



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
CAMPUS UNAM JURQUILLA**

**IDENTIDAD MOLECULAR DE ELEMENTOS QUE PARTICIPAN EN
LA SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA EN EL FOLÍCULO OVÁRICO DE
*Xenopus laevis***

TESIS

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

PRESENTA:

BIÓL. MARÍA ANGÉLICA ACOSTA MARROQUÍN

DIRECCIÓN DE TESIS:

DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA

JURIQUILLA, QUERÉTARO. 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado de Examen de Grado certificamos que la tesis elaborada por: María Angélica Acosta Marroquín, cuyo título es: "Identidad molecular de elementos que participan en la señalización purinérgica en el folículo ovárico de *Xenopus laevis*", 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:

Dr. Rogelio Arellano Ostoa

Vocal:

Dra. María del Refugio

García Villegas

Suplente:

Dr. Juan Pablo Reyes Valverde

Suplente:

Dr. Gerardo Rojas Piloni

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 Ostoá, y fue apoyado con recursos financieros del CONACyT (No. 82340 para ROA y 166725 para FGVC), PAPIIT-UNAM (No. IN208209 para FGVC; IN214409 e IN205312 para ROA) e IACOD-UNAM (No. IA200112 para FGVC).

RESUMEN

Las células foliculares y el ovocito de *Xenopus laevis* mantienen comunicación eléctrica y química durante el desarrollo folicular. Se sabe que esta comunicación intercelular incluye eventos eléctricos y metabólicos cuya importancia funcional en el proceso de foliculogénesis no ha sido precisada hasta el momento. Una de las respuestas eléctricas originadas en las células foliculares es la llamada corriente rápida de cloruro (F_{Cl}), que es generada a través de la estimulación de un receptor purinérgico de tipo P2Y, el cual promueve un aumento intracelular de Ca^{2+} lo que subsecuentemente activa canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} ($I_{Cl,Ca}$). Aun y cuando se conocen con detalle los eventos que generan esta respuesta y algunas de sus consecuencias fisiológicas, todavía es desconocida la identidad molecular de los elementos principales que participan en ella, tanto del receptor P2Y como la de los canales que intervienen en la generación de la F_{Cl} . El avance en el entendimiento de la función fisiológica de estas respuestas requerirá de conocer la identidad de los elementos activados. La presente tesis tuvo como principal objetivo avanzar hacia la definición de este conocimiento, haciendo uso de tecnologías modernas, como el silenciamiento de genes a través de la internalización de secuencias de oligonucleótidos antisentido y, de un estudio para identificar el perfil farmacológico de los canales de F_{Cl} . Como primer paso se estandarizó una técnica de electroporación *in vivo* de oligonucleótidos antisentido utilizando el folículo de *Xenopus*; una vez demostrada la eficiencia de esta metodología, procedimos a silenciar el receptor tipo P2Y₄ de *Xenopus*, subtipo que ha sido involucrado en la generación de la corriente F_{Cl} . Nuestros datos sugieren que el receptor *Xenopus*-P2Y₄ está efectivamente involucrado en la generación de la respuesta F_{Cl} . Sin embargo, también parecen indicar que no es el único receptor purinérgico endógeno involucrado. Por otro lado, fue determinado el perfil farmacológico de los canales activados durante la F_{Cl} . Los datos muestran que estos canales presentan bloqueo por diferentes drogas con la siguiente potencia: ácido niflúmico > DIDS > DPC > A9C, la cual es una secuencia similar a la que presentan los canales $I_{Cl,Ca}$ expresados en la membrana del ovocito y varios otros tipos celulares, así como a la de los canales formados por la proteína TMEM16A.

ABSTRACT

During follicular development in *Xenopus laevis*, follicular cells and the oocyte maintain chemical and electrical communication that includes electrical and metabolic events whose functional importance in the process of folliculogenesis has not yet been precisely defined. One of the electrical responses originating in the follicular cells is known as the fast chloride current (F_{Cl}), which is generated by the stimulation of a P2Y-type purinergic receptor; this, in turn, promotes an increase in intracellular Ca^{2+} that subsequently activates Ca^{2+} dependant Cl^- channels ($I_{Cl,Ca}$). Although the details of these events as well as some of the physiological consequences that this response elicits are known, the molecular identity of the main elements activated by this response, such as the P2Yreceptor and the channels that take part in generating the F_{Cl} response, are still unknown. Progress in understanding the physiological role of these responses will require identification of the activated elements, which was a main objective of this thesis. Modern technologies were used, such as gene silencing through the internalization of antisense oligonucleotides sequences, and a study to identify the pharmacological profile of the F_{Cl} channels. As a first step, a technique for in vivo electroporation of antisense oligonucleotides was standardized using the *Xenopus* follicle; once the efficiency of this methodology was demonstrated, we proceeded to silence the P2Y₄-type receptor from *Xenopus*, a subtype that has been implicated in the generation of the F_{Cl} current. Our data suggest that the P2Y₄ receptor is, indeed, involved in generating the F_{Cl} response; however, it seems that this is not the only endogen receptor involved. In addition, the pharmacological profile of the channels activated during operation of the F_{Cl} was established. The data show that these channels are blocked by various drugs with the following potency: Niflumic Acid > DIDS > DPC > A9C, which is quite similar to the profile of the channels expressed in the membrane of the oocyte and some other cell types, as well as to the profile of channels belonging to the TMEM16A protein.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (becaria No: 366315), así como a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (cuenta No: 511450534) por el apoyo económico otorgado durante la realización de este proyecto.

A mi tutor, el Dr. Rogelio Arellano Ostoa, por sus conocimientos y por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo en el laboratorio D-13 del Instituto de Neurobiología contribuyendo en mi formación científica y personal.

A la Doctora Refugio García Villegas por su acompañamiento, dirección, críticas, sugerencias, disposición, apoyo, consejos y aprecio no sólo en la primera etapa de este proyecto sino durante todo este tiempo.

Al Dr. Mauricio Díaz Muñoz y al Dr. Lenin David Ochoa de la Paz miembros del comité tutorial, por los valiosos aportes que hicieron de manera objetiva y crítica al presente proyecto y su enorme disposición de escucharme y orientarme en todo este proceso.

A los Doctores Refugio García, Juan Pablo Reyes, Mauricio Díaz y Gerardo Rojas Piloni por ser parte de mi comité jurado y tomarse el tiempo de leer mi trabajo y aportar críticas constructivas.

A la Dra. Edith Garay y al Doctor Francisco Vázquez por su apoyo en aspectos técnicos y su apoyo personal; a la Doctora Cristina Medina por su asesoría y dirección con el análisis estadístico; a la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos, por su ayuda con las imágenes de microscopía confocal; a la bióloga Lorena López por su ayuda con cortes y tinciones; a la M. en C. Leonor Casanova Rico, por su ayuda con todos los trámites administrativos; al Sr. Horacio Benjamín Ramírez Leyva, auxiliar de laboratorio por toda su ayuda; al doctor Jorge Parodi por todos sus aportes en el análisis de datos; a mis compañeros del laboratorio D-13, especialmente a Leticia Robles y Ricardo Cruz por toda la ayuda técnica, consejos y amistad durante toda esta etapa; a mi compañera Dámaris Rangel por darme cobijo en noches de trabajo; a Jorge, por sus conocimientos, consejos, cariño y tiempo; a mis amigas cercanas Maga, Areli, Selene, Yutsil y a los amigos que se encuentran lejos, Mónica, María del Pilar, Angélica, Swanni, Marce y Jairo por quererme, apoyarme y levantarme al caer; y a todos aquellos amigos que en algún momento fueron parte importante para este peldaño en mi carrera.

DEDICATORIAS

A ese ser supremo que está llenando mi vida con amor y felicidad para vivir en plenitud en todo momento.

A mi padre y amorosa madre por las enseñanzas, el cariño, los esfuerzos y desvelos para convertirme en la mujer que soy. Gracias por creer en mí, motivándome a seguir adelante sin importar las adversidades o la distancia.

A mis hermanos, Dianita, Olga y Miguel por acompañarme en este camino de la vida y mostrarme que todo cambia menos los lazos que nos unen y el cariño que como hermanos nos tenemos.

A Dulcina, Luis, Billo y Oc por convertirse en mi familia aquí en México. Gracias por darme cariño y apoyo incondicional desde que los conocí. Sin su ayuda esta etapa de mi vida hubiera sido más difícil.

Al doctor Carlos Germán Barraza por ser un profesional excelente e intachable y más importante aún, por ser una persona maravillosa que me sacó de las sombras y me mostró la luz que hay en mí.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIAS	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1 El folículo ovárico de <i>Xenopus laevis</i> como modelo para el estudio de la comunicación celular.....	5
2.2 El folículo ovárico de <i>Xenopus laevis</i>	6
2.2.1 Células foliculares.....	8
2.3 Receptores purinérgicos.....	8
2.4 Canales de Cl ⁻	10
2.4.1 Canales de Cl ⁻ dependientes de Ca ²⁺ en <i>Xenopus laevis</i>	11
2.4.2 Proteínas de la familia TMEM16.....	12
2.5 Farmacología de los canales de Cl ⁻	13
2.6 Respuestas purinérgicas y su relación con canales de I _{Cl,Ca} en células foliculares de <i>Xenopus</i>	14
2.7 Receptores involucrados en las respuestas de células foliculares.....	15
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	20
6. MATERIAL Y MÉTODOS	21
6.1 Obtención de folículos.....	21
6.2 Técnicas de transfección.....	21
6.2.1 Técnica de transfección por lipofección.....	23
6.2.2 Técnica de transfección por electroporación <i>in vivo</i>	26
6.3 Técnica de control de voltaje con dos electrodos.....	28
6.4 Construcción de curvas dosis-respuesta con bloqueadores de canales de Cl ⁻	31

6.5	Análisis estadístico	31
7.	RESULTADOS	33
7.1	Estandarización del método de transfección por lipofección y electroporación y silenciamiento del receptor P2Y ₄	33
7.1.1	Transfección por lipofección.....	33
7.1.2	Transfección por electroporación <i>in vivo</i>	35
7.1.2.1	Electroporación con un colorante fluorescente.....	36
7.1.2.2	Electroporación con EGTA y su efecto sobre F_{Cl}	38
7.1.2.3	Electroporación de oligonucleótidos antisentido para el receptor P2Y ₄ y su efecto sobre F_{Cl}	41
7.2	Efecto de bloqueadores de canales de Cl ⁻ sobre la respuesta F_{Cl}	45
8.	DISCUSIÓN	52
8.1	Transfección por electroporación <i>in vivo</i> y silenciamiento del receptor P2Y ₄	53
8.2	Curvas dosis-respuesta con bloqueadores de canales de Cl ⁻	57
9.	CONCLUSIONES.....	61
10.	REFERENCIAS.....	62
	ÍNDICE DE FIGURAS.....	72
	ÍNDICE DE TABLAS.....	73
	LISTA DE ABREVIATURAS.....	74

1. INTRODUCCIÓN

El folículo ovárico (*i.e.*, el ovocito en comunicación con sus células foliculares) de *Xenopus laevis* ha sido utilizado por varias décadas como modelo de dos campos muy relevantes de la biología como lo son, la biología del desarrollo y la biología celular. Estos campos a su vez circunscriben diversos fenómenos fisiológicos como la ovogénesis, la división celular, el transporte membranal, la comunicación celular y la dinámica intracelular de señalización de algunos mensajeros como el Ca^{2+} (Dargan *et al.* 2006). La comunicación celular ha cobrado gran importancia en este modelo, debido a que en el folículo son expresados distintos sistemas de comunicación inter- e intracelulares. El descubrimiento original de receptores colinérgicos y catecolaminérgicos en los ovocitos y folículos de *Xenopus* por el grupo del Profesor Ricardo Miledi en 1977, llevó a la descripción tanto de la expresión funcional de diversas moléculas receptoras, como también a la caracterización de las principales respuestas eléctricas endógenas en el sistema (Kusano *et al.*, 1977, Kusano *et al.*, 1982). Estas investigaciones seminales, ofrecieron valiosa información que permitió la utilización de los ovocitos y los folículos como modelo celular para el estudio de moléculas receptoras tanto endógenas, como aquellas expresadas exógenamente, y de sus mecanismos de señalización intracelulares, ocupando desde entonces un papel central en esta área.

Entre los sistemas de comunicación expresados en *X. laevis* que conllevan señalización intercelular, se encuentra el sistema purinérgico al que se le confieren papeles fisiológicos importantes puesto que su presencia no es exclusiva de un solo tipo celular ni de una clase (taxonómicamente hablando) de seres vivos en particular (Burnstock & Verkhrastky, 2009). Además, es un sistema de comunicación versátil que otorga especificidad a través de la expresión de moléculas receptoras pertenecientes a las superfamilias de receptores–canal (P2X) y de receptores acoplados a proteínas G (P2Y). Su estudio es de interés por ejemplo, en la fisiología celular del ovario porque los diferentes tipos de células somáticas que lo conforman expresan una diversidad de receptores tanto al ATP como a la adenosina que son las moléculas transmisoras principales en este sistema (Lotan *et al.*, 1982, Van Renterghem *et al.*, 1985, Arellano *et al.*, 1996, 1998). Antes de de conocerse el

sistema purinérgico ya se sabía que estas purinas participaban en diversos tejidos regulando fenómenos como la agregación plaquetaria (Born, 1962), dolor, neurotransmisión en el sistema nervioso central y periférico, inflamación y modulación de la actividad cardíaca.

En el folículo ovárico de *X. laevis* ha sido demostrado que estos agonistas purinérgicos, provocan respuestas eléctricas de diferentes tipos, activando e inhibiendo canales iónicos, cuyo papel ha sido identificado en la maduración meiótica del ovocito de esta especie. Los receptores purinérgicos fueron identificados por primera vez después de estos hallazgos por Lotan *et al.* (1986), quienes reportaron que los ovocitos de *X. laevis* responden a sustancias como adenosina y ATP. Sin embargo, no es hasta 1993 cuando se comenzaron a distinguir la diversidad en identidad, localización y funciones de los receptores purinérgicos tanto en el ovocito, como en las células foliculares (Arellano & Miledi, 1993; Arellano *et al.* 1996, 1998). Además, en los últimos años, los estudios realizados en nuestro laboratorio han determinado nuevos aspectos de gran importancia en el sistema purinérgico intrafolicular, tanto en *Xenopus* como en mamíferos (Arellano *et al.*, 2002, 2009, 2012). De manera reciente se ha obtenido evidencia de que el sistema purinérgico se encuentra expresado en los folículos ováricos de mamíferos, en donde estimula receptores específicos que generan corrientes eléctricas en sus membranas, semejantes a las descritas en el folículo y ovocito de rana, así como la acción de sus cascadas intracelulares que al ser activadas promueven fenómenos de importancia en la fisiología del folículo ovárico tales como la proliferación celular y la muerte programada (Arellano *et al.*, 2002; Vázquez-Cuevas *et al.*, 2006, 2010).

Respecto al folículo de *X. laevis* quedó demostrado que una de las fuentes principales de ATP intrafolicular, es el mismo ovocito, ya que este libera ATP tanto en forma basal como estimulada. De esta manera, el ovocito afecta de manera continua las propiedades eléctricas de las células foliculares que lo rodean y las células foliculares a su vez expresan los elementos moleculares de respuesta al ATP (Saldaña *et al.*, 2009). Dentro de esta maquinaria molecular se encuentran tanto los receptores purinérgicos como también las moléculas efectoras, tales como los canales de K^+ y los de Cl^- que son operados por cascadas de señalización activadas

por la estimulación de estos receptores (Arellano *et al.*, 1998; Arellano *et al.*, 2009). Se ha visto que los canales iónicos de Cl^- presentes en el folículo de *X. laevis* participan en la generación de dos respuestas generadas por su apertura. Una de estas respuestas es una corriente rápida de Cl^- llamada respuesta o corriente F_{Cl} . La segunda respuesta llamada corriente entrante dependiente de Ca^{2+} (I_{w}) está ligada a la F_{Cl} , y se origina por un influjo sostenido de Ca^{2+} . La activación de estas corrientes es independiente de un aumento de Ca^{2+} intracelular en el citoplasma del ovocito (Arellano & Miledi, 1993; Arellano *et al.*, 1996; Arellano *et al.*, 1998), esta característica las distingue claramente de las originadas en la membrana del ovocito *per se*. Tanto F_{Cl} como I_{w} , dependen más bien de un aumento citoplasmático de la concentración de Ca^{2+} de las células foliculares (Arellano *et al.*, 2012). Por lo tanto, los canales de Cl^- que producen ambas respuestas, son canales de cloruro dependientes de calcio ($I_{\text{Cl,Ca}}$). La identidad molecular de los $I_{\text{Cl,Ca}}$ continúa en debate. Sin embargo, actualmente diversas clases de proteínas han sido propuestas como candidatos para la formación de estos canales. No fue sino hasta 2008, que tres grupos diferentes encontraron los genes que codifican para proteínas de la familia TMEM16 (también llamada Anoctamina o ANO por Yang *et al.*, 2008) que recapitula las propiedades de la mayoría de los canales $I_{\text{Cl,Ca}}$ endógenos, generando corrientes acarreadas por Cl^- con características semejantes a las descritas para los canales $I_{\text{Cl,Ca}}$ expresados en diferentes tejidos (Caputo *et al.*, 2008; Schroeder *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). Esto abre la posibilidad de que los canales $I_{\text{Cl,Ca}}$ de las células foliculares estén formados por proteínas tipo TMEM16A al igual que en el ovocito.

El presente trabajo tuvo como objetivo fundamental identificar farmacológicamente y/o molecularmente dos de los principales elementos involucrados en la respuesta F_{Cl} generada por estimulación del folículo con ATP. La respuesta F_{Cl} es generada por la estimulación de receptores tipo P2Y presentes en las células foliculares (Arellano *et al.* 2012). Estos receptores se encuentran acoplados a la actividad de la fosfolipasa C (PLC) que una vez estimulada aumenta la síntesis de IP_3 en estas células; y este último como segundo mensajero promueve la liberación de Ca^{2+} intracelular desde reservorios intracelulares, aumentando sus niveles para finalmente generar la apertura de los canales $I_{\text{Cl,Ca}}$. Es importante hacer mención que los canales

$I_{Cl,Ca}$ de las células foliculares son diferentes, al menos en su sitio de expresión a los canales $I_{Cl,Ca}$ expresados en la membrana del ovocito *per se* (Arellano *et al.* 2012). Hasta ahora no han sido reportadas diferencias en las propiedades biofísicas o farmacológicas entre estos dos tipos de canales, por lo que uno de los objetivos particulares de este trabajo fue definir la identidad desde el punto de vista farmacológico de los canales en las células foliculares y compararla con la de los presentes en el ovocito. Por otro lado, otro objetivo particular fue el silenciamiento de genes mediante la internalización de secuencias antisentido de ADN utilizando técnicas modernas como la transfección por electroporación. Estandarizar este método en el modelo de *X. laevis*, resultó útil para conocer el receptor de tipo P2Y que está participando en la generación de la respuesta F_{Cl} .

2. ANTECEDENTES

2.1 El folículo de *Xenopus laevis* como modelo para el estudio de la comunicación celular

El modelo del folículo ovárico de *X. laevis* ha sido empleado durante varias décadas por su utilidad en el estudio de diferentes fenómenos de comunicación inter e intra celular a diferentes niveles caracterizándose vías de señalización, moléculas, y respuestas eléctricas, que han permitido dilucidar una amplia variedad de receptores y otras moléculas que se expresan en el folículo, pero que no son de ninguna manera exclusivos de este complejo celular y que por el contrario deja abierta la posibilidad de estudio de moléculas similares de otros tipos celulares dentro de su maquinaria. En este modelo por ejemplo, fueron descritos por primera vez los canales CACCs o $I_{Cl,Ca}$ (Miledi 1982), que a la postre se ha observado están involucrados en procesos fisiológicos de una gran cantidad de tipos celulares y cuya alteración podría estar involucrada en fenómenos patológicos (Papassotiriou *et al.*, 2001; Ousingsawat *et al.*, 2009) como fibrosis quística causada por la alteración en la expresión de estos canales. También este modelo ha sido fundamental en el estudio de las cascadas de señalización mediadas por IP_3 , y particularmente de los mecanismos de liberación de Ca^{2+} a través de esta molécula desde los reservorios intracelulares (Diambra & Marchant, 2009; Taylor *et al.*, 2009). De manera más reciente, ha sido descubierto un fenómeno de interacción funcional entre receptores de las células foliculares que sugiere que la regulación de sus respuestas ocurre a través de la heteromerización de sus elementos moleculares (Arellano *et al.*, 2009). El fenómeno de heteromerización de receptores acoplados a proteínas G es un campo de frontera que está cambiando rápidamente nuestra visión de la farmacología de estas moléculas (Angers *et al.*, 2002; Yoshioka *et al.*, 2002) y tendrá, sin duda, amplias repercusiones en la fisiología celular. Así mismo, la expresión heteróloga en el ovocito ha sido ampliamente utilizada para estudiar la estructura y la función de la gran diversidad de elementos involucrados en la comunicación celular tales como canales iónicos, bombas, transportadores y

receptores (Woodward & Miledi, 1987; revisiones de Maller, 1986-1987; Maller *et al.*, 1989; Maller, 1990; Maller, 1993; Berridge *et al.*, 1988; Arellano *et al.*, 1996; Dargan *et al.*, 2006; Whitaker, 2006). Como un prerrequisito para su utilización como modelo es imperativo el reconocimiento de sus propiedades endógenas. La falta de información respecto a esto ha provocado no en pocas ocasiones análisis equívocos en la literatura, causando ambigüedad y conclusiones erróneas, por lo que el continuar con el estudio de las propiedades básicas del modelo de *X. laevis*, no solo es de importancia para el análisis de las funciones fundamentales del ovario en vertebrados, sino que también ayuda a mejorar su uso como modelo de expresión exógena. Antes de explicar con detalle los componentes que se estudiaron en este trabajo haré una breve descripción morfológica del modelo, para posteriormente hacer énfasis en los elementos de las respuestas purinérgicas y la consecuente activación de canales de Cl⁻ activados por mecanismos que subyacen a la activación del sistema purinérgico.

2.2 El folículo ovárico de *Xenopus laevis*

El folículo ovárico de *X. laevis* presenta múltiples ventajas como modelo celular por sus características morfológicas y anatómicas, entre las que se encuentran su relativa facilidad y economía de mantenimiento en cultivo, facilidad en la implementación de manipulaciones experimentales debido a su gran tamaño que es de alrededor de 1.2 a 1.4 mm de diámetro, y su número por donador que puede ser de miles en cualquier época del año. Todo esto permite su utilización en una gran cantidad de técnicas fundamentales y modernas que van desde la electrofisiología y morfología, hasta diversas técnicas bioquímicas y de biología molecular.

El folículo de *X. laevis* pasa por seis estadios de desarrollo claramente identificados (Dumont, 1972). Cada folículo está conformado por capas tanto celulares como acelulares (ver figura 1) que rodean al ovocito. Observando el folículo desde su capa más externa a la más interna, este se conforma de la siguiente manera: La capa del epitelio interno ovárico, que está conformada por células escamosas regulares que se prolongan mediante microvellosidades que

hacen contacto con sus células vecinas. Bajo esta capa se encuentra la capa de la teca, conformada por células de aspecto fibroblástico, vasos y células sanguíneas. La capa subyacente está compuesta por fibras de colágeno que se entrecruzan y conforman la lámina basal de la capa de células foliculares. Estas células planas forman una monocapa con extensas macrovellosidades que se extiende a través de poros formados en la envoltura vitelina, considerada una segunda capa acelular del folículo.

Las macrovellosidades de las células foliculares hacen contacto con la membrana del ovocito en diversos puntos y para ello la membrana del ovocito proyecta hacia la monocapa de células foliculares, una red también muy extensa de microvellosidades. En esta red, existen puntos de contacto en los que han sido descritas regiones de comunicación especializada llamadas uniones comunicantes o “gap junctions” que permiten un robusto acoplamiento metabólico y eléctrico entre los dos tipos celulares. (Dumont, 1978; Patiño, 1993; Mónaco *et al.*, 2007).

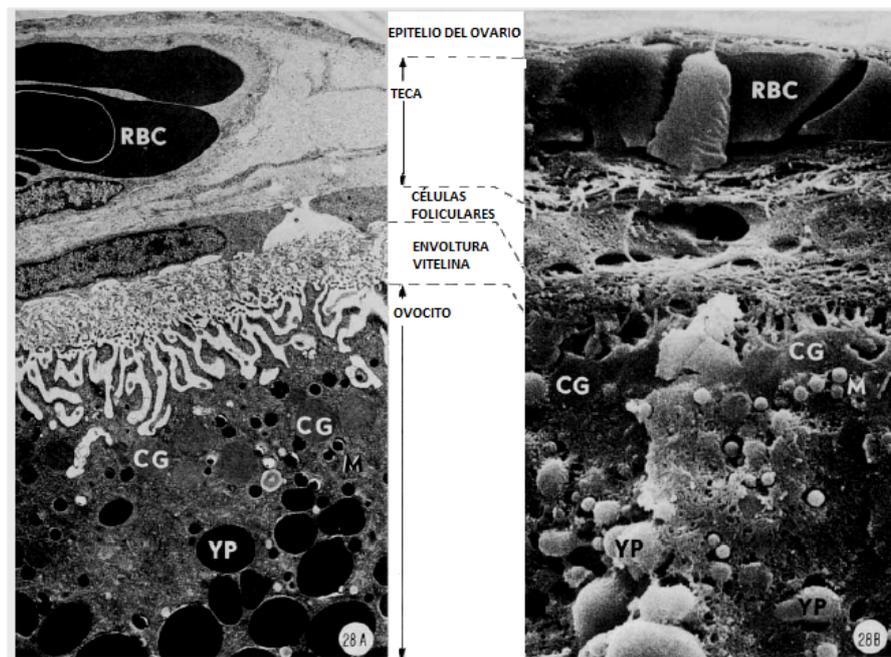


Figura 1. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (A) y de barrido (B) del folículo ovárico de *Xenopus laevis*. Se muestra la arquitectura del folículo (estado IV) compuesto por distintas capas celulares y acelulares. (RBC, eritrocitos; CG, gránulo cortical; M, gránulo de pigmento; YP, gránulo de yema). (Modificado de Dumont, 1978).

2.2.1 Células foliculares

Las células foliculares de la rana son homólogas a lo que en mamíferos se conoce como las células del cumulus, un subgrupo de células de la granulosa que tienen un estrecho contacto con el ovocito y mantienen comunicación vía “gap junctions” con el gameto. Las foliculares son células planas y estrelladas cuyo origen al parecer es de células fibroblásticas provenientes de la teca. Entre estas células existen dos tipos de contacto, uno dado por desmosomas y el otro por uniones comunicantes o “gap junctions”. Las células foliculares como se mencionó en el apartado anterior tienen comunicación eléctrica con el ovocito mediante uniones comunicantes formadas por las macro y microvellosidades. Las funciones esenciales de las células foliculares son múltiples entre las que se destacan, aportar al ovocito nutrientes y factores necesarios para su desarrollo (entre estos las hormonas esteroideas). En este sentido, las células foliculares expresan varios receptores como β -adrenérgicos (Kusano *et al.*, 1982), muscarínicos (Arellano & Miledi 1993; Arellano *et al.*, 1996; Arellano *et al.*, 1999), hormonas como la foliculo estimulante y la luteinizante, y purinérgicos tanto para la adenosina (Stinnakre, 1986) como para el ATP (Arellano *et al.*, 1996, 1998). Más adelante se brindará un panorama detallado de las respuestas que son acarreadas en las células foliculares así como sus elementos moleculares.

2.3 Receptores purinérgicos

Desde la primera mitad del siglo XX, la adenosina y el ATP fueron reconocidas como moléculas señalizadoras extracelulares que actuaban sobre receptores específicos. Estos receptores, llamados posteriormente, receptores purinérgicos, responden principalmente a la adenosina o al ATP y están distribuidos en una diversidad amplia de tejidos. La primera evidencia de receptores que respondían a adenosina data de 1929 y fue reportada por Drury & Szent-Gyorgyi (1929). En este estudio, se reportó que extractos del cerebro, el músculo, el bazo o el riñón, contenían una sustancia que fue aislada y luego caracterizada como adenosina. La

adenosina además, tenía un efecto sobre el corazón de mamífero, por ejemplo, causando disminución en su tasa de latidos, imposibilidad en los movimientos sistólicos y diastólicos y la aparición de fibrilación auricular.

Posteriormente, a raíz de un extenso trabajo pionero, Geoffrey Burnstock propuso dos tipos de receptores de acuerdo al ligando con el que se asocian, aquellos que son sensibles a la adenosina fueron llamados receptores P1, mientras que a los sensibles a ATP se les llamó receptores P2 (Burnstock, 1978). Algunos de los receptores P2 son sensibles a las purinas y a las pirimidinas como el UTP o el UDP (Ralevic & Burnstock, 1998; Burnstock, 2007). Los receptores P2 se clasifican actualmente en dos subtipos, el primero constituye los llamados receptores P2X, los cuales son receptores canal dependientes de ligando. En cambio, los receptores P2Y son moléculas acopladas a proteínas G que presentan la clásica configuración de 7 dominios transmembranales y son conocidos como GPCR. En mamíferos hasta la fecha, se han descrito 7 receptores del tipo P2X: P2X₁ al P2X₇ (Supernant & North, 2009). Mientras que para los receptores P2Y se han descrito 8 subtipos: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄ (Burnstock & Knight, 2004). También se han descrito otros tipos de receptores P2Y en diferentes especies de animales tales como el pavo (tp2Y), el pollo (P2Y₃) y en la rana (P2Y₈) (Bogdanov *et al.* 1997, 1998). Evolutivamente, el sistema de receptores purinérgicos es uno de los primeros en aparecer y se ha mantenido a lo largo de la escala filogenética desde bacterias, protozoarios, algas y hongos hasta los diferentes grupos de plantas y vertebrados (Schultz *et al.*, 2003 Burnstock, 2009). El sistema purinérgico en los distintos grupos de animales presenta una diversificación e importancia fundamental en procesos vitales tales como: el desarrollo, la neurotransmisión, la proliferación y sobrevivencia celulares, entre muchos otros (Burnstock 2007; Abracchio *et al.*, 2009), esto es a través de acciones específicas como son por ejemplo, la contracción del músculo liso (Burnstock, 1972), la modulación de la respuesta inflamatoria (Hu *et al.*, 1998), la transducción de señales en los sentidos de la vista, el olfato, el gusto y el oído (Housley *et al.*, 2009), y la secreción en células secretoras de epitelios (*e.g.* la vía respiratoria) (Dong *et al.*, 2006; Christofi, 2008) entre otras.

2.4 Canales de Cl⁻

El Cl⁻ como el anión más abundante en las células, juega un papel muy importante en la fisiología de las mismas. Su movimiento es regulado principalmente por canales de Cl⁻. Existen cuatro grandes categorías de canales de Cl⁻ donde en tres de ellas la caracterización a nivel molecular ha sido posible a nivel de proteína y de su participación en algunas enfermedades. Estas categorías son: 1) canales de Cl⁻ dependientes de ligando; 2) canales de Cl⁻ activados por voltaje; 3) canales de Cl⁻ regulados por AMPc y 4) Canales de Cl⁻ activados por calcio (Jentsch *et al.*, 2002). La identidad molecular de ésta última categoría ha sido difícil de discernir a pesar de muchos estudios en décadas recientes y de que las corrientes generadas por dichos canales se conocen desde los años 80. Los canales de Cl⁻ dependientes de Ca²⁺ ($I_{Cl,Ca}$) al parecer tienen un origen temprano en la evolución y se han conservado a lo largo de la escala filogenética incluyendo organismos del reino vegetal (Berecki *et al.*, 1999). En los años 80, fueron realizados estudios de corrientes de Cl⁻ activadas por Ca²⁺ en diferentes modelos incluyendo: huevos de *Rana pipiens* (Cross 1981), fotorreceptores de retina de salamandra (Bader *et al.*, 1982) y ovocitos de *Xenopus laevis* donde se ha caracterizado esta corriente (Miledi 1982; Miledi & Parker 1984). Posteriormente a estos estudios, estas corrientes fueron encontradas en diversos tejidos sugiriendo su diversidad de funciones en la fisiología de los organismos (Maricq & Korenbrot, 1988; Kleene & Gesteland, 1991).

Actualmente se sabe que su expresión está ampliamente distribuida en una gran cantidad de tejidos y que están involucrados en una diversidad de funciones tales como la amplificación de la transducción de la olfacción, la fototransducción, la regulación de las propiedades neuronales, la excitabilidad cardiaca, la contracción del músculo liso y la función endotelial (Burnstock, 1972; Hartzell *et al.* 2005; Housley *et al.*, 2009). Funcionalmente estos canales se activan y permiten el paso de Cl⁻ a través de la membrana celular y de esta manera regulan el potencial de membrana de la célula, que por lo general conlleva a una despolarización de la misma (Hartzell *et al.* 2005) aunque en algunos casos también se puede dar una hiperpolarización (Duran *et al.* 2010). Tres factores están determinando el flujo de Cl⁻ a través de estos canales: 1) el potencial de membrana, 2) el gradiente de concentración del Cl⁻ y 3) la concentración de calcio intracelular. A pesar de su

importancia y de más de 30 años de estudio sobre estos canales, su identidad molecular todavía se mantiene en debate, debido a varias razones. Entre las razones más importantes se encuentra la dificultad en la identificación de las clonas expresadas heterológicamente en el modelo de *Xenopus laevis* para caracterizar los canales $I_{Cl,Ca}$ ya que este modelo posee alta expresión endógena de dichos canales.

Pese a esta dificultad, las propiedades de los canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} en los diversos tejidos, se pueden resumir como sigue:

- Son activados por Ca^{2+} intracelular con concentraciones medias en el rango submicromolar (en el orden de nanomolar) pero sus valores exactos varían dependiendo del tipo celular.
- Presentan rectificación saliente en presencia de bajas concentraciones de calcio intracelular pero presentan una relación lineal corriente-voltaje a concentraciones más altas (> 200 nM) de Ca^{2+} y,
- Preferencialmente permean aniones de mayor tamaño siendo su selectividad como sigue: $NO_3^- > I^- > Br^- > Cl^- > F^-$ (Large & Wang, 1996; Qu & Hartzell, 2000).

2.4.1 Canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} en *Xenopus laevis*

Los canales $I_{Cl,Ca}$ generan corrientes entrantes en el sistema folicular de *Xenopus laevis* donde son las que predominan. En este modelo, los canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} presentes, tienen características particulares entre las que se encuentran su activación directa por Ca^{2+} , afinidad por el Ca^{2+} voltaje-dependiente desde valores nanomolares, sensibilidad a la cinética de Ca^{2+} y una aparente dependencia de voltaje a bajas concentraciones de calcio, con selectividad a aniones en el siguiente orden: $I^- > Br^- > Cl^- > F^-$ y alta permeabilidad a pseudohálidos, entre otras características. Ha sido propuesto que una de las funciones de estos canales es evitar la polispermia durante la fertilización del óvulo (Webb & Nuccitelli, 1985).

2.4.2 Proteínas de la familia TMEM16

Muchas familias de proteínas se han propuesto que podrían ser las responsables de la formación de los canales de $I_{Cl,Ca}$. Entre estas se destaca la familia de canales CIC-3 que son canales activados por CAMKII, la familia de ClCa, la familia de las bestrofinas y los canales tipo *tweety* (Hartzell *et al.*, 2005). Recientemente se ha mostrado que la familia de proteínas TMEM16 podría ser la mejor candidata para cumplir funciones de canales $I_{Cl,Ca}$ (Yang *et al.* 2008; Caputo *et al.* 2008; Schroeder *et al.* 2008). Se ha descrito un papel relevante de esta familia de proteínas en campos como la biología del desarrollo y el estudio de enfermedades como el cáncer, lo que resulta atractivo para avanzar en la comprensión de dichos fenómenos. Las proteínas de esta familia se componen de 8 dominios transmembranales putativos y tiene un asa tipo P entre los dominios 5 y 6. Su papel principal es el transporte de aniones en diferentes tejidos como en el epitelio de las vías respiratorias por ejemplo. Esta proteína está ampliamente distribuida tanto en tejidos de ratón como de humano y es de vital importancia en células epiteliales. Aún se está dilucidando su papel fisiológico. Actualmente se ha descrito que en varios tipos celulares los canales $I_{Cl,Ca}$ están conformados por proteínas de la familia TMEM16 de los que se han reconocido hasta ahora 10 subtipos (Manoury *et al.*, 2010). No se sabe sin embargo, si esta familia de proteínas, forman los canales $I_{Cl,Ca}$ descritos en todos los tipos celulares, o por el contrario, existen diferentes proteínas con la misma función, ya que se han postulado al menos otros dos tipos de proteínas que podrían tener características semejantes llamadas bestrofinas y los canales ClCa (Sun *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 2003; Cunningham *et al.*, 1995). Estudios a partir de 2008 han postulado a la proteína ANO1, o también conocida como TMEM16A, como candidata para conformar los canales $I_{Cl,Ca}$ (Yang *et al.*, Caputo *et al.*, 2008). Aunque estos estudios muestran que TMEM16A recapitula las propiedades biofísicas de estos canales en varios tipos celulares, existen algunas discrepancias farmacológicas respecto a los canales nativos en distintos tipos celulares. Una posible explicación a esta discrepancia es que la proteína que forma los canales $I_{Cl,Ca}$ tenga subunidades que se expresen de manera diferencial en los diversos tejidos.

Para conocer más acerca de la naturaleza y función de estos canales se requiere de estudios dirigidos a conocer sus características fundamentales, principalmente sus características farmacológicas y biofísicas, así como la naturaleza de la proteína que los componen. Como un primer acercamiento a este problema nos propusimos realizar una caracterización farmacológica de los canales activados para generar F_{Cl} y compararla con canales expresados en otros tipos celulares y determinar si tiene semejanza en este nivel con aquellos que han sido asociados con la expresión de TMEM16, y principalmente con aquellos que son expresados en la membrana del ovocito (Kajta, *et al.*, 2010). La información sobre la farmacología también nos aportará conocimiento que podría ayudar a distinguir la activación de los canales en uno u otro compartimento (*i.e.*, células foliculares y ovocito) y realizar con esta herramienta estudios encaminados a conocer sus papeles funcionales.

2.5 Farmacología de los canales de Cl^-

A pesar de la gran importancia fisiológica que poseen estos canales, se conoce poco de ellos a nivel molecular, biofísico y farmacológico. La farmacología de los canales $I_{Cl,Ca}$ no es específica y poseen efectos secundarios sobre otro tipo de canales. Por ejemplo, el ácido niflúmico (Ac. Nif.) y el ácido 4, 4'-diisotiocianatostilben 2, 2'- disulfónico (DIDS) bloquean además canales aniónicos regulados por volumen (VRAC) en algunos tipos celulares (Xu *et al.*, 1997); el ácido niflúmico y el 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)-benzoato (NPPB) tienen efecto sobre canales que acarrearán corrientes de potasio (Wang *et al.*, 1997). Con estos inconvenientes no se tienen bloqueadores con buena potencia o selectividad. No obstante, los bloqueadores más utilizados para este fin han sido: 1) el ácido niflúmico (White *et al.*, 1990), 2) el ácido 4, 4'-diisotiocianatostilben 2, 2'- disulfónico (DIDS, 3) el ácido 2-(anilino) benzoico (DPC), 4) el ácido 9-antracencarboxílico (A9C) (Q & Hartzell, 2001) y, 5) el 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)-benzoato (NPPB) (Wu & Hamill, 1992). Recientemente se han modificado compuestos derivados del

ácido antranílico, cuya acción antagónica se ha potenciado requiriendo menores concentraciones para provocar un bloqueo total (Oh *et al.*, 2008).

2.6 Respuestas purinérgicas y su relación con canales $I_{Cl,Ca}$ en células foliculares de *Xenopus*

Como se mencionó anteriormente, las respuestas purinérgicas foliculares fueron estudiadas inicialmente para la adenosina por Lotan y colaboradores (1982) y para ATP unos años después (1986). En estos primeros reportes, sin embargo, las respuestas fueron descritas erróneamente como respuestas con origen en la membrana del ovocito, y fueron de hecho catalogadas por sus características, como iguales a las respuestas provocadas por agentes colinérgicos; que habían sido descritas unos años antes por el grupo de Miledi y colaboradores (Kusano *et al.*, 1977; Kusano *et al.*, 1982). En estudios posteriores, fue demostrado sin ambigüedades que todas las respuestas purinérgicas, así como varias de las respuestas colinérgicas, tienen su origen en las células foliculares y que éstas son transmitidas al ovocito a través de la comunicación eléctrica mediada por las uniones comunicantes. Estos trabajos establecieron que las respuestas purinérgicas con origen en las células foliculares son de cuatro tipos principalmente: 1) Apertura de canales de Cl^- por ATP, entre éstas se incluyen dos principales respuestas, las rápidas o corrientes F_{Cl} , y las lentas o corrientes S_{Cl} (Arellano & Miledi, 1993; Arellano *et al.*, 1996, 1998), 2) La apertura de canales $I_{K,CAMP}$ tanto por receptores sensibles a la adenosina como al ATP (Saldaña *et al.*, 2005; Arellano *et al.*, 2009), 3) La inhibición de canales $I_{K,CAMP}$ por ATP (Arellano *et al.*, 1996; Fujita *et al.*, 2001) y, 4) La activación por ATP de canales permeables a Ca^{2+} , que permiten el influjo de este ión a través de vías dependientes del vaciado de los reservorios intracelulares (probablemente pertenecientes a canales tipo SOC, *store operated calcium channels*) (Arellano *et al.*, 2012).

En el presente trabajo nos enfocamos en los elementos que están involucrados en las respuestas F_{Cl} . Este tipo de respuesta fue primero caracterizada por su

estimulación con acetilcolina (Arellano *et al.*, 1993). Esta respuesta se distingue por tener un curso temporal rápido de activación e inactivación (5-10 s) comparada con otras respuestas que se generan en las mismas células foliculares, y también con respuestas de origen en el ovocito, las cuales tienen un curso más lento y en el caso de éstas últimas son de carácter oscilatorio. La respuesta F_{Cl} , depende de la activación de la enzima PLC por el receptor a ATP que es del tipo P2Y, ya que puede ser estimulado también por UTP (Arellano *et al.*, 1996, 1998). Como es de esperarse en este tipo de respuestas, la cascada de síntesis de IP_3 , aumenta los niveles de Ca^{2+} intracelular a través de su liberación desde reservorios, lo que promueve la apertura de los canales de Cl^- involucrados en la generación de la respuesta F_{Cl} ; una segunda respuesta provocada por la activación de esta cascada es la apertura de canales permeables a Ca^{2+} lo que permite un influjo de este ión al interior celular y la apertura de los mismos canales generando la respuesta I_{iw} (Arellano *et al.*, 2012).

Los canales $I_{Cl,Ca}$ responsables de la respuesta F_{Cl} se encuentran expresados en la membrana de las células foliculares y se distinguen claramente de los expresados en la membrana del ovocito, por el hecho de que el cargado de los folículos con agentes quelantes de Ca^{2+} como el BAPTA y el EGTA, cuando éste se realiza por inyección de las sustancias en el citoplasma del ovocito, inhibe de forma específica la generación de respuestas en el ovocito pero es incapaz de hacerlo sobre las respuestas de las células foliculares (*i.e.*, F_{Cl} , S_{Cl} , e I_{iw}). La activación de los canales $I_{Cl,Ca}$ por ATP, y por ende el aumento de Ca^{2+} intracelular, son por lo tanto respuestas restringidas al ámbito de las células foliculares, sin embargo, eléctricamente la respuesta es capaz de ser transmitida al ovocito a través de las uniones comunicantes.

2.7 Receptores involucrados en las respuestas de las células foliculares

Las respuestas F_{Cl} e I_{iw} , que dependen fundamentalmente de la apertura de los canales $I_{Cl,Ca}$ son activadas de manera específica por ATP y por acetilcolina. La

acetilcolina lo hace a través de receptores muscarínicos del tipo M1 (Arellano *et al.*, 1999); mientras que el receptor purinérgico tiene las características de un receptor de tipo P2Y sensible a UTP que puede ser de un receptor semejante a cualquiera de los subtipos llamados P2Y₂, P2Y₄ o P2Y₆ de mamíferos, o incluso podría tratarse de la acción combinada de ellos. Esta última posibilidad es plausible porque entre los agonistas con mayor potencia se encuentra el 2meS-ATP, y la secuencia de potencia de estos agonistas es 2meS-ATP>UTP>ATP>>UDP. Esta secuencia farmacológica no es típica de ninguno de los receptores sensibles a UTP. Por ejemplo, los receptores P2Y₂ y P2Y₄ son menos sensibles a 2meS-ATP, mientras que el P2Y₆ es más sensible a UDP. Existen otros receptores como el P2Y₁ y el P2Y₁₁ que son sensibles a derivados de 2meS pero estos son prácticamente insensibles a UTP. Por lo tanto, la farmacología de este receptor en las células foliculares de *X. laevis* es una que aparentemente no cumple con las características reportadas en los homólogos de mamífero o, de forma alternativa, se requiere de la expresión de más de un tipo de receptor para explicar sus efectos en las células foliculares (Romero-Rosales, 2006).

El receptor o receptores involucrados, además de activar las corrientes F_{Cl} e I_{iw} , tienen un tercer efecto sobre las propiedades eléctricas de las células foliculares. Su activación inhibe la apertura de canales de K⁺ dependientes de ATP la cual genera la corriente $I_{K,CAMP}$. La farmacología del receptor involucrado en ambos efectos es idéntica (Romero-Rosales, 2006) por lo que se ha sugerido que se trata de receptores P2Y del mismo tipo. La respuesta $I_{K,CAMP}$ es de gran interés en la fisiología folicular porque su activación acelera la cinética de maduración del ovocito, así como su eficiencia. Esta respuesta es activada por una gran cantidad de agonistas, entre los cuales los más importantes incluyen la hormona folículo estimulante, la noradrenalina, la dopamina, así como la adenosina y el propio ATP. Se sabe que el ATP es capaz también de activar los canales responsables de $I_{K,CAMP}$ y que lo hace a través de un receptor diferente al involucrado en la apertura de los canales $I_{Cl,Ca}$. Sin embargo, existen claras evidencias de que la formación de este receptor sensible al ATP que activa a $I_{K,CAMP}$ podría involucrar una interacción heteromérica funcional con el receptor a la adenosina, y es probable que el mismo receptor o receptores P2Y que se acoplan al sistema de PLC cuando actúan como monómeros, se acoplen en cambio al sistema de la adenilato ciclasa cuando se

encuentran formando heterómeros con receptores a la adenosina (Arellano *et al.*, 2009).

Dilucidar el papel que juegan diferentes receptores purinérgicos en la respuesta folicular requiere de experimentos que definan la naturaleza molecular de los participantes y la disección de los efectos que provoca la inhibición de cada uno. Lamentablemente la actual farmacología purinérgica está limitada y no es útil en problemas como el presentado en las células foliculares. Los datos recientes de nuestro laboratorio muestran que las células foliculares expresan el receptor P2Y₈ (ortólogo de P2Y₄ en mamíferos), el receptor P2Y₁, el P2Y₁₁ y el P2Y₆, aproximadamente en ese orden de abundancia. La farmacología del receptor folicular descrita arriba es más semejante a la presentada por el receptor P2Y₈, que llamaremos aquí P2Y₄, por la homología que presenta con el receptor de mamíferos (Bogdanov *et al.* 1997, 1998), por lo que hace suponer que este receptor podría tener un papel fundamental en la generación de las respuestas foliculares. Sin embargo, aún no es claro que sea el único receptor involucrado porque, a pesar de que tiene sensibilidad apreciable a 2meSATP el orden de los agonistas trifosfatados es inverso al observado en su forma nativa (*i.e.*, ATP>UTP>2meSATP). Una estrategia que ayudaría a resolver este intríngulis sería el poder silenciar específicamente la expresión de cada uno de los receptores cuyo ARNm se encuentra expresado en las células foliculares. Esta metodología no ha sido implementada antes en los folículos de *Xenopus*, teniendo como intención la inhibición específica de la expresión de moléculas nativas en las células foliculares, por lo que aquí planteamos como uno de los objetivos fundamentales la aplicación sistemática de tecnologías de transfección de moléculas nucleotídicas inhibidoras, especialmente ADN antisentido, al mismo tiempo que evaluamos electrofisiológicamente los probables efectos que estas moléculas antisentido tengan sobre las respuestas nativas estudiadas. Su implementación podría abrir la posibilidad de determinar con precisión no solo el papel de diferentes receptores purinérgicos, sino también de otros receptores de interés, así como de canales iónicos tales como los propios $I_{Cl,Ca}$ y los canales formadores de las uniones comunicantes.

3. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que durante la generación de la respuesta F_{Cl} por la activación de receptores purinérgicos participan canales $I_{Cl,Ca}$ y receptores del tipo P2Y. El estudio de las funciones de dicha respuesta en la fisiología del folículo, así como de la participación de las diferentes moléculas involucradas, requiere de un conocimiento puntual de sus propiedades farmacológicas y moleculares. Experimentos previos de nuestro laboratorio muestran que existe una expresión diferencial en los transcritos de los diferentes receptores P2Y particularmente en la expresión del receptor P2Y₄ que no está presente en el ovocito desnudo pero si en las células foliculares. También se tienen referentes farmacológicos de la inhibición de canales $I_{Cl,Ca}$ en los diferentes modelos celulares y que de manera clásica han sido utilizados (aunque estos no sean específicos ni muestren una potencia deseada), que nos permitieron comparar los canales presentes en las células foliculares y definir si desde la aproximación farmacológica podrían pertenecer también a la familia de las proteínas TMEM16.

Aquí se propuso entonces por una parte el estudio de los canales $I_{Cl,Ca}$ mediante metodologías farmacológicas para definir su semejanza a proteínas previamente relacionadas con canales $I_{Cl,Ca}$ en otras especies (e.g., TMEM16A). Mientras que para el estudio sobre la participación de los receptores P2Y, implementamos y utilizamos metodologías moleculares que permitieron inhibir específicamente los receptores tipo P2Y₄ en las células foliculares ováricas de *X. laevis*.

4. HIPÓTESIS

En la generación de la respuesta F_{Cl} está involucrada la activación de receptores purinérgicos tipo P2Y₄.

La activación de canales $I_{Cl,Ca}$ será sensible a diferentes bloqueadores con la siguiente secuencia de potencia ácido niflúmico >A9C >DIDS >DPC.

5. OBJETIVOS

- 1.- Estandarizar la técnica de transfección por electroporación *in vivo* en folículos de *Xenopus laevis*.
- 2.- Inhibir selectivamente la expresión de receptores P2Y₄ en folículos, utilizando metodologías de transfección de oligonucleótidos antisentido.
- 3.- Evaluar electrofisiológicamente el efecto de la inhibición del receptor P2Y₄ sobre la generación de la respuesta F_{Cl} .
- 4.- Caracterizar el efecto de bloqueadores de canales de Cl⁻ sobre la respuesta F_{Cl} dependiente de la activación de canales $I_{Cl,Ca}$.
- 5.- Comparar la potencia de estos fármacos con la reportada para otros canales $I_{Cl,Ca}$ y los expresados por la proteína TMEM16A.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención de folículos

Los folículos fueron disecados de los sacos ováricos de ranas *Xenopus laevis* que fueron obtenidas de Xenopus I (Ann Arbor, MI). Las ranas fueron anestesiadas por hipotermia y luego sometidas a cirugía en donde fue realizada una incisión abdominal para tener acceso a dicha cavidad. En la región donde se localizan los ovarios, fueron entonces disecados de 2 a 4 lóbulos ováricos. Una vez extraídos los lóbulos fueron colocados en una caja de Petri conteniendo solución de Barth modificada (la cual contiene 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 (SFB), y ajustada a pH 7.4 con NaOH). Finalmente, la rana fue suturada y devuelta a un estanque donde su recuperación fue monitoreada por un período de dos semanas.

Con la ayuda de un microscopio estereoscópico y pinzas finas, fueron disecados manualmente del lóbulo ovárico folículos en el estadio VI (Dumont 1972), a los cuales les fue removido el epitelio y la teca, esta preparación es nombrada folículos e.t.r. (por sus siglas en inglés). En esta preparación, las células foliculares conservan su membrana basal lo que es de gran importancia para mantener sus propiedades y sobrevivencia y dar estabilidad a las respuestas electrofisiológicas. Para la transfección y farmacología de los canales $I_{Cl,Ca}$ los folículos e.t.r. fueron registrados a las 24 ó 48 h según el protocolo utilizado para cada técnica.

6.2 Técnicas de transfección

En general, para introducir material genético dentro de una célula el procedimiento utilizado es la transfección que es una técnica que ha sido ampliamente utilizada en diferentes modelos celulares y que consiste en la introducción de material genético

foráneo a las células para el estudio de genes y/o sus productos. Muchos métodos de transfección se han desarrollado y cada uno tiene una aproximación diferente. De acuerdo a ésta, los métodos de transfección se dividen en tres grupos; biológicos, químicos y físicos. En el presente trabajo, fueron utilizadas dos aproximaciones, la química mediante la técnica de lipofección y la física mediante la técnica de electroporación *in vivo*. La elección de estos métodos se basó en la facilidad de ambos y la posibilidad de transfectar una población celular, así como de reducir el riesgo de citotoxicidad.

Para silenciar el receptor P2Y₄, el cual creemos es uno de los elementos involucrados en la generación de la respuesta F_{Cl} de las células foliculares, fue utilizada la técnica de silenciamiento selectivo o knockdown mediante oligonucleótidos antisentido específicos para este receptor, diseñados en nuestro laboratorio y basándonos en la secuencia nucleotídica descrita para dicho receptor (Bogdanov *et al.* 1997). Se diseñaron dos secuencias de oligonucleótidos antisentido de ADN cuya longitud en ambos casos fue de 30 nucleótidos y se nombraron como sigue:

1) asP2Y₄a (5'-GTAGGAAGTGGCCATGATGTCCTCCTCAGTCAT-3'); esta secuencia fue diseñada a partir del codón de inicio de la traducción de la proteína que correspondió a la posición 292 (No. Acc. Genbank BC157736). 2) La segunda secuencia, asP2Y₄b (5'-AAGTGGCCATGATGTCCTCAGTCATATTTT-3'), a diferencia de la primera, su diseño incluye 5 nucleótidos antes del codón de inicio de la traducción. En ambos casos el diseño pretende bloquear la traducción desde su inicio y evitar la formación de proteínas truncadas del receptor P2Y₄. La razón para el diseño de dos oligonucleótidos antisentido es básicamente que no se puede garantizar *a priori* la eficacia de inhibición de un oligonucleótido antisentido a pesar de las consideraciones generales que existen para su diseño (Chan *et al.* 2006). Ambos oligonucleótidos antisentido fueron probados después de la estandarización del método de transfección que se eligió para nuestro modelo como se explicará más adelante.

6.2.1 Técnica de transfección por lipofección

El primer acercamiento para la estandarización de la transfección en el folículo ovárico fue el método de lipofección que consiste en la utilización de un sistema de transporte compatible en sus propiedades físicas con la membrana celular, para que por medio de éste y a través de la fusión de ambos elementos (sistema de transporte y membrana celular) se favorezca el paso de las moléculas foráneas que se requiere introducir a la célula.

Para lipofectar las células foliculares (i.e., los folículos e.t.r.), fueron utilizados: el kit de lipofectamina 2000 (Invitrogen), el reactivo BLOCK-iT (Invitrogen), el reactivo TransIT 2020 (Mirus), y el reactivo jetPEI (Polyplus) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Cada uno de estos reactivos tiene características particulares que permiten la internalización de moléculas de manera diferente. Lipofectamina 2000 es un complejo catiónico liposomal que al formar los liposomas en un medio acuoso permite atrapar el material de transfección. De esta manera, los liposomas que contienen el material de transfección en su interior, se fusionan con la membrana celular y se incorporan en esta para así finalmente llegar al citoplasma. El reactivo jetPEI, es un polímero catiónico soluble en agua que interactúa de manera eficiente con moléculas de ADN para formar un complejo catiónico que puede atravesar fácilmente la membrana celular. Una vez dentro del citoplasma la liberación del material genético se da gracias a la desorganización del complejo catiónico por el efecto catiónico de esponja. En cambio, la composición del reactivo TransIT 2020 consiste en una combinación de los dos anteriores: lípidos y polímeros y el mecanismo de internalización posee los mismos principios.

Para monitorear la eficiencia de lipofección se siguieron dos estrategias; la primera internalizando un oligonucleótido fluorescente con características de siARN (BLOCK-iT) y la segunda internalizando el plásmido pEGFP-C1 (Clontech) que expresa una variante de la proteína verde fluorescente. BLOCK-iT consiste en una doble cadena de ARN con la misma longitud, carga y configuración que un siARN y que además contiene modificaciones químicas para conferirle estabilidad y permitir la evaluación de la señal fluorescente producto de la transfección por un período de tiempo mayor. Respecto al plásmido pEGFP-C1 (No. Acc. Genbank U 55763), este

plásmido tiene 4731 pares de bases y codifica para una variante de la proteína verde fluorescente. En el primer caso, donde se internalizó el oligonucleótido fluorescente, fue utilizada una concentración máxima para transfecciones (200 nM según ficha técnica) y se mezcló con lipofectamina para 24 horas después medir la eficiencia de transfección. En el segundo caso, el plásmido pEGFP-C1 fue mezclado con lipofectamina, *TransIT* o *jetPEI* y también fue observada la transfección 48 horas después. Para las dos estrategias después de la transfección de los folículos e.t.r. fueron aisladas las células foliculares y mantenidas en cultivo, como se describe más adelante, para evaluar la eficiencia de la transfección utilizando microscopía de fluorescencia.

En condiciones de esterilidad, los folículos e.t.r. fueron tratados con lipofectamina y el oligonucleótido BLOCK-iT cuya secuencia no es homóloga con ninguna secuencia de los genes conocidos hasta ahora; también los folículos fueron tratados con los reactivos *TransIT*, *jetPEI* y lipofectamina en cuyos casos se internalizó el plásmido pEGFP-C1 como marcador de transfección. Las condiciones de lipofección fueron en todos los casos las especificadas en las fichas técnicas utilizando en cada caso 3 μ L de cada uno de los reactivos mencionados anteriormente y el plásmido con una concentración final de 1 μ M. Esta mezcla fue agitada en vortex por 5 minutos y posteriormente se dejó por 20 minutos a temperatura ambiente y la mezcla fue adicionada a los folículos. Después de 6-8 h de incubación se removieron las células foliculares para ser observadas con microscopía de fluorescencia. Para el cultivo de las células foliculares la membrana basal fue removida utilizando pinzas (folículos cf.o. (células foliculares-ovocito)) en solución Barth modificada sin SFB. Grupos de folículos cf.o. transfectados o sus controles fueron colocados en cámaras de incubación estériles, por 15 min, en medio Barth normal sin Ca^{2+} , conteniendo tripsina 0.05% y 1 mM EDTA. Posteriormente fueron transferidos a una cámara conteniendo 250 μ l de solución Barth modificada suplementada con SFB 2%. Los folículos fueron entonces manipulados suavemente por 5 min, pasándolos de forma repetida a través del orificio de una pipeta Pasteur con los bordes pulidos, este procedimiento desprende las células foliculares del ovocito (una vez tratados los folículos cf.o. enzimáticamente). Finalmente alícuotas de aproximadamente 50 μ l del

sobrenadante que contenía las células en suspensión, fueron depositadas en platos de cultivo multipozo tratadas con colágena como substrato, una vez que las células se adhirieron a la superficie, les fue agregado 1 ml de la solución Barth modificada suplementada con SFB 0.2% en cada pozo. Las células tratadas y aisladas fueron entonces visualizadas utilizando un microscopio de fluorescencia IX71 (Olympus) equipado con una cámara digital (Evolution Qei). Se comparó la efectividad de los diferentes reactivos de lipofección, para el plásmido mencionado anteriormente y lipofectamina para el oligonucleótido fluorescente, y como control del tipo celular se utilizaron las células SKOV-3 en paralelo con los folículos utilizando solo el reactivo Jet PEI. Las células SKOV-3 son una línea celular derivadas de carcinoma humano en ovario. Estas células poseen facilidad de cultivo proliferando de manera rápida y haciendo colonias en poco tiempo. La figura 2 esquematiza de manera general el procedimiento de lipofección utilizando liposomas como sistema de transporte.

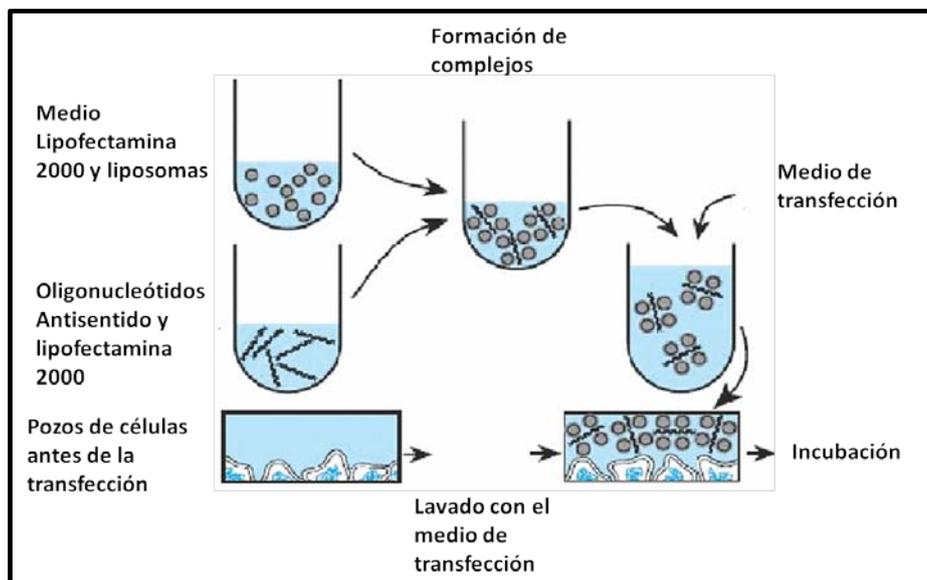


Figura 2. Esquema de la técnica de transfección por lipofección. Esta técnica se basa en la fusión de liposomas y la membrana celular para introducir ácidos nucleicos exógenos a la célula

6.2.2 Técnica de transfección por electroporación *in vivo*.

Otro método de transfección empleado ampliamente es la electroporación o electropermeabilización, éste se basa en provocar una desestabilización transitoria de la membrana, creando por lapsos breves de tiempo estructuras de fuga o poros como resultado de la aplicación de pulsos de campo eléctrico. Por medio de esta técnica es posible la inserción de drogas, proteínas, oligonucleótidos, ARN y ADN. En el presente trabajo, en un inicio fueron utilizadas cubetas de electroporación estériles con un espacio de 0.4 cm entre placas (Bio Rad), y un generador de pulsos Grass (Astro-Med Inc, EUA) para generar pulsos cuadrados de voltaje con varias amplitudes y duraciones. Para su implementación en los folículos e.t.r fueron utilizados diferentes protocolos de pulsos donde fueron variados tanto la intensidad del pulso (25, 50, 75 y 100V) como el número de pulsos (2 - 15) y el tiempo de latencia entre los pulsos (1-20 s).

La solución utilizada para la electroporación fue una solución de Barth sin Ca^{2+} que contenía en mM: NaCl 88, KCl 1, NaHCO_3 2.4, MgCl_2 1.8, EGTA 0.1, HEPES 5, ajustada a 7.4. A esta solución le fueron agregadas diferentes sustancias a electroporar, por ejemplo, un tratamiento incluyó el trazador YoPro en una concentración de 1 mM, en otras fue agregada una sonda marcada con fluoresceína en una concentración de 3 mM. Con esta técnica de electroporación también fueron evaluados los efectos del etilen glicol ácido tetracético (EGTA) y finalmente el antisentido P2Y₄, también con su respectiva secuencia control en las preparaciones de folículos e.t.r. El control de los oligonucleótidos antisentido para la proteína P2Y₄, asP2Y_{4a} y asP2Y_{4b}, consistió en un oligonucleótido de la misma longitud pero con una secuencia inespecífica. Para introducir los oligonucleótidos antisentido, fue necesario modificar la cámara de electroporación con el fin de reducir al máximo el volumen utilizado durante la electroporación, además de reducir el posible daño de los folículos durante la manipulación. Por lo tanto, fue diseñada una cámara de electroporación con un volumen de 30 μl fabricada en teflón, en cuyo interior fueron fijados electrodos de platino, que posteriormente fueron conectados al estimulador que generó los pulsos eléctricos requeridos para la formación de poros transitorios en la membrana celular.

En condiciones de esterilidad, los folículos *e.t.r.* para electroporar fueron incubados inmediatamente después de su disección en solución Barth modificada por 2 h, grupos de 12 a 14 folículos fueron posteriormente incubados en solución Barth cero Ca^{2+} por 2 min en una caja Petri de 35 mm agitada de manera continua y suave. Después de este tiempo fueron colocados en la cámara de electroporación que contenía la solución Barth cero Ca^{2+} con la molécula de interés a electroporar. Antes de aplicar el protocolo de pulsos para electroporar los folículos fueron incubados otros 2 min en la cámara para permitir un mayor equilibrio y homogeneidad de la solución de prueba. Después de la electroporación, los folículos fueron nuevamente incubados en solución Barth cero Ca^{2+} por 2 min, y finalmente fueron incubados a 18 °C en solución Barth modificada por 24 o 48 h.

Los resultados obtenidos por el tratamiento de electroporación cuando se utilizaron trazadores fluorescentes (e.g, YoPro) fueron analizados en un microscopio confocal-Zeiss Axiovert 200 LSM 510 Meta multifotónico. Las observaciones se hicieron utilizando aumentos de 5X y 20X. El método para el trazador fluorescente YoPro se muestra en la figura 3. Para el EGTA y los oligonucleótidos antisentido de P2Y_4 se realizaron registros electrofisiológicos de los folículos *e.t.r.* mediante la técnica de control de voltaje con dos electrodos.

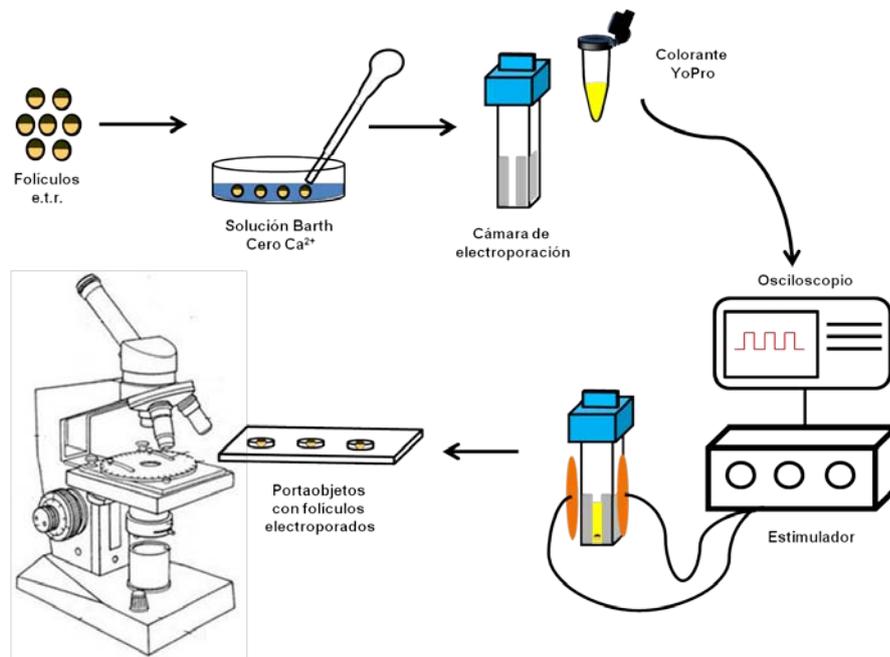


Figura 3. Esquema de la técnica de transfección por electroporación *in vivo*, donde se cargaron folículos *e.t.r* con el colorante fluorescente YoPro. Se realizaron 4 protocolos de electroporación para establecer las mejores condiciones de número de pulsos cuadrados, duración de los mismos y latencia entre pulso y pulso para posteriormente evaluarlos con microscopía confocal.

6.3 Técnica de control de voltaje con dos electrodos

Las respuestas eléctricas de los folículos *e.t.r.* fueron registradas mediante la técnica de control de voltaje con dos electrodos (Arellano & Miledi, 1993). El control de voltaje (Figura 4) es una técnica que se utiliza para el estudio de las corrientes que fluyen a través de canales iónicos en una membrana. Con esta técnica se controla a valores predeterminados el voltaje de la célula de interés, de tal manera que se pueda medir la corriente transmembranal que fluye en cada valor de voltaje. Con el potencial transmembranal de la célula controlado, la corriente que fluye a través de la membrana es proporcional a su conductancia que se encuentra determinada por la apertura y cierre de los canales iónicos (Hille, 2001). Esta técnica fue utilizada para medir la eficiencia de la implementación de la técnica de transfección por electroporación con la aplicación de EGTA y los antisentidos del receptor P2Y₄. También fue utilizada esta técnica para estudiar la farmacología de los canales $I_{Cl,Ca}$, construyendo curvas de inhibición dosis respuesta con los siguientes bloqueadores: 1) ácido niflúmico, 2) el ácido 9-antracencarboxílico (A9C), 3) ácido 4,4'-diisotiocianatostilven 2,2'- disulfónico (DIDS), 4) el ácido 2-(anilino) benzoico (DPC).

El sistema de control de voltaje es un circuito constituido por 2 microelectrodos intracelulares, uno de los cuales mide el voltaje transmembranal (V') y otro inyecta corriente (I') a la célula. La señal de potencial se compara con un voltaje 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 de un circuito de retroalimentación negativa (FBA). La corriente (I) que cruza la membrana celular fue medida por un amperímetro colocado en el baño. 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 de KCl y tuvieron una resistencia de 1-2 M Ω . 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 para su posterior análisis utilizando el programa pClamp 9 (Axon Inst.). Un generador de

pulsos Grass (Astro-Med Inc, EUA) fue utilizado para cambiar el voltaje de mantenimiento por períodos breves (1 a 2 s).

Los protocolos utilizados para los experimentos tanto de electroporación como farmacológicos se basaron en los efectos sobre la amplitud de las corrientes correspondientes. El monitoreo de estas corrientes se llevó a cabo por lo general en un potencial de mantenimiento de -60 mV, y fueron aplicados pulsos de 1 s a -40 mV cada 60 s para monitorear continuamente la conductancia de la membrana. Las preparaciones fueron perfundidas con solución Ringer normal (RN), que contenía (en mM): 115 NaCl, 1.8 CaCl₂, 5 HEPES, ajustada a pH 7.0 con NaOH) con un flujo constante de 10 ml/min. Para el caso del EGTA y el antisentido P2Y₄, la corriente registrada fue la respuesta F_{Cl} activada por ATP. El protocolo general utilizado consistió en la activación de las corrientes ya sea por la aplicación de Ringer sin Ca²⁺ o de ATP en Ringer normal. El protocolo de registro de la corriente F_{Cl} (ATP 10 μM) en los folículos electroporados o sus controles, consistió en el registro de la corriente respectiva de manera individual en 4-6 ovocitos de cada grupo (Figura 5).

Para probar cada fármaco bloqueador de canales de Cl⁻ sobre las corrientes F_{Cl} (ATP 3 μM), después del registro de la amplitud control y un lavado de 10 min con RN, los folículos fueron pre-incubados con la droga de interés (a una concentración definida) por 60 s, seguido inmediatamente de una co-aplicación de la droga con el agonista (mismas concentraciones) por un período de 60 s. Entre cada aplicación con o sin la droga, las preparaciones fueron lavadas por 10 min con el fin de permitir un lavado completo en solución RN. Cada folículo fue probado con diferentes concentraciones crecientes del fármaco desde 0.3 μM hasta 1 mM dependiendo de la droga.

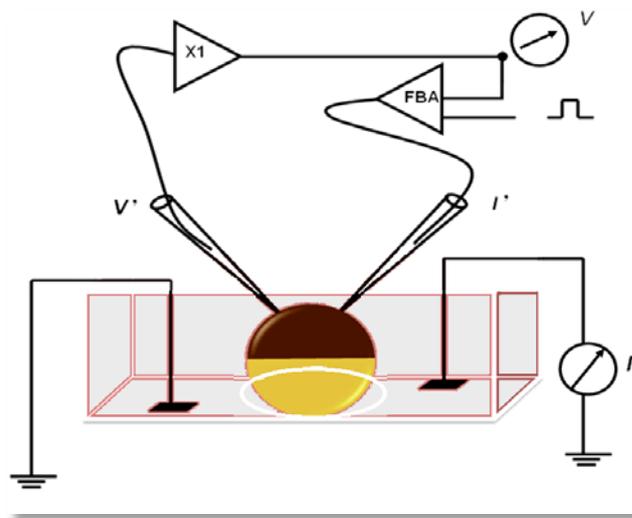


Figura 4. Esquema de la técnica de control de voltaje con dos electrodos, donde V' es el electrodo de voltaje. $X1$: es el amplificador. V : es el voltaje de mantenimiento. FBA : amplificador de retroalimentación negativa. I' es el electrodo intracelular de corriente, I es el amperímetro que se encuentra en el baño y mide la corriente transmembranal (Modificada de Hille, 2001).

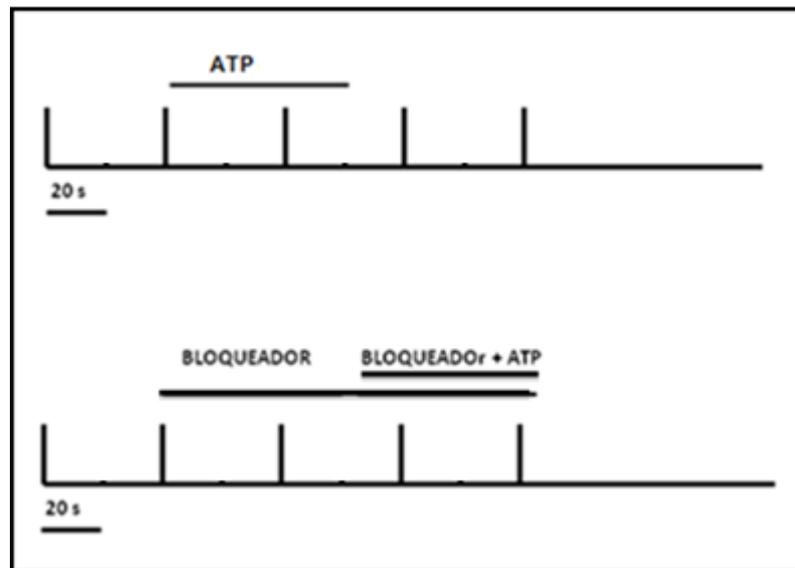


Figura 5. Esquema de los protocolos de registro. Foliculos e.t.r. fueron registrados bajo control de voltaje a -60 mV en RN, pulsos breves a -40 mV fueron aplicados periódicamente (cada 40 ó 60 s) para monitorear la conductancia membranal. El protocolo esquematizado arriba permitió monitorear la amplitud de las corrientes F_{Cl} activada por ATP en foliculos control y electroporados, mientras que el de la parte inferior fue utilizado para estudiar los efectos de bloqueadores de canales de Cl^- sobre F_{Cl} generada por ATP

6.4 Construcción de curvas dosis-respuesta con bloqueadores de canales de Cl⁻

Para evaluar la relación dosis-respuesta de la corriente F_{Cl} , el potencial de los folículos fue controlado a -60 mV y la concentración de los distintos bloqueadores se modificó en un rango 0.3 μ M - 1 mM. La amplitud de las respuestas se normalizó con respecto a la obtenida con la aplicación del ATP como agonista y en ausencia de la droga. Las curvas fueron construidas graficando el logaritmo de la concentración molar (M) aplicada versus la media de la amplitud de la respuesta F_{Cl} previamente normalizada. Los datos corresponden al registro de 6-10 folículos en cada concentración, y estos datos fueron ajustados a curvas construidas con base en la ecuación de Hill:

$$\frac{1}{\left(\frac{K_A}{[L]}\right)^n + 1}$$

Donde:

K_A : Concentración del ligando que produce la mitad de la ocupación de los sitios de unión.

L : Concentración del ligando libre.

n : Coeficiente de Hill que describe cooperatividad (u otras posibles propiedades bioquímicas).

El valor de la dosis media de inhibición de la respuesta (IC_{50}) fue obtenida de la sigmoide de ajuste.

6.5 Análisis estadístico

Con los datos obtenidos para la estandarización de la técnica de transfección por electroporación se realizó una comparación entre la amplitud de la respuesta de los diferentes grupos: folículos no electroporados, electroporados sin el oligonucleótido antisentido y los folículos con el oligonucleótido antisentido (la amplitud de la respuesta fue dada en nA y normalizada en todos los casos). En

todos los casos se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y en los casos donde se encontraron diferencias se emplearon la prueba *post hoc* de Bonferroni. El grado de significancia estadística para las pruebas correspondió en todos los casos a 0.05; el valor de P por debajo de 0.05 se indicó con * y se consideró como diferencia significativa mostrado en cada gráfica. Todos los datos se muestran como las medias \pm el error estándar de las mismas. Las pruebas estadísticas se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico GB- Stat v7.0 (Dynamic Microsystem) y las gráficas se realizaron con el paquete SigmaPlot 10.0.

7. RESULTADOS

7.1 Estandarización del método de transfección por lipofección y electroporación y silenciamiento del receptor *Xenopus* P2Y₄.

Con el fin de poder silenciar el receptor P2Y₄ mediante alguna de las dos técnicas de transfección descritas, se comenzó por evaluar el método de lipofección y determinar si este método era el más eficiente para el posterior silenciamiento del receptor *Xenopus* P2Y₄.

Puesto que los resultados no fueron satisfactorios, posteriormente se evaluó el método de electroporación para el cargado de un colorante fluorescente que permitió determinar el cargado del folículo con microscopia de fluorescencia lo que nos permitió obtener los parámetros iniciales para estandarizar el cargado con EGTA, que constituyó la forma directa cómo se pudo estandarizar la técnica de electroporación para finalmente internalizar sondas de oligonucleótidos antisentido del receptor *Xenopus* P2Y₄. Tanto el cargado con EGTA como la internalización de los oligonucleótidos antisentido para el receptor P2Y₄ fueron evaluados con registros electrofisiológicos.

7.1.1 Transfección por lipofección

La primera aproximación de transfección utilizada en los folículos fue el método de lipofección que aunque para *X. laevis* no está bien documentado, para otros tipos celulares tiene una efectividad de transfección del 80% o más. Por tanto, siguiendo las instrucciones del fabricante se procedió a transfectar dos tipos de moléculas: 1) Un oligonucleótido fluorescente con las mismas características de un siARN (BLOCK-iT) cuya concentración fue la máxima recomendada para transfectar (200 nM) mezclado con el reactivo lipofectamina 2000 y 2) Un plásmido con la

secuencia de una variante más brillante de la proteína verde (pEGFP-C1) en una concentración de 1 μ M. En un inicio, los experimentos fueron realizados utilizando folículos e.t.r., sin embargo, la visualización de las células foliculares por fluorescencia y su cuantificación se dificultaba al utilizar esta preparación, así que luego decidimos aislar las células y después ponerlas en platos de cultivo para visualizarlas directamente con microscopía de fluorescencia y proceder a la evaluación de la eficiencia de transfección (Figura 6). En todos los pozos observados hubo una tasa de adhesión muy baja. El tratamiento con el plásmido utilizando cada uno de los tres reactivos diferentes de lipofección se muestra en la figura 6. Al tratar con lipofectamina se observó la muerte de las células foliculares y una tasa de adhesión muy baja por lo que se descartó este método para la transfección en las células foliculares. Con el reactivo jetPEI (n=40 folículos) se obtuvo la mejor transfección en términos de número de células fluorescentes; por esto, se pretendió corroborar si la intensidad era la misma para otro tipo celular, y así descartar posible autofluorescencia proveniente de las células foliculares. Para esto utilizamos las células SKOV-3 como células control. Al demostrar que el plásmido no ocasiona daño celular y si permitió visualizar la transfección pero se observó bajo porcentaje de células fluorescentes, concluimos que la eficiencia de transfección con lipofección utilizando un plásmido como vector tampoco era eficiente en las células foliculares (Figura 6).

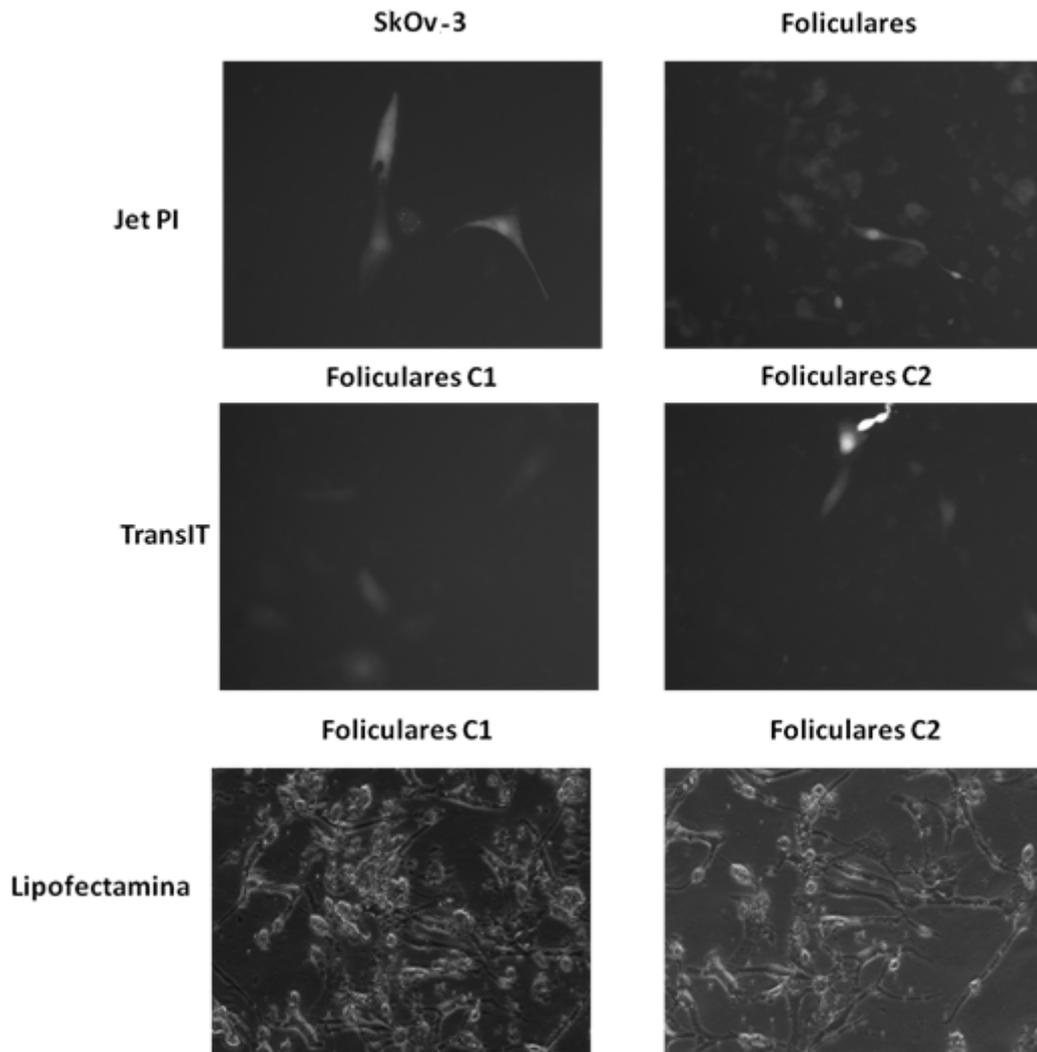


Figura 6. Lipofección de células foliculares aisladas del folículo de *Xenopus laevis*. Imágenes de fluorescencia de células SKOV-3 tratadas con jetPEI y células foliculares aisladas del folículo de *Xenopus* tratadas con TransIT y Lipofectamina2000. C1: Campo 1; C2: Campo 2.

7.1.2 Transfección por electroporación *in vivo*

Debido a la baja eficiencia de transfección con la técnica de lipofección para las células foliculares, decidimos utilizar la electroporación de los folículos e.t.r. El método de electroporación ha sido ampliamente utilizado en diversos modelos considerándolo desde los años 60 como uno de los métodos más eficientes de transferencia de oligonucleótidos o plásmidos de ADN. La electroporación *in vivo*

utilizando pulsos cuadrados de voltaje, tiene la ventaja de presentar un menor impacto en las células en cuanto a daño y citotoxicidad.

Para una electroporación exitosa se debe tener en cuenta tanto la forma del pulso como la amplitud y la duración del mismo. Es un método que ofrece varias ventajas en cuanto a facilidad, viabilidad de las células y costos. Para su implementación en los folículos fueron utilizados diferentes protocolos de pulsos donde fueron variados la intensidad del pulso (25, 50, 75 y 100V), el número de pulsos (2 y 5) y el tiempo de latencia entre los pulsos (15, 20 s).

7.1.2.1 Electroporación con un colorante fluorescente

Como primera aproximación para evaluar el cargado de una molécula utilizando la electroporación elegimos el trazador YoPro (900 kDa) que es una molécula fluorescente e impermeable a las membranas celulares. Los folículos e.t.r. fueron electroporados en la presencia de 1 mM de YoPro y aplicando distintos protocolos de pulsos, todos con 5 pulsos con voltajes entre 25 y 75 V y entre 1 y 10 ms de duración. Una vez que el grupo de folículos fue electroporado en la presencia de YoPro, también fueron preparados folículos control del mismo donador que consistieron en grupos electroporados en la ausencia del marcador, y un tercer grupo que se incubó en YoPro pero no le fue aplicado el protocolo de electroporación. 6 grupos de folículos fueron evaluados, los de 1, 5 y 10 ms cada uno con pulsos de 25, 50 y 75 V. Los folículos fueron expuestos a la solución con el colorante sólo por unos cuantos minutos y retirado después de la electroporación. Los folículos fueron lavados con solución Barth cero Ca^{2+} y dejados en solución Barth modificada en incubación a 18°C por 24 horas. Posteriormente fue realizado un análisis de fluorescencia con microscopía confocal en el cual fueron reconstruidas secciones de los folículos a través de cortes ópticos de 0.2 μm . Los resultados de estos análisis muestran que el trazador fluorescente difundió al interior del ovocito aunque aun el cargado del colorante no pudo ser discernido con claridad en las células foliculares.

Por otro lado los experimentos control indicaron que el nivel de autofluorescencia de los folículos fue eliminado y que el colorante no difundió después del tratamiento de electroporación. En cada caso fueron utilizados 5 folículos de dos donadores diferentes. En la Figura 7 se muestran los resultados del grupo de 50V que fue el que mejores resultados proporcionó.

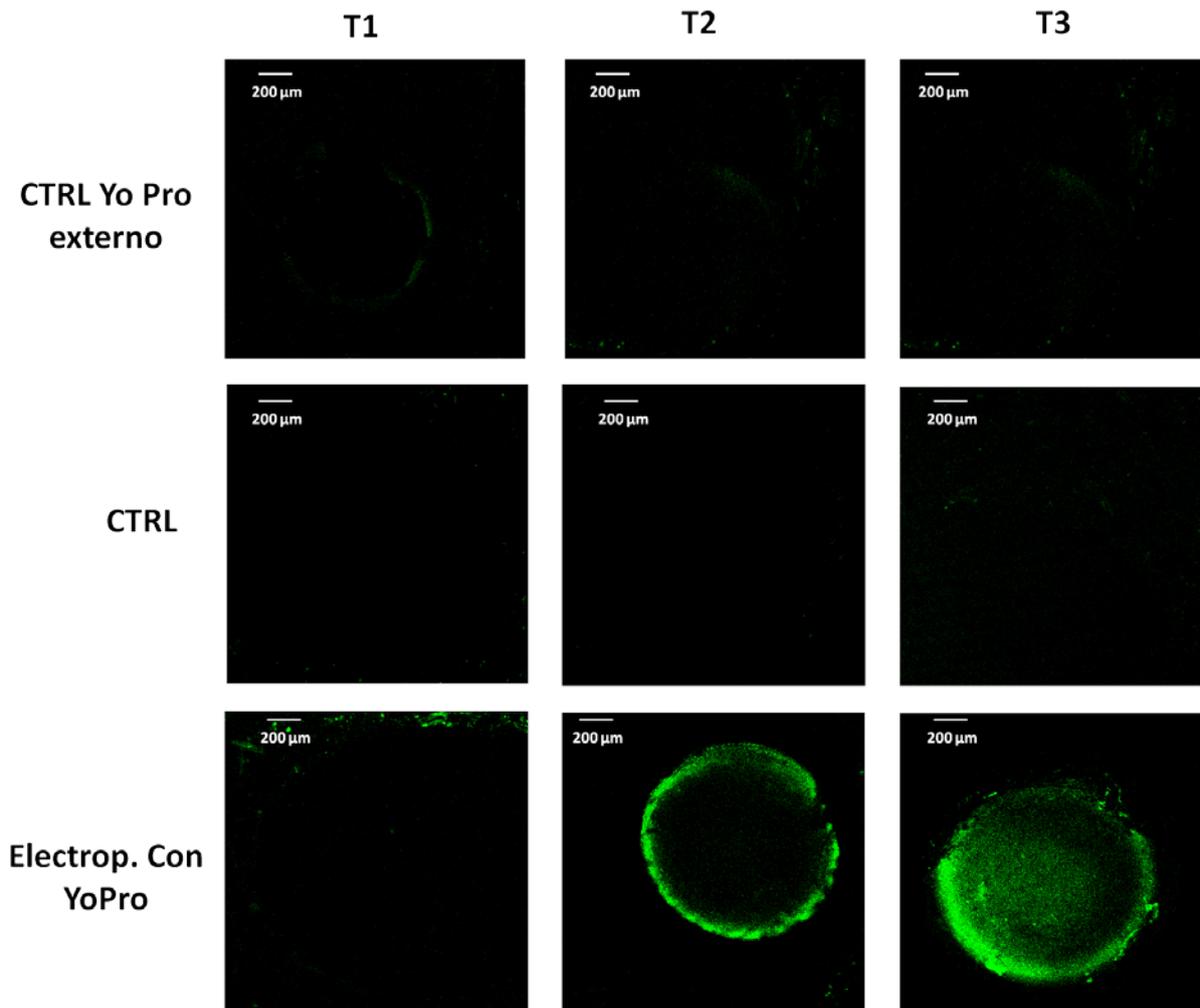


Figura 7. Electroporación del folículo e.t.r de *Xenopus laevis*. Microscopia confocal. Aumento 5X. Estos datos corresponden a: T1: protocolo con 5 pulsos de 1m s de duración y 50V.. T2: Protocolo con 5 pulsos de 5 ms de duración y 50V. T3: Protocolo con 5 pulsos de 10 ms de duración y 50 V.. N total= 60 folículos de dos donadores.

Puesto que los resultados de los experimentos anteriores mostraron la eficacia de la electroporación para el cargado del ovocito (folículo) con un colorante fluorescente, evaluamos si las células foliculares podrían ser cargadas por electroporación con

las moléculas antisentido. El protocolo de electroporación que mostró ser más efectivo fue el de 5 pulsos, con 10 ms de duración y 50 V.

7.1.2.2 Electroporación con EGTA y su efecto sobre F_{Cl}

Los resultados anteriores mostraron sólo de manera cualitativa el cargado de los folículos. Debido a ello, procedimos entonces a evaluar el efecto de cargar por electroporación una substancia impermeable que se sabe inhibe la respuesta F_{Cl} . Como se ha mencionado la corriente F_{Cl} depende de un aumento de Ca^{2+} en el citoplasma de las células foliculares (Arellano *et al.*, 1998; 2012). Este aumento de Ca^{2+} puede ser prevenido por el cargado de un quelante de Ca^{2+} tales como el EGTA y el BAPTA, manipulación que ha sido utilizada en diversos fenómenos donde el Ca^{2+} funciona como intermediario (Susuki *et al.* 2004; Yu *et al.* 2010). Puesto que los quelantes de Ca^{2+} son impermeables a la membrana y por lo regular son inyectados o incluidos en las pipetas de registro para observar sus efectos, en los experimentos siguientes utilizamos la técnica de electroporación para cargar los folículos e.t.r. con EGTA. De esta forma evaluamos los efectos del posible cargado de EGTA sobre la generación de F_{Cl} por ATP. El quelante fue disuelto en la solución de Barth cero Ca^{2+} de electroporación. Fueron utilizadas dos concentraciones distintas de 2 ó 20 mM. De manera paralela también se trató de hacer más eficiente el método buscando las mejores condiciones de electroporación que produjeran el menor daño posible al acoplamiento entre las células foliculares y el ovocito, así como al de la sobrevivencia de las células. Con este objetivo en los protocolos fueron variados el número de pulsos, la duración de estos y la amplitud del voltaje. El efecto de estos tratamientos fue evaluado por la comparación de las amplitudes de F_{Cl} generadas en los grupos control no electroporados y aquellos electroporados en la presencia de la solución Barth cero Ca (i.e., grupo electroporado en ausencia de EGTA). Por otro lado fue evaluada la eficiencia del cargado de EGTA en las células foliculares comparando las amplitudes de F_{Cl} en los grupos electroporados en ausencia y presencia del EGTA.

Las variables modificadas durante la estandarización fueron: el número de pulsos, el voltaje, la latencia entre pulsos así como la concentración del EGTA. Varias de las combinaciones posibles tuvieron un claro efecto deletéreo sobre la integridad de los folículos, reduciendo su viabilidad evidenciada tanto por su coloración como por sus propiedades eléctricas (datos no mostrados). En esta primera serie de experimentos los factores más importantes resultaron ser la amplitud de voltaje y la duración de los pulsos utilizados, por lo que decidimos estandarizar estos en 50 V y 10 ms que están además en el rango utilizando para otras preparaciones. 24 h después de la electroporación se midió el efecto de su aplicación sobre la generación de F_{Cl} en grupos de folículos e.t.r. electroporados en Barth cero Ca^{2+} . En la figura 8 se ilustran los resultados obtenidos al electroporar los folículos ($n=4$ en cada grupo) con 5, 15 y 25 pulsos comparados con el grupo control que no fue electroporado pero estuvo en presencia de la solución de electroporación. Comparando los diferentes grupos se observa que la amplitud de la respuesta F_{Cl} se mantiene en niveles medios similares entre el control y aquellos que fueron electroporados con 5 y 15 pulsos, en cambio el protocolo de 25 pulsos provocó una sensible disminución de la respuesta. Al realizar un análisis de ANOVA de una vía fueron encontradas diferencias significativas entre los grupos de 25 pulsos y los demás con un nivel de confianza del 95% (Figura 8). La prueba de corrección de Bonferroni mostró diferencias entre el grupo de 25 pulsos y los grupos de 5 y 15 pulsos.

El experimento previo indicó que un protocolo adecuado de estimulación para electroporar fue el de la aplicación de 15 pulsos cuadrados de 10 ms de duración y 50 V de amplitud, con una latencia entre pulsos de aproximadamente 1 s, ya que éste pareció tener pocos efectos sobre el mantenimiento de la corriente F_{Cl} . El siguiente experimento fue entonces el tratar de cargar EGTA en las células foliculares y evaluar su probable efecto sobre la respuesta F_{Cl} . Para esto realizamos un primer experimento control, cuyo objetivo fue saber si el EGTA, por el tiempo de incubación que se utiliza en la electroporación (aproximadamente 3 min), podría por si mismo tener un efecto importante sobre el acoplamiento en el folículo o sobre su viabilidad. Para ello fueron probados tres grupos de folículos: 1) folículos control sin electroporar en Barth cero Ca^{2+} , 2) folículos sin electroporar en Barth cero Ca^{2+} con EGTA 20 mM en el medio extracelular, y 3) folículos electroporados (15 pulsos, 10

ms, 50 V) en Barth cero Ca^{2+} con EGTA 20 mM. Los resultados mostraron claramente que la incubación en medio conteniendo EGTA 20 mM no afectó por sí misma la amplitud de la respuesta F_{Cl} (Figura 9). Además mostró que existió una diferencia significativa entre las amplitudes de F_{Cl} de los grupos 2 y 3 es decir entre aquellos electroporados y no en presencia del EGTA. Esto sugirió fuertemente que el EGTA podría haber entrado al citoplasma de las células foliculares y provocar la inhibición de la corriente folicular dependiente de Ca^{2+} . Si esta idea era válida supusimos que el efecto de EGTA podría ser dependiente de la concentración, por lo que los siguientes experimentos fueron realizados para resolver si nuestra hipótesis era válida o por el contrario los efectos observados eran debidos a una causa inespecífica. Para esto realizamos experimentos en los que los parámetros de electroporación fueron aplicados en folículos incubados con EGTA 20 mM, su efecto sobre F_{Cl} evaluado, y comparado con los observados en folículos electroporados con una concentración diez veces menor del quelante, es decir de 2 mM. Como se observa en las figuras 10 y 11, en los dos grupos electroporados (15 pulsos, 10 ms, 50 v) en presencia de EGTA (20 y 2 mM) se obtuvo una disminución significativa de la corriente F_{Cl} , aunque parece ser que el efecto de disminución es más importante en el grupo de EGTA 20 mM. Este resultado sin embargo no mostraba la eficiencia del número de pulsos en el método de electroporación sobre la respuesta de estudio. Por esto, se realizó un experimento en el que se redujera el número de pulsos utilizando las mismas concentraciones de EGTA (2 y 20 mM). Respecto a esto, las figuras 10 y 11 muestran que en los grupos de folículos electroporados con 5 pulsos en presencia de 2 ó 20 mM de EGTA, el efecto sobre la amplitud de la respuesta F_{Cl} dependió de la concentración del mismo. Mientras que con 2 mM de EGTA no hubo en absoluto disminución en la amplitud de F_{Cl} (a pesar de la alta dispersión). En el grupo con 20 mM de EGTA la acción del quelante fue de 67 %. Este resultado reforzó la idea de que los efectos provocados por la electroporación en presencia del EGTA fueron debidos al efectivo influjo del quelante al citoplasma de las células foliculares.

7.1.2.3 Electroporación de oligonucleótidos antisentido para el receptor P2y₄ y su efecto sobre F_{Cl} .

Finalmente habiendo obtenido parámetros adecuados para transfectar las células foliculares, se probó el protocolo de 15 pulsos, de 50 V y 10 ms de duración para cargar las dos secuencias oligonucleotídicas diseñadas del antisentido P2Y₄, asP2Y_{4a} y asP2Y_{4b}, con el objetivo de evaluar su efecto sobre la amplitud de F_{Cl} y determinar un posible papel del receptor P2Y₄ en su generación, además del grupo evaluado como control en la solución de electroporación solamente, se agregó un control electroporando en la presencia de un oligonucleótido con una secuencia no relacionada (oligo-control). La concentración utilizada de las moléculas antisentido y del oligo-control en estos experimentos fue de 1 µg/µl de solución (Barth cero Ca²⁺), y fueron evaluados los efectos sobre la amplitud de F_{Cl} a las 24 h y a las 48 h posteriores a la electroporación. Los resultados ilustrados en la Figura 12 muestran que la electroporación del asP2Y_{4a} no provocó diferencias significativas en la amplitud de la respuesta F_{Cl} , a las 24 o las 48 h, comparando los diferentes grupos electroporados evaluados, i.e., en la ausencia de oligonucleótido, con la secuencia oligo-control, o el electroporado con asP2Y_{4a} (11 folículos en cada grupo, 3 donadores).

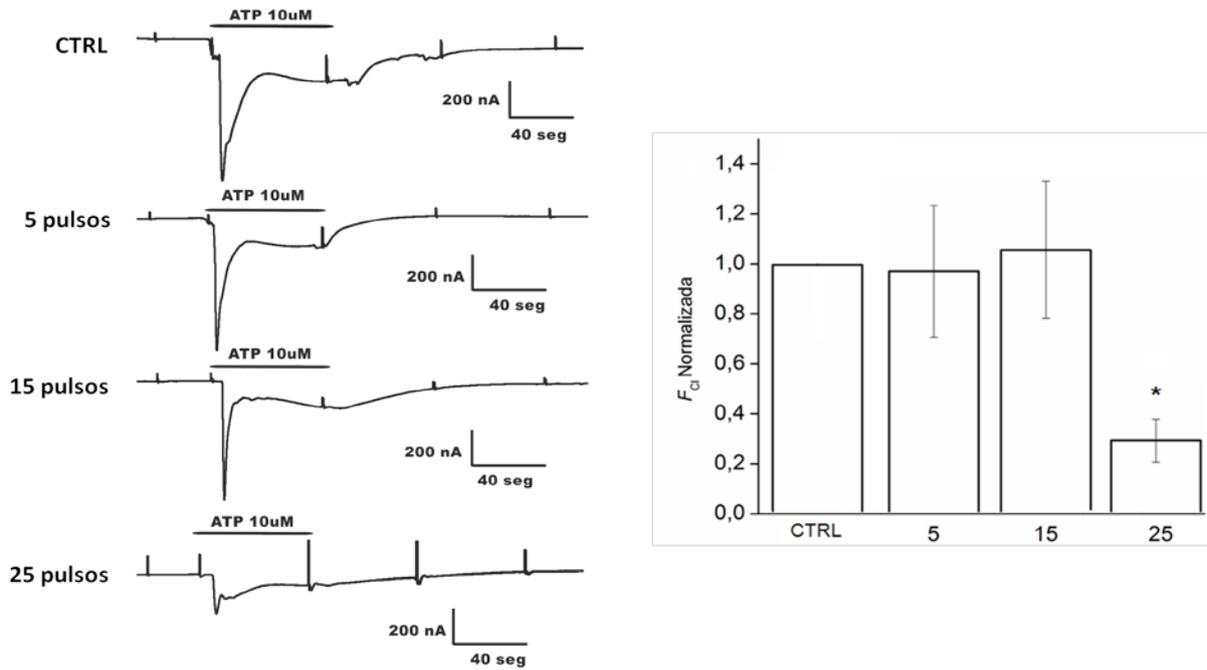


Figura 8. Electroporación de folículos *e.t.r* de *Xenopus laevis*. Respuesta F_{Ci} . Aplicación de diferentes números de pulsos de 50 V. Los trazos representativos muestran la amplitud de F_{Ci} a los diferentes números de pulsos utilizados. Las barras muestran la amplitud media de los folículos sometidos a diferentes números de pulsos. Este experimento correspondió a un donador con una $n=4$ folículos. La respuesta en cada caso fue normalizada.

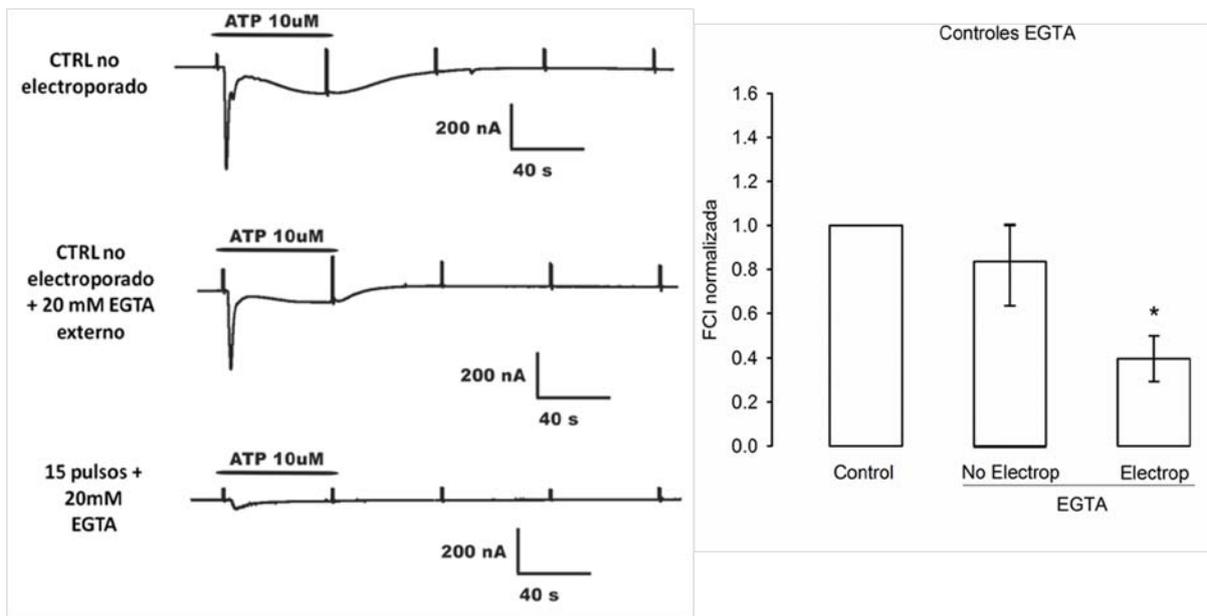


Figura 9. Efecto del quelante EGTA sobre las células foliculares acopladas al ovocito en *Xenopus laevis* transfectadas por electroporación. Amplitud de la Respuesta F_{Ci} normalizada. Aquí se muestra la amplitud promedio normalizada de los folículos utilizados ($n=9$ para cada grupo) Izq; Trazos representativos de cada grupo. Der. Gráfica de barras que muestra las medias \pm el error estándar de la media

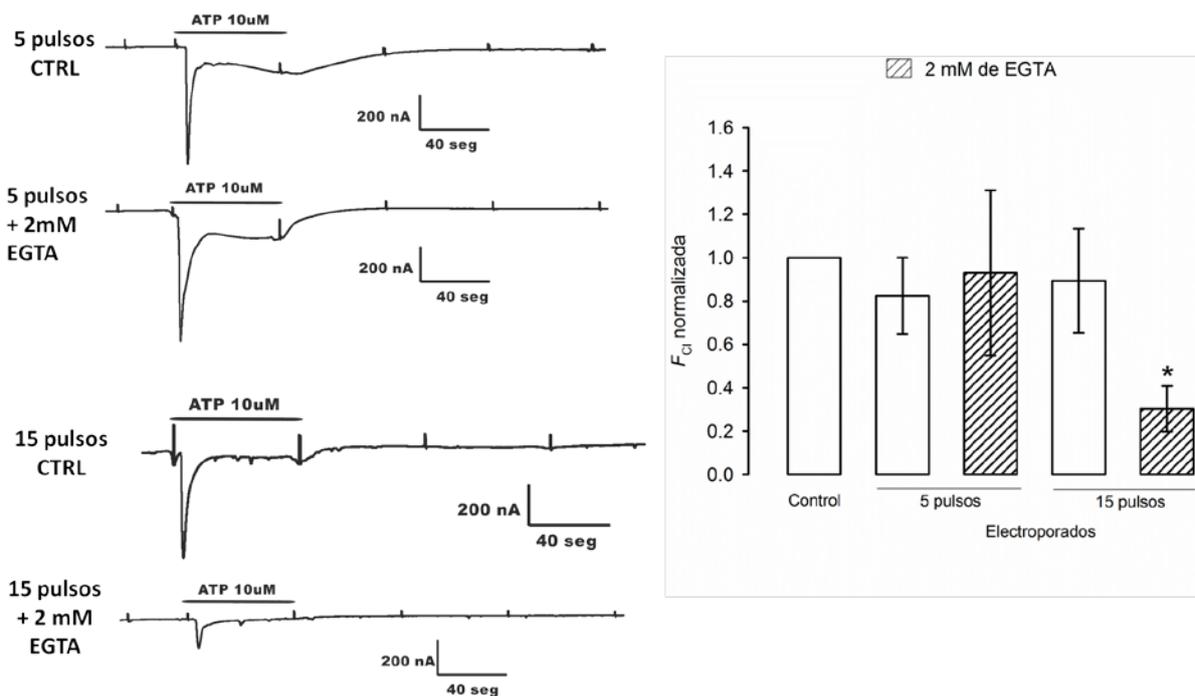


Figura 10. Efecto del cargado con 2 mM de EGTA en el fólculo e.t.r de *Xenopus laevis* usando dos protocolos de electroporación. Respuesta promedio normalizada de F_{Ci} electroporando con 5 y 15 de pulsos. Se muestra el promedio de los fólculos utilizados ($n=4$ en cada tratamiento) en un donador. Izq: Trazos representativos de cada grupo. Der. Gráfica de barras con la media de la respuesta +/- el error de la media para cada grupo.

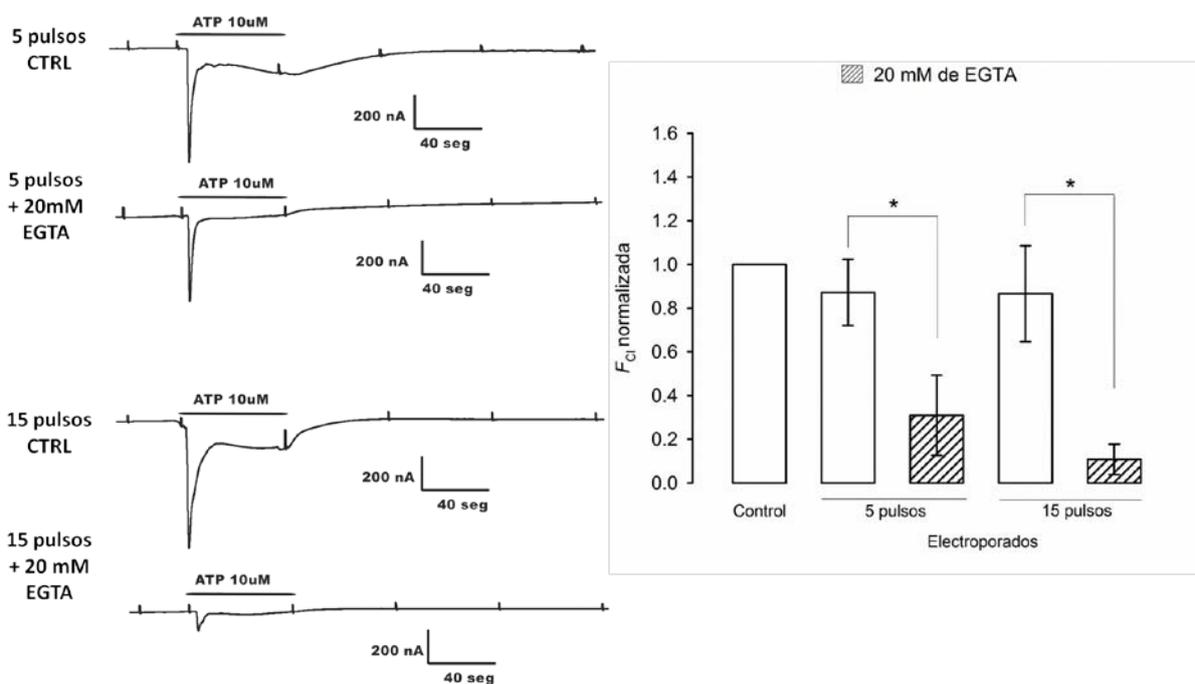


Figura 11. Efecto del cargado con 20mM de EGTA en el fólculo e.t.r de *Xenopus laevis* usando dos protocolos de electroporación. Respuesta promedio normalizada de F_{Ci} electroporando con 5 y 15 de pulsos. Se muestra el promedio de los fólculos utilizados ($n=8$ en cada tratamiento) en dos donadores. Izq: Trazos representativos de cada grupo. Der. Gráfica de barras con la media de la respuesta +/- el error de la media para cada grupo.

Utilizando en este mismo protocolo la segunda secuencia antisentido, asP2Y₄b, tampoco existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. A las 48 h, el efecto de la secuencia asP2Y₄b fue estadísticamente significativo respecto al grupo control pero no lo fue con respecto al grupo oligo-control (Figura 12). No obstante, el grupo oligo-control no fue estadísticamente significativo respecto al grupo control. Esto indicó que hubo una débil tendencia indicando que la secuencia asP2Y₄b resultó en una mayor disminución de la amplitud de F_{Cl} a las 48 horas.

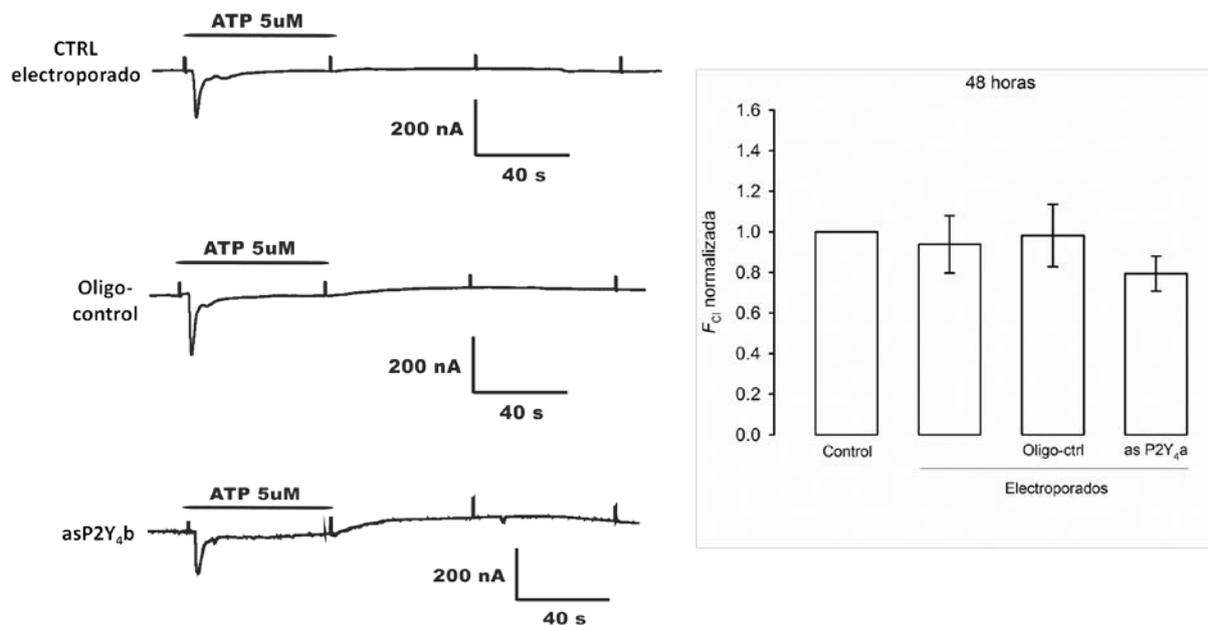


Figura 12. Electroporación del oligonucleótido asP2Y₄a para silenciar el receptor P2Y₄ en el folículo e.t.r de *Xenopus laevis*. 48 horas después de la electroporación se registraron los folículos control (CTRL), oligo-control (Oligo-ctrl) y asP2Y₄a. En la parte derecha se muestra la respuesta F_{Cl} normalizada para cada condición. Las barras de folículos electroporados corresponden a un protocolo de 15 pulsos (n=5 folículos para cada uno de los grupos).

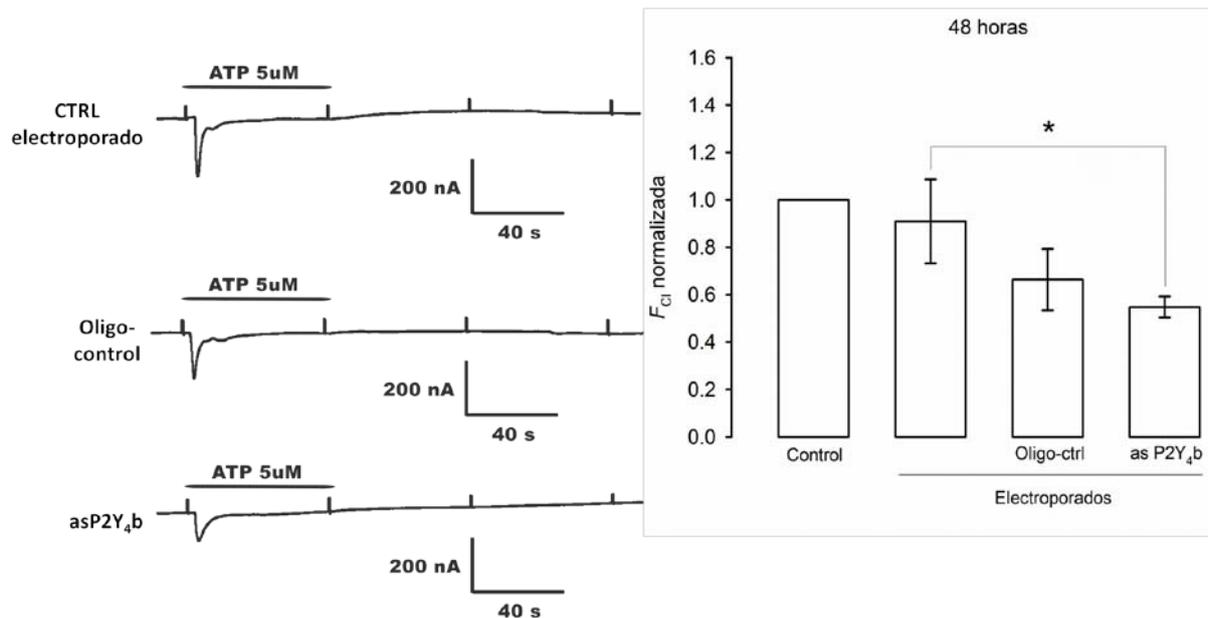


Figura 13. Electroporación del oligonucleótido asP2Y₄,b para silenciar el receptor P2Y₄ en el folículo e.t.r de *Xenopus laevis*. Respuesta F_{Cl} normalizada. 48 horas después de la electroporación se registraron los folículos control (CTRL), Oligo-control (oligo-ctrl) y aP2Y₄,b. Las barras de folículos electroporados corresponden a un protocolo de 15 pulsos (n=5 folículos para cada uno de los grupos).

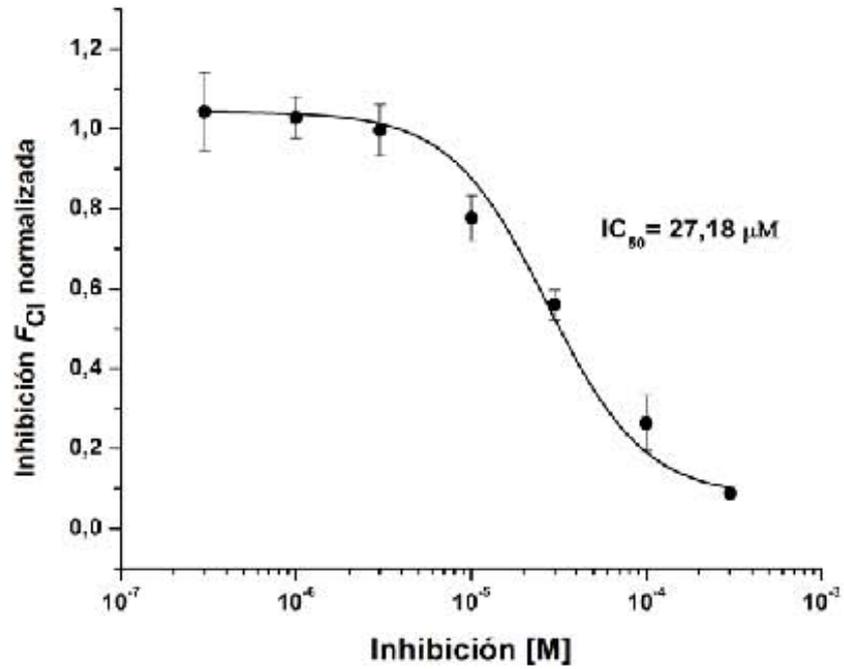
7.2 Efecto de bloqueadores de canales de Cl⁻ sobre la respuesta F_{Cl} .

Para caracterizar farmacológicamente los canales $I_{Cl,Ca}$ de las células foliculares involucrados en la respuesta F_{Cl} fueron evaluados los efectos de bloqueadores de estos canales utilizados ampliamente en distintos tipos celulares, incluyendo a los canales expresados en la membrana del ovocito de *Xenopus*. En estos experimentos fueron utilizadas 12 ranas cuyos folículos respondieron en todos los casos al ATP tal y como se ha reportado previamente (Arellano *et al.*, 1998, 2012). Como en los registros anteriores el potencial de membrana de los folículos fue fijado a -60 mV, y la amplitud de las respuestas fue normalizada con respecto a la máxima obtenida en la ausencia de los bloqueadores para cada caso. Las curvas dosis-respuesta para cada bloqueador fueron construidas graficando el logaritmo de la concentración de la droga (M) aplicada contra la corriente normalizada de F_{Cl} que prevalece en cada una de las concentraciones. Los datos correspondieron en cada curva al registro de 6-10 folículos (3 donadores para cada droga) en cada

concentración. Finalmente los datos experimentales fueron ajustados a una curva basada en la fórmula de Hill como se indica en métodos. El valor de la dosis media de inhibición (IC_{50}) fue obtenida de la sigmoide de ajuste en cada caso.

Las curvas para los diferentes bloqueadores fueron construidas aplicando concentraciones en el rango de 0.3 μ M a 1 mM según la droga. Los bloqueadores estudiados correspondieron a: ácido niflúmico, ácido 9-antracencarboxílico (A9C); ácido 4,4'-diisotiocianatostilven 2,2'- disulfónico (DIDS) y ácido 2-(anilino) benzoico (DPC). En todos los casos la amplitud de la F_{Cl} activada por 3 μ M ATP fue comparada con la amplitud de la respuesta a la misma concentración del agonista en co-aplicación de una de las drogas a una determinada concentración. Las figuras 14, 15, 16 y 17 ilustran las curvas de inhibición obtenidas y trazos representativos del efecto de cada droga sobre la F_{Cl} .

A



B

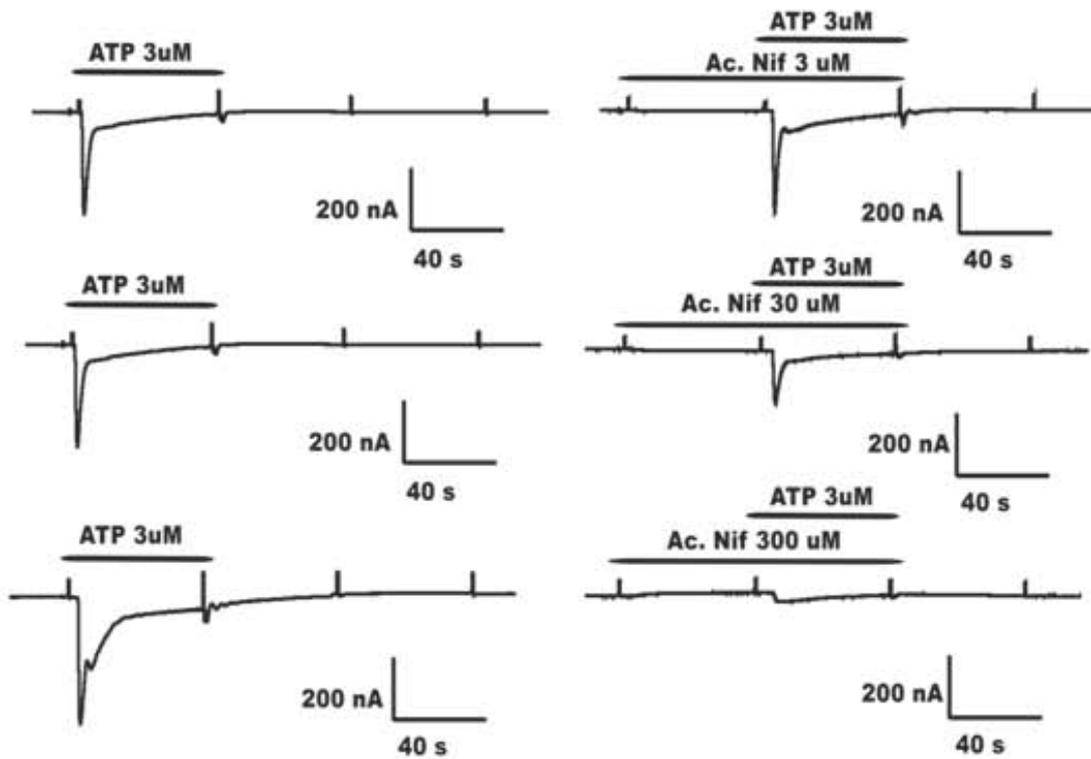
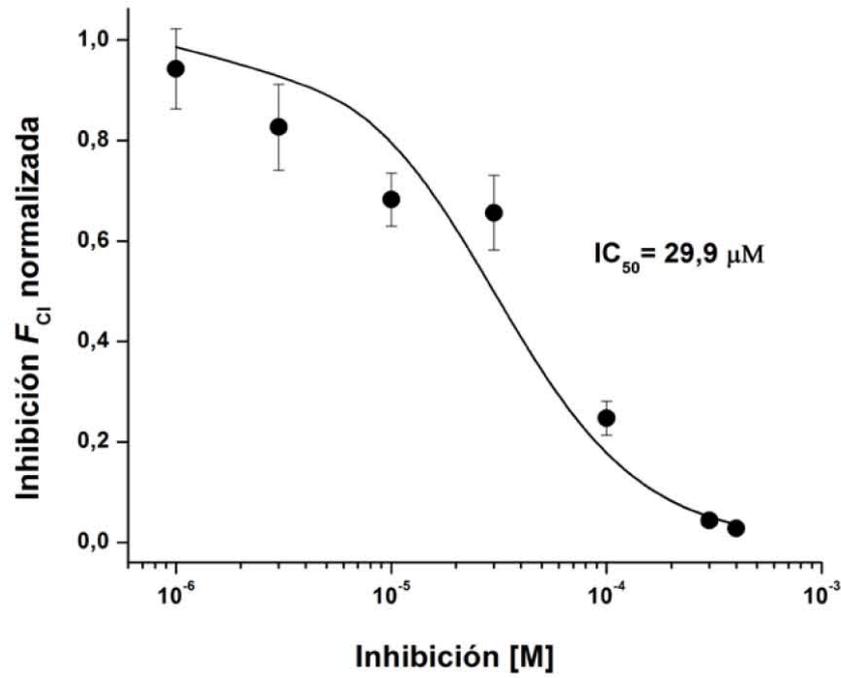


Figura 14. Curva dosis respuesta para ácido niflúmico en foliculos e.t.r de *Xenopus laevis*. A) curva dosis respuesta. B) trazos representativos para cada concentración del bloqueador. n=31 foliculos de 7 donadores.

A



B

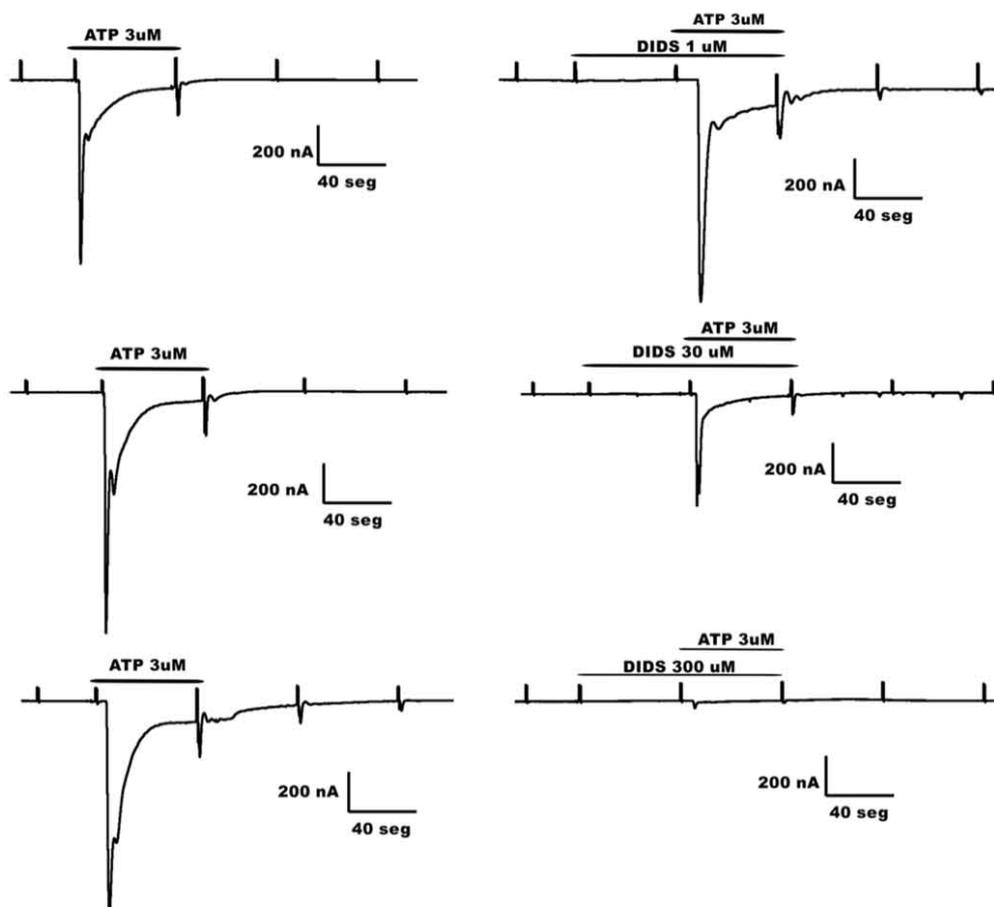


Figura 15. Curva dosis respuesta para DIDS en folículos *e.t.r* de *Xenopus laevis*. A) curva dosis respuesta. B) trazos representativos para cada concentración del bloqueador. n= 13 folículos de 2 donadores.

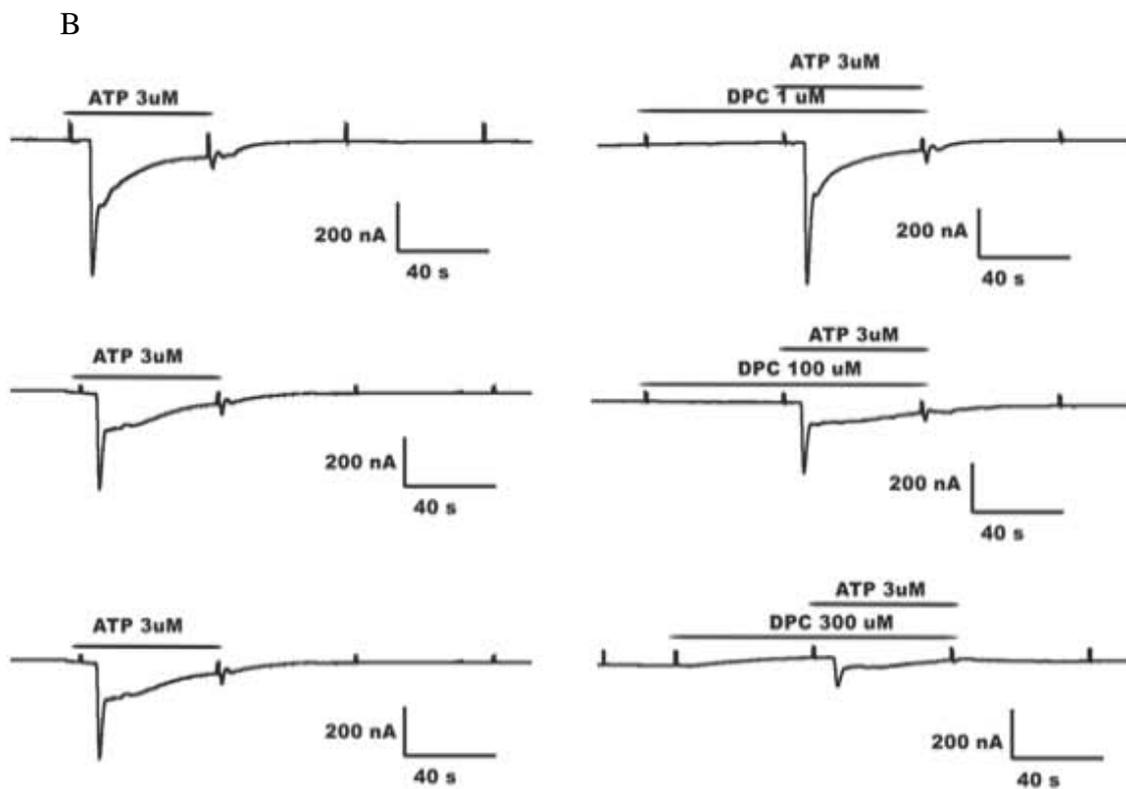
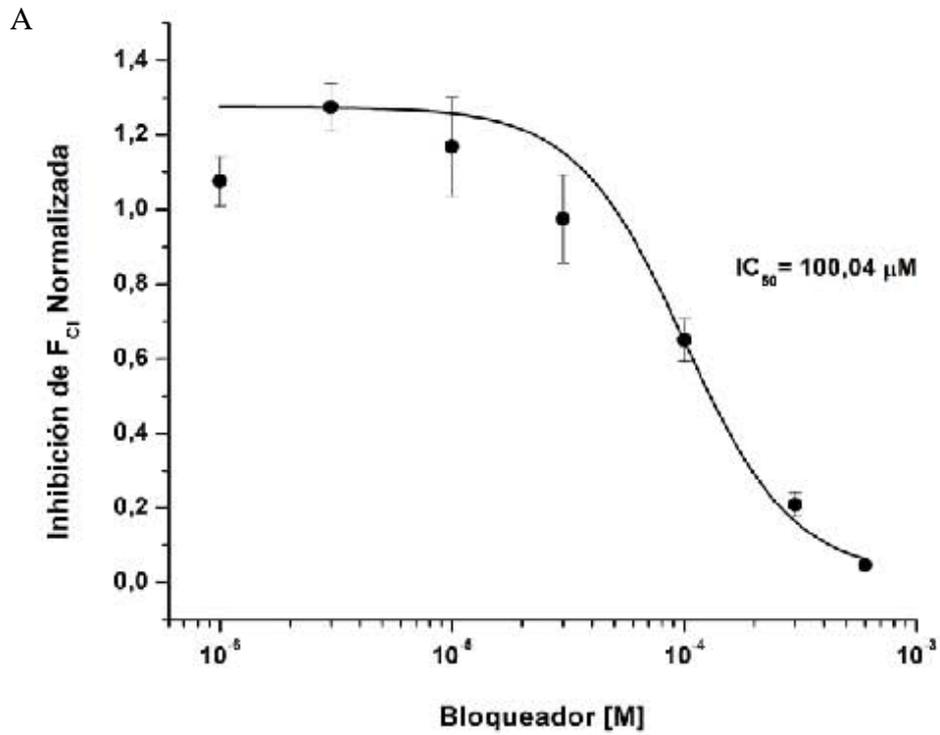
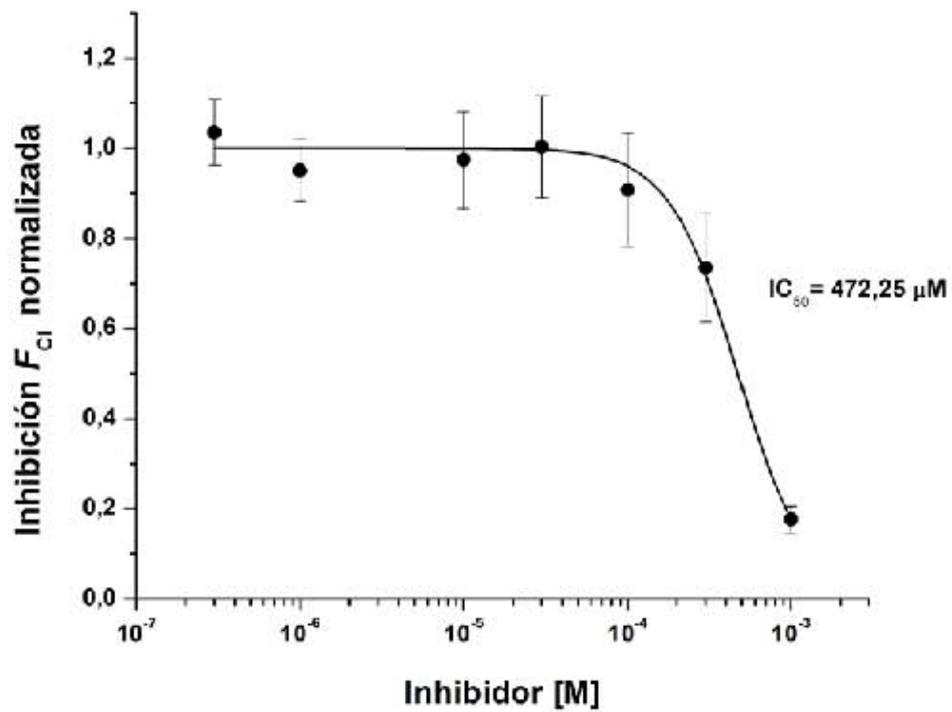


Figura 16. Curva dosis respuesta para DPC en folículos *e.t.r* de *Xenopus laevis*. A) curva dosis respuesta. B) trazos representativos para cada concentración del bloqueador. n=26 folículos de 6 donadores.

A



B

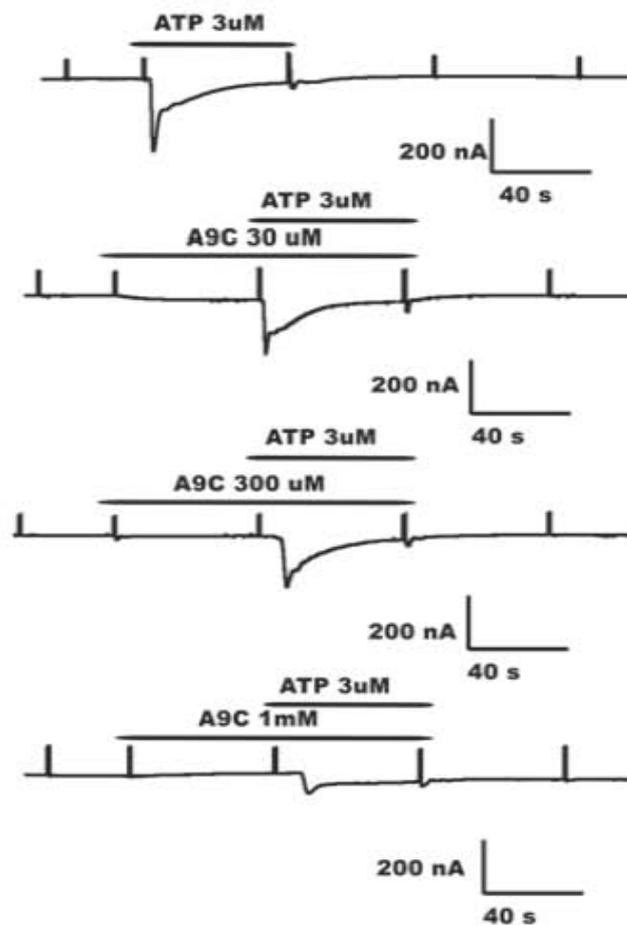


Figura 17. Curva dosis respuesta para A9C en foliculos *e.t.r* de *Xenopus laevis*. A) curva dosis respuesta. B) trazos representativos para cada concentración del bloqueador. n=29 foliculos de 7 donadores.

Las IC_{50} obtenidas tuvieron los siguientes valores: $27.18 \pm 3 \mu M$ para ácido niflúmico, $29,9 \pm 0,73 \mu M$ para DIDS, $100,04 \pm 16.12 \mu M$ para DPC y $472,25 \mu M \pm 36,67 \mu M$ para A9C. Estos valores indicaron que el orden de potencia para el bloqueo de los canales involucrados en la F_{Cl} correspondió a: Ac. Niflúmico >DIDS>DPC>A9C (Tabla I). Los coeficientes de Hill fueron 1.56 para ácido niflúmico, 1.27 para DIDS, 1,86 para DPC y 2,05 para A9C.

		Presente trabajo	Trabajos de otros investigadores	
	Referencias	2012	Qu & Hartzell (2001)	Oh <i>et al.</i> (2008)
	Preparación	Folículo ovárico (e.t.r.) de <i>Xenopus laevis</i>	Ovocito de <i>Xenopus laevis</i>	Ovocito de <i>Xenopus laevis</i>
Ácido Niflúmico		27.18 ^a	12.9 ^b	37,3 ^a
DIDS		29,9 ^a	562 ^b	10,7 ^a
DPC		100,04 ^a	323 ^b	88,1 ^a
A9C		472.25 ^a	158 ^b	94,3 ^a

^a Valor obtenido al potencial de membrana de -60 mV

^b Valor obtenido al potencial de membrana de 0 mV

Tabla I. Comparación de los valores obtenidos para la IC_{50} en la inhibición de canales $I_{Cl,Ca}$ en diferentes preparaciones de *Xenopus*. Para el caso del presente trabajo los datos se ajustaron al modelo basado en la fórmula de Hill en OriginPro 8.5. IC_{50} : Concentración a la que se obtiene el 50% de la inhibición de la respuesta máxima.

Cabe señalar, que para algunos bloqueadores aplicados en bajas concentraciones pareció ocurrir un efecto potenciador, sin embargo, este efecto podría haber sido producido por el DMSO ya que la aplicación de este solvente en una concentración de $0.3 \mu M$ a $1mM$ provocó un aumento en la respuesta a ATP en dos series de experimentos.

8. DISCUSIÓN

Los antecedentes en nuestro laboratorio han mostrado que los folículos de varias especies expresan un sistema de comunicación purinérgico entre las células foliculares y el ovocito (Arellano et al., 1996, 2002). Se postula que el ovocito y las células foliculares expresan diversas moléculas de señalización para regular o controlar procesos puntuales e importantes como por ejemplo la maduración del gameto (e.g., Honoré & Lazdunski, 1991; Wibrand *et al.*, 1992). Sin embargo, existen respuestas entre estos dos tipos celulares que deben tener implicaciones fisiológicas más generales referentes a procesos que ocurren durante toda la etapa de la foliculogénesis. Esta idea surge precisamente por una de las respuestas que proviene de las células foliculares y de la que se deriva el presente estudio; esta respuesta es la corriente F_{Cl} cuya caracterización a nivel molecular se pretende dilucidar. Uno de los elementos ejes de este estudio fue el receptor de tipo P2Y activado por ATP y acoplado a proteínas G_q que conlleva a un aumento en la síntesis de IP_3 por la vía de la PLC y el consecuente aumento intracelular de Ca^{2+} . Esto a su vez activa canales de Cl^- provocando al menos dos respuestas, la F_{Cl} y la I_{iw} (Arellano *et al.*, 2012). Por datos previos de nuestro laboratorio, se sabía que el receptor que genera el aumento intracelular de Ca^{2+} en las células foliculares para generar la respuesta F_{Cl} era de tipo P2Y por su sensibilidad tanto a transmisores purinérgicos como pirimidinérgicos (Arellano et al., 1998), cuya potencia es la siguiente: 2-MeSATP>UTP>ATP>BzATP. Esta secuencia no corresponde a ninguno de los receptores de tipo P2Y conocidos hasta el momento, aunque existen varios receptores de mamífero que comparten algunos de los agonistas que muestran una secuencia de potencia diferente. Por ejemplo, el receptor P2Y₂ responde a UTP=ATP>BzATP>2meSATP; el P2Y₄ a UTP=ATP=BzATP; el P2Y₆ responde a UTP>ADP>2meSATP, mientras que el receptor P2Y₄ de *Xenopus* responde a UTP=ATP>>2meSATP>BzATP (Bogdanov *et al.* 1997, Burnstock, 2004). Con estos antecedentes el candidato molecular más probable era el receptor P2Y₄ que también se ha demostrado en nuestro laboratorio es expresado en las células foliculares. Por estas razones, aquí se diseñaron y trataron de introducir por electroporación oligonucleótidos antisentido para disminuir la expresión de este receptor.

Por otra parte, este estudio pretendió la caracterización farmacológica de los canales de Cl^- implicados en la generación de la respuesta F_{Cl} que completa el objetivo general de este trabajo. Por el trabajo previo (Arellano *et al.*, 1998, 2012), queda demostrado que los canales que generan dicha respuesta son canales $I_{\text{Cl,Ca}}$. No obstante, no se tenía ninguna información pertinente a su identidad molecular que es determinante para manipular su expresión y tratar de saber cuáles son los mecanismos por los cuales estos canales ejercen su función. El candidato molecular más plausible que formaría los canales $I_{\text{Cl,Ca}}$ es la proteína conocida como TMEM16A (Caputo *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Schroeder *et al.*, 2008), la expresión exógena de esta proteína recapitula las propiedades esperadas para los canales $I_{\text{Cl,Ca}}$. En el caso del ovocito de *Xenopus*, es probable que TMEM16A sea la proteína que forme los canales endógenos. Esto sugiere, dada su semejanza, que los canales $I_{\text{Cl,Ca}}$ que están en las células foliculares del ovocito tengan la misma naturaleza proteínica.

Teniendo como marco general los puntos anteriores, la discusión de este trabajo se centra entonces en estos dos elementos fundamentales de la generación de la respuesta F_{Cl} de las células foliculares que se explicarán con detalle a continuación.

8.1 Transfección por electroporación *in vivo* y silenciamiento del receptor P2Y₄

El primer elemento a discutir tiene que ver con el receptor P2Y₄ y su participación en la respuesta F_{Cl} . Para saber si este receptor participa o no y de qué manera lo hace, utilizamos la estrategia de silenciar de manera selectiva la expresión del receptor en cuestión. El antagonismo del receptor utilizando farmacología no representa actualmente una opción, ya que no se conocen drogas selectivas para cada subtipo, ni para el receptor P2Y₄ específicamente. Por lo tanto, la manera que diseñamos fue tratar de silenciar el receptor por medio de la transfección de oligonucleótidos antisentido dirigidos a inhibir la traducción del ARNm que codifica para P2Y₄, estrategia que se ha seguido en otros modelos celulares (Van Tendeloo *et al.*, 2001). Para alcanzar ese objetivo desarrollamos un

estudio sistemático para conocer las condiciones en las que las células foliculares podrían cargarse con alguna droga al ser electroporadas sin desacoplarse del ovocito.

Después de un tratamiento de transfección por la técnica de lipofección, los resultados no fueron satisfactorios, en cuanto a las necesidades mencionadas arriba, tampoco pareció que la eficiencia de transfección fuera muy alta teniendo como comparación la transfección de células SKOV-3. Por esto decidimos tomar como alternativa la técnica de transfección por electroporación *in vivo*, que es utilizada frecuentemente por poseer algunas ventajas, como por ejemplo, menor impacto negativo sobre las células y mayor eficiencia de transfección (Teissie J *et al.*, 2005).

Una desventaja de la electroporación es sin lugar a dudas el que es dependiente del tipo celular a electroporar, por lo que nuestro primer paso fue determinar las condiciones adecuadas de electroporación. Los diferentes protocolos utilizados para la electroporación *in vivo* se basaron en modelos de ovocitos de ratón, células de la retina y en el mismo *Xenopus* en células neuronales (Liu & Haas, 2011) como punto de partida en la estandarización para su uso en los folículos, i.e., células foliculares. Teniendo como referentes a estos modelos, la primera aproximación para evaluar la eficiencia en el cargado de moléculas que se quiso tener fue a través de la microscopia de fluorescencia (Figura 7), introduciendo en el folículo un trazador no liposoluble que nos diera indicios de que las condiciones de electroporación eran adecuadas para un cargado eficiente. Puesto que las imágenes obtenidas solo representaban una aproximación cualitativa, se decidió entonces evaluar el cargado de una sustancia cuyos efectos se conocen sobre la respuesta F_{Cl} , utilizando los parámetros de electroporación encontrados, y que nos permitiera evaluar en paralelo dos características importantes para nuestro método de cargado: 1) que mantuviera la comunicación entre las células foliculares y el ovocito de tal manera que nos permitiera evaluar eléctricamente su acoplamiento hasta por alrededor de 72 h, y 2) que nos permitiera evaluar la eficiencia de cargado de la sustancia sobre una respuesta conocida. Elegimos entonces intentar cargar los folículos con EGTA por electroporación. Se sabe que el cargado de las células foliculares con este tipo de quelantes utilizando otras técnicas inhibe por completo la

generación de la respuesta F_{Cl} (Arellano *et al.*, 2012). Después de varios ensayos, donde se modificaron los 4 parámetros que consideramos más importantes, se obtuvo un protocolo en el que el daño a las células foliculares y/o su acoplamiento con el ovocito fueron mínimos, y al mismo tiempo se logró tener un efecto inhibitorio sobre la amplitud de la respuesta F_{Cl} activada por ATP. El efecto de disminución de la amplitud de la respuesta por la electroporación en presencia del EGTA se logró a una concentración de 20 mM aplicando 5 ó 15 pulsos cuadrados de 50 V cada uno y de 10 ms de duración. Demostramos también que este efecto fue específico del EGTA ya que una concentración menor de EGTA de 2 mM aplicando el protocolo de 5 pulsos no provocó una disminución en la eficiencia aparente del tratamiento. Esto sugirió fuertemente que los efectos sobre la respuesta F_{Cl} fueron dependientes de la concentración de EGTA cargada, y por lo tanto que efectivamente el procedimiento permitió el influjo del quelante en una concentración suficiente para inhibir la respuesta folicular. Otro elemento de importancia en estos experimentos fue la observación correspondiente a que en los controles, la electroporación no provocó desacoplamiento de la preparación en tiempos largos de incubación (24-48 h) después de la electroporación, esto es necesario ya que ante el cargado de un antisentido se requiere de un tiempo de incubación prolongado.

Una vez estandarizada la técnica con la inhibición de la corriente F_{Cl} , el siguiente paso en el estudio fue introducir los oligonucleótidos antisentido diseñados para la inhibición del receptor P2Y₄. La Figura 12 muestra el efecto del asP2Y_{4a} después de 48 h de ser electroporado. En términos generales, los resultados obtenidos en los diferentes grupos hacen suponer que el efecto de este oligonucleótido antisentido en los folículos de *Xenopus* no es claro. Al parecer, aunque la viabilidad del folículo como tal no se afecte, el cargado de este antisentido no provocó ningún efecto significativo sobre la respuesta. En cambio, la segunda secuencia asP2Y_{4b} utilizada presentó una disminución de la amplitud de F_{Cl} cuando es comparada con el control electroporado pero no así cuando se compara con el control electroporado en la presencia de la secuencia oligo-control.

Un mayor número de datos, tal vez permitiría disminuir la incertidumbre en este resultado, sin embargo por ahora podemos argüir que nuestros resultados están indicando, sin ser los únicos, alguno o algunos de los siguientes escenarios: 1) el

método de electroporación desarrollado fue eficiente para cargar las células foliculares con EGTA pero no lo es para las condiciones de concentración utilizadas para los antisentidos, 2) el receptor P2Y₄ no está involucrado en la generación de la respuesta F_{Cl} por ATP, 3) la eficiencia de los antisentidos diseñados no es la óptima por lo que la proteína de P2Y₄ no disminuyó en nuestros experimentos, 4) la posible pérdida en la síntesis de P2Y₄ es compensada con la expresión de otro receptor, y 5) el receptor P2Y₄ no es el único involucrado en la generación de la respuesta F_{Cl} . Por ejemplo, es posible que aun y cuando la expresión de receptor P2Y₄ haya sido disminuida, la acción del ATP sobre el folículo pudiera involucrar otro receptor que actuando de manera conjunta diera como resultado la farmacología atípica observada para esta respuesta. En este sentido, sería importante estudiar la farmacología de la respuesta remanente de F_{Cl} una vez electroporados los folículos con los antisentidos. Algunos de los escenarios planteados podrían ser clarificados con experimentos en paralelo utilizando ensayos de Western blot para el receptor P2Y₄ en las células foliculares en cada uno de los grupos tratados. Otro escenario que planteamos es la eficiencia encontrada con EGTA pero no con los oligonucleótidos antisentido, debido probablemente a la concentración a la cual se deben electroporar los folículos con secuencias antisentido que como se ha reportado, es muy baja en varios tipos celulares. La realización de curvas de concentración podría ser de utilidad para determinar la concentración a la cual el oligonucleótido antisentido para este receptor inhiba la respuesta si no de manera absoluta, por lo menos de una manera casi total. En caso de que el aumento de la concentración de oligonucleótidos antisentido no sea efectivo, una estrategia que pudiera resolver el problema sería el uso de secuencias de siARN que pueden ser más efectivos para el caso de las células foliculares. Para asegurarnos de esto, sería conveniente marcar de manera fluorescente el oligonucleótido siARN y observar con microscopía confocal la internalización de la secuencia y posteriormente demostrar el efecto en la respuesta electrofisiológica. El último escenario aquí planteado es un sistema de compensación del folículo con la síntesis de otro receptor como consecuencia de la pérdida del receptor P2Y₄. Respecto a esto, experimentos de Western blot también nos ayudarían a dilucidar qué receptor aumenta su expresión una vez se abate la expresión del receptor P2Y₄. Para esto es necesario generar anticuerpos específicos de los receptores P2Y que son expresados en el folículo. Otra manera de poder determinar si existe la posibilidad

de otro receptor expresado como efecto compensatorio es mediante el silenciamiento de los receptores expresados en las células foliculares y posteriormente con farmacología determinar los cambios en la potencia de acción de los agonistas de receptores P2Y, o la medición del RNAm de los otros receptores P2Y que se expresan en las células foliculares.

8.2 Curvas dosis-respuesta con bloqueadores de canales de Cl⁻

Como se ha mencionado a lo largo de esta tesis, a pesar de los estudios a nivel biofísico y fisiológico de las corrientes generadas por canales $I_{Cl,Ca}$, la identidad molecular de estos canales no ha sido demostrada claramente. Una de las principales dificultades ha sido, que no existen actualmente bloqueadores específicos para canales $I_{Cl,Ca}$ y en muchos casos causan efectos secundarios en la maquinaria celular específicamente en otro tipos de canales que están actuando de manera indirecta en el comportamiento de estos canales. Otra gran dificultad ha sido los métodos para la expresión de cDNAs de estos canales en nuestro modelo puesto que la expresión endógena de canales $I_{Cl,Ca}$ en *Xenopus* no permite estudiar los encontrados en otros tipos celulares. Los métodos de expresión heteróloga en otros modelos desafortunadamente no habían sido posibles y los candidatos propuestos como proteínas formadoras de estos canales no recapitulaban las características de los canales $I_{Cl,Ca}$ en sus sistemas endógenos.

Sin embargo, pese a estas dificultades se sabe que los canales expresados en la membrana del ovocito, poseen características similares a los encontrados en músculo cardiaco, músculo liso, células secretoras de epitelio y neuronas (Qu & Hartzell, 2001), y recientemente ha sido demostrado que las células foliculares expresan canales similares cuyas propiedades biofísicas se asemejan a varios de ellos (Arellano *et al.*, 2012). Con estos antecedentes, nos propusimos reforzar esta observación realizando un estudio farmacológico utilizando los bloqueadores inespecíficos disponibles y comparar sus efectos con las preparaciones estudiadas previamente. Las figuras 14- 17 muestran los resultados obtenidos para cada uno

de los bloqueadores. De manera particular, llaman la atención 2 resultados en el análisis global:

- La potencia hipotetizada al principio de este trabajo, basada en lo observado en otros canales $I_{Cl,Ca}$, fue idéntica excepto por los resultados obtenidos con el bloqueador DIDS, la IC_{50} para esta droga difiere a la reportada anteriormente por el grupo de Oh (2008) en ovocitos desnudos de *Xenopus laevis*. Al comparar también nuestro orden de potencia con el que se reporta por otro grupo a un potencial de mantenimiento de 0 mV, los resultados que se obtuvieron difieren especialmente para DIDS y DPC.
- Aparentemente existe un efecto potenciador en bajas dosis de DMSO. Este efecto observado en nuestro modelo no ha sido reportado en la literatura para otros canales $I_{Cl,Ca}$. Sin embargo, podría ser de importancia ya que se han utilizado diferentes proporciones de este solvente en diferentes condiciones. Para demostrar esto, un mayor número de experimentos sería necesario.

En el primer punto, la variación importante de la dosis media de inhibición podría ser el resultado de nuestras condiciones de experimentación. Por ejemplo, en nuestro estudio se realizaron las curvas de inhibición a un potencial de mantenimiento de -60 mV. Se sabe que el efecto inhibitor de algunos bloqueadores para estos canales son dependientes de voltaje como ocurre con DIDS, DPC y A9C (Qu & Hartzell, 2001). Por lo tanto, la dosis media de inhibición puede cambiar de manera importante si se modifica el voltaje de mantenimiento. Al comparar los resultados que se obtuvieron con los reportados en la literatura también a un potencial de mantenimiento de -60 mV (Oh *et al.* 2008), existe una diferencia importante con la potencia de A9C. Nuestro trabajo reportó una baja acción de bloqueo a -60 mV mientras que la literatura reporta que esta droga es 4 veces más potente en ovocito desnudo de *X. laevis* (ver tabla 1). Pese a esto, el orden de potencia reportado es idéntico a excepción de DIDS.

Al comparar nuestros resultados con resultados de la literatura en donde el potencial de mantenimiento es 0mV, los valores y el orden de potencia de estos bloqueadores difiere casi en su totalidad (ver tabla 1 y Qu & Hartzell, 2001). La

hipótesis es que a potenciales más hiperpolarizantes, la acción del bloqueador disminuirá y los valores de IC_{50} serán en consecuencia más altos. Se espera por tanto que si se realizaran estos experimentos cambiando el voltaje de mantenimiento para células foliculares, la potencia de todos los bloqueadores a excepción del ácido niflúmico cuya acción aparentemente no tiene dependencia de voltaje, fuera mayor y en consecuencia, los valores de IC_{50} para casi todas las drogas fueran menores.

En el caso particular de A9C, la dosis media obtenida en este trabajo (472,25 μ M) es similar con la dosis utilizada para promover la actividad miotónica en husos de músculo esquelético reportada recientemente, donde la dosis efectiva del bloqueador fue de 512 μ M para ver el efecto en la baja conductancia de los canales y las implicaciones de este fenómeno sobre la acción muscular (Bandschapp *et al.*, 2012). El efecto observable de inhibición casi total de la respuesta F_{CI} fue a una concentración de 1 mM. Esto pudo deberse a que el DMSO en esta concentración puede causar daño celular como se ha reportando. No obstante, se realizaron experimentos mostrando que el efecto de la casi total disminución de la amplitud de la respuesta no fue debido al efecto del DMSO por si mismo sino a la acción del bloqueador.

Respecto al posible efecto que puede tener el DMSO sobre diferentes tipos celulares, se ha reportado que sus efectos en las células se pueden presentar a concentraciones por encima de 0.3-% en solución. Los efectos principales que tiene el DMSO sobre las células recaen en la morfología celular y las propiedades de membrana debido al cambio en la osmolaridad (Santos *et al.*, 2003). Para nuestro modelo farmacológico (a excepción de la aplicación de A9C donde se tuvo hasta 1% de DMSO en solución) el valor máximo de DMSO en solución fue de 0.1%. El DMSO es un solvente ampliamente utilizado que facilita la disolución de sustancias hidrofóbicas de prueba en soluciones de perfusión. Es bien sabido el efecto biológico del DMSO pero no se conoce casi ningún reporte en la literatura de cómo esta sustancia puede estar afectando las propiedades de los canales. No obstante, se sabe al respecto que el DMSO en canales hERG tiene efectos sobre la compuerta del canal de una manera voltaje dependiente ocasionando pequeños cambios en la potencia de los bloqueadores de estos canales, Con estos hallazgos, también se reportó el efecto que tiene con la aplicación del fármaco E-431 a bajas

concentraciones (3 nM) representado en un aumento de la cola de corriente de los canales hERG (Xiaoji *et al.*, 2006). Los mecanismos por los cuales ocurren estos aumentos en la corriente generada no son bien entendidos. Por tanto, se puede decir que el DMSO puede interferir no sólo en las propiedades del canal sino también en como un fármaco interactúa con el mismo. Debido a ello, es indispensable identificar el efecto del DMSO sobre las corrientes a estudiar y discriminar sobre el efecto del bloqueador. Por lo anterior, de esta tesis surge la posibilidad de aplicar las drogas bloqueadoras directamente sobre la solución tanto como sea posible teniendo en cuenta las propiedades de cada una de ellas así como se hizo para DIDS.

En cuanto a las potencias encontradas con los bloqueadores utilizados, aunque la hipótesis planteada no se cumple en su totalidad, existe evidencia inicial para pensar que estos canales de $I_{Cl,Ca}$ en las células foliculares, son similares a los ya reportados en el ovocito, es decir, estos canales se asemejan al canal TMEM16A. Este trabajo sobre los canales $I_{Cl,Ca}$ de las células foliculares, abre la posibilidad de estudios más exhaustivos en los que se analicen aspectos biofísicos de los mismos.

Dichos estudios deberán hacerse mediante las técnicas de patch clamp y la técnica de control de voltaje con dos electrodos donde el voltaje de mantenimiento sea cambiado. Esto con el fin de ver el efecto de los fármacos que ya se sabe, difiere de manera dependiente de voltaje. También sería importante estudiar si las células foliculares tienen sólo un tipo de canales de Cl^- o expresan otros miembros de la familia TMEM16 que contribuyan a la diferencia en los valores exactos de la dosis media de inhibición aunque se debe tener presente también que estos canales se expresan de manera específica en cada tipo celular.

9. CONCLUSIONES

1. Se establecieron parámetros para cargar por electroporación folículos de *Xenopus laevis* con una sonda fluorescente y con EGTA que correspondieron a 10 pulsos de 50 V, de 10 ms de duración y latencia de 1 s entre pulsos.
2. El receptor P2Y₄ podría participar en la generación de la respuesta F_{Cl} .
3. Se requiere mejorar el diseño de cargado y/o el oligonucleótido antisentido; aumentar en lo posible su concentración y realizar un estudio de potencia para los diferentes agonistas 48 h después de cargados los antisentidos. Se requiere además de un análisis de Western blot para analizar la eficiencia del modelo directamente sobre la abundancia de la proteína P2Y₄.
4. Los resultados farmacológicos sugieren que los canales $I_{Cl,Ca}$ expresados en las células foliculares, son similares a los presentes en los ovocitos de *Xenopus laevis* y probablemente ambos estén formados por la proteína TMEM16A.

REFERENCIAS

Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. 2009. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* Jan; 32(1):19-29.

Burnstock G, Verkhratsky A. 2009. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiol. (Oxf).*195:415-447.

Angers S., Salahpour A., and Bouvier M. 2002. Dimerization: an emerging concept for G protein coupled receptor ontogeny and function. *Annu. Rev.Pharmacol.Toxicol.* 42, 409–435.

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.* 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.

Arellano RO, Robles-Martínez L, Serrano-Flores B, Garay E, Vázquez-Cuevas F. 2012. Agonist-activated Ca(2+) influx and Ca(2+) -dependent Cl(-) channels in Xenopus ovarian follicular cells: Functional heterogeneity within the cell monolayer. *J. Cell Physiol.* 227:3457-3470

Bader CR, Bertrand D, Schwartz EA. 1982. Voltage-activated and calcium activated currents studied in solitary rod inner segments from the salamander retina. *J. Physiol.* 331:253–284.

Bandschapp O, Soule CL, Laizzo PA. 2012. Lactic acid restores skeletal muscle force in an in vitro fatigue model: are voltage-gated chloride channels involved? *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 302:C1019-1025.

Berecki G, Varga Z, Van Iren F, and Van Duijn B. 1999. Anion channels in characorallina tonoplast membrane: calcium dependence and rectification. *J. Membr. Biol.* 172:159–168.

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.

Bogdanov YD, Dale L, King BF, Whittock N, Bunstock G. 1997. Early expression of a novel nucleotide receptor in the neural plate of Xenopus embryos. *J. Biol. Chem.* 272: 12583-12590.

Bogdanov YD, Wildman SS, Clements MP, King BF, Bunstock G Molecular cloning and characterization of rat P2Y4 nucleotide receptor. 1998. *Br J Pharmacol.* 124:428-430.

Born G. V. 1962. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194:927-9.

Burnstock G. 1972. Purinergic nerves. *Pharmacological reviews* 24: 509-581.

Burnstock G. 1978. Purinergic signalling: past, present and future. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42:3-8.

Burnstock G. 2004. "Introduction: P2 Receptors". *Curr. Top Med. Chem.* 4: 793-803.

Burnstock G, Knight GE. 2004. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cytol.* 240: 31–304.

Burnstock G. 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87:659–797.

Burnstock G. 2007. Purines and Pyrimidines receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 1471 – 1483.

Burnstock G. & Verkhrastky A. 2009. Evolutionary origin of the purinergic signaling system. *Acta physiol.* 195: 415-447.

Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, Pfeffer U, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O, Galiotta LJ. 2008. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 322:590-594.

Chan JH, Lim S, Wong WS. 2006. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33:533-540.

Christofi FL. 2008. Purinergic receptors and gastrointestinal secretomotor function. *Purinergic Signal* 4:213-236.

Cross NL. 1981. Initiation of the activation potential by an increase in intracellular calcium in eggs of the frog, *Rana pipiens*. *Dev. Biol.* 85:380–384.

Cunningham SA, Awayda MS, Bubien JK, Ismailov II, Arrate MP, Berdiev BK, Benos DJ, and Fuller CM .1995. Cloning of an epithelial chloride channel from bovine trachea. *J Biol Chem.* 270:31016–31026.

Dargan SL, Demuro A, Parker I. 2006. Imaging Ca²⁺ signals in Xenopus oocytes. *Methods Mol. Biol.* 322:103-119.

Diambra, L. & Marchant J. 2009. Experimental insights into the functional activation of IP3 receptors. *Chaos* 19: 037103-1-037103-8.

Dong H., Smith A, Hovaida M, & Chow J. J. 2006. Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in duodenal mucosal ion transport and bicarbonate secretion. *Am. J. Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 291:G1120-1128.

Drury, AN, Szent-Gyorgyi A. 1929. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol. (Lond.)* 68: 213-237.

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

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

Duran C, C.H, Xiao Q, Hartzell C. 2010. Chloride Channels: Often enigmatic, rarely predictable. *Annu. Rev. Physiol.* 72: 95–121.

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.

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. 814p.

Honoré E, Lazdunski M.1991. Biophysical, pharmacological and developmental properties of ATP-sensitive K⁺ channels in cultured myotomal muscle cells from *Xenopus* embryos. *Pflugers Arch.* 429:607-616.

Housley GD, Bringmann A, Reichenbach A. 2009. Purinergic signaling in special senses. *Trends Neurosci.* 32:128-41.

Hu Y, Fiset PL, Denlinger LC, Guadarrama AG, Sommer JA, Proctor RA, Bertics PJ. 1998. Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *J Biol. Chem.* 273:27170-27175.

Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA.2002. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol. Rev.* 82:503–568.

Katja Sobczak, Nadine Bangel-Ruland, Geraldine Leier, Wolf-Michael Weber. 2010. Endogenous transport systems in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane. *Methods* 51: 183–189.

Kleene SJ and Gesteland RC.1991. Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia. *J. Neurosci.* 11:3624–3629.

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.* 328:143-70.

Large WA, Wang Q. 1996. Characteristics and physiological role of the Ca⁽²⁺⁾-activated Cl⁻ conductance in smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 271:C435-454.

Liu XF, Haas K. 2011. Single-cell electroporation of *Xenopus* tadpole tectal neurons. *Cold Spring Harb. Protoc.* 1:2011(9).

Lotan I, Dascal N, Cohen S & Lass Y. 1982. Adenosine-induced slow ionic currents in the *Xenopus* oocyte. *Nature*. 298:572-574.

Lotan I, Dascal N, Cohen S & Lass Y. 1986. ATP-evoked membrane responses in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch*. 406:158-162.

Maller JL. 1986-1987. Mitogenic signalling and protein phosphorylation in *Xenopus* oocytes. *J. Cyclic. Nucleotide Protein Phosphor. Res.* 11:543-555.

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.

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.* 127-128:267-281.

Manoury B, Tamuleviciute A, Tammaro P. 2010. TMEM16A/anoctamin 1 protein mediates calcium-activated chloride currents in pulmonary arterial smooth muscle cells. *J. Physiol.* 588:2305-2314.

Maricq AV & Korenbrot JI. 1988. Calcium and calcium-dependent chloride currents generate action potentials in solitary cone photoreceptors. *Neuron* 1:503–515.

Miledi R. 1982. A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 215:491–97.

Miledi R, Parker I. 1984. Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 357:173–183.

Mónaco M, Villeco E & Sánchez S. 2007. Implications of gap junction coupling in amphibian vitellogenin uptake. *Zigote* 15: 149-157.

Oh SJ, Park JH, Han S, Lee JK, Roh EJ, Lee CJ. 2008. Development of selective blockers for Ca²⁺-activated Cl⁻ channel using *Xenopus laevis* oocytes with an improved drug screening strategy. *Molecular Brain* 1:14.

Ousingsawat J, Martins JR, Schreiber R, Rock JR, Harfe BD, Kunzelmann K. 2009. Loss of TMEM16A causes a defect in epithelial Ca²⁺-dependent chloride transport. *J. Biol. Chem.* 284: 28698-28703.

Papassotiriou J., Eggermont J., Droogmans G & Nilius B. 2001. Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in Ehrlich ascites tumor cells are distinct from mCLCA1, 2 and 3. *Pflugers Arch.* 442:273-279.

Patiño R & Purkiss R. 1993. Inhibitory Effects of n-Alkanols on the Hormonal Induction of Maturation in follicle-enclosed *Xenopus* Oocytes: Implications for Gap junctional transport of Maturation-Inducing steroid. *General and Comparative Endocrinology* 91:189-198.

Qu Z, Hartzell HC. 2000. Anion permeation in Ca(2+)-activated Cl(-) channels. *J. Gen. Physiol.* 116:825-44.

Qu Z, Hartzell HC. 2001. Functional geometry of the permeation pathway of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels inferred from analysis of voltage-dependant block. *J. Biol. Chem.* 276:18423-18429.

Qu, Z., R. W. Wei, W. Mann, and H. C. Hartzell. 2003. Two bestrophins cloned from *Xenopus laevis* oocytes express Ca²⁺-activated Cl⁻ currents. *J. Biol. Chem.* 278:49563–49572.

Ralevic V. & Burnstock G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews* 50: 413-492.

Romero-Rosales VJ. 2006. Análisis funcional de los receptores purinérgicos en el folículo de *Xenopus*. Tesis de maestría, Instituto de Neurobiología, UNAM. 66 p.

Saldaña C, Vázquez CF, Garay E, Arellano RO. 2005. Epithelium and/or theca are required of 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.

Santos, N. C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., & Saldanha, C. 2003. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology* 65: 1035–1041.

Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, Jan LY. 2008. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* 134:1019-1029.

Schultz A & Schöneberg T. 2003. The Structural Evolution of a P2Y-like G-protein-coupled Receptor. *The J. of Biol. Chem.* 278: 35531–35541.

Stinnakre J, Van Renterghem C. 1986. Cyclic adenosine monophosphate, calcium, acetylcholine and the current induced by adenosine in *Xenopus* oocyte. *J. Physiol.* 374:551-569.

Sun, H., T. Tsunenari, K. W. Yau, and J. Nathans. 2002. The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:4008–4013.

Surprenant A & North R.A. 2009. Signaling at Purinergic P2X Receptors. *Annu Rev Physiol.* 71:333-59.

Taylor CW, Taufiq-Ur-Rahman, & Pantazaka E. 2009. Targeting and clustering of IP3 receptors: Key determinants of spatially organized Ca²⁺ signals. *Chaos* 19:037102.

Teissie J, Golzio M, Rols MP. 2005. Mechanisms of cell membrane electropermeabilisation: a minireview of our present (lack of?) knowledge. *Biochim. Biophys. Acta* 1724:270–280.

Van Renterghem, C., Penit-Soria, J & Stinnake, J. 1985. B-adrenergic induced potassium current in *Xenopus* oocytes: Role of cyclic AMP, inhibition by muscarinic agents. *Proc. Roy. Soc. B.* 223: 389-402.

Van Tendeloo VFI, Ponsaerts P, Lardon F, Nijs G, Lenjou M, Van Broeckhoven C, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. 2001. Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood* 98:49–56.

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, Zárata-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.

Wang HS, Dixon JE, McKinnon D. 1997. Unexpected and differential effects of Cl⁻ channel blockers on the Kv4.3 and Kv4.2 K⁺ channels. Implications for the study of the I(to2) current. *Circ. Res.* 81:711-718.

Webb D, Nuccitelli R. 1985. Fertilization potential and electrical properties of the *Xenopus laevis* egg. *Dev. Biol.* 107:395–406.

Whitaker M. 2006. Calcium at fertilization and in early development. *Physiol. Rev.* 86:25-88. White MM, Aylwin M. 1990. Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca²⁺-activated G_f channels in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.* 37:720–24.

White MM, Aylwin M. 1990. Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.* 37:720-724.

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. USA* 84: 4135-4139.

Wu G, Hamill OP. 1992. NPPB block of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch.* 420:227-229.

Xiaoyi Du, Daniel Lu, Eric D. Daharsh, Aizhen Yao, Rebecca Dewoody, Jian-An Yao. 2006. Dimethyl sulfoxide effects on hERG channels expressed in HEK293 cells. *J. of Pharmacol. Toxicol. Methods* 54: 164–172.

Xu WX, Kim SJ, So I, Kang TM, Rhee JC, Kim KW. 1997. Volume-sensitive chloride current activated by hyposmotic swelling in antral gastric myocytes of the guinea-pig. *Pflugers Arch.* 435:9-19.

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.

Yoshioka K., Saitoh O., & Nakata H. 2002. Agonist-promoted heteromeric oligomerization between adenosine A1 and P2Y1 receptors in living cells. *FEBS Lett.* 523:147–151.

Yu F, Sun L, Machaca K. 2010. Constitutive recycling of the store-operated Ca²⁺ channel Orai1 and its internalization during meiosis. *J. Cell Biol.* 191:523-535.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión y de barrido del folículo ovárico de <i>Xenopus laevis</i>	7
Figura 2. Esquema de la técnica de transfección por lipofección	25
Figura 3. Esquema de la técnica de transfección por electroporación <i>in vivo</i>	27
Figura 4. Esquema de la técnica de control de voltaje con dos electrodos	30
Figura 5. Esquema de los protocolos de registro.....	30
Figura 6. Lipofección de células foliculares aisladas del folículo de <i>Xenopus laevis</i>	35
Figura 7. Electroporación del folículo e.t.r de <i>Xenopus laevis</i>	37
Figura 8. Electroporación de folículos e.t.r de <i>Xenopus laevis</i> : Respuesta F_{Cl}	42
Figura 9. Efecto del quelante EGTA sobre las células foliculares acopladas al ovocito en <i>Xenopus laevis</i> transfectadas por electroporación.....	42
Figura 10. Efecto del cargado con 2mM de EGTA en el folículo e.t.r de <i>Xenopus laevis</i> usando dos protocolos de electroporación.....	43
Figura 11. Efecto del cargado con 20mM de EGTA en el folículo e.t.r de <i>Xenopus laevis</i> usando dos protocolos de electroporación.....	43
Figura 12. Electroporación del oligonucleótido asP2Y _{4a} para silenciar el receptor P2Y ₄ en el folículo e.t.r de <i>Xenopus laevis</i>	44
Figura 13. Electroporación del oligonucleótido asP2Y _{4b} para silenciar el receptor P2Y ₄ en el folículo e.t.r de <i>Xenopus laevis</i>	45
Figura 14. Curva dosis respuesta para ácido niflúmico en folículos e.t.r de <i>Xenopus laevis</i>	47
Figura 15. Curva dosis respuesta para DIDS en folículos e.t.r de <i>Xenopus laevis</i> . .	48
Figura 16. Curva dosis respuesta para DPC en folículos e.t.r de <i>Xenopus laevis</i> ...	49
Figura 17. Curva dosis respuesta para A9C en folículos e.t.r de <i>Xenopus laevis</i>	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Valores obtenidos para la IC_{50} de la inhibición de la corriente ($I_{Cl,Ca}$)	51
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

2-meSATP	2-metil-tio-ATP
A9C	Ácido 9-antracencarboxílico
Ac. Nif.	Ácido niflúmico
ACh	Acetil colina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ADO	Adenosina
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
AMPc	Adenosina 5'-monofosfato cíclico
ANO	Anoctamina
ANO1	Anoctamina 1
ATP	Adenosina 5'-trifosfato.
BAPTA	Ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi)etano—N,N,N',N'- tetra acético.
Br⁻	Bromo
Ca²⁺	Calcio
I_{Cl,Ca}	Canales de cloro dependientes de calcio
CAMKII	Proteína cinasa Ca ²⁺ /calmodulina-dependiente
CFTR	Regulador de conductancia transmembranal de fibrosis quística
Cl⁻	Cloruro
CTP	Citidin trifosfato
CTRL	Control
CX38	Conexina 38
DIDS	Ácido 4, 4'-diisotiocianatostilben 2, 2'- disulfónico
DMSO	Dimetil sulfoxido
DPC	Ácido 2-(anilino) benzoico
e.t.r	Epitelio y teca removidos
EDTA	Ácido etilen-diamin-tetracético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis (β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetracético
F⁻	Flúor

F_{Cl}	Corriente rápida de cloro
GTP	Guanosín trifosfato
HEPES	Acido 2-(4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinil) etanosulfónico
hERG	gen humano éter a go-go relacionado
I⁻	Yodo
IC₅₀	Concentración media de inhibición
I_{iw}	Corriente entrante dependiente de calcio
IK	Canales de potasio con conductancia intermedia
I_{K,CAMP}	Corriente de potasio dependiente de AMPc
IP₃	Inositol 1, 4,5- trifosfato
K⁺	Potasio
NO₃	Nitrato
NPPB	5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)-benzoato
PLC	Fosfolipasa C
RN	Ringer normal
RT-PCR	Reacción en cadena de polimerasa- transcriptasa reversa
S_{Cl}	Corriente lenta de cloro
SFB	Suero fetal bovino
SKOV-3	Células de carcinoma ovárico
SOC	canales de cloro activados por almacenamiento
TMEM16	Proteína transmembranal de función desconocida 16
UDP	Uridina 5'- difosfato
UTP	Uridina 5'- trifosfato
VRAC	Canales aniónicos regulados por volumen