo han convertido en elemento indispensable tanto en investigaciones de carácter básico como aplicado.

El desarrollo temprano como modelo de expresión heteróloga, impulsó un gran interés en estudiar las características endógenas o nativas del modelo, ya que una adecuada comprensión de dichas características, permitirá un análisis adecuado de las moléculas exógenas de estudio.

En este contexto, en diferentes estudios que utilizan el ovocito de *Xenopus* como modelo de expresión heteróloga, no han sido pocas las conclusiones erróneas sobre las características funcionales de diversas moléculas; esto debido precisamente a la falta de información de los elementos expresados de forma endógena y que de alguna manera interactúan directa o indirectamente con las moléculas expresadas. Otra de las áreas en donde su uso como modelo celular ha sido fundamental es en el relacionado con las vías de comunicación intracelulares, en este campo el ovocito ha sido utilizado para el entendimiento de por ejemplo: 1) las vías intracelulares que controlan el ciclo celular, y 2) los mecanismos y las moléculas involucradas en la señalización a través de la síntesis de IP_3 , la dinámica del aumento del Ca^{2+} intracelular y sus efectos sobre moléculas efectoras tales como canales iónicos membranales. Cada uno de estos temas son muy amplios, y las aportaciones de este modelo celular a estos aspectos de la biología celular han sido descritos en numerosas revisiones (e.g., Maller, 1990,1993, 1986-1987; Maller *et al.*, 1989; Berridge *et al.*, 1988; Dargan *et al.*, 2006; Whitaker, 2006).

Sin embargo, este conocimiento esencial no es el único de interés para continuar el análisis de las características nativas de la comunicación del folículo

ovárico de *Xenopus*, desde los primeros estudios de las propiedades electrofisiológicas del folículo fue demostrado que éste expresaba en su membrana una diversidad de sistemas de comunicación endógenos, que por su abundancia y diversidad, mostraban que de forma nativa el folículo expresa receptores específicos a las principales sustancias transmisoras comúnmente expresadas en el sistema nervioso (colinérgicas, purinérgicas, catecolaminérgicas, adrenérgicas, etc.), así como a una gran diversidad de péptidos bioactivos (angiotensina II (AII), el factor natriurético auricular (ANF), el péptido intestinal vasoactivo (VIP), etc.) y otras sustancias transmisoras (prostaglandinas, ácido lisofosfatídico), además por supuesto, de la expresión de moléculas receptoras a las hormonas gonadotrópicas (Woodward & Miledi, 1987; Arellano *et al.*, 1996). La sorprendente diversidad en la expresión de estos sistemas de comunicación propició de manera natural preguntas acerca del papel funcional de las moléculas receptoras en este sistema, y de los mecanismos que activan en la membrana del folículo; sin embargo eliminar la mayoría de las preguntas permanecen sin respuesta. Existen sin embargo importantes avances en el estudio de algunos de los sistemas de señalización, los resultados obtenidos han permitido sugerir que representan sistemas conservados a lo largo de la escala filogenética, y que los mecanismos que activan podrían contribuir en los procesos de crecimiento y desarrollo del gameto. En esta categoría se encuentran los elementos involucrados tanto en las respuestas purinérgicas, como en las respuestas colinérgicas, y también en las respuestas provocadas por el péptido angiotensina II (AII). Antes de explicar la naturaleza de estos sistemas de señalización haré un breve resumen de las características esenciales del modelo celular en estudio, para después plantear los principales antecedentes específicos del problema que intentamos resolver en el presente trabajo, el cual será enunciado en la última sección de antecedentes.

Se debe mencionar aquí, que el estudio sistemático de los sistemas de señalización en el folículo de *Xenopus* se enmarca, sin embargo, de forma más amplia en un problema general de la biología moderna, que tiene que ver con el fenómeno de especificidad de las señales transmisoras. Sabemos ahora que los diferentes tipos celulares expresan una gran diversidad de receptores en sus membranas, muchos de estos son comunes a los expresados en sistemas celulares por completo diferentes y que realizan otras funciones en el organismo. Sin embargo, en condiciones normales, las sustancias transmisoras conllevan señales

específicas que son reconocidas e interpretadas de forma inequívoca por la célula receptora. Este fenómeno es debido a una serie de factores que en su conjunto garantizan la apropiada traducción de la señal en cada tipo celular; los mecanismos de control y regulación de este fenómeno están siendo estudiados por la biología moderna utilizando diversas metodologías. Algunos de los mecanismos propuestos han sido descubiertos de manera reciente, y requieren aun de mayor información para ser entendidos cabalmente, por ejemplo, el fenómeno de oligomerización de receptores acoplados a proteínas G, que permite la formación de moléculas con propiedades funcionales diferentes a las manifestadas por los monómeros (Yoshioka & Nakata, 2004; ver también, Arellano *et al.*, 2009).

2.2 Estructura del folículo de *Xenopus laevis*

Estudios detallados de la morfología de los folículos de *Xenopus laevis*, demuestran que están compuestos por diversas capas celulares y acelulares. En la parte más externa se encuentra el epitelio interno ovárico, después la capa de la teca, conformada principalmente por células tecales que tienen una apariencia fibroblástica así como por vasos y células sanguíneas, la siguiente capa está formada por una intrincada red de fibras de colágena que forman la membrana basal de la siguiente capa celular, una monocapa de células foliculares, la cual es seguida de una membrana vitelina acelular, y finalmente el ovocito (Figura 5) (Dumont, 1978).

Las células foliculares son de principal importancia en el contexto del presente estudio, funcionalmente son células homólogas a las células de la granulosa y del cumulus en la estructura del folículo ovárico de especies superiores. Estas células presentan comunicación eléctrica entre ellas y con el ovocito mediante uniones comunicantes (Arellano *et al.*, 1996). Dichas uniones forman un poro por el cual logran pasar moléculas del citoplasma de una célula al citoplasma de otra. Están conformadas por conexinas, estas proteínas al unirse forman conexones que son parte del poro central. Las uniones se encuentran en puntos de contacto entre proyecciones celulares tanto de las células foliculares (microvellosidades) como del propio ovocito (macrovellosidades), estas proyecciones atraviesan la capa vitelina a través de poros en su estructura (Dumont, 1978). Las células foliculares son las encargadas de proveer un microambiente adecuado para el desarrollo del gameto,

produciendo y secretando esteroides y otros factores que promueven el crecimiento y la maduración del ovocito.

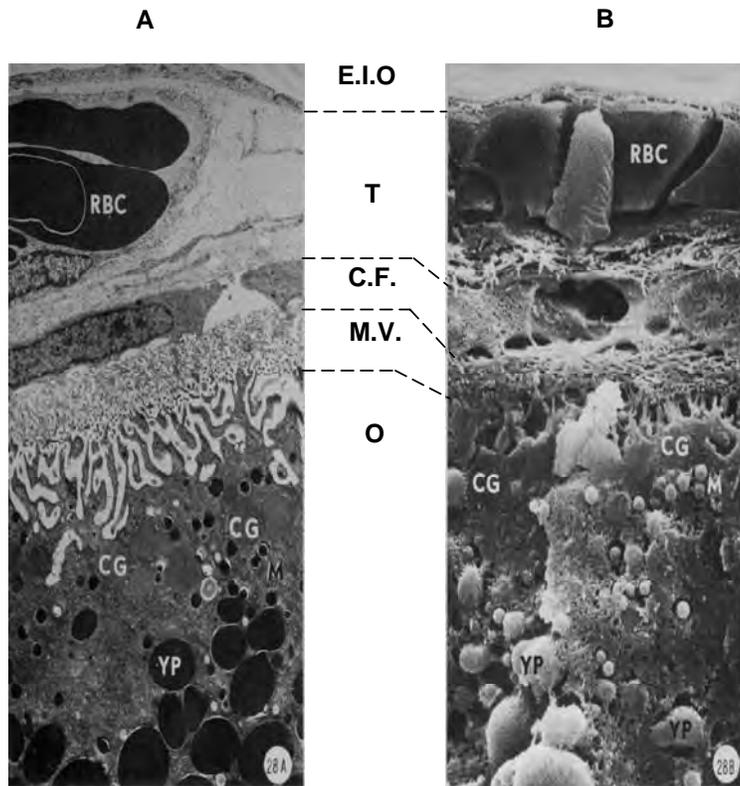


Figura 5. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (A) y de barrido (B) del folículo ovárico de *Xenopus laevis*. Se muestra la arquitectura del folículo (estado IV) compuesto por diversas capas celulares. El epitelio interno del ovario (E.I.O.); la teca (T); las células foliculares (C.F.); la membrana vitelina (M.V.) y el ovocito (O) (RBC, eritrocitos; CG, gránulo cortical; M, gránulo de pigmento; YP, gránulo de yema). (Modificado de Dumont, 1978).

2.3 Origen folicular de las corrientes iónicas provocadas por ATP, ACh y All en *Xenopus*

En el folículo de *Xenopus* se ha demostrado la activación de corrientes iónicas a través de la aplicación de diferentes agonistas, varias de estas respuestas celulares fueron descritas originalmente por Miledi y colaboradores hace poco mas de 30 años (Kusano *et al.*, 1977, 1982). Las respuestas se originan tanto en la

membrana del ovocito como también en las células foliculares, éstas últimas, las respuestas foliculares, son transmitidas a través de las uniones comunicantes al gameto en desarrollo (Arellano *et al.*, 1996). La señal transmitida al ovocito no solo es eléctrica en esencia, sino también puede en algunos casos tratarse de la transmisión de segundos mensajeros tales como el IP_3 o el AMPc como veremos mas adelante.

En el folículo de *Xenopus* ha sido descrita la generación de corrientes llevadas por iones Cl^- y de corrientes llevadas por K^+ , debido a que estas respuestas son por lo general monitoreadas a través de electrodos implantados en el ovocito, surgió la posibilidad de que su origen fueran las células foliculares y no propiamente el ovocito. La principal observación que llevaba a esta hipótesis fue que en condiciones de cultivo las respuestas de K^+ , y algunas de Cl^- , disminuían su amplitud hasta en un 90% en las primeras 24 horas. El papel fundamental de las células foliculares en la generación de las corrientes de K^+ fue demostrada en experimentos de defoliculación por Miledi & Woodward (1989). Éste y otros estudios demostraron que la defoliculación no sólo elimina las corrientes de K^+ , sino también corrientes de Cl^- generadas por agonistas colinérgicos y purinérgicos (Arellano & Miledi 1993; Arellano *et al.*, 1996, 1998), las respuestas eliminadas por defoliculación eran las mismas que se perdían en cultivo con el tiempo, esto indicó que las corrientes de este tipo tenían su origen en la monocapa de células foliculares, y que lo mas probable era, que éstas son transmitidas a través de comunicación eléctrica al ovocito. Posteriormente, se introdujeron diferentes formas de preparar los folículos, y una modificación de las condiciones de cultivo que permitían mantener y monitorear las corrientes foliculares de forma más eficiente y prolongada (Arellano & Miledi 1993; Arellano *et al.*, 1996).

La corriente de K^+ puede ser activada por diferentes agonistas como purinérgicos, catecolaminérgicos y adrenérgicos, así como por varios agonistas neuropéptidos y hormonas, es una de las respuestas originadas en las células foliculares. Debido a que esta corriente es activada a través de un aumento en la síntesis de AMPc se le conoce actualmente como corriente de K^+ dependiente de AMPc ($I_{K,AMPc}$). Entre los agonistas mas conspicuos de esta respuesta se encuentran, la adenosina, el ATP, la norepinefrina, la dopamina, la hormona folículo estimulante, así como el péptido vaso-intestinal, el factor atrial-natriurético, y las prostaglandinas (Arellano *et al.*, 1996). La respuesta puede ser mimetizada por el

aumento de los niveles de AMPc de forma directa, por ejemplo, la activación de la adenilato ciclasa por forskolina, la inhibición de las fosfodiesterasas por drogas específicas como la isobutilmetilxantina, y por la inyección intracelular directa de AMPc o la perfusión con derivados permeables de este segundo mensajero. Los canales responsables de esta corriente parecen ser del tipo sensible a ATP, los cuales son afectados por sustancias que abren canales de K^+ tales como el pinacidil y la cromakalina, y bloqueados por drogas del tipo de las sulfonilureas tal como la glibenclamida utilizada en el tratamiento de la diabetes (Wibrand *et al.*, 1992; Honoré & Lazdunski, 1991). Se ha sugerido que la composición de estos canales corresponde con subunidades de canales de potasio Kir6.1 asociadas al receptor de sulfonilureas del tipo SUR2A (Fujita *et al.*, 2007).

Por otra parte, han sido estudiadas en el folículo respuestas debidas a la activación de corrientes acarreadas por iones Cl^- , los principales agonistas de estas respuestas son sustancias purinérgicas y colinérgicas así como el péptido All (Sandberg *et al.*, 1992; Woodward & Miledi, 1991; Arellano & Miledi, 1993; Arellano *et al.*, 1996, 1998). Las corrientes debidas a sustancias purinérgicas y colinérgicas resultaron ser más complejas que las generadas por All, en cuanto que implicaban al menos dos tipos de canales de Cl^- diferentes, y además la generación de corrientes de K^+ del tipo $I_{K,AMPc}$. Arellano y colaboradores demostraron que las corrientes generadas por receptores muscarínicos (Arellano & Miledi, 1993) y purinérgicos (Arellano *et al.*, 1998) en el folículo, involucran diferentes tipos de canales de Cl^- a los descritos en el ovocito. Por su cinética y diferencias en los mecanismos de activación, la estimulación colinérgica o purinérgica provoca que las respuestas foliculares a estos agentes sean multifásicas, y la primera descripción distinguió respuestas foliculares de Cl^- rápidas y lentas.

Fue demostrado que estas dos fases de la respuesta a ACh acarreadas por Cl^- son eliminadas por defoliculación y que cada una de ellas depende de la apertura de canales de Cl^- con características diferentes, de la misma manera que los canales involucrados en la activación de corrientes de Cl^- activadas en el ovocito (ver más adelante); actualmente a estas corrientes foliculares se les conoce como F_{Cl} (corriente rápida de Cl^-) y S_{Cl} (corriente lenta de Cl^-), mientras que la que tiene origen en el ovocito se le conoce como corriente oscilatoria de Cl^- dependiente de Ca^{2+} ($I_{Cl(Ca)}$). La respuesta a ACh que se origina en el ovocito, fue la primera respuesta eléctrica en ser descrita, esta es una corriente con una cinética de activación

oscilatoria (Kusano *et al.*, 1977, 1982). Su generación corresponde con la estimulación de receptores muscarínicos expresados en la membrana del ovocito, y la apertura de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} localizados también en el ovocito. La respuesta $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ oscilatoria tiene un mecanismo de activación que involucra la liberación de Ca^{2+} por la vía de activación de la fosfolípasa C (PLC) y la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3); debido a esta característica las corrientes oscilatorias son eliminadas en pocos segundos después del cargado del ovocito con quelantes de Ca^{2+} tales como el ácido etilenglicol-bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetracético (EGTA) o el ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano—N,N,N',N'-tetracético (BAPTA). En claro contraste, las corrientes F_{Cl} y S_{Cl} son respuestas que en general no presentan oscilaciones en su activación, y cuando el ovocito es cargado con alguno de los quelantes de Ca^{2+} , estas respuestas permanecen aun después de varias decenas de minutos, inclusive utilizando concentraciones del quelante muy superiores a las necesarias para eliminar la corriente oscilatoria (Arellano & Miledi, 1993); la conclusión inmediata fue que estas corrientes no requerían de un aumento de Ca^{2+} en el citoplasma del ovocito para poder ser activadas y por lo tanto no involucraban la apertura de los canales de Cl^- expresados en su membrana. Posteriormente, se demostró que estos dos últimos tipos de corrientes de Cl^- foliculares, F_{Cl} y S_{Cl} , son también generados por ATP y otros agonistas purinérgicos como el UTP y el 2MeS-ATP (Arellano *et al.*, 1996, 1998). Las características esenciales de estas respuestas purinérgicas fueron muy similares a las reportadas para los agentes colinérgicos, incluyendo el ser insensibles a la quelación del Ca^{2+} en el citoplasma del ovocito y su independencia del Ca^{2+} extracelular. Los agonistas purinérgicos parecen compartir la vía de señalización utilizada por los receptores muscarínicos localizados en las células foliculares (Arellano *et al.*, 1996, 1998). El pre-tratamiento con la toxina de pertusis inhibe ~50% de la respuesta F_{Cl} y S_{Cl} generadas por ATP o ACh, apoyando la idea de que los receptores específicos para cada transmisor pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Arellano *et al.*, 1998), esta idea se refuerza por el hecho de que la respuesta es también activada por UTP, un agonista que hasta ahora se sabe solo actúa a través de receptores metabotrópicos. La activación de las corrientes foliculares a través del ATP probablemente tienen un papel fisiológico relevante, ya que ha sido demostrado que el ovocito libera a este transmisor y una vez en el espacio extracelular es capaz de activar las corrientes endógenas en la membrana de las células foliculares;

actuando de esta forma como un transmisor parácrino (Maroto & Hamill, 2001; Saldaña *et al.*, 2009).

Sin embargo, el mecanismo de activación de F_{Cl} y S_{Cl} no se ha esclarecido por completo, se sabe que cuando son activadas por ACh o agonistas purinérgicos no están relacionadas con la síntesis de AMPc. Las respuestas foliculares de Cl^- , F_{Cl} y S_{Cl} , no son los únicos efectos compartidos por la activación de receptores muscarínicos y purinérgicos. Stinnakre y su grupo (van Renterghem, 1985) demostraron que ACh es capaz de provocar una fuerte inhibición sobre la $I_{K,AMPc}$, y que este efecto se lleva a cabo por la estimulación de receptores muscarínicos. En 1996, Arellano y colaboradores demostraron que ATP y UTP también provocan la inhibición de $I_{K,AMPc}$. Estos resultados han sido corroborados y ampliados en estudios recientes (Arellano *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 2001), demostrando además que la inhibición de la $I_{K,AMPc}$ provocado por la estimulación purinérgica tampoco depende de un aumento del Ca^{2+} intracelular en el ovocito o de Ca^{2+} extracelular. En este caso, a diferencia de lo que ocurre con la compleja respuesta acarreada por Cl^- , se ha demostrado que la activación de las corrientes de Cl^- y la inhibición de $I_{K,AMPc}$ es llevada a cabo por dos subtipos diferentes de receptores muscarínicos que colocalizan en la membrana de las células foliculares, en el caso de la activación de las respuestas de Cl^- se encuentra involucrado un receptor tipo M3, mientras que en el caso de inhibición de la respuesta $I_{K,AMPc}$ se trata de un receptor del tipo M2 o M4 (Arellano *et al.*, 1999). Las características de los mecanismos de la inhibición de $I_{K,AMPc}$ no han sido completamente estudiados, sin embargo, la importancia de la generación de $I_{K,AMPc}$ y su inhibición radica en el papel que juega esta corriente durante la maduración del ovocito, ya que la corriente $I_{K,AMPc}$ potencia de forma marcada la cinética de maduración del ovocito (Wibrand *et al.*, 1992; Honoré & Lazdunski, 1991), por lo cual ha sido sugerida como un modulador fisiológico de este fenómeno.

3. JUSTIFICACIÓN

Es importante hacer énfasis, dentro del contexto del presente estudio, en que la activación de receptores a ATP en ningún caso producen respuestas oscilatorias $I_{Cl(Ca)}$, en cambio, las respuestas foliculares provocadas por el péptido All en general no incluyen la activación de las corrientes F_{Cl} (Arellano *et al.*, 1996) sino solo la respuesta oscilatoria $I_{Cl(Ca)}$. Se sabe, que la All actúa a través de receptores específicos localizados en la membrana de las células foliculares donde aumenta la síntesis de IP_3 , este segundo mensajero difunde a través de las uniones comunicantes hasta el citoplasma del ovocito donde promueve la liberación de Ca^{2+} y la activación de $I_{Cl(Ca)}$ en la membrana del ovocito; las evidencias experimentales más importantes muestran que la respuesta a All es eliminada por la quelación del Ca^{2+} en el citoplasma del ovocito, y que las respuestas son eliminadas por defoliculación o por bloqueadores de las uniones comunicantes, también ha sido mostrado que las células foliculares promueven la síntesis de IP_3 al ser estimuladas por la All (Sandberg *et al.*, 1992). Por lo tanto, si bien ambos tipos de receptores metabotrópicos se encuentran localizados en la membrana de las células foliculares, estos actúan sobre sus respectivos receptores activando al parecer mecanismos de traducción diferentes.

Sin embargo -y esto corresponde a los antecedentes más importantes que provocaron la mayor interrogante en el inicio de este estudio- se sabe que ATP o UTP son capaces de provocar un aumento del calcio intracelular en varias células ováricas de distintas especies (Arellano *et al.*, 2002; Morales-Tlalpan *et al.*, 2005; Markosyan *et al.*, 2006), todas aparentemente a través de la síntesis de IP_3 (ver también, Vázquez-Cuevas *et al.*, 2006), y recientemente hemos demostrado que las células foliculares aisladas de la rana *Xenopus laevis* responden a ATP y a All provocando un aumento de Ca^{2+} intracelular (Robles-Martínez, 2007), que es lo esperado para un sistema actuando a través de PLC estimulada por la activación de la proteína Gq. Además, los receptores metabotrópicos purinérgicos de los subtipos que son sensibles a UTP, llamados P2Y2, P2Y4, y P2Y6, todos son receptores que se acoplan preferentemente al sistema de PLC (Lazarowski & Boucher, 2001) en los diversos sistemas celulares estudiados. Esto justifica un análisis con mayor detalle del posible papel que podría tener el Ca^{2+} tanto extracelular como intracelular

durante las respuestas purinérgicas foliculares. Las preguntas inmediatas ante estas evidencias en su conjunto son: 1) ¿La respuesta eléctrica F_{Cl} , generada por ATP, es provocada a través de un mecanismo de traducción distinto a la activación de PLC y liberación de Ca^{2+} intracelular?, 2) ¿Si éste no es el caso y F_{Cl} es activada por la estimulación de PLC, entonces, qué determina que no se generen respuestas oscilatorias en el ovocito? Es decir en donde radica la especificidad de la señal comparada al mecanismo activado por AII, y, 3) ¿Si la generación de F_{Cl} no depende de la activación de PLC cuál es el mecanismo activado?

Para tratar de responder a estas preguntas, en la presente tesis fueron realizados experimentos electrofisiológicos y de fluorescencia funcional, en donde fue evaluada la posible participación del Ca^{2+} durante la respuesta F_{Cl} , y sobre el aumento de este catión en las células foliculares durante su estimulación por ATP y otras drogas.

Pensamos que el estudio de un modelo de las características del folículo de *Xenopus*, aportará también información útil para la comprensión de los mecanismos involucrados en el fenómeno de especificidad de las señales.

4. HIPÓTESIS

Las corrientes iónicas activadas a través de la estimulación de receptores purinérgicos en células foliculares de *Xenopus laevis* son dependientes de calcio.

5. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la dependencia con Ca^{2+} de la respuesta purinérgica en el folículo ovárico de *Xenopus laevis*

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención de folículos

Ranas hembra de la especie *Xenopus laevis* fueron obtenidas de Xenopus I (Ann Arbor, MI). Las ranas fueron anestesiadas por hipotermia y sometidas a cirugía para disecar de 2 a 3 lóbulos ováricos. Se realizó una incisión abdominal de 0.5 cm, tanto en dermis como en músculo (Figura 6) para obtener acceso a la cavidad abdominal y el ovario, una vez disecados los lóbulos del ovario estos fueron colocados en una caja Petri con solución de Barth modificada (conteniendo en mM: 88 NaCl, 0.2 KCl, 2.4 NaHCO₃, 0.33 Ca(NO₃)₂, 0.41 CaCl₂, 0.82 MgSO₄, 0.88 KH₂PO₄, 5 glucosa, gentamicina 70 mg/ml, suplementada con 0.2% de suero fetal bovino (SBF), y ajustada a pH 7.4 con NaOH), por último la rana fue suturada y colocada en un estanque donde su recuperación fue supervisada por dos semanas.

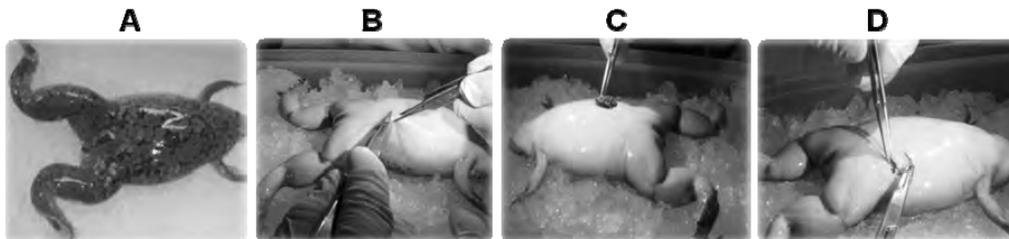


Figura 6. Cirugía de rana *Xenopus laevis*. (A) Rana *Xenopus laevis* (B) Incisión abdominal; (C) Disección de lóbulos ováricos; (D) sutura.

Posteriormente, con la ayuda de un microscopio estereoscópico y de unas pinzas finas, fueron disecados folículos de los lóbulos ováricos en el estado VI de desarrollo según la clasificación de Dumont (1972) (Figura 7), a los cuales se les removió el epitelio y la teca por lo que son llamados folículos *e.t.r.* (Figura 8). En los folículos *e.t.r.* la membrana basal de las células foliculares queda intacta proporcionándoles la protección y el ambiente natural a estas células; además esto facilita la inserción de los electrodos y provee estabilidad en los registros electrofisiológicos, facilitando la interpretación de resultados por la eliminación de la probable participación de las capas celulares más externas en la respuesta folicular (Arellano & Miledi 1993; Arellano *et al.*, 2009).

En otro tipo de preparaciones denominadas *cf.o.* (células foliculares-ovocito), la membrana basal de las células foliculares fue removida junto con las capas del epitelio interno ovárico y las células de la teca, estas preparaciones *cf.o.* se utilizan para la obtención del cultivo primario de células foliculares que se describirá mas adelante.

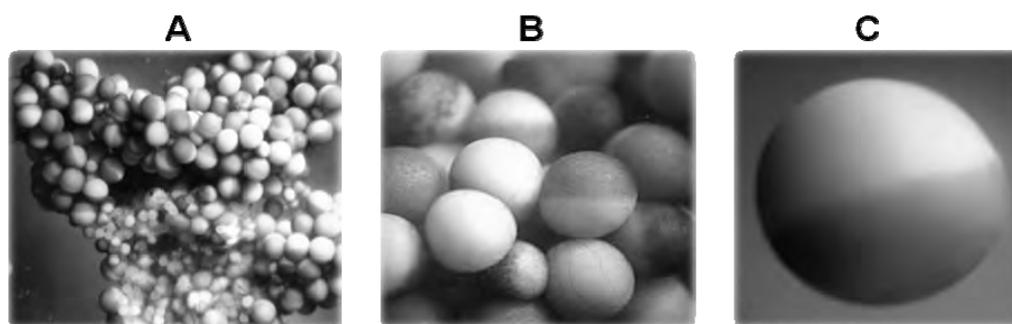


Figura 7. Aislamiento de folículos de *Xenopus laevis*. (A) lóbulo ovárico; (B) folículos unidos al epitelio ovárico; (C) Folículo *e.t.r.* (epitelio y teca removido) aislado.

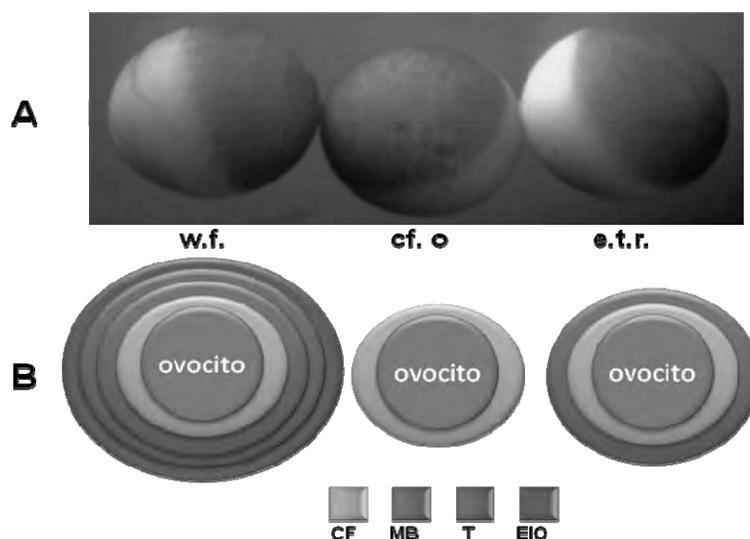


Figura 8. Folículos de *Xenopus laevis*. (A) Fotografía de folículos tipo *w.f.*, la preparación *cf.o.* y folículos *e.t.r.* (B) Esquema que resume las diferentes preparaciones de folículos utilizadas en este estudio (*w.f.*(folículo completo), *cf.o.*(células foliculares-ovocito), y *e.t.r.*(epitelio y teca removido)), donde las diferentes capas son señaladas como sigue: EIO, epitelio interno ovárico en azul; T, teca en rojo; MB, membrana basal en morado; CF, células foliculares en naranja.

6.2 Técnica de control de voltaje

Las respuestas eléctricas de los folículos ováricos *e.t.r.* fueron registradas utilizando la técnica de control de voltaje con dos electrodos (Miledi, 1982; Figura 9). El control de voltaje es una técnica ampliamente utilizada para el estudio de las corrientes que fluyen a través de canales iónicos en una membrana. Con esta técnica se controla a un valor predeterminado el voltaje de la célula bajo estudio, de tal forma que se pueda medir la corriente transmembranal que fluye a este potencial. Con el voltaje transmembranal de la célula bajo control, la corriente que fluye a través de la membrana es proporcional a su conductancia y ésta se encuentra determinada por la apertura y cierre de los canales iónicos (ver: Hille, 2001).

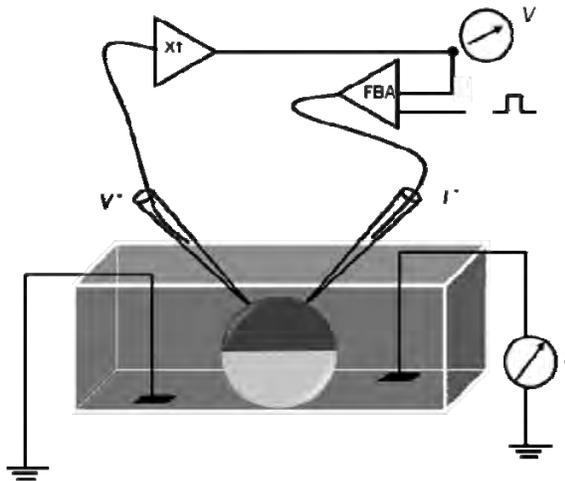


Figura 9. Esquema de la técnica de control de voltaje, donde V' es el electrodo de voltaje. $X1$: es el amplificador. V : es el voltaje de mantenimiento. FBA : amplificador de retroalimentación negativa. I' es el electrodo intracelular de corriente, I es el amperímetro que se encuentra en el baño y censa la corriente transmembranal (Modificada de Hille, 2001).

El sistema es un circuito cerrado (Figura 9) constituido por 2 microelectrodos intracelulares, uno de los cuales registra el voltaje (V') y otro inyecta corriente (I') a la célula. Debido a que el orden de magnitud de los voltajes registrados es muy pequeño, el electrodo de voltaje se conecta a un amplificador. La señal se compara con un voltaje comando o de mantenimiento (V) que es el valor de voltaje al que se desea controlar la membrana, la diferencia entre ellos es compensada por una

inyección de corriente, a través del electrodo I' cuya magnitud es determinada a través de un circuito de retroalimentación negativo (FBA). En el baño se encuentra un tercer electrodo que mide a través de un amperímetro la corriente (I) que cruza la membrana de la célula.

Los electrodos intracelulares V' e I' utilizados fueron elaborados con capilares de vidrio de borosilicato con un diámetro interno y externo de 1.2 y 2 mm respectivamente (WPI, FI, EUA). Los electrodos fueron llenados con solución 3 M KCl y tuvieron una resistencia de 1-2 MΩ. El amplificador de control de voltaje empleado fue el GeneClamp 500B (Axon Inst., CA, EUA). La señal de corriente transmembranal fue registrada utilizando un osciloscopio marca Gould (D50-602), también la señal fue almacenada digitalmente utilizando el convertidor A/D Digidata 1200A y el programa pClamp 9 (Axon Inst.). Un generador de pulsos GRASS (Astro-Med Inc, EUA) fue utilizado para cambiar el voltaje de mantenimiento por periodos breves (1 a 2 s).

El registro electrofisiológico de los folículos *e.t.r.* se realizó dentro de un periodo de 12 hasta 72 h después de la disección. Las respuestas electrofisiológicas fueron observadas bajo un protocolo de registro que consistió en el control de voltaje de los folículos a un potencial de -60 mV para los estudios de activación de las corrientes provocadas por ATP. Los folículos bajo registro fueron mantenidos en una cámara, donde se perfundieron continuamente (10 ml/min) con una solución Ringer Normal (RN) que contenía en mM: 115 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 5 HEPES, ajustada a pH 7.0 con NaOH. Las drogas fueron disueltas en RN, a partir de alícuotas concentradas de cada uno de los fármacos, y aplicadas a través de la perfusión. Después de un registro de las condiciones eléctricas basales se procedió a perfundir la preparación por 60 a 120 s con los diferentes agonistas estudiados.

6.3 Soluciones externas e inyección intracelular de quelantes de Ca²⁺

La solución RN contenía 1.8 mM CaCl₂, ésta es considerada en el estudio la concentración basal de Ca²⁺, se utilizaron sin embargo soluciones conteniendo diferentes concentraciones en donde fue substituido equiosmolarmente el NaCl de la solución RN por CaCl₂, para ello fueron preparadas dos soluciones de igual osmolaridad: 1) Solución Ringer conteniendo 60 mM Ca²⁺ (R60Ca, que contenía en

mM: 25 NaCl, 2 KCl, 60 CaCl₂, 5 HEPES, pH 7) y 2) Solución Ringer sin Ca²⁺ (RzCa) en donde fue omitido el CaCl₂ en la solución RN. Las soluciones conteniendo diferentes concentraciones de Ca²⁺ utilizadas fueron preparadas entonces mezclando diferentes proporciones de las soluciones R60Ca y RzCa (e.g., R30Ca contenía 50% de R60Ca y 50% de RzCa).

La sustitución aniónica en la solución RN se realizó de la siguiente manera: 1) Soluciones Ringer donde todo el NaCl fue substituido por NaI (RI⁻), NaBr (RBr⁻), NaSCN (RSCN⁻), o Na₂SO₄; en esta última la osmolaridad de la solución fue compensada agregando sacarosa y es llamada solución Ringer sin Cl⁻ (RzCl⁻, que contenía en mM: 17.19). Las soluciones conteniendo bajo Cl⁻ con alto Ca²⁺ fueron preparadas agregando la concentración apropiada de R60Ca a la solución RzCl⁻, por lo que las soluciones R10Ca bajo Cl⁻ contenía 20 mM Cl⁻, mientras que la solución R20Ca bajo Cl⁻ contenía 40 mM Cl⁻. Las soluciones alto Ca²⁺ conteniendo los diferentes aniones les fue agregado 5 ó 10 mM de CaCl₂ por lo que también contenían la proporción correspondiente de Cl⁻.

En una serie de experimentos fueron inyectados en el citoplasma del ovocito sustancias quelantes de Ca²⁺, el EGTA o el BAPTA. Para esto fue utilizada una pipeta insertada en el ovocito de folículos *e.t.r.*, la pipeta fue cargada con 0.05 a 0.1 M de alguno de los quelantes y conectada a un sistema eyector de aire a presión (20 psi), ajustando electrónicamente los tiempos necesarios de inyección para cargar los ovocitos con 3 a 9 nanomoles del quelante correspondiente, el control se realizó a través de una válvula electrónica que permitía la inyección por tiempos breves de cientos de milisegundos. La concentración final de la droga, en el citoplasma del ovocito, fue estimada midiendo el diámetro de la gota de solución inyectada por un pulso idéntico antes de penetrar el ovocito con la pipeta. En estas condiciones y considerando un volumen del ovocito aproximado a 1 µl las concentraciones alcanzadas de los quelantes fueron de 3 a 9 mM.

6.4 Obtención de cultivo primario de células foliculares

En el aislamiento de las células foliculares fueron utilizados cubreobjetos y aros de clonación celular (*V-Ring teflon PTFE; 0.5"*) que fueron lavados de la siguiente forma: aplicando Et-OH 75% y ácido nítrico al 65% por 24 h, después fueron lavados dos veces con agua destilada por 30 min para retirar el exceso de ácido nítrico, dejando secar en campana de flujo laminar. A continuación fueron tratados con radiación ultravioleta por 8 h. Los aros de clonación fueron adheridos a los portaobjetos, para formar una cámara de incubación (500 μ l) para la obtención de las células foliculares.

Otros cubreobjetos fueron colocados en cajas de cultivo de doce pozos, y se les agregó 200 μ l de colágeno 0.1 mg/1 ml durante 4 h, después se retiró el exceso de la solución de colágeno, se lavó y se dejó secar en la campana de flujo laminar.

Una vez preparados estos materiales, fueron obtenidos folículos a los cuales les fue disecada la cubierta epitelial, junto con las células de la teca y la membrana basal de las células foliculares (folículos *cf.o.: células foliculares-ovocito*) en solución Barth modificada sin SFB, debido a que el suero puede inhibir la acción del tratamiento enzimático. Fueron entonces colocados en la cámara de incubación por 15 min, en medio conteniendo tripsina 0.05% 1 mM EDTA, en seguida se colocaron en 250 μ l de la solución Barth modificada suplementada con SFB 5%, para detener la reacción enzimática. Los folículos fueron agitados suavemente transfiriéndolos de forma repetida a través de una pipeta Pasteur por 5 min, finalmente alícuotas (aprox. 50 μ l) del sobrenadante conteniendo las células en suspensión, fueron depositadas sobre los vidrios tratados con colágeno en los platos de cultivo multipozo. Las preparaciones fueron incubadas por 2 h aproximadamente para que las células foliculares se adhirieran al vidrio tratado, y posteriormente les fue agregada 1 ml de la solución Barth modificada suplementada con SFB 2% en cada pozo, y fueron incubadas por 24 horas (Figura 10).

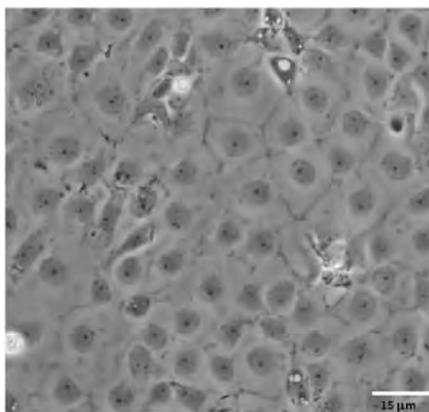


Figura 10. Células foliculares aisladas del folículo de *Xenopus laevis*. Imagen campo claro de células foliculares aisladas.

6.5 Determinación de Ca^{2+} por Microscopía de Fluorescencia

La preparación de las células foliculares cargadas con el indicador Fluo 4-AM, fue colocada en una cámara de registro, y las células fueron perfundidas constantemente con solución RN. Los cambios en la fluorescencia de las células provocados por la aplicación de ATP fueron observados estimulando las células a 494-516 nm con una lámpara de mercurio (emisión-excitación respectivamente), utilizando un microscopio IXT71 (Olympus) equipado con una cámara (Evolution Qei) cuya velocidad de adquisición es de 33 ms por cuadro. Se sabe que los cambios en la intensidad de la fluorescencia del Fluo 4-AM son directamente proporcionales a la concentración de calcio libre, es decir a una mayor intensidad corresponde una mayor concentración de Ca^{2+} . Se realizó de esta forma el siguiente protocolo para determinar los cambios de calcio intracelular en las células foliculares. El experimento consistió en el registro por 5 s del estado basal de las células (RN), seguido por 5 s del registro de las células estimuladas por los agonistas, y por último un lavado del estímulo por 10 a 30 s.

El análisis de las imágenes adquiridas se realizó mediante los siguientes programas: Image Proplus 4.5.1.29 (*The proven solución TM*); Image J (*NIH*), y un programa para el análisis de imágenes desarrollado en el laboratorio.

7. RESULTADOS

7.1 La corriente F_{Cl} generada por ATP en los folículos *e.t.r.*

En el presente estudio se utilizaron folículos disecados como preparaciones *e.t.r.* ($n=190$, 47 ranas). Estos presentaron en solución RN un potencial de reposo promedio -34 ± 0.5 mV (\pm E.S.M.) y una resistencia de entrada de 0.66 ± 0.03 M Ω .

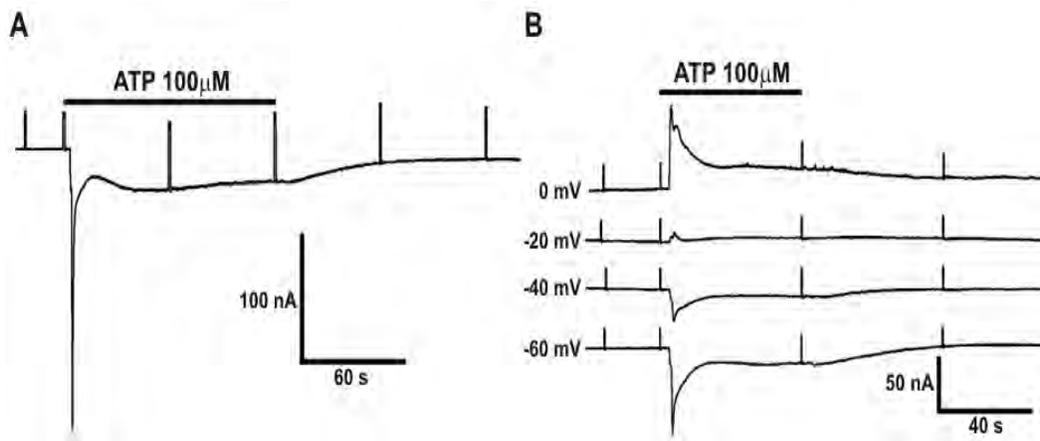


Figura 11. Corriente F_{Cl} generada por la aplicación de ATP extracelular. A) El trazo mostrado corresponde al registro típico de la corriente transmembranal en un folículo *e.t.r.* controlado a un potencial de -60 mV. Después de un periodo de monitoreo de la corriente basal se aplicó ATP a una concentración de $100 \mu\text{M}$ por el tiempo indicado por la barra negra superior (y por los pulsos breves a -40 mV indicando el inicio y la terminación de la aplicación de ATP). El ATP provocó la generación de una corriente entrante que se activó e inactivó con un curso temporal rápido, ésta cinética correspondió con características reportadas previamente para la corriente F_{Cl} . B) Respuesta F_{Cl} provocada por la aplicación de ATP $100 \mu\text{M}$ controlando el folículo *e.t.r.* en los diferentes potenciales membranales indicados a la derecha de cada trazo, mostrando un potencial de inversión de la respuesta F_{Cl} cercano a -20 mV. En cada trazo también se puede observar la generación de corrientes S_{Cl} de menor amplitud.

Estos folículos mantenidos en un potencial de -60 mV respondieron a la aplicación extracelular de ATP $100 \mu\text{M}$ generando principalmente corrientes entrantes rápidas (Figura 11), asociadas a un aumento de la conductancia de membrana, y con una amplitud promedio de 395 ± 76 nA (en un rango de 49 a 1190 nA). Las características cinéticas de la corriente, su dependencia de la presencia de

las células foliculares así como de su acoplamiento al ovocito, y su potencial de inversión alrededor de -25 mV (Figura 11), que coincidió con el valor reportado anteriormente; todas fueron características que identificaron a esta corriente como la llamada corriente F_{Cl} que tiene su origen en las células foliculares (Arellano & Miledi, 1993; Arellano *et al.*, 1996; 1998).

Los folículos que presentaron respuestas F_{Cl} robustas como las mostradas fueron entonces utilizados tanto para su registro electrofisiológico como *e.t.r.*, así como para la obtención de preparaciones de células foliculares aisladas para su uso en experimentos de fluorescencia funcional.

7.2 Estandarización del cargado con Fluo 4-AM de las células foliculares aisladas de *Xenopus*

Con la finalidad de estudiar un posible aumento de Ca^{2+} intracelular en las células foliculares causado por la aplicación de ATP y su relación con la respuesta F_{Cl} , nuestro primer objetivo fue corroborar este aumento utilizando fluorescencia funcional (Robles-Martínez 2007). Aún y cuando los protocolos utilizados para diferentes preparaciones son relativamente estándares, la técnica de cargado de las células foliculares presentó varios problemas que tratamos de subsanar en nuestros primeros experimentos. El primero de estos problemas fue que el cargado del colorante provocaba su concentración en la región perinuclear de la célula (Figura 12). Esto fue probablemente debido a una compartimentalización acelerada del colorante, sugiriendo que las condiciones de cargado utilizadas no eran las adecuadas para este tipo celular, por lo que se decidió hacer algunas modificaciones de la técnica. Cabe mencionar que condiciones de cargado similares han sido utilizadas en el laboratorio en diversos tipos celulares tales como, células del epitelio ovárico, células de la teca, astrocitos, oligodendrocitos, y células HEK entre otras (e.g., Vázquez-Cuevas, 2006, 2010), y la apariencia de captura del colorante en estas células no fue observada o fue en menor proporción a la observada en las células foliculares de *Xenopus*.

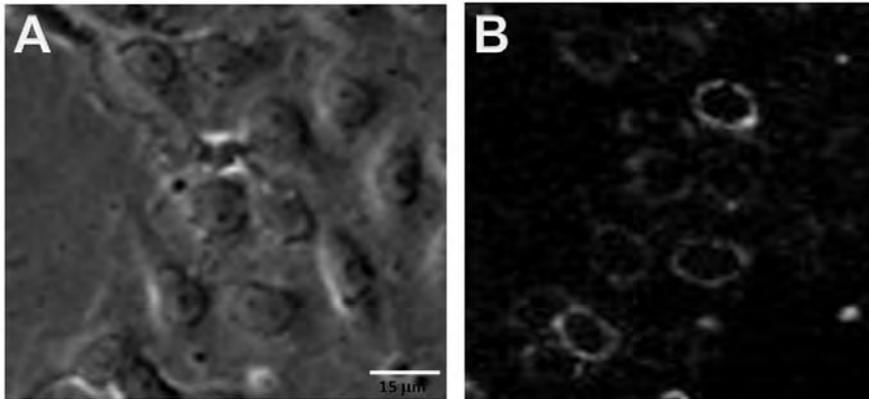


Figura 12. Células foliculares aisladas del folículo ovárico de *Xenopus laevis*. (A) Imagen típica de células foliculares en cultivo utilizando contraste de fases, (B) Imagen de fluorescencia del mismo campo en A, las células fueron cargadas con 2.5 μM Fluo 4-AM, 0.1% de ácido plurónico y 0.01% BSA durante 45 minutos. Se puede observar que la fluorescencia se localizó principalmente en la región perinuclear de la célula.

Fueron entonces modificados tres parámetros que podrían estar influyendo en el cargado, el primero fue el tiempo de incubación de las células con el colorante (en la Figura 13 se muestra un ejemplo donde se redujo el tiempo de cargado), el segundo fue la concentración del colorante (Figura 14) y por último la concentración del ácido plurónico. La modificación de cualquiera de estas tres variables resultó en cambios en el grado de cargado y en la distribución del colorante intracelularmente, sin embargo en esencia los resultados fueron muy semejantes al cambiar solo una de las condiciones y las células presentaron en la mayoría de las preparaciones un aparente elevado secuestro del colorante en compartimentos intracelulares. Las condiciones que provocaron en algunos casos un cargado mas homogéneo en el citoplasma de las células, fueron las siguientes: 5 μM del indicador y 0.1% ácido plurónico sin BSA, durante 30 min (Figura 15).

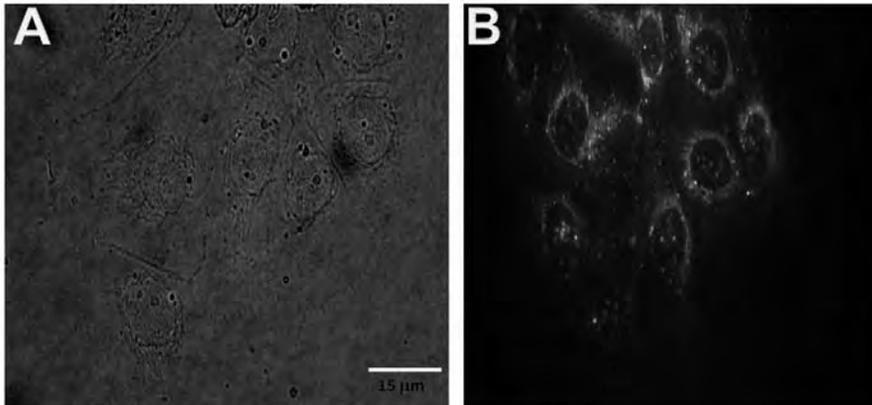


Figura 13. Células foliculares aisladas del folículo de *Xenopus laevis*. Imagen de microscopía de campo claro (A) y fluorescencia (B) de células que fueron cargadas con 2.5 μ M Fluo 4-AM (2% DMSO), 0.1% de ácido plurónico y 0.01% BSA durante 30 minutos.

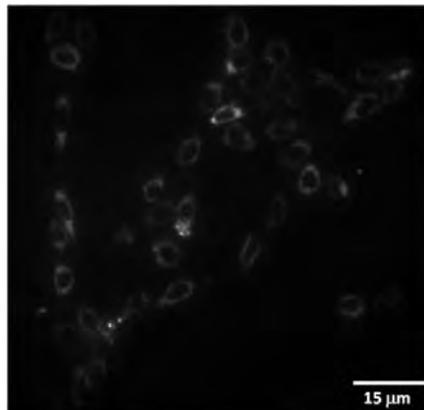


Figura 14. Células foliculares de *Xenopus laevis*. Imagen de fluorescencia de células que fueron cargadas con 2.5 μ M Fluo 4-AM (2% DMSO), 0.1% de ácido plurónico y 0.01% BSA durante 30 minutos.

Utilizando estas condiciones de cargado se observó que en varias preparaciones el citoplasma de las células foliculares se cargó de forma más homogénea, eliminando gran parte de la fluorescencia que sugería secuestro por parte de organelos (Figura 15). Sin embargo, aún en estas condiciones no todas las preparaciones de células foliculares presentaron la misma eficiencia, por lo que el número de preparaciones con cargado eficiente fue de 8 de un total de 10 preparaciones.

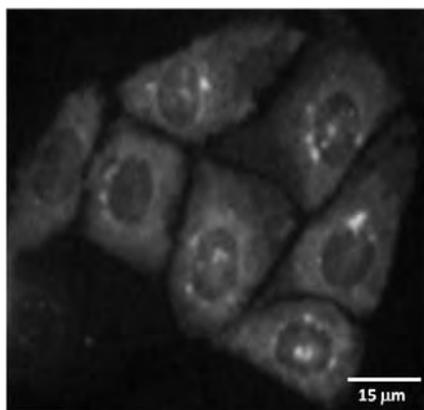


Figura 15. Células foliculares cargadas con el indicador Fluo 4-AM. Imagen por microscopía de fluorescencia en células foliculares cargadas con 5 μM (0.01% DMSO), 0.1% ácido plúronico en ausencia de BSA durante 30 minutos.

7.3 Aumento de Ca^{2+} intracelular provocado por ATP en células foliculares

Para medir los posibles cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular causados por la estimulación con ATP, se utilizaron células foliculares aisladas de folículos ováricos de 9 donadores. Las células en cultivo fueron cargadas con el indicador fluorométrico para calcio Fluo 4-AM como indicamos en la sección anterior.

La aplicación de ATP produjo un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} en todas las células foliculares estudiadas. La gráfica mostrada en la Figura 16A ilustra este resultado, en ella se muestra que la aplicación de ATP 100 μM produjo un aumento rápido, transitorio y monotónico de la concentración de calcio citoplasmático, en la gráfica cada punto representa el promedio de la intensidad de la fluorescencia cuantificado en 20 células de diferentes campos de observación. Estos resultados corroboraron el aumento de Ca^{2+} intracelular por ATP observado previamente (Robles-Martínez 2007). Como puede ser observado en la misma figura la intensidad de la fluorescencia disminuye rápidamente en alrededor de 20 segundos, lo cual imposibilita el realizar subsecuentes manipulaciones experimentales en la misma preparación. Este decremento rápido de la fluorescencia fue observado en todas las preparaciones utilizadas, ajustado a un curso temporal de decaimiento presentando una cinética exponencial con una γ y τ

de 16 s (60 células, 9 donadores) (Figura 16B). Experimentos similares, realizados con esta metodología en el laboratorio, utilizando células de la granulosa, y de la teca o el epitelio del ovario de ratón, indicaron que el grado de blanqueo es prácticamente nulo en la misma escala temporal. Este comportamiento del marcado en las células foliculares de rana, tanto su alto grado de compartimentalización como su rápido blanqueo, representó serias limitaciones técnicas para la realización de experimentos de mayor duración en las mismas preparaciones. Debido a esto, el problema central sobre la participación de Ca^{2+} en la respuesta purinérgica de este estudio fue realizado utilizando las herramientas clásicas de la electrofisiología y la farmacología.

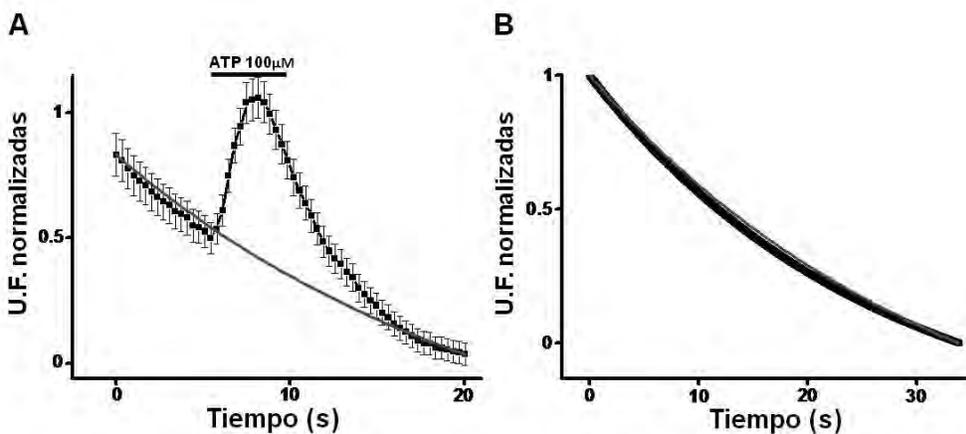


Figura 16. Aumento de Ca^{2+} intracelular evocado por ATP en RN. (A) La gráfica muestra el promedio del aumento en la intensidad de fluorescencia estimulada por ATP 100 μM en células foliculares aisladas ($n=20$, de 3 donadores diferentes) y cargadas con el colorante Fluo 4-AM. La línea roja es el ajuste a una exponencial de decaimiento en estos experimentos. Resultados similares fueron obtenidos en 9 cultivos provenientes del mismo número de donadores. (B) Blanqueo del colorante observado en células de los 9 cultivos usados en este estudio, los puntos representan el promedio de la intensidad de fluorescencia observado en 60 células cargadas con Fluo 4-AM y la línea roja la exponencial de decaimiento ajustada a los puntos experimentales.

7.4 Participación del Ca^{2+} extracelular en la respuesta folicular F_{Cl}

La participación de Ca^{2+} extracelular en la generación de la respuesta folicular a ATP fue evaluada realizando experimentos electrofisiológicos en los que se modificó la concentración del catión en el medio de perfusión.

En esta parte del estudio fueron utilizados 170 folículos *e.t.r.* de 40 ranas, que mostraron en solución RN valores similares de potencial de reposo y resistencia de entrada a la muestra total. La estimulación de los folículos con ATP 100 μM generaron respuestas F_{Cl} con una amplitud promedio de 355.9 ± 22 nA. Después de la primera aplicación de ATP y durante varios minutos después del lavado de F_{Cl} , la perfusión de los folículos con soluciones conteniendo una alta concentración de Ca^{2+} (5-30 mM) generó corrientes entrantes, asociadas con un incremento en la conductancia de la membrana. Por lo general, la corriente entrante inducida de esta forma por la estimulación purinérgica incrementó lentamente desde los primeros segundos de aplicación de la solución con alto Ca^{2+} , hasta que alcanzó una amplitud estable en alrededor de 40 a 80 s, y permaneció activada regularmente por varios cientos de segundos mientras la perfusión con Ringer alto Ca^{2+} se mantuvo, y retornando a su nivel basal en pocos segundos al regresar la perfusión a la solución RN.

La corriente activada en Ringer conteniendo 20 mM Ca^{2+} (R20Ca^{2+}) presentó una variabilidad en la amplitud máxima alcanzada entre folículos de diferentes donadores, sin embargo entre folículos del mismo donador la amplitud máxima fue mas homogénea, la corriente entrante presentó amplitudes en el rango de 7 a 875 nA y en promedio su amplitud fue de 255 ± 16 nA.

En general, como se ilustra en la figura 17 la aplicación de R20Ca^{2+} previa a la estimulación con ATP no generó ninguna respuesta o generó una pequeña corriente (5-15 nA) de salida asociada con un decremento de la conductancia de la membrana. El promedio de la corriente entrante generada por la aplicación de R20Ca^{2+} previo a la estimulación con el agonista fue de 46.7 ± 6.3 nA (137 folículos, 39 ranas). Sin embargo, algunos folículos de diferentes donadores desarrollaron corrientes entrantes en R20Ca^{2+} antes de la aplicación del agonista, así de un total de 137 folículos (39 ranas), 58 folículos generaron corrientes entrantes ≤ 7 nA, 42 folículos presentaron corrientes en el rango de 7 a 50 nA, y 31 folículos tuvieron

corrientes en el rango de 51 a 200 nA (Figura 18). Es claro que en varios donadores la corriente se encontró en cierta proporción activada de forma basal, en estas preparaciones sin embargo la aplicación del ATP provocó en todos los casos un aumento adicional de la corriente.

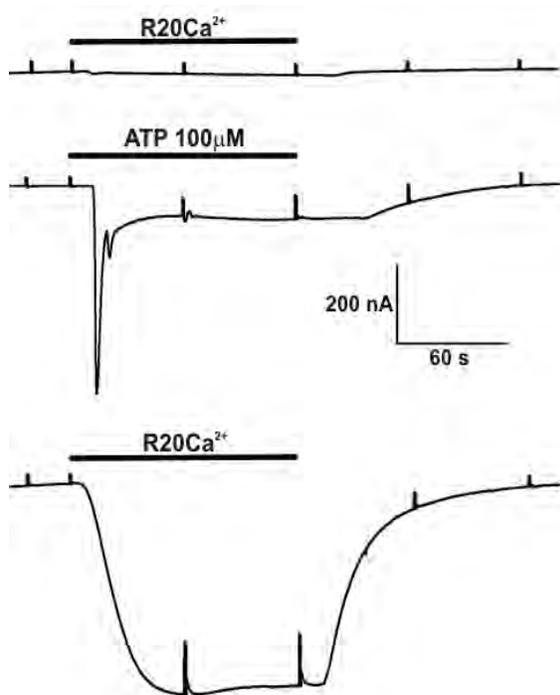


Figura 17. Corriente entrante inducida por ATP activada por un aumento del Ca²⁺ extracelular. Los trazos muestran la corriente generada en el mismo folículo, mantenido a -60 mV, por la aplicación secuencial de R20Ca²⁺, ATP 100 μM en RN, y nuevamente R20Ca²⁺. El intervalo entre aplicaciones fue en todos los casos de alrededor de 5 minutos tiempo en el cual fue perfundida solución RN de forma continua. El experimento es un ejemplo típico de las corrientes observadas en un total de 137 folículos de 39 ranas.

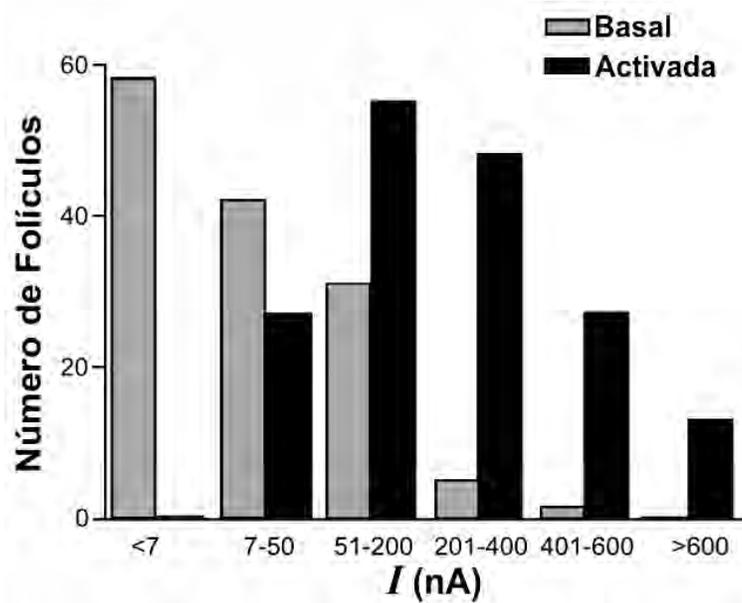


Figura 18. Distribución de los picos de amplitud de la corriente entrante activada por Ringer alto Ca^{2+} . Las barras indican el número de folículos en cada uno de los rangos de corriente señalados antes (corriente basal) y después de ser inducida por la aplicación de ATP 100 μM (137 folículos, 39 ranas).

Como se menciona en la introducción, All incrementa la síntesis de IP_3 en las células foliculares, provocando la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares en el ovocito y la activación de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} en la membrana del mismo. Debido a este importante antecedente decidimos comparar la efectividad de ATP con la de All para inducir la corriente entrante dependiente de Ca^{2+} extracelular, la cual denotaremos aquí como $I_{\text{iw,Ca}}$. Esto fue realizado en folículos de donadores que presentaron respuestas robustas activadas en R20Ca^{2+} (después de la aplicación de ATP), y que fueron previamente tratados con All 1 μM , una concentración que evoca la respuesta oscilatoria ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) máxima en los folículos (Sandberg *et al.*, 1992). Como se ilustra en la figura 19, la aplicación de All no indujo de forma consistente la generación de la respuesta $I_{\text{iw,Ca}}$ (45 folículos, 15 ranas), ya que en promedio la aplicación de R20Ca^{2+} no incremento la corriente membranal después de la aplicación de All. En algunos casos, sin embargo, fueron observados corrientes $I_{\text{iw,Ca}}$ de 5 a 15 nA en 10 folículos de la misma muestra (3 ranas). No obstante la incapacidad de All para activar $I_{\text{iw,Ca}}$, la aplicación de All generó la típica corriente oscilatoria en la membrana del ovocito, $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$, similar en

amplitud a las respuestas F_{Cl} activadas por ATP en los folículos utilizados. La corriente oscilatoria provocada por All fue eliminada efectivamente por defoliculación en los donadores utilizados, lo que indicó que el origen de esta respuesta fue la membrana de las células foliculares, como ha sido mostrado en otros estudios.

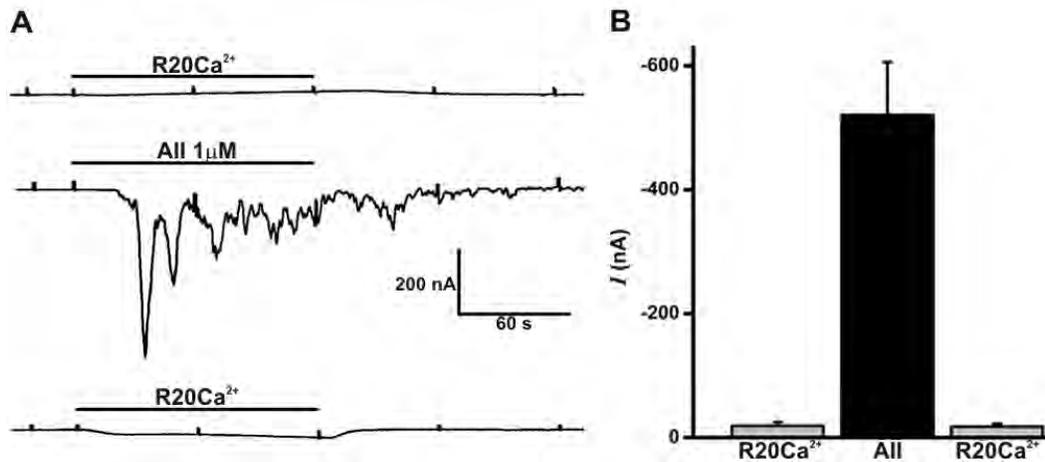


Figura 19. All no es capaz de activar la respuesta $I_{iw,Ca}$. (A) De forma similar a lo ilustrado en la figura 17, los trazos muestran respuestas típicas generadas en el mismo folículo por la aplicación secuencial de R20Ca²⁺, All 1 μM en RN, y nuevamente R20Ca²⁺. B) Resumen de los experimentos mostrados en A, indicando el pico máximo de la corriente transmembranal generada por los tratamientos indicados en cada barra siguiendo el mismo patrón de aplicación mostrado en los trazos (45 folículos de 15 ranas).

7.5 La respuesta $I_{iw,Ca}$ permanece activada por periodos prolongados de tiempo

Una sola aplicación de ATP 10 μM fue capaz de estimular la corriente entrante por R20Ca²⁺, repetidas aplicaciones de 1 min de R20Ca²⁺ cada 10 minutos indicaron que $I_{iw,Ca}$ se lavó lentamente alcanzando el 50% del pico de la amplitud máxima en cerca de 30 ± 4.3 min (11 folículos, 4 ranas; figura 20), y aun después de una hora de la aplicación de ATP la $I_{iw,Ca}$ permaneció activada en un $36 \pm 2\%$. El rango de decaimiento de la corriente activada por R20Ca²⁺ no parece ser dependiente de la dosis de ATP usada para su inducción, ya que la corriente estimulada por ATP 100 μM decayó cerca del 50% en 30 min (4 folículos, 4 ranas).

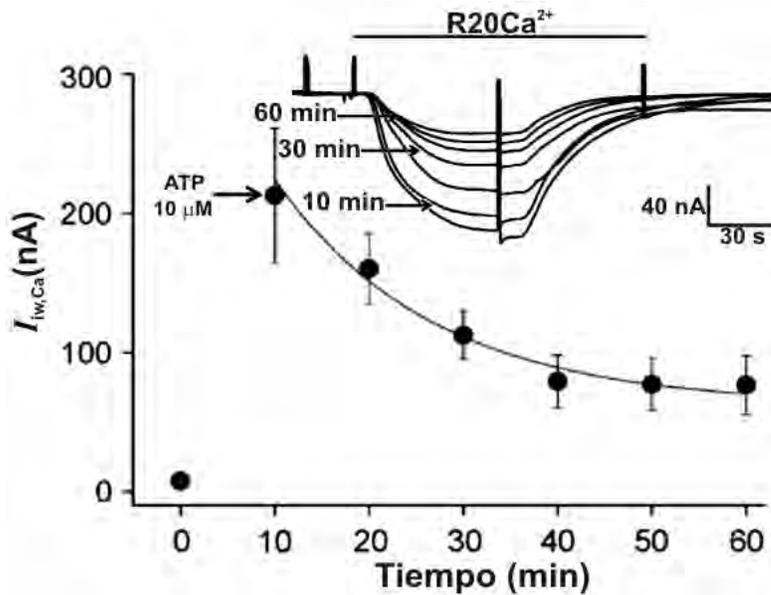


Figura 20. Decaimiento de la activación de la respuesta $I_{iw,Ca}$ por R20Ca^{2+} previamente inducida por ATP. La gráfica muestra el curso temporal que sigue la amplitud de la corriente entrante activada por R20Ca^{2+} una vez inducida por la aplicación de ATP $10 \mu\text{M}$ (en el tiempo señalado por la flecha en la gráfica), los trazos son registros representativos de un solo folículo aplicando R20Ca^{2+} cada 10 min después de su máxima activación. Los puntos representan el promedio de la amplitud obtenida en 11 folículos de 4 ranas.

7.6 $I_{iw,Ca}$ depende de la concentración de ATP y de Ca^{2+}

La respuesta $I_{iw,Ca}$ activada por alto Ca^{2+} presentó una clara dependencia de la concentración de Ca^{2+} extracelular y también de la concentración del agonista utilizada para su inducción. Dosis bajas de ATP fueron capaces de estimular la corriente entrante, esto se puede observar en la figura 21 donde se muestra la amplitud de la corriente entrante que se alcanzó perfundiendo R20Ca^{2+} durante 2 min después de aplicar ATP en cada una de las diferentes concentraciones en el rango de $0.3 \mu\text{M}$ a $100 \mu\text{M}$, cada punto representa el promedio (\pm E.S.M.) de la amplitud máxima de $I_{iw,Ca}$ activada en 7 folículos de 3 ranas.

Como se puede observar la activación de la corriente entrante mostró una clara relación dependiente de la dosis, los puntos experimentales fueron ajustados a una curva sigmoideal que mostró una dosis media (EC50) para ATP de $2.05 \pm 0.012 \mu\text{M}$ (Figura 21).

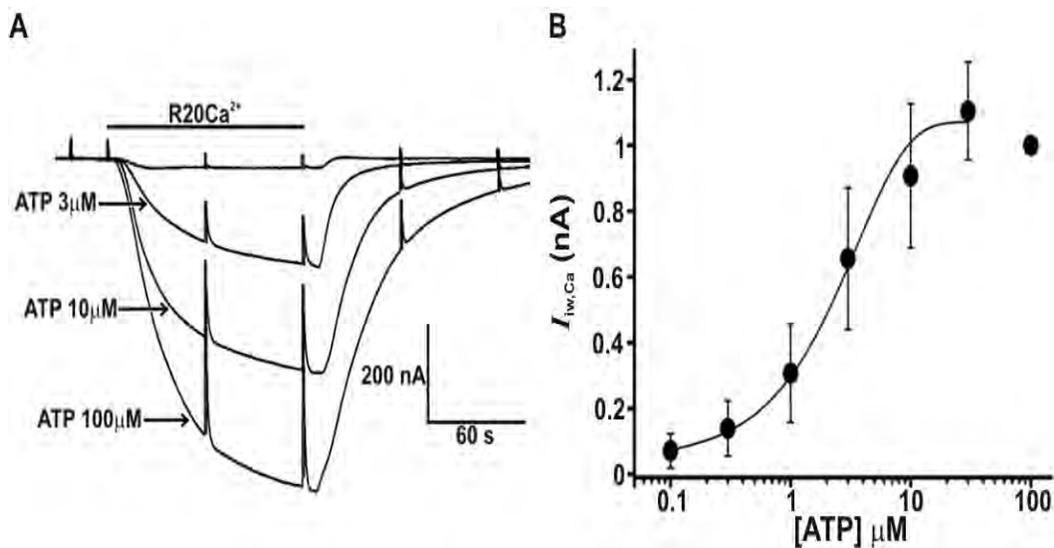


Figura 21. Relación dosis-respuesta de la inducción de $I_{iw,Ca}$ por aplicación de ATP. La gráfica muestra la amplitud normalizada de $I_{iw,Ca}$ activada por la aplicación de R20Ca²⁺ una vez inducida por diferentes dosis de ATP (7 folículos, 3 ranas). El pico de amplitud de $I_{iw,Ca}$ inducida en cada concentración de ATP fue normalizado con respecto a la obtenida con ATP 100 μM. Los puntos experimentales fueron ajustados a una curva dosis-respuesta con un EC₅₀ de $2.05 \pm 0.012 \mu\text{M}$.

La amplitud de $I_{iw,Ca}$ también fue dependiente de la concentración de Ca²⁺ extracelular. En la figura 22 y 23 se ilustran los experimentos realizados para conocer la relación que guardan estas dos variables. Los folículos fueron estimulados con ATP 100 μM, y subsecuentemente fue registrada la corriente entrante incrementando la concentración Ca²⁺ en la solución desde 1 mM hasta 30 mM por 2 min, con intervalos entre las aplicaciones de 5 min durante los cuales las preparaciones fueron perfundidas con RN. Para mantener aproximadamente el mismo nivel de inducción de $I_{iw,Ca}$, fue aplicada una dosis de ATP 100 μM cada 15 minutos. Es importante notar que un decremento en la concentración normal de Ca²⁺ de la solución RN, que contiene 1.8 mM, a una que contiene 1 mM, regularmente generó una corriente de salida asociada a un decremento en la conductancia de la membrana, sugiriendo que una fracción de la corriente entrante se encontró activada aun en RN. La curva en la figura 23 indicó que la corriente presenta una amplitud media en una concentración extracelular de Ca²⁺ de $13.6 \pm 0.4 \text{ mM}$ (coeficiente de Hill = 1.95).

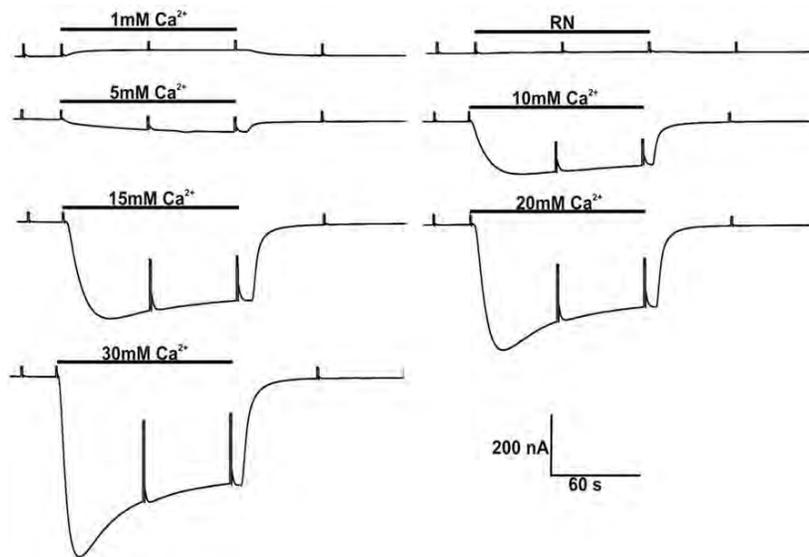


Figura 22. Activación de $I_{iw,Ca}$ inducida por ATP aplicando diferentes concentraciones de Ca^{2+} .

Los trazos mostrados corresponden a las corrientes generadas en folículos por la aplicación de diferentes concentraciones de Ca^{2+} extracelular en un solo folículo, una vez que la corriente fue inducida por la aplicación de ATP 100 μ M al comienzo del experimento, y entre las concentraciones 5 y 10 mM de Ca^{2+} , así como entre 20 y 30 mM. Los trazos son respuestas típicas obtenidas en 20 folículos de 7 ranas.

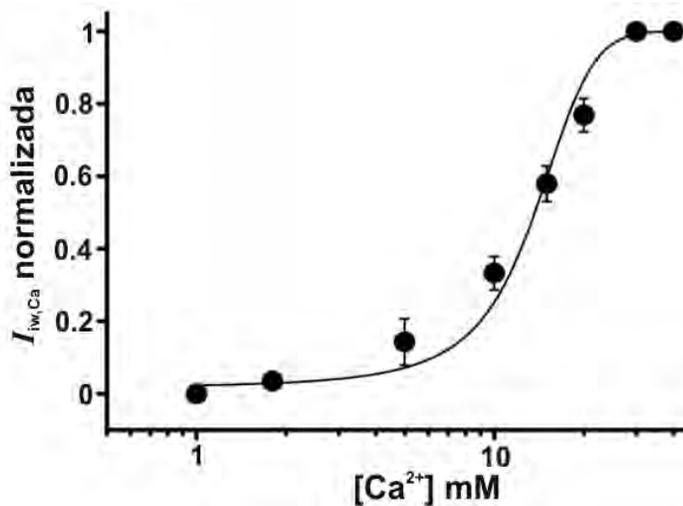


Figura 23. Activación de $I_{iw,Ca}$ inducida por ATP aplicando diferentes concentraciones de Ca^{2+} .

Corrientes entrantes normalizadas inducidas por la aplicación de ATP 100 μ M y generadas por la perfusión de concentraciones crecientes de Ca^{2+} extracelular (20 folículos, 7 ranas). Los puntos experimentales fueron ajustados a una curva dosis-respuesta con un EC50 de 13.6 ± 0.4 mM.

7.7 Relación entre las amplitudes de las respuestas $I_{iw,Ca}$ y F_{Cl}

Cuando se realizaron los experimentos anteriores utilizando diferentes concentraciones de Ca^{2+} se observó que la amplitud de la respuesta F_{Cl} parecía disminuir con un aumento del ión, por lo que los siguientes experimentos fueron realizados para conocer de forma sistemática la relación que guardan sus amplitudes. Los experimentos son ilustrados en la figura 24, en estos, los folículos fueron perfundidos con soluciones Ringer conteniendo diferentes concentraciones de Ca^{2+} de forma similar a lo mostrado en la figura 22, un minuto después en cada concentración creciente del ión fue aplicado por un minuto más la concentración máxima de ATP $10 \mu M$ con la correspondiente concentración de Ca^{2+} extracelular.

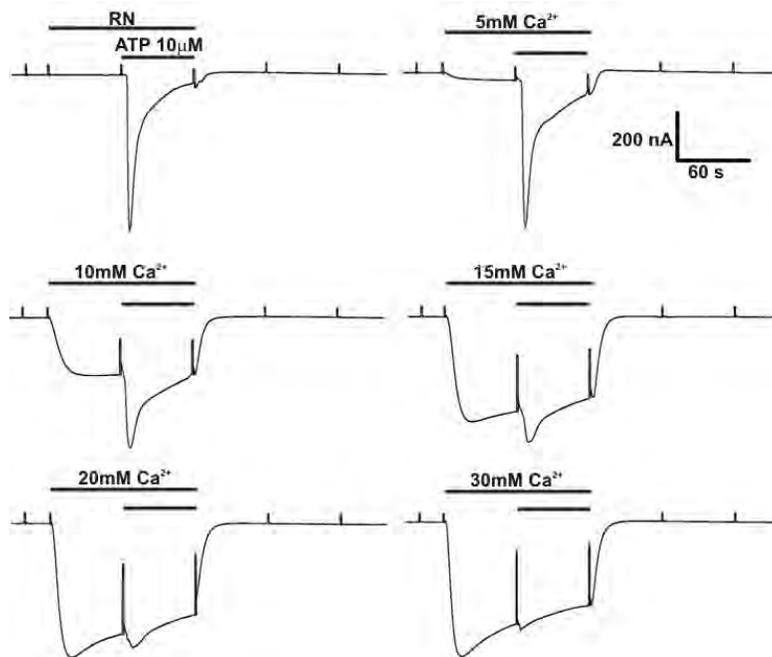


Figura 24. Respuestas $I_{iw,Ca}$ y F_{Cl} en diferentes concentraciones de Ca^{2+} . Los trazos ilustran las corrientes generadas en el mismo folículo por la aplicación de ATP $10 \mu M$ en soluciones Ringer conteniendo concentraciones crecientes de Ca^{2+} extracelular. Los registros muestran resultados típicos obtenidos en 14 folículos de 7 ranas.

Como se puede observar en los trazos representativos de la figura, mientras que $I_{iw,Ca}$ aumentó su amplitud con concentraciones crecientes de Ca^{2+} , las respuestas F_{Cl} disminuyeron proporcionalmente alcanzando un mínimo en el máximo de la respuesta entrante activada por Ca^{2+} . Esto muestra que la relación entre la amplitud de la respuesta F_{Cl} y la amplitud de la corriente entrante fue inversa, e indicó que las respuestas no fueron aditivas, lo cual sugiere claramente que existe una interacción entre los mecanismos de generación de las corrientes. Las amplitudes de ambas respuestas fueron normalizadas con respecto a sus máximos para cada una de las concentraciones de Ca^{2+} aplicadas, y los datos fueron graficados en la figura 25 que se ajustaron a curvas dosis-respuesta. Como se esperaba las curvas se entrecruzan en la región de ascenso de las mismas alrededor de una concentración de 11 mM de Ca^{2+} .

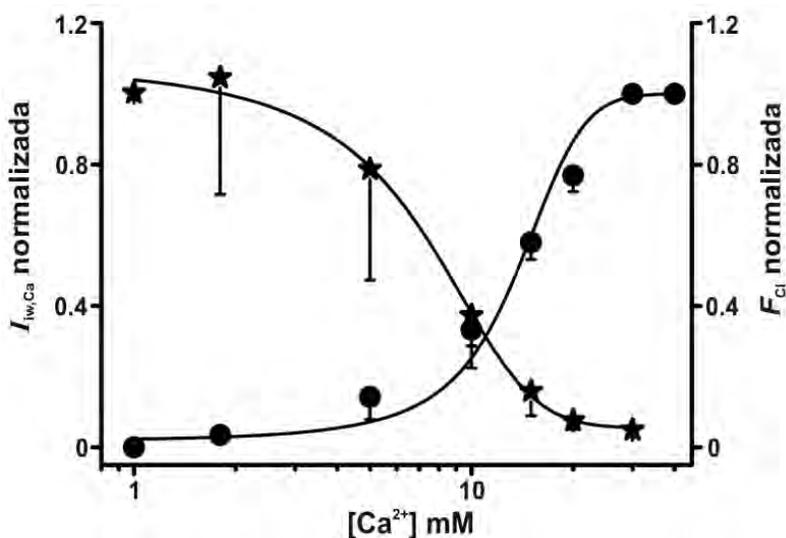


Figura 25. Relación entre las amplitudes de F_{Cl} y de $I_{iw,Ca}$ inducida por ATP en soluciones conteniendo diferentes concentraciones de Ca^{2+} . Los puntos representan la amplitud normalizada de la respuesta F_{Cl} y de $I_{iw,Ca}$ generadas en el mismo folículo siguiendo el protocolo ilustrado en la figura anterior, donde la concentración de Ca^{2+} extracelular fue aumentada de forma secuencial. Cada punto es el promedio de las respuestas en 14-7 folículos de 7-3 ranas, $I_{iw,Ca}$ (●), F_{Cl} (★). Los puntos experimentales de las curvas se entrecruzan en la concentración de 11 mM de Ca^{2+} .

7.8 Las respuestas $I_{iw,Ca}$ y F_{Cl} no dependen de un aumento de Ca^{2+} en el citoplasma del ovocito

Ha sido demostrado previamente que la corriente F_{Cl} no es eliminada al cargar al ovocito con quelantes de Ca^{2+} (Arellano & Miledi, 1993; Arellano *et al.*, 1996, 1998), esto indicó claramente que la corriente F_{Cl} es diferente de las clásicas corrientes de Cl^- dependientes de Ca^{2+} generadas en la membrana del ovocito ($I_{Cl(Ca)}$). Los experimentos anteriores sugirieron que las respuestas F_{Cl} e $I_{iw,Ca}$ parecen compartir mecanismos de activación, la pregunta que surgió ante esta importante característica fue saber si la $I_{iw,Ca}$ inducida por ATP presentaba el mismo comportamiento con respecto a la independencia de F_{Cl} al Ca^{2+} en el citoplasma del ovocito. En esta serie de experimentos los folículos fueron cargados con EGTA (3 a 9 nanomoles/ovocito) a través de una micropipeta de inyección insertada en el ovocito, y comparadas sus respuestas con las que presentan los mismos folículos previo a la inyección del quelante. La generación de la respuesta F_{Cl} fue provocada por la aplicación de ATP 100 μ M mientras que la corriente entrante con la perfusión de $R20Ca^{2+}$.

Primero fue evaluada la eficacia de las inyecciones de EGTA para bloquear corrientes que dependen de un aumento de Ca^{2+} intracelular, para esto fueron medidas las amplitudes de las corrientes T_{out} en los folículos antes y después de ser inyectados con el quelante. La corriente T_{out} se sabe que es activada en la membrana del ovocito por la apertura de canales de Ca^{2+} que dependen del voltaje, el influjo subsecuente de Ca^{2+} a través de estos últimos abre a su vez canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} localizados en la membrana del ovocito (Miledi 1982), ha sido mostrado que la inyección de un quelante como EGTA en el citoplasma del ovocito elimina por completo la corriente en pocos segundos. La corriente T_{out} fue entonces activada por despolarización de la membrana para activar los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje, mediante la aplicación de pulsos despolarizantes secuenciales a 0, +20 y +40 mV, desde un potencial de -100 mV. La corriente T_{out} fue entonces monitoreada en los folículos antes y después de ser cargados con EGTA (o BAPTA), mientras se perfundió la preparación en Ringer alto Ca^{2+} para aumentar la amplitud de la corriente T_{out} (Miledi 1982) a valores absolutos similares a los observados durante la generación de $I_{iw,Ca}$ inducida por ATP. Los folículos mostraron corrientes T_{out} que fueron máximas en los pulsos despolarizantes a +20

mV, en $R20Ca^{2+}$ las corrientes al pico presentaron una amplitud promedio de 1172 ± 113 nA previo al cargado del ovocito con EGTA, mientras que en todos los casos (12 folículos, 5 ranas) una vez cargados con el quelante la corriente T_{out} fue eliminada por completo al despolarizar la membrana (Figura 26). La eliminación de T_{out} ocurre en los primeros segundos de inyección del EGTA y permanece inhibida por el tiempo que dura el experimento en un folículo, por lo regular de 40 a 120 min. Como ha sido reportado previamente, en los mismos ovocitos donde la T_{out} fue eliminada, el cargado del ovocito con el quelante no eliminó la respuesta F_{Cl} generada por ATP $100 \mu\text{M}$, en este caso los folículos previo a ser cargados con EGTA generaron corrientes F_{Cl} con una amplitud promedio de 396.25 ± 79.59 nA, mientras que una vez cargados la amplitud de la corriente F_{Cl} fue de 311 ± 51.73 nA (8 folículos, 3 ranas) (Figura 27).

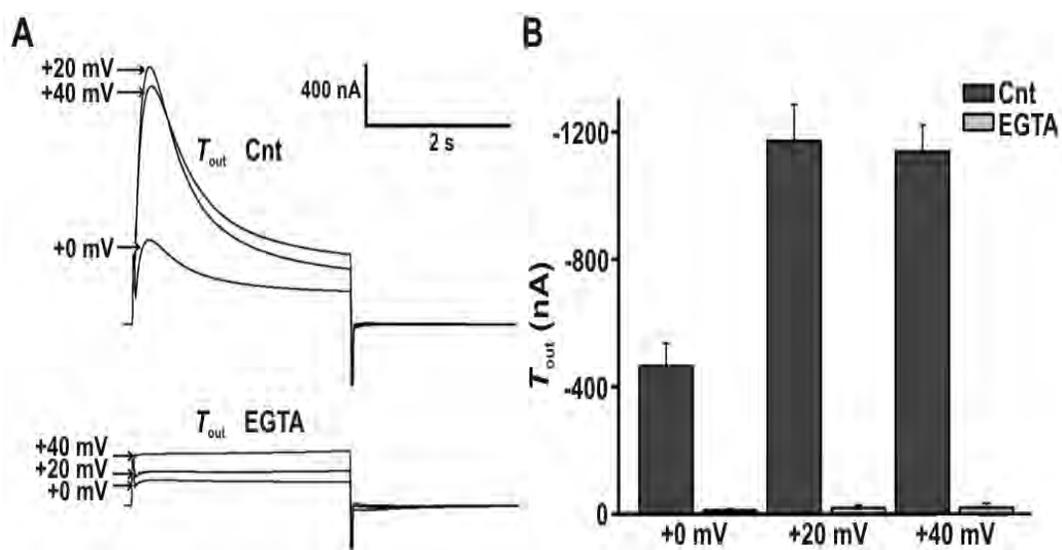


Figura 26. Eliminación de T_{out} por cargado del ovocito con EGTA. A) Los trazos muestran la activación de la corriente T_{out} por la despolarización de la membrana de -100 mV a diferentes potenciales (trazos sobreimpuestos) de 0, +20 y +40 mV, aplicados antes y después de cargado el ovocito con EGTA. B) Amplitud promedio de las corrientes T_{out} generadas en los folículos, antes y después de la inyección del ovocito con EGTA, en los diferentes voltajes despolarizantes (12 folículos, 5 ranas).

De forma importante, en los mismos folículos fue observado que la corriente entrante dependiente de Ca^{2+} se comportó de manera similar en folículos cuyos ovocitos fueron cargados o no con EGTA, previo a la inyección con el quelante los

foliculos generaron $I_{iw,Ca}$ de 371 ± 143 nA mientras que inyectados generaron corrientes con una amplitud promedio de 230 ± 27 nA. Esto muestra que ambas respuestas no requirieron de un aumento del Ca^{2+} en el citoplasma del ovocito (Figura 27). Experimentos similares pero utilizando BAPTA como quelante provocaron cambios semejantes.

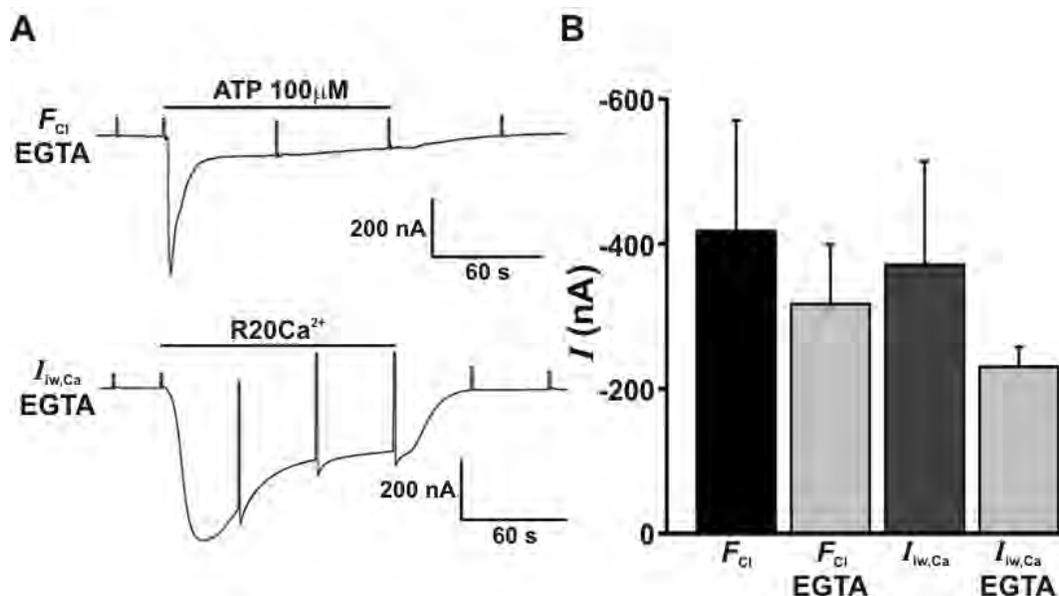


Figura 27. Efecto de cargado del ovocito con EGTA sobre F_{Cl} y la corriente entrante. Promedio de las corrientes F_{Cl} generadas en foliculos *e.t.r.* controlados a -60 mV, y activadas por aplicación de ATP 100 μ M antes y después de la inyección del ovocito con EGTA.

Este último resultado pareció contradictorio, ya que en los experimentos de las secciones 7.6 y 7.7 fue mostrado que la corriente entrante es claramente dependiente de la concentración de Ca^{2+} extracelular, y esto indicó que $I_{iw,Ca}$ fue generada a través de un influjo de Ca^{2+} hacia el citoplasma de las células foliculares. La explicación que resolvería esta aparente contradicción, fue sugerida en los estudios originales que describen la respuesta F_{Cl} , y es la posibilidad de que el EGTA o el BAPTA inyectado en el ovocito no difundan en la concentración adecuada hacia el citoplasma de las células foliculares, y de esta manera no podría evitarse el incremento de Ca^{2+} en el citoplasma de estas células (Arellano & Miledi, 1993; Arellano *et al.*, 1996, 1998). Para poner a prueba esta hipótesis, fueron incubados foliculos *e.t.r.* en solución Barth's conteniendo 25 μ M BAPTA-AM (0.1% DMSO) por

tiempos de entre 2 a 5 h, y se comparó la amplitud de las repuestas con las de folículos control incubados en la misma solución y concentración de DMSO. En la figura 28 y 29 se ilustran los resultados obtenidos, tanto la corriente F_{Cl} generada por la aplicación de ATP 100 μ M, como también la corriente entrante activada por R20Ca²⁺ y la corriente T_{out} , fueron inhibidas de forma marcada en los folículos incubados en BAPTA-AM, mientras que los folículos control presentaron los tres tipos de respuesta en amplitudes control. Este resultado sugirió que las respuestas foliculares fueron dependientes de un aumento de Ca²⁺ intracelular en las células foliculares pero no en el citoplasma del ovocito. Esta conclusión parece indicar también que las uniones comunicantes entre el ovocito y las células foliculares, presentan un filtro selectivo que discrimina algunas sustancias, en especial, en este caso los quelantes de Ca²⁺ el EGTA y el BAPTA. También la dependencia a Ca²⁺ en las células foliculares, de ambas respuestas, refuerza la idea de que $I_{iw,Ca}$ y F_{Cl} comparten los mecanismos de activación e inclusive la vía de conducción, por lo tanto los siguientes experimentos fueron hechos para aclarar con mayor detalle la relación entre las vías conductivas de ambas respuestas.

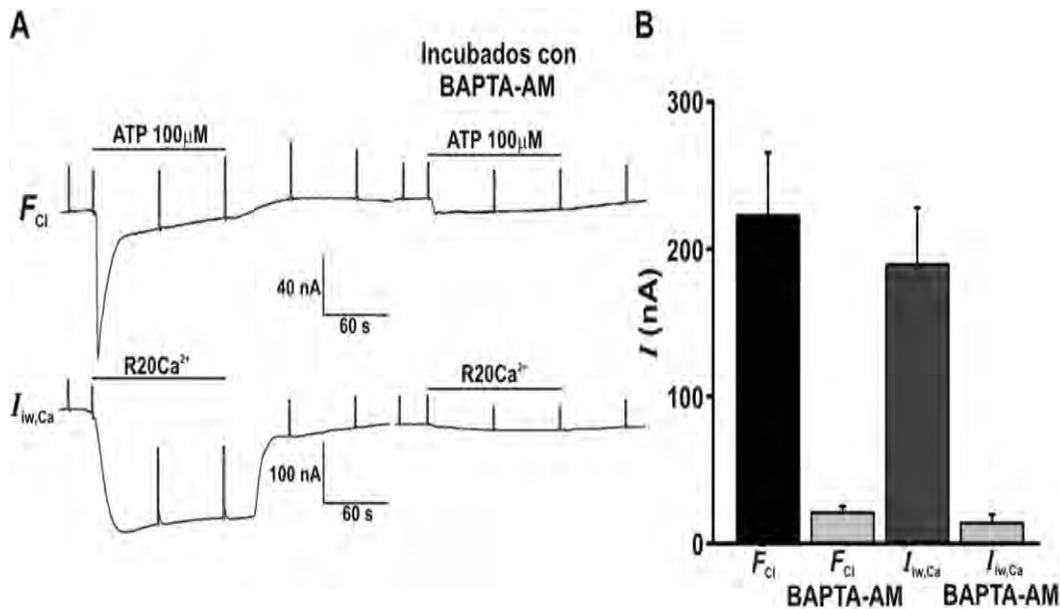


Figura 28. Efecto de cargado del folículo con BAPTA-AM sobre las respuestas F_{Cl} e $I_{iw,Ca}$. Promedio de las corrientes F_{Cl} generadas en folículos *e.t.r.* controlados a -60 mV, y activadas por aplicación de ATP 100 μ M antes y después del cargado del folículo con BAPTA-AM de 2 a 5 horas.

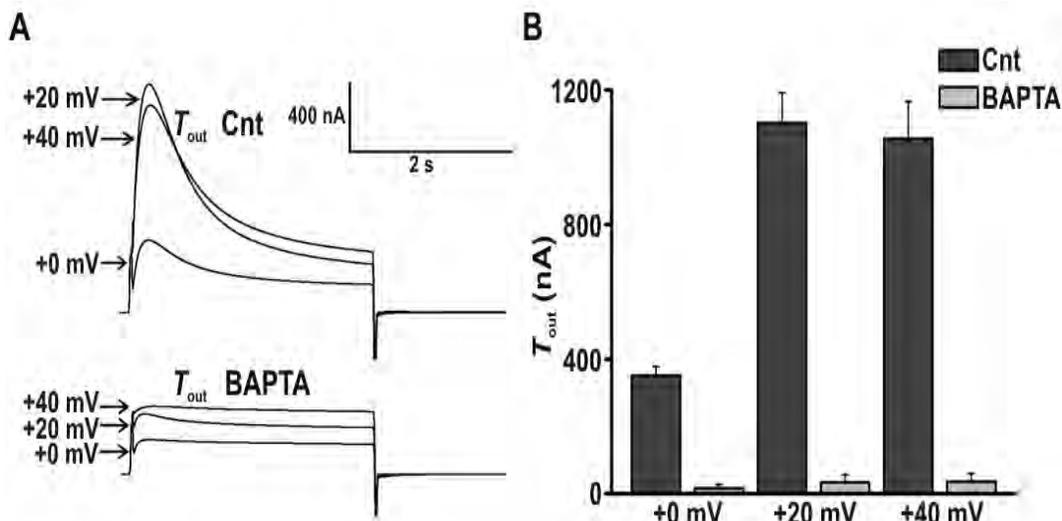


Figura 29. Efecto sobre la corriente T_{out} por cargado del folículo con BAPTA-AM. A) Los trazos muestran la activación de la corriente T_{out} por la despolarización de la membrana de -100 mV a diferentes potenciales (trazos sobreimpuestos) de 0, +20 y +40 mV, aplicados antes y después de cargado el ovocito con BAPTA-AM. B) Amplitud promedio de las corrientes T_{out} generadas en los folículos, antes y después del cargado con BAPTA-AM, en los diferentes voltajes despolarizantes (22 folículos, 4 ranas).

7.9 Bases Iónicas de $I_{iw,Ca}$

Fueron entonces realizados experimentos para determinar las bases iónicas que participan en la generación de la respuesta $I_{iw,Ca}$, y poder compararlas con las descritas para la corriente F_{Cl} . Se obtuvo el potencial de inversión de $I_{iw,Ca}$, mediante la construcción de curvas I/V usando un protocolo de pulsos (cada uno de 3 s de duración) aplicado en un rango de -140 a +40 mV en incrementos de 20 mV (Figura 30). Como sería predicho para una corriente que depende del influjo de Ca^{2+} , fue observado que la aplicación de pulsos despolarizantes, desde el potencial de -60 mV, produjo una disminución en $I_{iw,Ca}$, mientras que pulsos hiperpolarizantes generaron un incremento de la misma. Este comportamiento provocó la generación de corrientes que se relajan lentamente al finalizar los pulsos, éstas fueron corrientes salientes después de un pulso despolarizante, y corrientes entrantes cuando el potencial fue restablecido después de un pulso hiperpolarizante denominadas corrientes de cola.

De forma similar a lo mostrado en la sección anterior, los pulsos despolarizantes provocaron regularmente la corriente T_{out} , para evitar la activación de esta respuesta y su posible mezcla con $I_{iw,Ca}$, los folículos fueron cargados con EGTA por medio de su inyección en el ovocito como se describió anteriormente (Figura 27). En estas condiciones, el protocolo de pulsos fue aplicado en $R20Ca^{2+}$ antes y después de ser inducida la corriente entrante por la aplicación de ATP $100 \mu M$. En todos los casos, la corriente registrada con $R20Ca^{2+}$ en cada potencial una vez inducida fue restada de la obtenida en condiciones basales (previo a la aplicación de ATP), y los valores que resultaron fueron graficados contra el voltaje tal y como se ilustra en la figura 30, y las figuras subsecuentes. La curva I/V indicó que la corriente activada perfundiendo $R20Ca^{2+}$ invirtió en un potencial promedio de $-23.7 \pm 3 \text{ mV}$ (7 folículos, 3 ranas), y presentó una rectificación saliente y entrante moderadas. Los valores del potencial de inversión no fueron diferentes cuando se utilizaron soluciones $R5Ca^{2+}$ o $R10Ca^{2+}$ para activar $I_{iw,Ca}$. El potencial de inversión observado es cercano al potencial de equilibrio del Cl^- en ovocitos y folículos, y por lo tanto también al reportado para F_{Cl} activada por ATP o ACh (Kusano *et al.*, 1982; Arellano & Miledi, 1993; Arellano *et al.*, 1998).

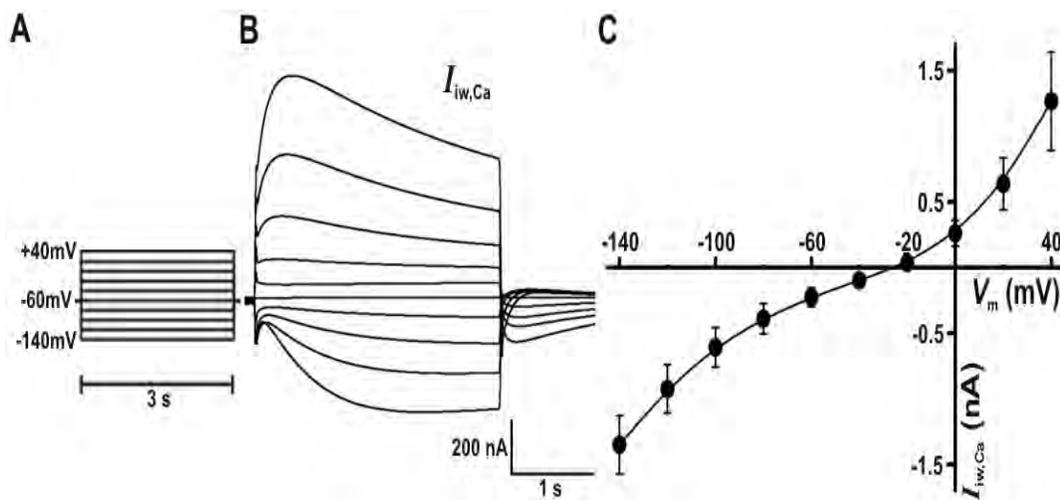


Figura 30. Curva I/V de $I_{iw,Ca}$. A) Protocolo de pulsos en un rango de -140 a +40 mV en incrementos de 20 mV (cada 3 s) B) Los trazos muestran la activación de la corriente $I_{iw,Ca}$ por la despolarización de la membrana de -100 mV a diferentes potenciales (trazos sobreimpuestos). C) Promedio de las corrientes transmembranales registradas, aplicando $R20Ca^{2+}$ después de la inyección de EGTA (12 folículos, 5 ranas).

Para determinar si fue Cl^- el principal ión que acarreó la corriente entrante, fueron realizadas curvas I/V en soluciones que contenían una baja concentración del anión, substituyéndolo por iones SO_4^{2-} que normalmente son impermeables a través de canales de Cl^- . La disminución en la concentración de Cl^- en la solución externa modificó el potencial de inversión de la corriente hacia valores mas positivos de -13 ± 5 mV en 40 mM Cl^- y de $+7 \pm 10$ mV en 20 mM Cl^- , lo cual refuerza la idea de que la corriente entrante inducida por la aplicación de ATP fue una corriente acarreada principalmente por Cl^- (Figura 31).

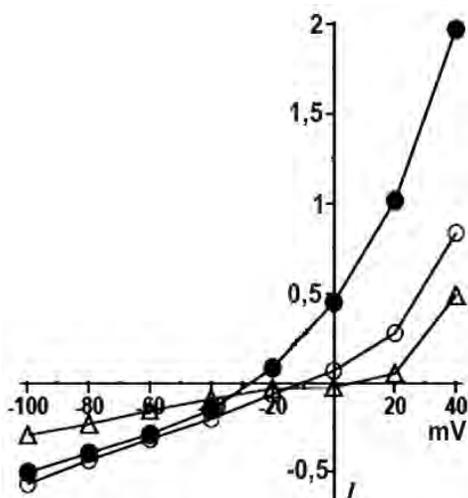


Figura 31. Disminución de la concentración de Cl^- en la corriente $I_{iw, Ca}$. Promedio de la corriente transmembranal registrada aplicando un protocolo de pulsos de -140 a +40 mV, durante la activación de $I_{iw, Ca}$ en la disminución de la concentración de Cl^- : 145 mM Cl^- (●), 40 mM Cl^- (○) y 20 mM Cl^- (△).

Soluciones conteniendo alto Ca^{2+} donde fue substituido el Cl^- por otros aniones también fueron capaces de generar la corriente inducida por ATP, y fue determinado que soluciones donde los principales aniones fueron SCN^- , I^- , o Br^- , los potenciales de inversión correspondientes fueron de -63 ± 4 mV, -52 ± 3 mV y -37 ± 3 mV (Figura 31). Por lo que la secuencia de permeabilidad $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$ fue también idéntica a la reportado previamente para la respuesta F_{Cl} (Arellano & Miledi, 1993; Arellano *et al.*, 1998).

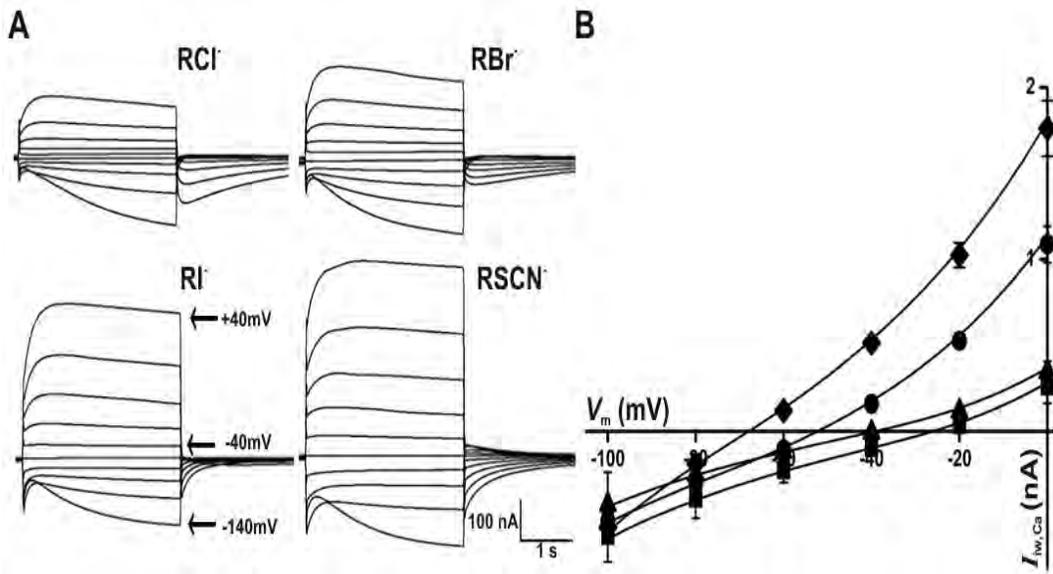


Figura 32. Bases iónicas de $I_{iw,Ca}$. A) Los trazos muestran la activación de la corriente $I_{iw,Ca}$ por la despolarización de la membrana de -100 mV a diferentes potenciales (trazos sobrepuestos). B) Promedio de la corriente transmembranal registrada aplicando un protocolo de pulsos de -140 a +40 mV (para claridad solo fueron graficadas las corrientes obtenidas en el rango de -100 a 0 mV), durante la activación de $I_{iw,Ca}$ en la presencia de soluciones conteniendo los diferentes aniones señalados: RSCN⁻ (◆), RI⁻ (●), RBr⁻ (▲) y RCl⁻ (■). Cada punto representa el promedio de 7 folículos (3 ranas) cargados con EGTA en el citoplasma del ovocito.

7.10 La generación de las respuestas F_{Cl} e $I_{iw,Ca}$ es dependiente de la actividad de PLC

Los resultados anteriores parecen indicar que tanto los canales involucrados en la generación de F_{Cl} , como los de la corriente entrante, corresponden a canales de Cl⁻ dependientes de Ca²⁺, por lo que la acción principal de la estimulación purinérgica podría estar relacionada con los mecanismos que promueven el aumento del Ca²⁺ en el citoplasma de las células foliculares. La secuencia de eventos electrofisiológicos en el folículo ante la estimulación purinérgica mostrados en este estudio, parece entonces similar a lo observado en otros tipos celulares, donde los receptores específicos para ATP actúan a través de receptores acoplados a proteínas G, activando la fosfolípasa C (PLC) y promoviendo la síntesis de IP₃ y diacilglicerol. El aumento de IP₃ en el citoplasma tiene dos consecuencias importantes, la primera es la liberación de Ca²⁺ de reservorios intracelulares, y la

segunda, la activación de vías permeables a Ca^{2+} en la membrana citoplasmática. Así, los siguientes experimentos fueron realizados para investigar la posible participación de la PLC durante la respuesta folicular. Para esto incubamos por 10 min los folículos en U73122 (3.5 μM), un inhibidor específico de la PLC (e.g., Horowitz *et al.*, 2005; Drissi *et al.*, 1998), y fue monitoreado su efecto sobre la generación de la respuesta F_{Cl} (activada por ATP) y sobre $I_{\text{iw,Ca}}$ (por perfusión de R20Ca^{2+}). El efecto de U73122 fue comparado contra el efecto de U73343 (3.5 μM), un derivado inactivo de la droga, sobre las respuestas generadas en folículos de las mismas ranas e incubados en las mismas condiciones.

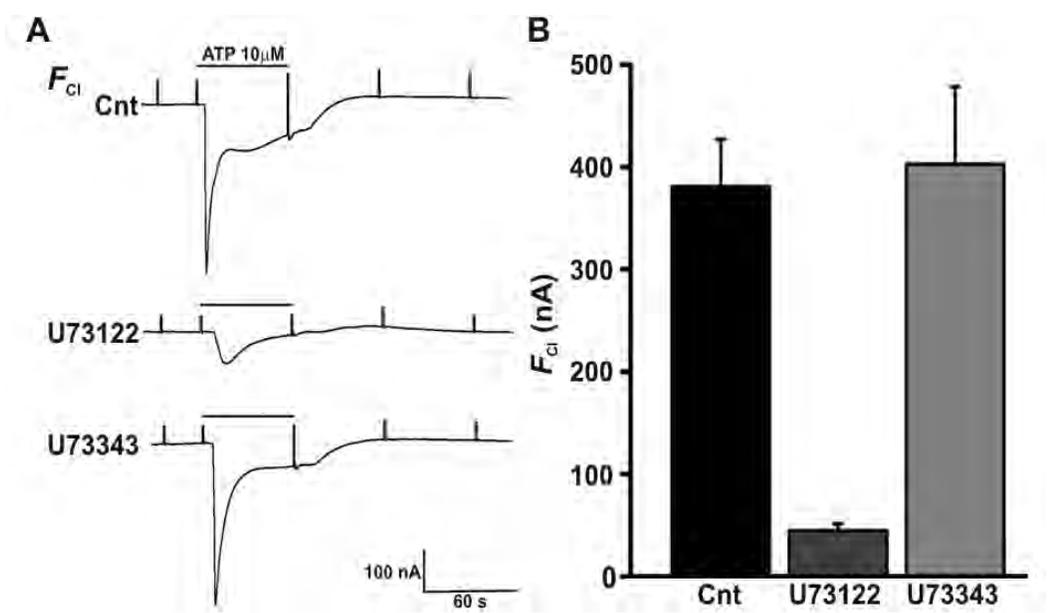


Figura 33. Efecto de U73122 y U73343 sobre la corriente F_{Cl} . A) Los trazos muestran la corriente generada en el mismo folículo, mantenido a -60 mV, por la aplicación secuencial de ATP 10 μM en RN, y en la presencia de U73122 y U73343. B) Promedio de la corriente F_{Cl} activada por ATP 10 μM .

En la figura 33 se ilustran los resultados obtenidos, la droga activa U73122 inhibió ambas respuestas en un $88 \pm 7 \%$, mientras que la droga inactiva no tuvo efectos (15 folículos, 5 ranas). Además, fue observado que la corriente entrante una vez inducida por ATP no fue afectada por la superfusión (10 min) del U73122 que disminuyó solo $10 \pm 1.2 \%$ de la corriente, sugiriendo que el mecanismo involucrado en la generación del influjo folicular de Ca^{2+} ocurrió de forma paralela con la activación del receptor y que el efecto no fue debido a un posible bloqueo directo de

la droga sobre los canales (Figura 34). Estos resultados apoyan la posible participación de la PLC folicular durante la generación de las respuestas F_{Cl} , y en la generación de $I_{iw,Ca}$, ésta última a través de la apertura de una vía permeable a Ca^{2+} que permitió su influjo a las células foliculares activando canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} también localizados en la membrana de las células foliculares.

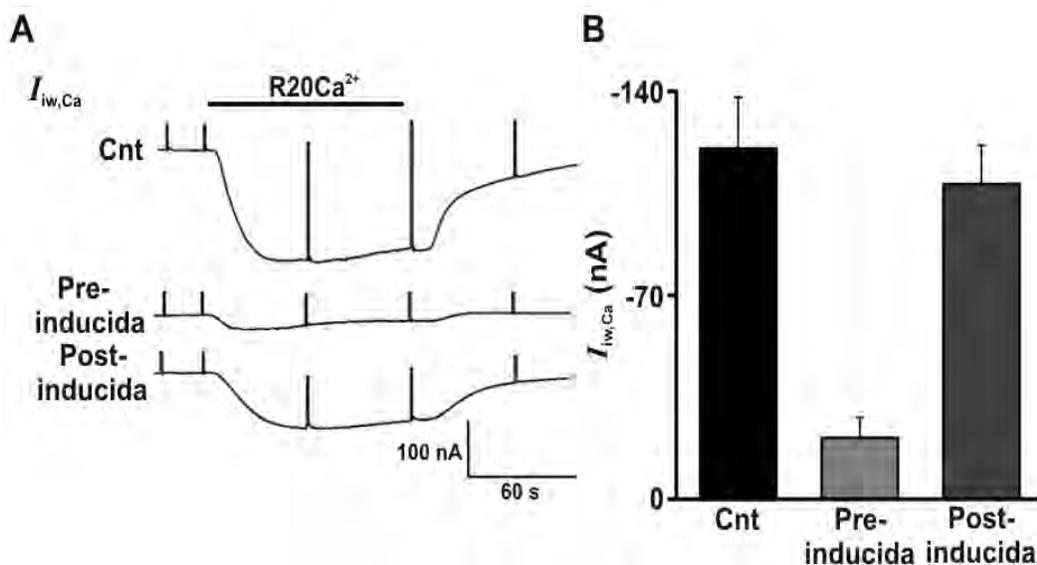


Figura 34. Efecto de U73122 sobre la corriente $I_{iw,Ca}$. A) Los trazos muestran la corriente generada a un potencial de mantenimiento de -60 mV, por la aplicación secuencial de $R20Ca^{2+}$, antes y después de una aplicación de ATP 10 μ M en RN, con la presencia de U73122. B) Promedio de la corriente $I_{iw,Ca}$ activada por $R20Ca^{2+}$.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se describe el papel que tienen, tanto el Ca^{2+} extracelular como el intracelular, en la generación de la respuesta purinérgica del folículo ovárico de la rana *Xenopus laevis*. En general, la información obtenida es importante para la comprensión de diferentes fenómenos sobre especificidad de la señalización intercelular, que serán enunciados más adelante a lo largo de esta sección, y plantea nuevas preguntas que requerirán de la ampliación de estos estudios. En particular, la demostración presentada acerca de la participación de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} durante la corriente F_{Cl} , abre preguntas acerca de la función del sistema de señalización purinérgico, también sobre la conectividad eléctrica entre las células somáticas y el gameto, así como acerca del papel de la activación de corrientes entrantes de Ca^{2+} desde el medio extracelular hacia el citoplasma de las células foliculares. En esta sección discutiremos los resultados más relevantes del estudio que serán divididos en 3 apartados principales: 1) Sobre la generación de influjo de Ca^{2+} a través de la estimulación de receptores purinérgicos en las células foliculares de *Xenopus*, 2) Sobre la participación de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} en la generación de F_{Cl} y su papel en las células foliculares, y 3) Sobre la posible diversidad de las células foliculares en comunicación con el ovocito. Sin embargo, antes de abordar estos temas haremos reflexiones generales principalmente a lo referente a los resultados obtenidos con las metodologías de fluorescencia funcional.

Cuando las células foliculares fueron aisladas y cargadas con indicadores fluorescentes específicos para Ca^{2+} , éstas mostraron un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular con un curso temporal rápido provocado por la estimulación con el agonista, esto fue similar a lo observado en la respuesta eléctrica provocada por ATP en el folículo completo bajo la técnica de control de voltaje y corroboraron datos previos del laboratorio (Robles-Martínez, 2007). En este punto, durante desarrollo del estudio comenzaron a ser evidentes diversos problemas técnicos en cuanto el cargado del colorante, y su blanqueo una vez capturado en la célula folicular. Las células foliculares aisladas mostraron tener una gran variabilidad en el cargado de los colorantes permeables a la membrana (AM), y una vez cargados estos parecen compartimentalizarse (Poenie, 1990) con rapidez,

provocando concentraciones mayores en orgánulos intracelulares de manera comparada con el citoplasma. Este fenómeno ha sido observado en algunos otros tipos celulares previamente y se le ha denominado compartimentalización o secuestro del indicador por parte de los reservorios celulares (Poenie, 1990). El secuestro o compartimentalización es considerado como la acumulación del indicador fluorescente alrededor del núcleo, esto es debido a que el indicador se concentra en los orgánulos perinucleares (Vornd *et al.*, 1995). Este fenómeno interfiere con la eficiencia de la técnica, disminuyendo la concentración citosólica de Ca^{2+} , y generando así artefactos o complicaciones en la obtención de una estimación adecuada del Ca^{2+} citoplásmico (Poenie, 1990).

Aquí, se realizaron una gran cantidad de experimentos en diferentes condiciones, tratando de minimizar esta característica desventajosa para los experimentos que se pretendían realizar. Aun y cuando se logró minimizar esto en algún grado, el secuestro del colorante permaneció en una gran cantidad de experimentos, lo que provocó probablemente una variabilidad en los resultados imposibilitando un análisis adecuado de la respuesta. Además de esta gran desventaja, se observó que el indicador se blanqueaba muy rápido, esto podría deberse posiblemente a la morfología de las células foliculares, debido a que son células planas de pocas micras de profundidad, cuando se encuentran adheridas a los cubreobjetos, de esta manera presentan un pequeño volumen citoplásmico que contendría un reducido número de moléculas del indicador, por lo que se podría provocar su rápido blanqueado. Esto es consistente con datos del laboratorio que indican que otros tipos celulares, tales como las células de la teca y las células epiteliales del ovario mamífero, sin las características morfológicas desventajosas de las células foliculares para experimentos de fluorescencia, tienen un tiempo de blanqueado más prolongado (de varios cientos de segundos; Vázquez-Cuevas *et al.*, 2007, 2010). Estas desventajas en la técnica de cargado en las células foliculares provocaron una gran variabilidad en la obtención, repetición y análisis de los resultados, limitando también la posibilidad de repetir aplicaciones, variar condiciones y lavar adecuadamente las preparaciones. A pesar de estas limitaciones, algunos de los resultados obtenidos indicaron la existencia de un aumento del Ca^{2+} intracelular durante la respuesta de las células foliculares a ATP. De esta manera nuestros experimentos se enfocaron a la participación del Ca^{2+} en la

respuesta eléctrica provocada por ATP con la técnica de control de voltaje de folículos.

8.1 Sobre la generación de influjo de Ca^{2+} a través de la estimulación de receptores purinérgicos en las células foliculares de *Xenopus*

Uno de los hallazgos centrales del estudio es la generación a través de estimulación purinérgica en los folículos de *Xenopus*, de una respuesta entrante que depende del Ca^{2+} extracelular a la cual hemos llamado $I_{iw,Ca}$. Nuestros datos indicaron que esta respuesta entrante fue acarreada principalmente por iones Cl^- y que depende estrictamente del Ca^{2+} extracelular, es decir, la eliminación en el medio del catión divalente elimina por completo la generación de la corriente de Cl^- , y un aumento en su concentración provocó un aumento proporcional de la respuesta con una clara relación dosis-respuesta. Por lo tanto es evidente que aún y cuando $I_{iw,Ca}$ es acarreada por Cl^- , ésta requiere del influjo de iones Ca^{2+} hacia el compartimento intracelular del folículo, y esta corriente subyacente es parte de la misma $I_{iw,Ca}$. Las evidencias que mostraron que la corriente es acarreada principalmente por iones Cl^- incluyeron: *i)* El potencial de inversión de la respuesta corresponde con el potencial de equilibrio para iones Cl^- en ovocitos y folículos (sección 7.8 y 7.9), *ii)* La disminución en la concentración de iones Cl^- , substituido por SO_4^{2-} , provoca un cambio del potencial de inversión de la respuesta a valores más positivos, consistente con la predicción aplicando la ecuación de Nernst (sección 7.9), y *iii)* La substitución de los iones Cl^- por otros aniones provocaron corrientes entrantes en un potencial de mantenimiento de -60 mV, lo cual indicó que la vía conductiva es también permeable a otras especies aniónicas. Las respuestas $I_{iw,Ca}$ provocadas en soluciones con diferentes aniones presentaron diferentes potenciales de inversión, consistente con una secuencia de permeabilidad de $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$ (secc. 7.9).

Por lo tanto la respuesta $I_{iw,Ca}$ fue debida principalmente a la activación de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} . De forma basal los folículos en general no presentan la respuesta activada o es de baja amplitud (en 20 mM de Ca^{2+} extracelular), sin embargo, hemos encontrado algunos ejemplos en los que $I_{iw,Ca}$ presentó una amplitud robusta antes de la aplicación exógena de ATP; es probable

que estos casos correspondan con folículos que presentan un alta liberación de ATP endógeno desde el ovocito (Saldaña *et al.*, 2009). Serán necesarios experimentos específicos para definir una posible relación entre estas dos variables, si éste fuera el caso podría indicar que la activación del influjo de Ca^{2+} es controlada por el mismo ovocito a través de la liberación del ATP, lo cual podría tener consecuencias importantes en la fisiología del gameto en desarrollo.

Dos de las características más importantes de la respuesta $I_{iw,Ca}$ fue su relación dosis-respuesta con respecto a ATP y su larga duración, una vez inducida, inclusive en bajas concentraciones de ATP, la respuesta permanece por decenas de minutos; regresaremos a estas dos características mas adelante porque representan características que podrían apuntar hacia los mecanismos membranales responsables de su inducción. Un hallazgo importante fue el hecho de que All, un péptido que activa corrientes de Cl^- dependientes de Ca^{2+} en el folículo de *Xenopus*, a través de un mecanismo dependiente de la PLC, fue incapaz de activar las respuestas $I_{iw,Ca}$. Esta no fue la única diferencia entre las respuestas eléctricas foliculares activadas por ATP y All, como ha sido mostrado previamente las características cinéticas de la corriente por ATP y All fueron por completo diferentes, mientras que la respuesta purinérgica principal muestra un curso temporal de activación e inactivación rápidas (corrientes F_{Cl}), la respuesta a All fue una corriente oscilatoria, típica de las respuestas generadas en el ovocito. Dado que la respuesta $I_{iw,Ca}$ fue debida a la apertura de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} fue planteada de inmediato la interrogante si estos correspondían con los canales que se sabe son expresados en la membrana del ovocito (Miledi 1982; Parker & Miledi, 1987); un antecedente que parecía apoyar esto es la respuesta reportada por Supplisson y colaboradores en 1991, quienes mostraron que la activación del transportador de $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ en su modo inverso en la membrana de las células foliculares, promueve un influjo de Ca^{2+} , éste parece difundir hasta el ovocito a través de la uniones comunicantes y activar en su membrana los canales de Cl^- . Por lo tanto, realizamos experimentos para poder definir si los canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} ($I_{Cl(Ca)}$) involucrados en $I_{iw,Ca}$ correspondían con los localizados en la membrana del ovocito. Los canales $I_{Cl(Ca)}$ en la membrana del ovocito pueden ser activados a través de los dos mecanismos fundamentales de incremento de Ca^{2+} intracelular, a través de su liberación desde reservorios intracelulares, y también por el influjo de Ca^{2+} al citoplasma desde el medio. En el primer caso, la liberación puede ser promovida a

través de la estimulación de receptores específicos localizados principalmente en la misma membrana del ovocito, sin embargo, el caso de los receptores a All representan un ejemplo bien documentado de receptores expresados en la membrana de las células foliculares, su activación promueve la síntesis de IP_3 en este tipo celular, el IP_3 difunde entonces hasta el citoplasma del ovocito donde libera Ca^{2+} del retículo endoplásmico, aumentando los niveles de Ca^{2+} en el citosol y abriendo los canales $I_{Cl(Ca)}$ que generan la corriente oscilatoria (Sandberg *et al.*, 1990, 1992). En el segundo caso, el influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular puede ser provocado por la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, lo que genera una respuesta saliente en potenciales despolarizantes llamada corriente T_{out} (Miledi 1982; Barish 1983). Estas dos respuestas dependientes de un aumento de Ca^{2+} en el citoplasma del ovocito ha sido mostrado que son eliminadas de forma eficiente inyectando en el ovocito quelantes del ión Ca^{2+} (e.g., Arellano & Miledi, 1993). De acuerdo con estos datos, nuestros resultados demostraron una completa inhibición de estas dos corrientes dependientes de Ca^{2+} al cargar los ovocitos con EGTA o BAPTA a través de inyecciones con pulsos de presión, sin embargo, la corriente $I_{iw,Ca}$ no fue eliminada en los mismos folículos. Esto mostró claramente dos importantes hallazgos: *i)* Los canales $I_{Cl(Ca)}$ involucrados en $I_{iw,Ca}$ no correspondieron con los canales localizados en el ovocito, y *ii)* Los quelantes de Ca^{2+} son incapaces de amortiguar un aumento de Ca^{2+} en el citoplasma de las células foliculares, probablemente debido a una pobre difusión de las sustancias hacia el compartimento de estas células. Esto fue reforzado con los resultados que muestran que cuando el folículo es cargado con el quelante aplicado desde el medio extracelular, utilizando una molécula permeable a la membrana como lo es el BAPTA-AM, todas las respuestas que dependen de Ca^{2+} tanto del ovocito como aquellas originadas en las células foliculares (i.e., $I_{iw,Ca}$) fueron eliminadas de forma efectiva. Como queda demostrado que ambas vías conductivas difieren, al menos en localización, para distinguir los canales $I_{Cl(Ca)}$ de la membrana del ovocito de los expresados en la membrana de las células **foliculares** denotaremos a estos últimos como canales o respuestas $f I_{Cl(Ca)}$.

La generación de influjo de Ca^{2+} a través de la estimulación de receptores membranales ha sido bien documentada en una diversidad de sistemas celulares, las vías principales a través de las cuales ocurre este fenómeno han sido llamadas de forma general como SOCE y ROCE. La determinación de la vía específica

utilizada por el folículo requerirá de mayores estudios, sin embargo, algunos de los datos obtenidos hasta ahora sugieren características operacionales contradictorias para cada uno de los casos, por ejemplo: *i)* la corriente de Ca^{2+} involucrada en SOCE es activada ante un vaciado de los reservorios intracelulares (lo cual activa STIM1 y los canales Orai), sin embargo, las corrientes foliculares que subyacen a la apertura de $I_{\text{iw,Ca}}$ fueron activadas desde concentraciones bajas del agonista lo que aparentemente excluye el vaciado de los reservorios en las células foliculares y por lo tanto participación de SOCE. *ii)* Las respuestas $I_{\text{iw,Ca}}$ una vez inducidas permanecen activas por periodos de tiempo prolongados en ausencia del agonista, esto no es una característica de ROCE, además los canales involucrados en este tipo de entrada parecen ser menos selectivos a Ca^{2+} y presentan una cierta permeabilidad a cationes en general, tal corriente catiónica no fue observada en nuestros experimentos utilizando folículos. Un estudio detallado de la vía permeable a Ca^{2+} durante $I_{\text{iw,Ca}}$ proporcionará sin duda elementos para poder definir los mecanismos activados en nuestro modelo.

Por otro lado, tanto SOCE como ROCE en varios tipos celulares tienen como factor común su activación a través de vías de síntesis de fosfoinosítidos; aquí mostramos que la activación de la $I_{\text{iw,Ca}}$ en las células foliculares requirió de la activación de PLC (secc. 7.10), lo cual sugirió fuertemente la participación de IP_3 en su mecanismo de activación. Esto último también explicaría los resultados que dieron origen al presente trabajo, referentes al aumento de Ca^{2+} intracelular provocado por ATP en células foliculares aisladas. Así el mecanismo de activación de la $I_{\text{iw,Ca}}$ folicular es explicado a través del siguiente mecanismo: La estimulación de receptores purinérgicos del tipo P2Y (sensibles a UTP) localizados en la membrana de las células foliculares, activa la enzima PLC promoviendo a través de sus productos la apertura de canales permeables a Ca^{2+} , del tipo de los involucrados en SOCE y/o ROCE, lo cual permite el flujo de Ca^{2+} al citoplasma de las células foliculares lo que abre canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} generando $I_{\text{iw,Ca}}$; la maquinaria molecular para la activación de esta respuesta se encuentra en su totalidad expresada en las células foliculares. El Ca^{2+} que fluye a través de la membrana de las células foliculares no difunde hasta el ovocito, y la producción de IP_3 a través de la participación de PLC no parece afectar los reservorios localizados en el ovocito; esto último es una importante diferencia con respecto al mecanismo

activado por la estimulación de los receptores foliculares a All ya que confiere una clara especificidad de las señales en el sistema.

8.2 Sobre la participación de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} en la generación de F_{Cl}

La activación de $I_{\text{iw,Ca}}$ fue debida a la apertura de canales $f I_{\text{Cl(Ca)}}$ y nuestros resultados mostraron que las características de esta vía explican también la generación de la respuesta F_{Cl} estimulada a través de los receptores purinérgicos. La descripción original de la respuesta F_{Cl} folicular fue realizada en el contexto de estimulación muscarínica (Arellano & Miledi, 1993), posteriormente fue mostrado que agentes purinérgicos compartían la generación de esta corriente así como la de la corriente dependiente de la osmolaridad llamada S_{Cl} (Arellano *et al.*, 1996, 1998). Esta primera descripción mostró que F_{Cl} no requería de la maquinaria molecular de movilización de Ca^{2+} expresada en el ovocito, y que eran por completo de origen en las células foliculares. Sin embargo, los mecanismos moleculares de su activación habían permanecido sin ser detallados, ésta es una interrogante que queda resuelta con los resultados obtenidos en este estudio. Nuestros resultados muestran que los canales involucrados en la generación de F_{Cl} son los mismos que los involucrados en $I_{\text{iw,Ca}}$, i.e., canales $f I_{\text{Cl(Ca)}}$. Son varias las evidencias mostradas en este sentido que pueden ser resumidas como sigue: *i)* Las respuestas foliculares fueron independientes de un aumento del Ca^{2+} intracelular en el citoplasma del ovocito, sin embargo, ambas respuestas dependen del aumento de Ca^{2+} en el citoplasma de las células foliculares, tal y como quedó demostrado por los experimentos de cargado de quelantes de Ca^{2+} , ya sea de forma específica en el ovocito a través de la inyección de estas sustancias en su citoplasma, como también por su cargado en el folículo completo utilizando el BAPTA permeable. *ii)* Las corrientes son acarreadas principalmente por iones Cl^- que presentaron una secuencia idéntica de permeabilidad a diferentes aniones, $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$, que además es idéntica a la observada para otros canales $I_{\text{Cl(Ca)}}$ incluyendo los expresados en el ovocito (Arellano *et al.*, 1998). *iii)* Las respuestas no fueron aditivas, la máxima activación de $I_{\text{iw,Ca}}$ inhibe la generación de F_{Cl} lo que sugiere claramente que comparten los mecanismos involucrados, y de manera más probable utilizan ambas canales $f I_{\text{Cl(Ca)}}$.

iv) También por la dependencia de ambas respuestas foliculares a la activación de la PLC mostrada a través de los experimentos utilizando el inhibidor específico de esta enzima el U73122.

Con respecto al último punto, hemos mostrado que tanto la respuesta F_{Cl} como la $I_{iw,Ca}$ fueron inhibidas de forma potente por U73122 que ha sido mostrado en una diversidad de modelos celulares como un inhibidor efectivo y específico de la enzima PLC, así como el nulo efecto de U73343, derivado de la droga que funciona como control negativo (Zhu *et al.*, 1998; Jeong *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2009). Debido a las evidencias mostradas aquí y a lo mostrado previamente, por ejemplo: *i*) que la respuesta F_{Cl} no depende del Ca^{2+} extracelular (Arellano & Miledi 1993; Arellano *et al.*, 1996, 1998), y *ii*) que el ATP provoca un rápido aumento de Ca^{2+} en el citoplasma de las células foliculares (Robles-Martínez, 2007) que recuerda a la cinética de la propia F_{Cl} ; proponemos que ésta respuesta eléctrica es generada a través del aumento de Ca^{2+} en las células foliculares, promovido por la liberación del ión desde sus reservorios intracelulares, a través de la acción de la PLC. La cascada de generación de ambas respuestas, la F_{Cl} y la $I_{iw,Ca}$, estaría entonces acoplada a la producción de IP_3 a través de la estimulación de PLC por los receptores purinérgicos, y la primera dependería de la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares mientras que la segunda de su influjo a través de vías relacionadas con SOCE y/o ROCE, ambas activando canales $I_{Cl(Ca)}$.

El papel funcional de los canales $fI_{Cl(Ca)}$ en la generación de las respuestas F_{Cl} e $I_{iw,Ca}$ es una de las interrogantes más importantes que deben ser abordadas en estudios subsecuentes. En general, los canales $I_{Cl(Ca)}$ han sido involucrados en una variedad de funciones dependiendo del tipo celular en los que se encuentran expresados, por ejemplo, en el ovocito han sido implicados en los mecanismos que impiden la polispermia durante la fertilización (Yang *et al.*, 2008), en olfacción representan uno de los mecanismos esenciales de excitabilidad de las células receptoras (Reisert *et al.*, 2005), en células secretoras representan la vía más importante del eflujo de Cl^- que permite el movimiento de agua, y funciones importantes han sido reportadas en músculo (esquelético, liso y cardiaco), neuronas y glía, así como epitelios y endotelios diversos (para una revisión exhaustiva ver Hartzell & Arreola, 2005). Es bien conocido el papel fundamental de las células foliculares (células de la granulosa en mamíferos) en el mantenimiento de las condiciones propicias para el crecimiento y desarrollo del ovocito; el acoplamiento a

través de uniones comunicantes de éstas con el gameto en desarrollo es un fenómeno determinante de la foliculogénesis y la ovogénesis (Aaltonen *et al.*, 1999; Fourten *et al.*, 1983). Su participación en estos fenómenos complejos incluyen interacciones metabólicas y eléctricas, en donde la comunicación intercelular tiene un papel fundamental; en ésta, la aportación de nutrientes así como de hormonas y factores de crecimiento por parte de las células somáticas al ovocito son de los eventos más estudiados (Messinis *et al.*, 1988). De forma reciente, en nuestro laboratorio ha sido mostrado que el ovocito libera ATP hacia el medio extracelular y que éste es capaz de activar las corrientes nativas estimulando los receptores expresados en las células foliculares. Así, tanto canales de K^+ (Saldaña *et al.*, 2005) como los canales $f I_{Cl(Ca)}$ (Saldaña *et al.*, 2009) pueden ser activados por el ATP liberado y la estimulación intrafolicular de receptores específicos, funcionalmente esto confiere a la membrana de las células foliculares una maquinaria apropiada que permitiría la regulación iónica y la secreción de agua, fenómenos necesarios para las funciones generales mencionadas arriba. En este punto se convierte de primera importancia saber cómo es controlada la liberación de ATP por parte del ovocito, ya que la existencia de este fenómeno por parte del gameto representaría un sistema de regulación parácrina donde el gameto en desarrollo mantiene control sobre las funciones de las células somáticas que lo acompañan.

Una de las características más relevantes de la respuesta purinérgica $I_{iw,Ca}$ es su curso temporal prolongado, de hecho algunos donadores presentaron folículos con activación endógena de la corriente, este influjo de Ca^{2+} constante al citoplasma de las células foliculares podría tener consecuencia muy importantes en las funciones de las células más allá de la apertura de canales iónicos en la membrana. Así, la apertura simultánea de los canales $f I_{Cl(Ca)}$ mantendría el gradiente electroquímico apropiado para un continuo y robusto influjo de Ca^{2+} mientras los canales SOCE y/o ROCE se mantienen abiertos. Sobre las consecuencias del prolongado influjo de este importante segundo mensajero en las células foliculares se debe de investigar más para conocer sus consecuencias; por ejemplo, resultados preliminares en el laboratorio muestran que la activación persistente de este influjo permite la activación del sistema de MAPK cinasas, lo cual podría llevar a vías de regulación génica (Vazquez-Cuevas, comunicación personal).

8.3 Sobre la posible diversidad de las células foliculares en comunicación con el ovocito

Según lo mostrado aquí, dos de los principales sistemas de señalización expresados en el folículo de *Xenopus laevis* funcionan a través de un mecanismo similar de segundos mensajeros estimulado por la PLC. Sin embargo, la estimulación a través de sus agonistas específicos, el ATP y la AII, generaron respuestas por completo diferentes, mientras que la AII estimula la liberación de Ca^{2+} en el ovocito, el ATP solo provoca el aumento de Ca^{2+} en las células foliculares. Ha sido demostrado previamente que es el IP_3 producido en las células foliculares por la acción de la AII quien difunde al citoplasma del ovocito, a través de las uniones comunicantes que los mantienen acoplados, y es en el citoplasma del ovocito donde el IP_3 ejerce sus efectos de liberación de Ca^{2+} y la consecuente activación de los canales de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$. Por otro lado, el IP_3 aparentemente producido en las células foliculares a través de la estimulación por ATP es incapaz de liberar Ca^{2+} en el ovocito, y solo se observan sus efectos en el compartimento de las células foliculares. Esto parece indicar que en el último caso el mensajero propuesto, el IP_3 , parece no difundir hasta el ovocito en clara diferencia a lo provocado por la AII. Una explicación simple de esta diferencia (esquemática en la figura 35) podría tener relación con poblaciones distintas de células foliculares, una población incluiría células expresando receptores a AII y otra a células expresando receptores a ATP, éstas últimas también expresan de forma exclusiva los canales $f I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ (puesto que AII no activa las respuestas F_{Cl} e $I_{\text{w,Ca}}$). A pesar de que las dos poblaciones hipotéticas de células foliculares se encuentran acopladas eléctricamente al ovocito, las uniones comunicantes de las células que responde al ATP poseerían un filtro que impide la difusión de IP_3 hacia el citoplasma del ovocito. Esta posibilidad también explicaría el hecho de que moléculas como EGTA y BAPTA inyectadas en el ovocito son incapaces de amortiguar el Ca^{2+} en el compartimento de las células foliculares respondiendo a ATP (como mostramos en este trabajo), de forma coincidente estas tres moléculas son de carácter aniónico, lo que podría ser una característica de exclusión para la permeabilidad de la unión comunicante involucrada. Sin duda, también en este aspecto se requiere de mayor número de experimentos enfocados a conocer las características de células foliculares aisladas y de las uniones comunicantes expresadas en el folículo de *Xenopus*, puesto que la propuesta no es

la única explicación plausible. Por ejemplo, deben ser descartadas otras posibilidades: la localización diferencial de receptores en microdominios de las mismas células, favoreciendo la difusión de IP_3 sintetizado en regiones especializadas de las células foliculares, o una posible activación de diferentes tipos de PLC cuya dinámica de síntesis de IP_3 y su degradación permitan aumentos bien diferenciados en cada uno de los compartimentos. Cualquiera que sea el caso, lo demostrado en el folículo de *Xenopus* es un ejemplo de especificidad de la señal promovida a través del mismo segundo mensajero, que podría tener una explicación que no habría sido vislumbrada previamente en otros modelos celulares, y que implica un relación de conectividad diferencial entre las células que componen una unidad funcional, en este caso representada por el folículo ovárico.

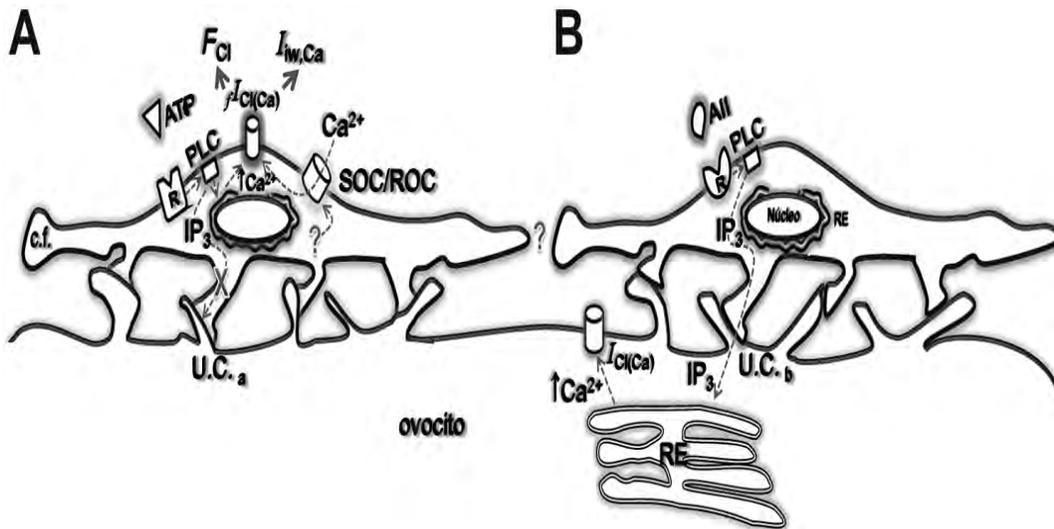


Figura 35. Esquema hipotético de poblaciones diferentes de células foliculares. A) Población de células foliculares que expresan receptores a ATP, expresando los canales $I_{Cl(Ca)}$. B) Células foliculares expresando receptores a AII. Célula folicular (c.f.); Retículo Endoplásmico (RE); Fosfolipasa C (PLC); Store operated channel (SOC); Receptor operated channel (ROC); Unión comunicante de la célula tipo a (U.C.a, impermeable a IP_3 señalizado por X); Unión comunicante de la célula tipo b (U.C.b). Una posible conectividad entre estos dos tipos de células, así como los mecanismos de activación de SOC/ROC quedan por definir.

9. CONCLUSIONES

1. La corriente F_{Cl} activada por ATP depende de un aumento en la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma de las células foliculares.
2. La estimulación purinérgica induce la generación de una corriente entrante ($I_{iw,Ca}$) dependiente de Ca^{2+} extracelular asociado a un incremento en la conductancia de la membrana a iones Cl^- .
3. Tanto F_{Cl} como $I_{iw,Ca}$ son respuestas debidas a la apertura de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} localizados en la membrana de las células foliculares ($fI_{Cl(Ca)}$).
4. De acuerdo a las características electrofisiológicas de la vía permeable a Cl^- activada durante F_{Cl} e $I_{iw,Ca}$, y a su interacción funcional, ambas respuestas se deben a la apertura del mismo tipo de canales $fI_{Cl(Ca)}$.
5. Las respuestas purinérgicas F_{Cl} e $I_{iw,Ca}$ dependen de la activación de la enzima PLC.
6. Parecen existir dos tipos de células foliculares; uno, expresa receptores a ATP y el otro, receptores a All. Las células con receptores purinérgicos, expresan también el mecanismo que genera las respuestas $I_{iw,Ca}$ y la F_{Cl} , mientras que las que expresan All no presentan respuestas eléctricas asociadas en su membrana.
7. Las uniones comunicantes entre el ovocito y las células foliculares que expresan los receptores purinérgicos son impermeables a sustancias como EGTA, BAPTA y al mismo IP_3 .

10. BIBLIOGRAFÍA

Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppä L, Louhio H, Tuuri T, Sjöberg J, Bützow R, Hovata O, Dale L, Ritvos O. 1999. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 84:2744-2750.

Arellano RO, 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 RO, Woodward RM, Miledi R. 1996. Ion channels and membrane receptors in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *Ion Channels* 4:203-259.

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

Arellano RO, Garay E, Miledi R. 1999. Muscarinic receptor heterogeneity in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 521:409-419.

Arellano RO, Martínez-Torres A, Garay E. 2002. Ionic currents activated via purinergic receptors in the cumulus cell-enclosed mouse oocyte. *Biol. Reprod.* 67:837-846.

Arellano RO, Garay E, Vázquez-Cuevas F. 2009. Functional interaction between native G protein-coupled purinergic receptors in *Xenopus* follicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:16680-16685.

Berridge MJ. 1997. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J. Exp. Biol.* 200:315-319.

Berridge MJ. 2004. Calcium signal transduction and cellular control mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 1742:3-7.

Berridge MJ, Cobbold PH, Cuthbertson KS. 1988. Spatial and temporal aspects of cell signalling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 320:325-343.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:11-21.

Bezzerrides VJ, Ramsey IS, Kotecha S, Greka A, Clapham DE. 2004. Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat. Cell. Biol.* 6:709-720.

Boulay G, Brown DM, Qin N, Jiang M, Dietrich A, Zhu MX, Chen Z, Birnbaumer M, Mikoshiba K, Birnbaumer L. 1999. Modulation of Ca^{2+} entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor (IP_3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP_3R in store depletion-activated Ca^{2+} entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:14955-14960.

Butanda-Ochoa A, Höjer G, Morales-Tlalpan V, Díaz-Muñoz M. 2006. Recognition and activation of ryanodine receptors by purines. *Curr. Med. Chem.* 13:647-657.

Cahalan MD. 2009. STIMulating store-operated Ca^{2+} entry. *Nat. Cell. Biol.* 11:669-777.

Clapham DE. 1995. Calcium signaling. *Cell.* 80:259-268.

Dargan SL, Demuro A, Parker I. 2006. Imaging Ca^{2+} signals in *Xenopus* oocytes. *Methods Mol. Biol.* 322:103-119.

Drissi H, Lasmoles F, Le Mellay V, Marie PJ, Lieberherr M. 1998. Activation of phospholipase C-beta1 via Galphaq/11 during calcium mobilization by calcitonin gene-related peptide. *J. Biol. Chem.* 273:20168-20174.

Dumont JN. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. 1972. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136:153-179.

Dumont JN. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). VI. 1978. The route of injected tracer transport in the follicle and developing oocyte. *J. Exp. Zool.* 204:193-217.

Fahrner M, Muik M, Derler I, Schindl R, Fritsch R, Frischauf I, Romanin C. 2009. Mechanistic view on domains mediating STIM1-Orai coupling. *Immunol. Rev.* 231:99-112.

Feske S. 2009. ORAI1 and STIM1 deficiency in human and mice: roles of store-operated Ca^{2+} entry in the immune system and beyond. *Immunol. Rev.* 231:189-209.

Feske S, Giltneane J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A. 2001. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat. Immunol.* 2:316-324.

Flemming PK, Dedman AM, Xu SZ, Li J, Zeng F, Naylor J, Benham CD, Bateson AN, Muraki K, Beech DJ. 2006. Sensing of lysophospholipids by TRPC5 calcium channel. *J. Biol. Chem.* 281:4977-4982.

Frischauf I, Schindl R, Derler I, Bergsmann J, Fahrner M, Romanin C. 2008. The STIM/Orai coupling machinery. *Channels (Austin)* 4:2261-2268.

Fujita R, Kimura S, Kawasaki S, Takashima K, Matsumoto M, Hirano H, Sasaki K. 2001. ATP suppresses the K^+ current responses to FSH and adenosine in the follicular cells of *Xenopus* oocyte. *Jpn. J. Physiol.* 51:491-500.

Fujita R, Kimura S, Kawasaki S, Watanabe S, Watanabe N, Hirano H, Matsumoto M, Sasaki K. 2007. Electrophysiological and pharmacological characterization of the K(ATP) channel involved in the K^+ -current responses to FSH and adenosine in the follicular cells of *Xenopus* oocyte. *J. Physiol. Sci.* 57:51-61.

Gerasimenko O, Gerasimenko J. 2004. New aspects of nuclear calcium signalling. *J. Cell. Sci.* 117:3087-3094.

Hartzell C, Putzier I, Arreola J. 2005. Calcium-activated chloride channels. *Annu. Rev. Physiol.* 67:719-758.

Hille B. 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. University of Washington. New York. 814 pp.

Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G. 1999. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397:259-263.

Hogan PG, Lewis RS, Rao A. 2010. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu. Rev. Immunol.* 28:491-533.

Honoré E, Lazdunski M. 1991. Two different types of channels are targets for potassium channel openers in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* 287:75-79.

Horowitz LF, Hirdes W, Suh BC, Hilgemann DW, Mackie K, Hille B. 2005. Phospholipase C in living cells: activation, inhibition, Ca²⁺ requirement, and regulation of M current. *J. Gen. Physiol.* 126:243-262.

Huang J, van Breemen C, Kuo KH, Hove-Madsen L, Tibbits GF. 2006. Store-operated Ca²⁺ entry modulates sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ loading in neonatal rabbit cardiac ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290:C1572-C1582.

Hu R, He ML, Hu H, Yuan BX, Zang WJ, Lau CP, Tse HF, Li GR. 2009. Characterization of calcium signaling pathways in human preadipocytes. *J. Cell. Physiol.* 220:765-770.

Jeong SM, Lee JH, Kim S, Rhim H, Lee BH, Kim JH, Oh JW, Lee SM, Nah SY. 2004. Ginseng saponins induce store-operated calcium entry in *Xenopus* oocytes. *Br. J. Pharmacol.* 142:585-593. PubMed Central PMCID: PMC1574966.

Kiselyov K, Xu X, Mozhayeva G, Kuo T, Pessah I, Mignery G, Zhu X, Birnbaumer L, Muallem S. 1998. Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* 396:478-482.

Kurosaki T, Baba Y. 2010. Ca²⁺ signaling and STIM1. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 103:51-58.

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

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

Lazarowski ER, Boucher RC. 2001. UTP as an extracellular signaling molecule. *News Physiol. Sci.* 16:1-5.

Lee KP, Yuan JP, Hong JH, So I, Worley PF, Muallem S. 2010. An endoplasmic reticulum/plasma membrane junction: STIM1/Orai1/TRPCs. *FEBS Lett.* 584:2022-2027.

Lewis R. 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 19:497-521.

Lewis R. 2007. The molecular choreography of a store-operated calcium channel. *Nature* 446:284-287.

Liao Y, Erxleben C, Abramowitz J, Flockerzi V, Zhu MX, Armstrong DL, Birnbaumer L. 2008. Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/*I*_{crac} channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:2895-2900.

Liao Y, Plummer NW, George MD, Abramowitz J, Zhu MX, Birnbaumer L. 2009. A role for Orai in TRPC-mediated Ca²⁺ entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca²⁺ entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:3202-6.

Lipp P, Thomas D, Berridge MJ, Bootman MD. 1997. Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs. *EMBO J.* 16:7166-7173.

- Lodish H, Darnell J. 2002. *Biología Celular y Molecular*. Ed. Omega. 1054 pp.
- Maller JL. 1986-1987. Mitogenic signalling and protein phosphorylation in *Xenopus* oocytes. *J. Cyclic. Nucleotide Protein Phosphor. Res.* 11:543-55.
- Maller JL. 1990. *Xenopus* oocytes and the biochemistry of cell division. *Biochemistry.* 29:3157-3166.
- Maller JL. 1993. On the importance of protein phosphorylation in cell cycle control. *Mol. Cell. Biochem.* 127-128:267-81.
- Maller J, Gautier J, Langan TA, Lohka MJ, Shenoy S, Shalloway D, Nurse P. 1989. Maturation-promoting factor and the regulation of the cell cycle. *J. Cell. Sci.* 12:53-63.
- Markosyan N, Dozier BL, Lattanzio FA, Duffy DM. 2006. Primate granulosa cell response via prostaglandin E2 receptors increases late in the periovulatory interval. *Biol. Reprod.* 75:868-76.
- Maroto R, Hamill OP. Brefeldin. 2001. A block of integrin-dependent mechanosensitive ATP release from *Xenopus* oocytes reveals a novel mechanism of mechanotransduction. *J. Biol. Chem.* 276:23867-23872.
- Messinis IE, Templeton AA. 1988. The endocrine consequences of multiple folliculogenesis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 36:27-37.
- Miledi R. 1982. A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 215:491-497.
- Miledi R, Woodward RM. 1989. Effects of defolliculation on membrane current responses of *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 416:601-621.
- Morales-Tlalpan V, Arellano RO, Díaz-Muñoz M. 2005. Interplay between ryanodine and IP₃ receptors in ATP-stimulated mouse luteinized-granulosa cells. *Cell Calcium* 37:203-213.

Naylor J, Milligan CJ, Zeng F, Jones C, Beech DJ. 2008. Production of a specific extracellular inhibitor of TRPM3 channels. *Br. J. Pharmacol.* 155:567-573.

Penna A, Demuro A, Yeromin AV, Zhang SL, Safrina O, Parker I, Cahalan MD. 2008. The CRAC channel consists of a tetramer formed by STIM-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* 456:116-120.

Parekh AB, Penner R. 1997. Store depletion and calcium influx. *Physiol. Rev.* 77:901-930.

Parekh AB, Putney JW Jr. 2005. Store-operated calcium channels. *Physiol. Rev.* 85:757-810.

Pérez-Samartín AL, Miledi R, Arellano RO. Activation of volume-regulated Cl⁻ channels by ACh and ATP in *Xenopus* follicles. *J. Physiol.* 15:721-734.

Patel AC, Brett TJ, Holtzman MJ. 2009. The role of CLCA proteins in inflammatory airway disease. *Annu Rev Physiol.* 71:425-449.

Poenie M. Alteration of intracellular Fura-2 fluorescence by viscosity: a simple correction. 1990. *Cell Calcium.* 11:85-91.

Putney JW Jr. 1976. Stimulation of ⁴⁵Ca influx in rat parotid gland by carbachol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 199:526-537.

Putney JW Jr. 1977. Muscarinic, alpha-adrenergic and peptide receptors regulate the same calcium influx sites in the parotid gland. *J. Physiol.* 268:139-49.

Reisert J, Lai J, Yau KW, Bradley J. 2005. Mechanism of the excitatory Cl⁻ response in mouse olfactory receptor neurons. *Neuron.* 45:553-561.

Robles-Martínez L. 2007. Aumento de Ca²⁺ intracelular por ATP y Angiotensina II en células foliculares aisladas de *Xenopus laevis*. Tesis Profesional, Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla 51 pp.

Supplisson S, Kado RT, Bergman C. 1991. A possible Na/Ca exchange in the follicle cells of *Xenopus* oocyte. *Dev. Biol.* 145:231-240.

Skupin A, Kettenmann H, Falcke M. 2010. Calcium signals driven by single channelnoise. *PLoS. Comput. Biol.* 6(8) pii: e1000870.

Saldaña C, Vázquez-Cuevas F, Garay E, Arellano RO. 2005. Epithelium and/or theca are required for ATP-elicited K⁺ current in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *J. Cell. Physiol.* 202:814-821.

Saldaña C, Garay E, Rangel GE, Reyes LM, Arellano RO. 2009. Native ion current coupled to purinergic activation via basal and mechanically induced ATP release in *Xenopus* follicles. *J. Cell Physiol.* 218:355-365.

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

Sandberg K, Ji H, Iida T, Catt KJ. 1992. Intercellular communication between follicular angiotensin receptors and *Xenopus laevis* oocytes: mediation by an inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent mechanism. *J. Cell Biol.* 117:157-167.

Van Renterghem C, Renit-Soria J, Stinnakre J. beta-Adrenergic induced K⁺ current in *Xenopus* oocytes: role of cAMP, inhibition by muscarinic agents. 1985. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 223:389-402.

Vázquez-Cuevas FG, Juárez B, Garay E, Arellano RO. 2006. ATP-induced apoptotic cell death in porcine ovarian theca cells through P2X7 receptor activation. *Mol. Reprod. Dev.* 73:745-755.

Vázquez-Cuevas FG, Zárate-Díaz EP, Garay E, Arellano RO. 2010. Functional expression and intracellular signaling of UTP-sensitive P2Y receptors in theca-interstitial cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8:88.

Verkhatsky A, Toescu EC. 1998. Calcium and neuronal ageing. *Trends. Neurosci.* 21:2-7.

Whitaker M. 2006. Calcium at fertilization and in early development. *Physiol Rev.* 86:25-88.

Wibrand F, Honoré E, Lazdunski M. 1992. Opening of glibenclamide-sensitive K⁺ channels in follicular cells promotes *Xenopus* oocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:5133-5137.

Woodward RM, Miledi R. 1987. Hormonal activation of ionic currents in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:4135-4139.

Woodward RM, Miledi R. 1991. Angiotensin II receptors in *Xenopus* oocytes. *Proc. Biol. Sci.* 244:11-19.

Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim WS, Park SP, Lee J, Lee B, Kim BM, Raouf R, Shin YK, Oh U. 2008. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 455:1210-1215.

Yuan JP, Kim MS, Zeng W, Shin DM, Huang G, Worley PF, Muallem S. 2009. TRPC channels as STIM1-regulated SOCs. *Channels (Austin)* 3:221-225.

Yoshioka K, Nakata H. 2004. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: purinergic receptor complex: generating adenosine nucleotide-sensitive adenosine receptors. *J. Pharmacol. Sci.* 94:88-94.

Zhu X, Jiang M, Birnbaumer L. 1998. Receptor-activated Ca²⁺ influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. Evidence for a non-capacitative Ca²⁺ entry. *J. Biol. Chem.* 273:133-142.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de comunicación química celular	2
Figura 2. Canales permeables a Ca^{2+} en la membrana plasmática	5
Figura 3. Estructura molecular de STIM y Orai	7
Figura 4. Unidades funcionales del canal SOC ensambladas en respuesta al vaciado de Ca^{2+} de los reservorios	10
Figura 5. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión y de barrido del folículo ovárico de <i>Xenopus laevis</i>	14
Figura 6. Cirugía de rana <i>Xenopus laevis</i>	23
Figura 7. Aislamiento de folículos de <i>Xenopus laevis</i>	24
Figura 8. Folículos de <i>Xenopus laevis</i>	24
Figura 9. Esquema de la técnica de control de voltaje	25
Figura 10. Células foliculares aisladas del folículo de <i>Xenopus laevis</i>	29
Figura 11. Corriente F_{Cl} generada por la aplicación de ATP extracelular	30
Figura 12. Células foliculares aisladas del folículo ovárico de <i>Xenopus laevis</i>	32
Figura 13. Células foliculares aisladas del folículo de <i>Xenopus laevis</i>	33
Figura 14. Células foliculares de <i>Xenopus laevis</i>	33
Figura 15. Células foliculares cargadas con el indicador Fluo 4-AM	34
Figura 16. Aumento de Ca^{2+} intracelular evocado por ATP en RN.....	35
Figura 17. Corriente entrante inducida por ATP activada por un aumento del Ca^{2+} extracelular.....	37
Figura 18. Distribución de los picos de amplitud de la corriente entrante activada por Ringer alto Ca^{2+}	38
Figura 19. All no es capaz de activar la respuesta $I_{\text{iw,Ca}}$	39
Figura 20. Decaimiento de la activación de la respuesta $I_{\text{iw,Ca}}$ por $\text{R}20\text{Ca}^{2+}$ previamente inducida por ATP	40
Figura 21. Relación dosis-respuesta de la inducción de $I_{\text{iw,Ca}}$ por aplicación de ATP.....	41
Figura 22. Activación de $I_{\text{iw,Ca}}$ inducida por ATP aplicando diferentes concentraciones de Ca^{2+}	42
Figura 23. Activación de $I_{\text{iw,Ca}}$ inducida por ATP aplicando diferentes concentraciones de Ca^{2+}	42
Figura 24. Respuestas $I_{\text{iw,Ca}}$ y F_{Cl} en diferentes concentraciones de Ca^{2+}	43

Figura 25. Relación entre las amplitudes de F_{Cl} y de $I_{iw,Ca}$ inducida por ATP en soluciones conteniendo diferentes concentraciones de Ca^{2+}	44
Figura 26. Eliminación de T_{out} por cargado del ovocito con EGTA.....	46
Figura 27. Efecto de cargado del ovocito con EGTA sobre F_{Cl} y la corriente entrante	47
Figura 28. Efecto de cargado del folículo con BAPTA-AM sobre las respuestas F_{Cl} e $I_{iw,Ca}$	48
Figura 29. Efecto sobre la corriente T_{out} por cargado del folículo con BAPTA-AM...	49
Figura 30. Curva I/V de $I_{iw,Ca}$	50
Figura 31. Disminución de la concentración de Cl^- en la corriente $I_{iw,Ca}$	51
Figura 32. Bases iónicas de $I_{iw,Ca}$	52
Figura 33. Efecto de U73122 y U73343 sobre la corriente F_{Cl}	53
Figura 34. Efecto de U73122 sobre la corriente $I_{iw,Ca}$	54
Figura 35. Esquema hipotético de poblaciones diferentes de células foliculares.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
Ang II	Angiotensina II
AMPc	Adenosín monofosfato-3',5' cíclico
ANF	Péptido natriurético auricular
ATP	Adenosín trifosfato
BAPTA	Ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N,N,N',N'- tetracético
Br⁻	Bromo
Ca²⁺	Calcio
cf.o.	Células foliculares-ovocito
C.F.	Células foliculares
CG	Gránulo Cortical
Cl⁻	Cloro
CRAC	Canal de calcio activado por liberación de calcio
EGTA	Ácido etilenglicol-bis (β-aminoetil éter)-N,N,N',N'- tetracético
EIO	Epitelio Interno Ovárico
e.t.r.	Epitelio y teca removido
F_{Cl}	Corriente rápida de Cloro
f I_{Cl(Ca)}	Corriente folicular de cloro dependiente de calcio
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
PLC	Fosfolípasa C
I⁻	Yodo
I_{Cl(Ca)}	Corriente de cloro dependiente de calcio
I_{iw,Ca}	Corriente entrante dependiente de calcio
I_{K,AMPc}	Corriente de potasio dependiente de AMPc
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
K⁺	Potasio
Na⁺	Sodio
NCX	Intercambiador sodio-calcio
M.V.	Membrana Vitelina
M	Gránulo de pigmento
O	Ovocito

RBC	Eritrocitos
RE	Retículo Endoplásmico
ROCE	Entrada de calcio operada por receptor
SBF	Suero Fetal Bovino
S_{Cl}	Corriente lenta de Cloro
SCN⁻	Tiocianato de sodio
SERCA	Sarcoplasmic and endoplasmic reticulum calcium ATPasa
SOCE	Entrada de calcio operada por reservorios
SMOC	Canales operados por segundos mensajeros
STIM	Stromal interacting molecule
T	Teca
TRP	Transient receptor potential
UTP	Uridina-5'-trifosfato
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VOC	Canales dependientes de voltaje
w.f.	Folículo completo
YP	Gránulo de yema
2 MeS-ATP	2- Metiltioadenosin- 5'- O- trifosfato
[Ca²⁺]	Concentración de calcio