



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFEECTO DE LA EXPRESIÓN DE UN CANAL DE POTASIO EN EL CICLO CELULAR

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

MARÍA DE LOURDES VÁZQUEZ CRUZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. LEONILA IRMA LAURA ESCOBAR PÉREZ

MÉXICO D.F. 2013





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

1. Datos del alumno

Vázquez
Cruz
María de Lourdes
50 16 31 73
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
303290229

2. Datos del tutor

Dra.
Leonila Irma Laura
Escobar
Pérez

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Gertrudis Hortensia
González
Gómez

4. Datos del sinodal 2

Dr.
José Luis
Arreola
Ramírez

5. Datos del sinodal 3

QFB
Beatriz
Díaz-
Bello

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Miguel Ángel
Palomino
Garibay

7. Datos del trabajo escrito.

Efecto de un canal de potasio en el ciclo celular
Participación del canal de potasio GIRK5 en el proceso de maduración de *Xenopus laevis*.
50
2013

Esta tesis de licenciatura se realizó bajo la dirección de la **Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez.**

Fue realizada en el Laboratorio de Canales Iónicos, del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la **Universidad Nacional Autónoma de México.**

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Gertrudis Hortensia González Gómez
Vocal	Dr. José Luis Arreola Ramírez
Secretario	Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez
1er Suplente	QFB Beatriz Díaz Bello
2° Suplente	M. en C. Miguel Ángel Palomino Garibay

El apoyo financiero para la realización de este trabajo fue brindado por:

Programa de Apoyo a la investigación e Innovación Tecnológica **PAPIIT**

- Proyecto No. IN202110

“IDENTIFICACIÓN Y PAPEL FISIOLÓGICO DE CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE EN EL RIÑÓN DE LA RATA”

Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología **CONACYT**

- Proyecto No. 166913

“UN NUEVO CANAL SECRETOR DE POTASIO Y UN CANAL DE AMONIO EN EL RIÑÓN. EFECTO DE LA DIETA DE POTASIO Y DE LA ACIDOSIS METABÓLICA

- Fundación para la acidosis tubular renal infantil en México **FUNATIM**

La **asesoría técnica** estuvo a cargo de la QFB **Beatriz Díaz-Bello.**

Agradezco la ayuda de la M en C. **Claudia Iveth Rangel García** con el **análisis estadístico.**

AGRADECIMIENTOS

Ésta tesis de licenciatura y la culminación de mi carrera no hubieran sido posible sin el apoyo de diversas personas, a las que deseo dedicar éste trabajo:

A mis padres, cuyo amor y apoyo incondicional me dieron la oportunidad de convertirme en Bióloga y madre a la vez. No habrá forma de agradecer las oportunidades que me brindaron, las cuales me hicieron crecer y cambiaron mi vida.

A la Dra. Laura Escobar, por dejarme ser parte de su grupo de trabajo y por el apoyo valioso y constante que me brindó durante este proyecto.

A mi madre, por tanto cariño y ayuda absoluta, por su ejemplo y su fuerza. Nunca sabrás cuán agradecida estoy contigo.

A mi padre, por los valores que inculcó en mí, por el amor incondicional que le brinda a su familia, por ser la persona más noble que conozco.

A mi querido Mauricio, que merece toda mi admiración y orgullo. Por sus palabras renovadoras siempre llenas de cariño y fuerza, por todo su amor. Por creer en mí.

A mi hermano Juan Carlos, por cuidarme, por darme tanto amor y apoyarme siempre, por todo el tiempo que me hizo reír. Por creer en mí.

A mi Darío, por ser la fuente de mi amor, de mi cariño, el color de mi vida.

A Beatriz Díaz, por todo el conocimiento que me brindó, por tenerme tanta paciencia, por ser una grandiosa amiga y maestra a la vez, un ejemplo a seguir. Por todos los momentos que compartimos juntas.

A Claudia Rangel, por su gran ayuda, su paciencia y amistad.

A Liliana, a Carolina, a Tere, a Zina a Antonio, a Rolando, a Olmo, y a Dylan, por su ayuda y por todos los momentos increíbles que me brindaron, por ser unas personas maravillosas.

Al Dr. Víctor Hugo Reynoso, por el apoyo y las oportunidades que me brindó durante mi carrera, pero sobre todo, por su invaluable amistad.

A Adriana y a Berenice, por tantos años a mi lado, por escucharme siempre, por tantos buenos momentos que me brindaron. Por ser mis mejores amigas.

A Lourdes Herrera, por la ayuda que me brindó con Darío, por ser una grandiosa persona.

A todas aquellas personas que en algún momento intervinieron para que pudiera continuar con mi carrera.

PARTICIPACIÓN DEL CANALE DE POTASIO GIRK5 EN EL PROCESO DE MADURACIÓN DE LOS OVOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*.

ÍNDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

2. ANTECEDENTES

2.1 *Xenopus laevis*

2.2 Ovocito de *Xenopus laevis*

2.2.1 Ovogénesis

2.3 Ciclo celular del ovocito

2.3.1 Arresto el ciclo celular

2.4 Activación de la AC por proteínas G

2.5 El arresto se mantiene por proteínas G α s y G β γ

2.6 Maduración del ovocito.

2.6.1 Andrógenos como activadores de la maduración

2.6.2 Maduración mediada por progesterona

2.6.3 Factor promotor de la maduración (MPF)

2.6.4 Inhibición de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA)

2.7 Segundo arresto meiótico

2.7.1 Reanudación de la meiosis II

2.8 Canales iónicos en el ovocito de *Xenopus laevis*.

2.8.1 Canales iónicos

2.8.2 Canales de potasio rectificadores entrantes(Kir)

2.8.2.1 Subfamilia Kir 3 (GIRK5)

2.9 El canal endógeno GIRK5 en los ovocitos de *Xenopus laevis*

2.9.1 Regulación de la expresión funcional del canal

2.10 Canal GIRK5-Y16A y GIRK5-K13AR14A.

2.11 Otros canales endógenos

3. HIPÓTESIS

4. OBJETIVOS

4.1 Generales

4.2 Particulares

5. MÉTODO

5.1 Estrategia experimental.

5.2 Transcripción *in vitro* del mRNA

5.3 Ovariectomía y manejo de los ovocitos de *Xenopus laevis*.

5.4 Ensayos previos con la progesterona en ovocitos.

5.4.1 Curva dosis-respuesta para determinar la dosis eficaz 50 de progesterona en ovocitos.

5.5 Microinyección del mRNA de los canales GIRK5 y sus mutantes.

6. RESULTADOS

6.1 Obtención de la Curva dosis-respuesta para determinar la dosis eficaz 50 de progesterona en ovocitos de *Xenopus* .

6.2 Efecto de la expresión del canal GIRK5 y del canal GIRK5Y16A en la maduración del ovocito, con progesterona.

6.3 Efecto de la expresión del canal GIRK5 y del canal GIRK5Y16A en la maduración del ovocito, sin progesterona.

6.4 Resultados de la prueba estadística

7. DISCUSIÓN

7.1 La mutante GIRK5Y16A acelera la maduración

7.2 Maduración sin progesterona

7.3 La mutante GIRK5Y16A, las subunidades $G\beta\gamma$ y $G\alpha_s$.

7.4 Participación del canal GIRK5 en la maduración de los ovocitos.

7.5 Canales de potasio y progresión del ciclo celular en células cancerosas.

8. CONCLUSIONES

9. PERSPECTIVAS

10. BIBLOGRAFÍA

RESUMEN

El ovocito de la rana *Xenopus laevis* es un modelo ampliamente utilizado en la investigación biológica como un sistema de expresión heteróloga, óptimo para el análisis de las vías de señalización celular. El ovocito tiene la propiedad de sintetizar proteínas de membrana plasmática exógenas, como son los transportadores, canales iónicos y receptores.

Durante la ovogénesis, el ovocito se encuentra arrestado en la primera profase meiótica del ciclo celular (PI). El ovocito se mantiene en el estado arrestado por la existencia de una poza endógena de dímeros G $\beta\gamma$ libres de proteínas G heterotriméricas del tipo inhibitorias (Sheng *et al.*, 2001), las cuales activan a la adenilato ciclasa (AC) y elevan el AMPc. La reanudación de la meiosis se caracteriza por la ruptura de la envoltura nuclear, GVBD por sus siglas en inglés (Germinal Vesicular Break Down).

La maduración del ovocito *in vitro* puede inducirse con la hormona progesterona, la cual provoca la disminución del nivel del AMPc y genera la activación del factor promotor de la maduración (MPF), el principal regulador del arresto. Sin embargo, los andrógenos son los principales activadores fisiológicos de la maduración *in vivo* (Lutz *et al.*, 2001).

El ovocito tiene canales de cloro Cl⁻ dependientes de calcio Ca²⁺ (Barish *et al.*, 1983), de calcio Ca²⁺ dependientes de voltaje (Miledi, 1982); de potasio K⁺ del tipo rectificador tardío (Lu *et al.*, 1990) y de potasio del tipo rectificador entrante (Bauer *et al.*, 1996). En 1996, David Clapham aisló el cDNA de un canal de potasio rectificador entrante endógeno, activado por el dímero G $\beta\gamma$ de una proteína G heterotrimérica del tipo inhibitoria, (canal GIRK5). De acuerdo a su secuencia de nucleótidos, el canal tiene 3 posibles sitios de inicio, originando con ello tres posibles isoformas (GIRK5, Δ 5GIRK5 y Δ 25GIRK5) (Hedin *et al.*, 1996). En nuestro laboratorio de investigación se realizó el estudio de las tres isoformas y sólo la más corta resultó ser funcional (Salvador *et al.* 2001).

Investigaciones posteriores demostraron que la fosforilación de un residuo de tirosina que se ubica dentro de los 25 primeros aminoácidos de la región amino terminal del canal, regula su tráfico a la membrana (Mora I & Escobar L, 2005). La mutación de este residuo de tirosina (Y) por alanina (A) GIRK5-Y16A, le permite que se exprese en forma funcional en la membrana plasmática (Mora *et al.* 2005), a diferencia del canal wild type (WT) que se encuentra retenido en el retículo endoplásmico del ovocito (Díaz-Bello *et al.*, 2013). Durante los ensayos funcionales del canal, se observó que había una aceleración en la maduración de los ovocitos cuando éstos expresan el canal mutado GIRK5Y16A.

En este trabajo se planteó determinar el efecto de expresar el canal GIRK5 y su mutante Y16A en la maduración del ovocito mediante el conteo de la formación del GVBD. Las dos formas del canal recombinante: GIRK5-WT y GIRK5-Y16A favorecieron la aparición del GVBD, sin embargo, el efecto de la expresión del canal mutado Y16A fue mucho mayor.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los mejores modelos experimentales para la investigación biológica es el ovocito de la rana *Xenopus laevis* (*X. laevis*). Estas células se han convertido en una herramienta sumamente útil para el estudio del ciclo celular, para fenómenos relacionados con el transporte intracelular, transducción de señales, para el estudio de la biología del desarrollo y para la expresión funcional de proteínas de transporte. Los ovocitos de *Xenopus l.* son células de gran tamaño, miden cerca de 1 mm, requieren de un mantenimiento relativamente simple y su manipulación es fácil y asequible.

Uno de los usos más frecuentes es el del sistema de expresión heteróloga, basado en la inyección *in vitro* de DNA o mRNA en el ovocito. Cuando el mRNA traducido produce un receptor o una proteína de transporte, exhibe todas sus propiedades farmacológicas y electrofisiológicas. Sin embargo el ovocito posee un complejo sistema de transporte (Weber, 1999).

Los ovocitos se introdujeron como un sistema de expresión heteróloga por John Gurdon en 1977 y posteriormente por Ricardo Miledi en 1982. El retículo endoplásmico del ovocito permite la síntesis de proteínas de membrana plasmática exógenas (transportadores, canales iónicos, receptores). Un ejemplo de este sistema, es su uso en la inyección del mRNA para la transcripción de canales iónicos, su caracterización funcional por registros electrofisiológicos y el estudio de su localización con quimeras fluorescentes.

La maduración de los ovocitos inducida por hormonas esteroideas es independiente de la transcripción, ocurre por acción no genómica mediante receptores a esteroides (Boonyaratanakornkit & Edwards, 2007) esto los hace un modelo óptimo para estudiar los procesos de señalización celular.

Durante el proceso de ovogénesis, los ovocitos permanecen arrestados en la fase de transición de G2 a Meiosis I (Profase I). La reanudación de la meiosis en el ovocito inducida por hormonas, involucra la activación de distintas vías de transducción de señales que convergen en la activación del factor promotor de la maduración (MPF) (Schmitt & Nebrada, 2002).

La maduración comienza con la acción de una hormona esteroidea. La progesterona, la hormona utilizada para provocar la maduración *in vitro*, actúa reduciendo el nivel de AMPc en la célula. El mecanismo preciso de la maduración en *Xenopus laevis* aún no está resuelto en su totalidad; probablemente la progesterona actúa mediante un receptor membranal acoplado a Gi. La reducción de AMPc inhibe la PKA y se favorece la cascada de señalización que conduce a la activación del MPF,

promoviendo la meiosis y la aparición de la vesícula de rompimiento (GVBD). Aunque la progesterona es la hormona más utilizada para inducir la maduración *in vitro*, los activadores fisiológicos *in vivo* son los andrógenos. (Deng *et al*, 2008)

El ovocito posee una poza endógena de proteínas G $\beta\gamma$ libres. Estos dímeros actúan como inhibidores de la maduración (Lutz *et al*, 2000; Sheng *et al*, 2001). Al parecer tanto el dímero G $\beta\gamma$ como el G α_s , están involucrados en la estimulación de la adenilato ciclasa (AC); esta enzima sintetiza y mantiene altos los niveles de cAMP intracelular, lo que mantiene en el estado arrestado a los ovocitos (Gallo *et al*, 1995; El-jouni *et al*, 2007).

El canal de potasio GIRK5 es un canal endógeno del ovocito de *Xenopus laevis*. GIRK5 pertenece a la familia de canales de potasio rectificadores entrantes y a la subfamilia de canales Kir activados por proteínas G. Los canales GIRK5 se activan por ligandos de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gi. La proteína Gi heterotrimérica consta de tres subunidades: la alpha (α), la beta (β) y la gama (γ). La proteína se disocia y el dímero G $\beta\gamma$ se une al canal de potasio GIRK y de esta manera lo abre con lo cual promueve que los iones potasio difundan de dentro hacia fuera de la célula, regulando el equilibrio electroquímico. Al abrirse los canales GIRK se hiperpolariza la membrana celular.

Durante el estudio de la regulación del canal GIRK5 se identificó que la fosforilación del residuo de tirosina 16 en el amino terminal, regula su expresión funcional. El canal silvestre GIRK5 no es funcional mientras que la mutante GIRK5-Y16A (Y/A) se expresa en la membrana plasmática y es funcional (Mora & Escobar, 2005).

2. ANTECEDENTES

2.1 *Xenopus laevis*

La rana de garras sudafricana *Xenopus laevis* es una de las 17 especies de anuros pertenecientes al género *Xenopus*, incluidos en la familia Pipidae (Tinsley & Kobel, 1996). Es un animal acuático, de actividad predominantemente nocturna, carroñero y depredador activo, que habita en aguas estancadas y turbias (Fig 1). Se distribuye naturalmente en África del Sur y partes de Zimbabwe (Solís *et al.*, 2004). Actualmente *Xenopus* se reconoce como una especie potencialmente invasora en distintas regiones del mundo, incluido el suroeste de México.

X. laevis es un organismo modelo para estudios de biología molecular, celular y del desarrollo (Gurdon, 1996); su gran tolerancia y fácil manipulación en condiciones de laboratorio permitieron ampliar su uso en diversos centros de investigación, consolidando a *Xenopus* como uno de los vertebrados mejor estudiados en la actualidad.

Una característica importante de *Xenopus* es que es una especie tetraploide, es decir con 4 juegos de 36 cromosomas. (Evans *et al.* 2004; Hughes & Hughes, 1993). Su condición de organismo poliploide ofrece un excelente modelo de estudio para el entendimiento de los efectos evolutivos de la duplicación genética.



Figura 1. Rana sudafricana *Xenopus laevis*.

2.2 Ovocito de *Xenopus laevis*

El éxito del modelo de *X. laevis* radica principalmente en las características que presentan sus ovocitos: son células de gran tamaño que se pueden manipular con facilidad y que no necesitan de una infraestructura costosa para su mantenimiento, ni de condiciones de esterilidad absoluta, con respecto a los cultivos de células de mamífero. De acuerdo a la clasificación de Dumont pertenecen a las células individuales más grandes del reino animal (Dumont, 1972). Ya en el estadio VI tienen un diámetro que va de 1 a 1.3 mm y una membrana plasmática altamente plegada con un área de entre 18 y 20 mm² (Sobczak *et al.* 2010). Los huevos y embriones tempranos de este anfibio han permitido el avance de estudios embriológicos en función de su tamaño que permite estudiarlos y manejarlos más fácilmente que los de cualquier otro organismo.

La producción de huevos en condiciones naturales está determinada por la disponibilidad del alimento; puede ocurrir en cualquier época del año siempre y cuando las ranas dispongan de los recursos necesarios. En el laboratorio, la ovulación puede inducirse con la inyección de hormonas, como la gonadotropina corionica humana (Reed, 2005); por tanto, la disponibilidad de los huevos no está restringida y se pueden obtener en el momento que se requiera. De igual forma la obtención de ovocitos, es decir de huevos inmaduros, no está limitada; se pueden extraer mediante ovariectomía parcial, procedimiento que no requiere del sacrificio de las ranas. Sin embargo, aún en condiciones de laboratorio, el efecto estacional puede impactar tanto en el éxito reproductivo, como en la calidad de los ovocitos cuando son extraídos del ovario.

Xenopus fue el primer animal vertebrado en ser clonado (Gurdon *et al.*, 1975) y durante los últimos años aumentó su uso continuo con el advenimiento de las tecnologías genéticas. Una técnica en auge que ha ampliado el conocimiento de la biología celular es el de “expresión heteróloga”, que se basa en la inyección *in vitro* de mRNA o DNA de una proteína de interés para que sea traducido y expresado en el ovocito.

2.2.1 Ovogénesis

Los ovocitos se encuentran dentro de los ovarios de la rana; estos son los órganos más grandes de una rana adulta, simulan ser sacos transparentes que están divididos en múltiples “lóbulos” (aproximadamente 24 por ovario); cada uno contiene cientos de ovocitos en distintos estadios de desarrollo (Rasar & Hammes, 2006) (Fig. 2). Los ovocitos se encuentran rodeados de una capa de células foliculares que los irradia de hormonas y proteínas necesarias para su crecimiento.

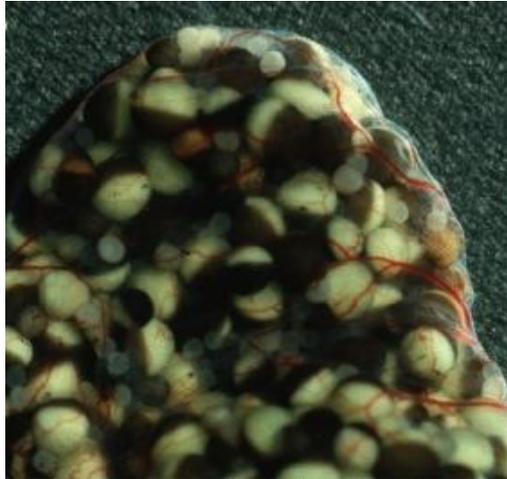


Figura 2. Saco de ovocitos de *Xenopus laevis*.

La ovogénesis es el proceso de transformación de ovogonias a ovocitos y requiere aproximadamente de ocho meses. Una ovogonia crece y se diferencia en ovocito primario y continúa su ciclo celular hasta detenerse en una profase meiótica muy prolongada. Durante este periodo de crecimiento, los ovocitos acumulan ribosomas, vitelo, glucógeno, lípidos y mRNA materno que posteriormente será utilizado para la regulación de la síntesis de proteínas y el desarrollo embrionario temprano. (Rasar & Hammes, 2006). En *X. laevis* la ovogénesis comprende los estadios de crecimiento del I al VI y es de tipo asincrónica, es decir que todos los estadios pueden presentarse al mismo tiempo en el ovario (Weber, 1999) (Fig. 3). El tamaño de los ovocitos varía desde 35 micras en el estadio I hasta 1.3 mm en el estadio VI (Fig. 4).

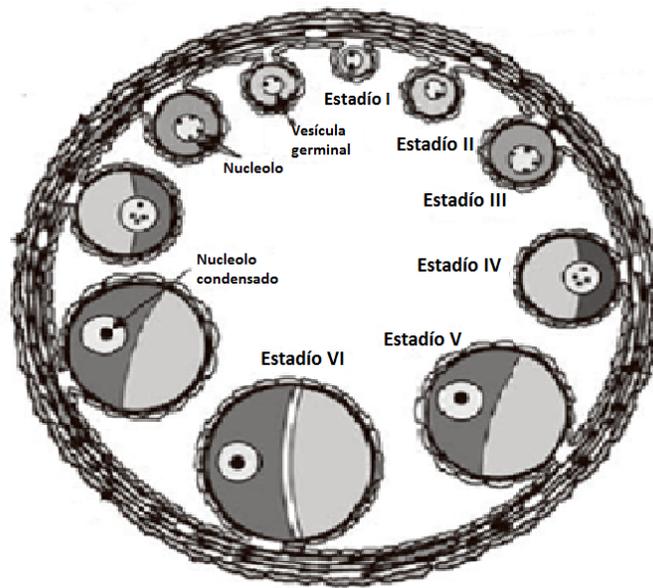


Figura. 3. Representación esquemática del ovario y ovogénesis de *X. laevis* (Modificado de Rasar & Hammes, 2006).

En el estadio VI el ovocito está separado por una banda o cinturón ecuatorial que lo divide en dos hemisferios: el polo animal de color oscuro que contiene el núcleo y el polo vegetal de color amarillo pálido que alberga la mayor parte del vitelo y proteínas (Fig.5). El núcleo almacena el RNA ribosomal indispensable para la síntesis de proteínas y se le conoce como la vesícula germinal (GV) (Fig.4).

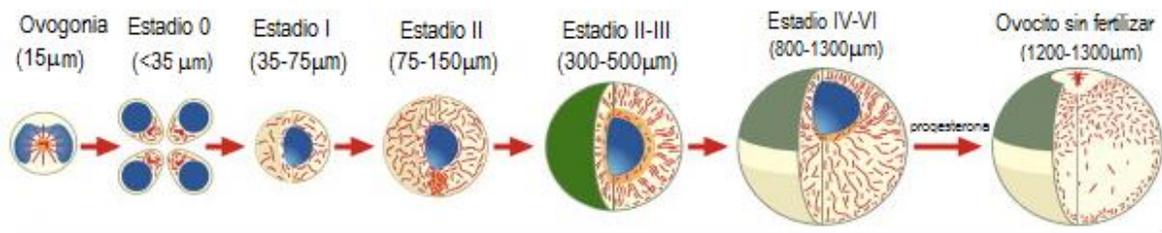


Figura 4. Ovogénesis de *Xenopus*. Estadios por los que atraviesa el ovocito durante la ovogénesis, se muestra la vesícula germinal en color azul. (Modificado de Selenko & Wagner, 2007)



Figura 5. Ovocito de *X. laevis* en el estadio VI.

Los ovocitos que se encuentran en esta etapa final de desarrollo, han completado la vitelogénesis y son competentes para la ovulación y la fertilización (Fig. 5) (Rasar & Hammes, 2006).

2.3 Ciclo celular del ovocito

La meiosis comprende la división de células especializadas para producir células germinales haploides, óvulos o espermias (Nebreda & Ferby, 2000). En *X. laevis* se producen células germinales diploides, debido a su ploidía ($4n$).

La primera profase de la meiosis se divide en varias etapas durante las cuales ocurren procesos de reorganización de los cromosomas; estas son: leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno, y diacinesis. El diploteno es una fase muy prolongada de la ovogénesis durante la cual ocurre la mayor parte del crecimiento del ovocito, es un periodo de intensa actividad metabólica en el cual se detiene el ciclo celular meiótico y el ovocito permanece arrestado. En ésta última etapa de crecimiento (estadio VI) los ovocitos son descritos como inmaduros; (Karp, 2005). En este momento se producen todos los rRNA y tRNA necesarios para la síntesis de proteínas hasta el estadio de blástula media y todos los mRNA maternos necesarios para el desarrollo temprano (Gilbert & Singer, 2006).

La reanudación de la meiosis conlleva el rompimiento de la vesícula germinal (GVBD). En este evento ocurre el desensamble de la envoltura nuclear, los nucléolos se desintegran para migrar hacia el polo animal y para comenzar la división, comienza la condensación de cromosomas y la formación del huso.

La transición entre meiosis I y meiosis II incluye la inhibición de la fase S y el bloqueo del ovocito por un segundo arresto en metafase II, que es ocasionado por la actividad del factor citostático (CSF)

(Schmitt & Nebreda, 2002). Posteriormente la meiosis II termina una vez que el ovocito se fecunda (Fig. 6)

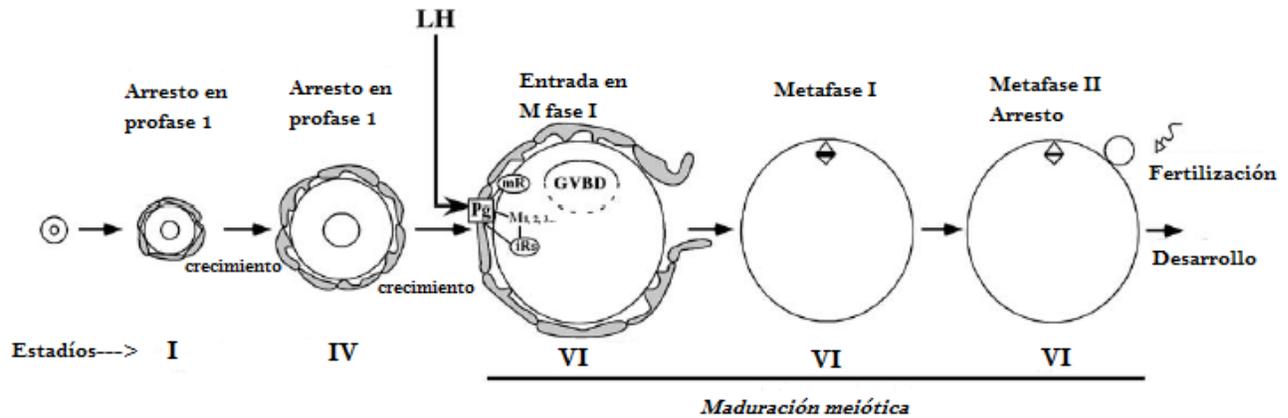


Figura 6. Diagrama del ovocito en la transición de meiosis I a meiosis II. La reanudación de la meiosis I comienza con la acción de la hormona luteinizante (LH) que desencadena la acción de una hormona esteroidea (Pg progesterona) provocando el GVBD.

2.3.1 Arresto del ciclo celular

El arresto de la maduración meiótica se caracteriza principalmente por el incremento en el nivel de adenosin monofosfato cíclico (AMPC) intracelular. El AMPC funciona como un segundo mensajero en muchas vías de comunicación celular, en respuesta a un estímulo externo, generando la amplificación de una señal (Karp, 2005). Es un nucleótido que se sintetiza a partir de adenosin trifosfato (ATP) por la acción de la adenilato ciclasa (AC). La AC es una enzima transmembranal que es activada por proteínas G heterotriméricas; su activación y la producción de AMPC pueden estar moduladas por la acción de muchas hormonas y neurotransmisores. (García, 1996).

2.4 Activación de la AC por proteínas G

Las proteínas G heterotriméricas constan de tres subunidades, la alfa (α), la beta (β) y la gama (γ). Las dos últimas forman un dímero estable ($G\beta\gamma$) que únicamente se disocia cuando se desnaturaliza la proteína. La subunidad $G\alpha$ tiene sitios de unión para el GDP y el dímero $G\beta\gamma$, cuando el receptor acoplado a las proteínas G se activa, se promueve el intercambio de GDP por GTP y la separación de la subunidad $G\alpha$ GTP tanto del receptor como del dímero $G\beta\gamma$. Las subunidades $G\alpha$ GTP y $G\beta\gamma$ libres modulan la actividad de una amplia variedad de efectores como las enzimas y los canales iónicos. La señalización termina debido a la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad $G\alpha$ que convierte el

GTP en GDP. El trímero se asocia nuevamente y se regresa al estado basal. Las proteínas reguladoras de la señalización mediada por las proteínas G, RGSs (regulador de la señalización de proteínas G) o GAPs (proteína activadora de GTPasa) incrementan la actividad GTPasa de la subunidad $G\alpha$, (**Fig.7**) (Wettschureck y Offermanns 2005).

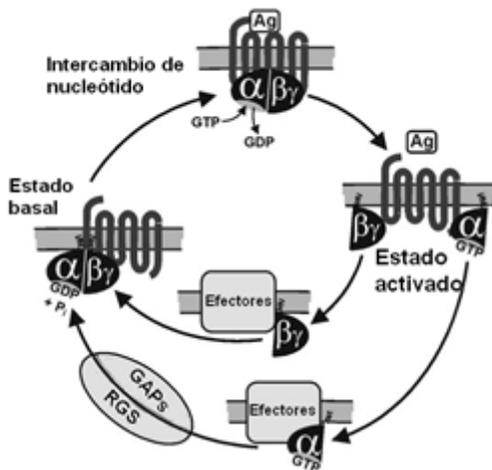


Figura 7. Ciclo funcional de la actividad de la proteína G. Cuando el receptor se activa por el agonista (Ag) se producen cambios conformacionales en las proteínas G que permiten el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$, y la liberación del dímero $G\beta\gamma$ de la proteína G heterotrimérica. La hidrólisis espontánea de GTP a GDP se puede acelerar por las proteínas GAPs o RGS. El trímero se asocia nuevamente al receptor y se reinicia el ciclo. (Modificado de Wettschureck y Offermanns, 2005)

La subunidad $G\alpha$ confiere las propiedades básicas de las proteínas G heterotriméricas y se subdividen en cuatro subfamilias $G\alpha_s$ (activan a la adenilato ciclasa), $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ (Activan a la fosfolipasa C), $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ (activan a la fosfolipasa A2) y $G\alpha_i/G\alpha_0$ (inhiben a la adenilato ciclasa). Cuando las proteínas heterotriméricas $G\alpha_i/G\alpha_0$ se activan, la subunidad $G\alpha$ inhibe a la adenilato ciclasa.

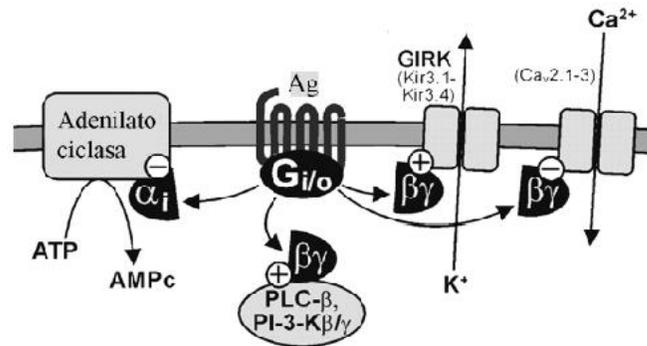


Figura 8. Vía de señalización de las proteínas $G\alpha_i/G\alpha_0$. Cuando el receptor se activa por el agonista (Ag) se producen cambios conformacionales en las proteínas G que permiten el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$, el trímero $G\alpha\beta\gamma$ se disocia y la subunidad $G\alpha_i$ inhibe la cascada de señalización de la adenilato ciclasa. Por su parte, el dímero $G\beta\gamma$ puede provocar la apertura de algunos canales iónicos, en éste caso se ejemplifica uno de potasio y uno de calcio (Modificada de Wettschureck y Offermanns, 2005).

2.5 El arresto se mantiene por proteínas Gas y Gβγ

Se ha demostrado que la sobre-expresión de las subunidades Gas inhiben la maduración inducida por progesterona en los ovocitos de *X. laevis* (Romo *et al.*, 2002). A su vez, la sobre-expresión de Gβγ inhibe la maduración y la vía MAPK, mientras que el secuestro de las subunidades Gβγ endógenas, la incrementa. (Lutz *et al.*, 2000; Sheng *et al.*, 2001). Con estos resultados se concluyó que existe una poza de proteínas Gβγ endógenas libres, responsable de mantener el arresto en G2. La reanudación de la meiosis puede inducirse por reclutadores de Gβγ *in vitro*, o naturalmente, con progesterona, mediante un mecanismo en el que se suprime la liberación de las Gβγ (Sheng *et al.*, 2001)

Aunque las subunidades Gas y Gβγ contribuyen a mantener el arresto meiótico, Gβγ parece ser esencial para este proceso (Lutz *et al.*, 2001). Sin embargo, la acción de esta subunidad parece estar condicionada a la presencia de las subunidades Gas (Guzmán *et al.*, 2005). A pesar de que Gas y Gβγ son los reguladores principales del arresto, aún no se determina cómo estas subunidades entran en estado activo en los ovocitos inmaduros. El equipo de Romo en 2008 sugirió que existe un factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF) para las subunidades Gas de *X. laevis* (xRic) que activa a las Gas y mantiene la señalización Gas- Gβγ-AC activa (Romo *et al.*, 2008).

Por otra parte, las subunidades Gas al igual que las Gαi regulan la actividad de la proteína cinasa de tirosina Src (Yong-Chao *et al.*, 2000). La proteína Src en los ovocitos de *Xenopus* (xSrc) acelera la maduración por medio de la vía MAPK (Tokmakov *et al.*, 2005).

2.6 Maduración

2.6.1 Andrógenos como activadores de la maduración.

Desde 1960 la progesterona ha sido la hormona utilizada para activar la maduración *in-vitro* del ovocito (Liu *et al.*, 2006). Sin embargo muchos otros esteroides son iguales o más capaces de promover la maduración. Aunque la progesterona es un potente promotor de la maduración *in vitro*, poco se sabe acerca de la maduración en condiciones *in vivo*. Se ha demostrado que los ovocitos son más sensibles a la señalización por los andrógenos testosterona y androstenediona que por progesterona. Si un receptor de andrógenos (AR) se bloquea por un antagonista como la flutamida, la maduración inducida por andrógenos y la cascada de señalización vía MAPK que activa el MPF, se ven atenuadas (Lutz *et al.*, 2001).

La progesterona se metaboliza a androstenediona por la enzima endógena CYP17 en los ovocitos aislados (Lutz *et al.*, 2001). Por consiguiente, los andrógenos son los principales mediadores fisiológicos de la maduración *in vivo* y juegan un papel importante en la maduración mediada por progesterona *in vitro*. (Fig. 9)

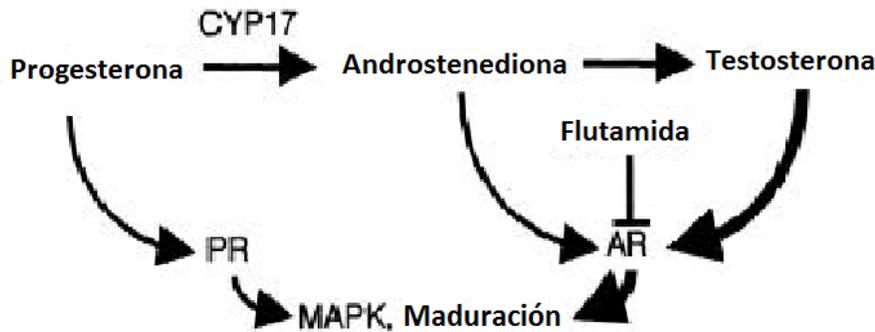


Figura 9. Modelo de la maduración por la acción de esteroides. La progesterona induce la maduración vía MAPK por medio de dos vías; por un lado actúa mediante un receptor de progesterona (aún no identificado) y por otra parte se metaboliza en androstenedieona por la acción del citocromo CYP17; a su vez, la androstenediona se sintetiza en testosterona; ambas hormonas inducen la maduración mediante un receptor de andrógenos (Modificado de Lutz *et al.*, 2001).

2.6.2 Maduración mediada por progesterona

La maduración mediada por progesterona está determinada por una cascada de señalización que comienza con la secreción de la progesterona por las células foliculares que rodean al ovocito, en respuesta a la hormona gonadotrófica secretada por la hipófisis (Yamashita, 1998).

A diferencia de los receptores de progesterona de mamíferos, los cuáles son factores nucleares de transcripción, se piensa que en los ovocitos de *Xenopus* la progesterona funciona acoplándose a un receptor en la membrana plasmática. (Smicht & Nebreda, 2001; Ríos *et al.*, 2008). Ya que es indispensable un receptor acoplado a proteínas G (GPCR) para mantener el arresto (El-jouni, *et al.*, 2007), es posible que la progesterona funcione como un agonista que activa a una proteína G_i , que inhibe la AC por medio de $G_{\alpha i}$. No obstante los estudios de Lutz (2000) sugieren que la inhibición de la AC en los ovocitos de *X. laevis* está determinada más bien por el descenso de los dímeros $G\beta\gamma$ libres, los cuales mantienen el arresto, debido probablemente a su secuestro por parte de las $G_{\alpha i}$ cuando se sobre-expresan (Lutz *et al.*, 2001). Algunos estudios sugieren que las subunidades α de las proteínas G_i no están involucradas en la inhibición de la AC, y apoyan esta teoría por medio de

experimentos en donde la inyección de subunidades α de tres tipos de proteínas Gi de mamíferos (G_{i1} , G_{i2} , y G_{i3}), no causa el GVBD en los ovocitos (Sheng *et al.*, 2001).

A pesar de que el mecanismo de acción de la progesterona es aún desconocido, lo que está demostrado es que la AC se inhibe y el AMPc deja de sintetizarse, en consecuencia, distintas vías de señalización actúan para activar el MPF, con lo que se promueve el GVBD.

2.6.3 Factor promotor de la maduración MPF

Aunque son distintas las vías de señalización involucradas en la maduración, todas ellas convergen en la activación del factor promotor de la meiosis, conocido también como factor promotor de la maduración (MPF). En 1971 Yoshio Masui y Clement Markert inyectaron citoplasma de ovocitos de rana maduros en el citoplasma de ovocitos arrestados en la fase G2, los ovocitos en estado arrestado pasaban a la fase M después de someterse a la inyección; estos experimentos demostraban que existía un factor en el citoplasma responsable de reanudar el ciclo, a esta supuesta sustancia la llamaron maturation promoting factor (MPF) (Masui & Market, 1971).

El MPF es un complejo que está constituido por dos subunidades, la ciclina B y una cinasa dependiente de ciclina (Cdc2) (Standfor *et al.*, 2003). En *X. laevis* el MPF se encuentra de forma inactiva (pre-MPF) y su acción está regulada por la fosforilación y desfosforilación en residuos de tirosina (Y15) y treonina (T14) de la cinasa Cdc2 (Yamashita, 1998). La actividad del MPF puede ser catalizada por la fosfatasa Cdc25 que lo activa, o por la proteína cinasa Myt1, que inhibe a Cdc2 y lo inactiva (Nebreda & Ferby, 2000).

2.6.4 Inhibición de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA)

La proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) es uno de los reguladores más importantes en la maduración del ovocito. La inhibición de la PKA puede inducir la maduración aún en ausencia de la progesterona (El-Jouni *et al.*, 2007). El decremento en el nivel de PKA conduce a la activación de dos vías principales por las cuáles el pre-MPF se activa (Figura 10). Por una parte, la proteína cinasa serina/treonina (PLK1 o su homólogo en *Xenopus* PLx1), fosforila y activa la Cdc25; esta desfosforila la cdc2 del MPF y entonces lo activa (Kishimoto, 2003). Por otro lado, se inicia la maquinaria de síntesis de la proteína Mos; la cinasa Aur-A induce la poliadenilación y la traducción del mRNA almacenado que codifica la proteína mos que activa la vía MEK-MAPK-90Rsk. Al traducir la proteína

cinasa mos, una cinasa específica de la MAPK cinasa (MEK) permite la activación de la proteína p90Rsk; ésta en cambio fosforila e inhibe la cinasa Myt1, una cinasa inhibitoria de la subunidad Cdc2 del MPF. (Schmitt & Nebrada, 2002)(Fig.10). Esta proteína Mos es detectable únicamente durante la maduración del ovocito y se destruye rápidamente en la fecundación (Gilbert & Singer, 2006).

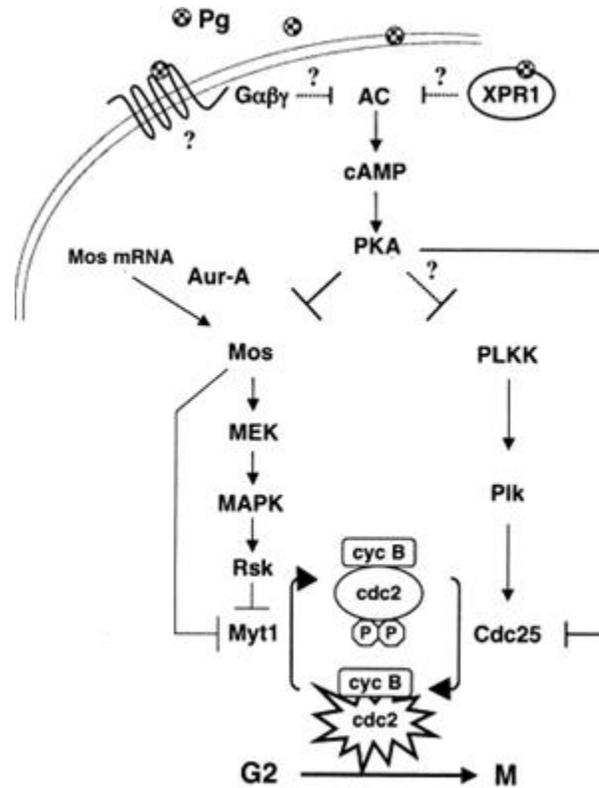


Figura 10. Cascada de señalización que conduce a la activación del MPF (ciclin B/cdc2). (Standfor *et al.*, 2003)

Las subunidades Gβγ parecen estar involucradas en la vía MAPK, estudios revelan que el secuestro de Gβγ incrementa la expresión de la proteína mos (Lutz *et al.*, 2000). Ya que está demostrado que Gβγ mantiene el arresto del ovocito, es posible que éstas subunidades tengan influencia directa sobre la vía de la proteína mos.

2.7 Segundo arresto meiótico

Poco después de que se reanuda la meiosis y el gameto femenino es liberado del ovario, el ovocito encuentra un segundo bloqueo en la metafase II. Este bloqueo de la metafase es causado por las acciones combinadas de las proteínas c-mos y la cinasa 2 dependiente de ciclina (cdc2). Estas dos proteínas son subunidades que conjuntamente forman el factor citotático (CSF) que puede bloquear el ciclo celular en metafase. Se piensa que el CSF impide la degradación de la ciclina Cdc2 (Gilbert & Singer, 2006).

2.7.1 Reanudación de la metafase II

El ciclo celular que se detiene en metafase II se reanuda en el momento de la fecundación. La evidencia sugiere que el flujo de iones de calcio que se genera en la fecundación, permite que la proteína calmodulina que une calcio se active. La calmodulina, a su vez puede activar a dos enzimas que inactivan al CSF: la proteína cinasa II dependiente de calmodulina, que inactiva la cinasa cdc2 y calpaína II, una proteasa dependiente de calcio que degrada a c-mos (Figura 11). Esta acción promueve la división celular de dos modos. En primer lugar, sin el CSF, la ciclina puede ser degradada y se completa la división meiótica. En segundo lugar, la proteína cinasa II dependiente de calcio también permite la duplicación del centrosoma, formando de este modo los polos del huso meiótico. La fecundación y la meiosis parecen estar íntimamente relacionadas a la liberación y unión de iones de calcio. (Gilbert & Singer, 2006).

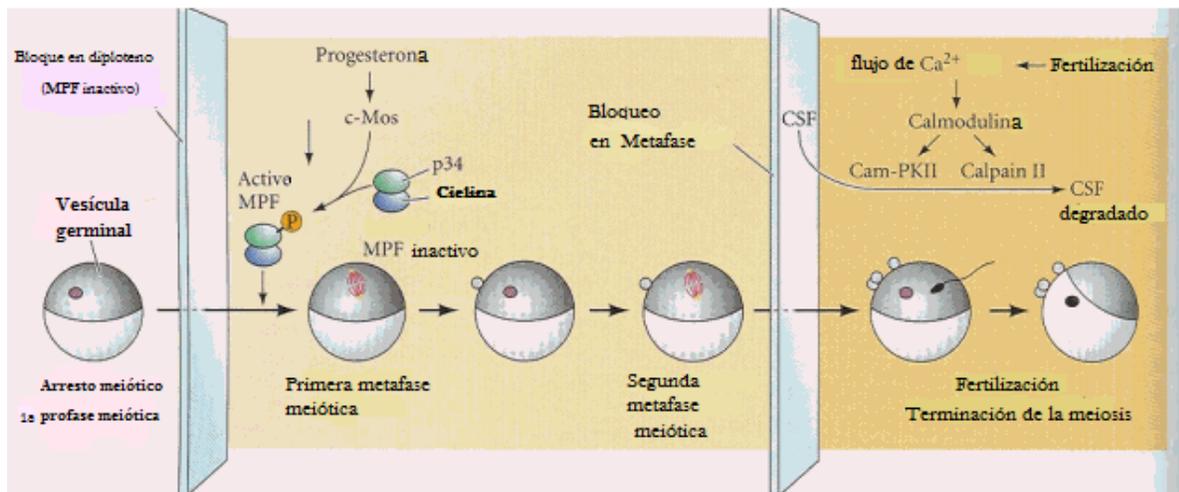


Figura 11. Esquema de la progresión de la meiosis del ovocito. Se muestran los dos bloqueos en profase I y en metafase II y las proteínas principales que participan en el arresto y la reanudación del ciclo (Gilbert & Singer, 2006).

2.8 CANALES IÓNICOS EN EL OVOCITO DE *Xenopus laevis*.

Como un modelo de expresión heteróloga, la traducción de proteínas a canales iónicos para estudios electrofisiológicos, es uno de los usos más frecuentes que se le da al ovocito, ello ha permitido al mismo tiempo conocer sus propios canales endógenos y como éstos regulan el potencial de membrana.

2.8.1 Canales iónicos

Los canales iónicos dependientes de voltaje, son proteínas integrales de membrana a través de las cuales se da el transporte selectivo de iones en respuesta a cambios en el voltaje transmembranal (Chaves *et al.* 2003). Estos canales permiten la difusión selectiva de un tipo de ión: Na⁺, K⁺ Ca⁺ o Cl⁻ a favor de su gradiente electroquímico.

La apertura de los canales ocurre en respuesta a un estímulo específico. Los principales estímulos son cambios en el voltaje a través de la membrana (canales regulados por voltaje) o la unión de un ligando (canales regulados por ligando) El ligando puede ser tanto un mediador extracelular (canales regulados por neurotransmisor) o un mediador intracelular, o un nucleótido (canales regulados por nucleótidos). La actividad de muchos canales también se encuentra regulada por fosforilación y desfosforilación. (Alberts *et al.*, 2004)

Durante la maduración del ovocito, sus propiedades bioeléctricas cambian considerablemente, el potencial de membrana (U_m) se despolariza drásticamente con valores que van de -50mV hasta -10mV, esta despolarización causa una regulación negativa de los canales iónicos y de los sistemas de co-transporte en la membrana (Weber, 1999).

2.8.2 Canales de potasio rectificadores entrantes (Kir)

Los canales iónicos que permiten el intercambio de iones K⁺ en la célula, son cruciales para el mantenimiento del potencial de membrana en reposo y para controlar la fase de repolarización en las células excitables.

De entre los distintos tipos de canales de K⁺, aquellos que constan de dos segmentos transmembranales (M1 y M2) pertenecen a la familia de canales de potasio rectificadores entrantes

(Kir). Entre sus dos segmentos, se encuentra la región que forma el poro, la cual presenta un filtro de selectividad para el ión potasio. (**Fig. 12**). Estos canales se agregan en tetrámeros para formar un canal funcional y se les llama rectificadores porque permiten el movimiento de los iones en un solo sentido y no en el otro.

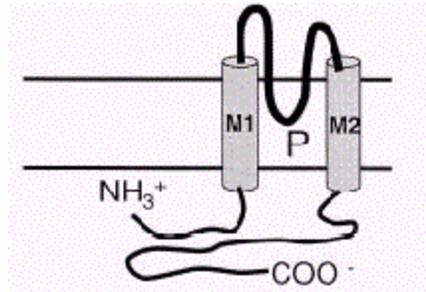


Figura 12. Canales de K⁺2TM/P. Constan de dos segmentos transmembranales (M1 y M2) con la región del poro (P) entre ellos.

El papel fisiológico de los canales Kir es mantener el potencial de reposo celular cercano al potencial de equilibrio para el ion potasio (E_K). En consecuencia, regulan la excitabilidad celular, la secreción de hormonas y mantienen el balance electrolítico (Lu, 1990).

Algunos de estos canales pueden ser modulados en forma indirecta por receptores sensibles a hormonas, neurotransmisores y otros metabolitos celulares (Hille, 2001). También son regulados por elementos intracelulares y membranales como son los nucleótidos cíclicos, los fosfolípidos, el ATP, las cinasas, el pH y las proteínas G heterotriméricas, entre otros. (Bichet, *et al.* 2003; Ruppersberg, 2000).

2.8.2.1 Subfamilia Kir 3 (GIRK).

Los canales Kir 3 juegan un papel importante en la regulación del ritmo cardiaco y en la neurotransmisión inhibitoria del cerebro (Müllner *et al.* 2000). Esta familia de canales es activada por subunidades G $\beta\gamma$ de proteínas G heterotriméricas, (Zhang *et al.*, 2008).

Los canales GIRK se expresan en el corazón, el sistema nervioso (central y periférico), las plaquetas y las células cancerosas de mama y pulmón. Cinco miembros de la subfamilia GIRK se han clonado hasta la fecha. Los canales GIRK1 (Kubo *et al.*, 1993) y GIRK4 (Krapivinsky *et al.*, 1995) se clonaron

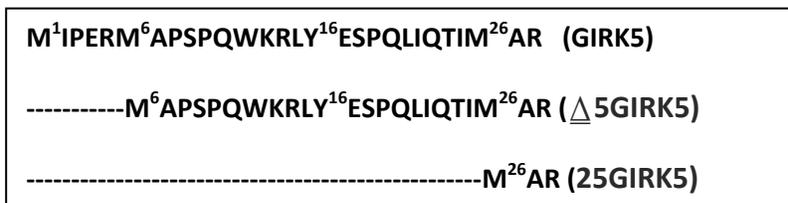
de aurícula de ratón mientras que GIRK2 y GIRK3 del cerebro de mamíferos (Lesage *et al.*, 1994) La isoforma GIRK5 se clonó de los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* (Hedin *et al.*, 1996).

Los receptores acoplados a las proteínas Gi/Go que activan a los canales GIRK son: el muscarínico m2, el adrenérgico $\alpha 2$, el dopaminérgico D2, el de serotonina (5HT1A), el de adenosina A1, el de ácido γ -aminobutírico B (GABAB), el de esfingosina 1-fosfato, el de somatostatina y los opioides κ , μ y δ (Werner, *et al.* 1996; Yamada, *et al.* 1998; Smith, *et al.* 2001; Hille, 2001). Además del dímero G $\beta\gamma$, la actividad de los canales GIRK está regulada por un gran número de moduladores intracelulares como el fosfatidil inositol 4-5-bifosfato (PIP2), Na⁺, eicosanoides, ATP, Mg²⁺, y por fosforilación (Mark & Herlitze , 2000; Bichet, *et al.* 2003).

2.9 El canal endógeno GIRK5 en los ovocitos de *Xenopus laevis*.

El canal GIRK5 localizado en los ovocitos de *X. laevis* forma homomultímeros funcionales que son activados por una poza endógena de subunidades G $\beta\gamma$ (Lutz *et al.*, 2000).

En 1996 el grupo de David Clapham aisló el cDNA del canal de potasio rectificador entrante endógeno de los ovocitos de la rana *Xenopus*, Kir 3.5 o GIRK5 (XIR); en su secuencia determinó que tiene tres posibles sitios de inicio correspondientes a las metioninas localizadas en la posición 1, 6 y 26 del amino terminal.



En nuestro laboratorio se produjeron en forma recombinante las tres isoformas del canal GIRK5 (GIRK5-WT, GIRK5- Δ 5 y GIRK5- Δ 25) y se estudió su expresión funcional en los ovocitos de la rana *Xenopus*. Únicamente la isoforma más corta fue funcional (Salvador *et al.* 2001). Al comparar la secuencia de los aminoácidos de la región amino terminal de las tres isoformas, determinaron que en los primeros 25 aminoácidos se encuentra un residuo de tirosina (Y16) que se ubica dentro de una secuencia consenso de fosforilación (I/L-Y-D/E_X-L) (Figura 13).

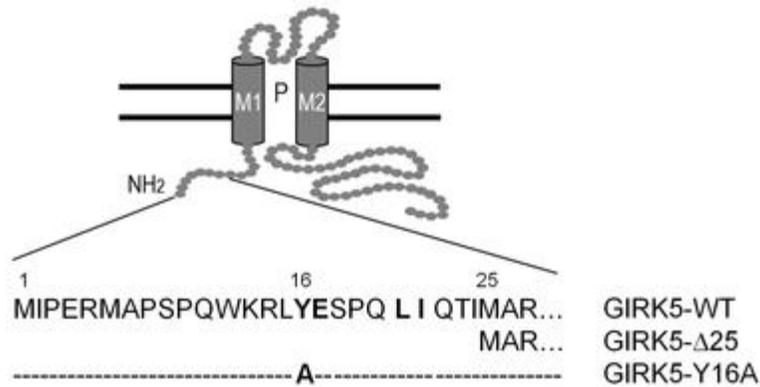


Figura 13. Secuencia de los primeros 25 aminoácidos del canal GIRK5. Se muestra el residuo de tirosina ubicado dentro de una secuencia de fosforilación (Tomado de Díaz Bello *et al.* 2013)

2.9.1 Regulación de la expresión funcional del canal.

La acción de fosforilación por cinasas en residuos de treonina y serina regulan el tráfico y la activación de muchos canales de potasio. Los canales GIRK son modulados por la fosforilación en residuos de tirosina, mediante cinasas de tirosinas (PTKs) del tipo receptor y no receptor (Src). En los canales GIRK4 la fosforilación de residuos de tirosina (Y32 y Y53) por cinasa TrkB pone al descubierto los aminoácidos glutamina (Q28 y Q51) y a la arginina (R30 y R52) que forman un dominio catalítico GAP (GTPase-Activating Proteins), lo cual induce la hidrólisis del GTP y por lo tanto, la disminución de las proteínas G $\beta\gamma$ y la inactivación del canal (Ippolito *et al.* 2002).

Mora y Escobar (2005) determinaron mediante la acción de un inhibidor de cinasas de tirosinas, geldanamicina, que el tráfico del canal GIRK5-wt y su expresión funcional, están regulados por PTKs (protein tirosin kinase) endógenas.

2.10 Canal GIRK5-Y16A.

La mutación en el residuo 16 de tirosina por alanina Y16A promueve la expresión funcional del canal GIRK5. Lo anterior se determinó utilizando quimeras de las isoformas GIRK5- Δ 5 y GIRK5- Δ 25 y la mutante GIRK5-Y16A con la proteína verde de fluorescencia aumentada (EGFP), expresadas en los ovocitos de *X laevis*. Mora y Escobar (2005) observaron que tanto la isoforma Δ 25GIRK5 como la mutante GIRK5- Y16A se encontraban en la membrana plasmática y eran funcionales. (Mora & Escobar 2005).

2.11 Otros canales endógenos.

Los ovocitos poseen una gran variedad de transportadores membranales endógenos y ya que se utiliza como un herramienta óptima para el sistema de expresión heteróloga, es muy importante diferenciar entre las corrientes endógenas de las heterólogas (Sobczak *et al.* 2010). Las corrientes endógenas pueden registrarse con protocolos de voltaje y condiciones iónicas específicas. El ovocito tiene canales de Cl dependientes de Ca^{+2} (Barish *et al.*, 1983), de Ca^{+2} dependientes de voltaje (Miledi *et al.*, 1982), de K^{+} del tipo rectificador tardío (Lu *et al.*, 1990) y de K^{+} del tipo rectificador entrante (Bauer *et al.*, 1996); Sobczak *et al.* 2010). No todos los canales endógenos producen corrientes en el rango de microamperios, como son los canales GIRK5 y los canales de cloro. Las condiciones de registro de los canales de potasio GIRK5 no interfieren con las condiciones de registro de los canales de cloro.

3. HIPÓTESIS

- Los canales GIRK5 que son funcionales favorecen la formación del rompimiento de la vesícula germinal (GVBD).

4. OBJETIVOS

4.1 General:

- Determinar si la expresión del canal GIRK5-wt y sus mutante Y16A intervienen en la maduración del ovocito de *Xenopus laevis*.

4.2 Particulares:

- Obtener los mRNAs del canal GIRK5-WT y de las mutantes GIRK5- Y16A.
- Microinyección *in vitro* del mRNA del canal GIRK5 y las mutante Y16A en el ovocito.
- Determinar si la maduración se ve favorecida con la expresión del canal WT y con cada una de sus mutantes.

5. MÉTODO

5.1 Esquema de la estrategia experimental.

El procedimiento experimental que se realizó para este trabajo se puede resumir en el esquema (Fig.15) y diagrama de flujo.

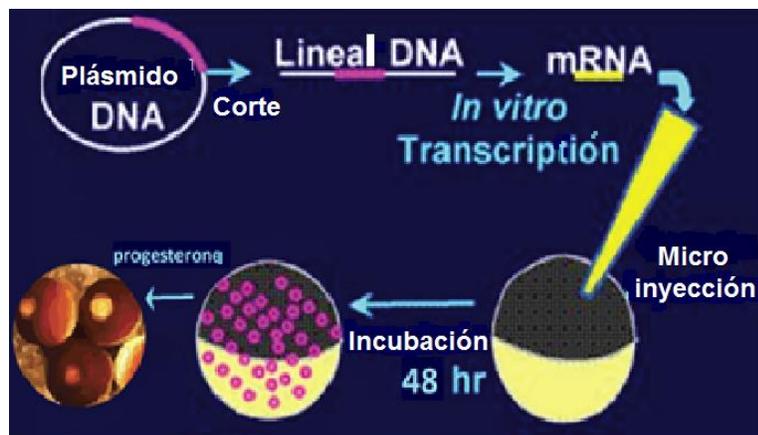


Figura 14. Esquema del procedimiento experimental.

5.2 Transcripción *in vitro* del mRNA

Previamente en el laboratorio se obtuvieron los cDNAs del canal WT y el canal mutado mediante amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

A partir de los cDNAs se realizó la transcripción *in vitro* para sintetizar los mRNA de GIRK5-WT y GIRK5-Y16A con el kit mMessage mMachnine (Ambion Corporation, Austin, TX) siguiendo las especificaciones del proveedor.

Los distintos mRNA se analizaron en geles de agarosa al 1%. El mRNA que se obtuvo se diluyó con agua y se almacenaron alícuotas de 1µl a -70°C. La concentración del mRNA se determinó por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260nm con 0.061 de ABS.

5.3 Ovariectomía y manejo de los ovocitos de *Xenopus laevis*.

Se realizó una ovariectomía parcial a las ranas *Xenopus laevis* hembras para extraer los sacos de ovocitos (Figura 16). La rana se coloca en hielo por lapso de 1 hora, previa a la cirugía. La ovariectomía parcial consiste en un corte de la piel y músculo en la zona del vientre aproximadamente un centímetro arriba del anca de la rana. Una vez que se extraen los ovocitos se colocan en medio ND96 sin Ca²⁺ y se sutura el corte, la rana se coloca en agua nuevamente para que salga de la anestesia. Posteriormente los ovocitos se incuban con colagenasa tipo II - [0.5mg/mL] - en agitación moderada durante 45 minutos, con el fin de eliminar el exceso del saco vitelino, romper las células foliculares y dejar al descubierto los ovocitos.

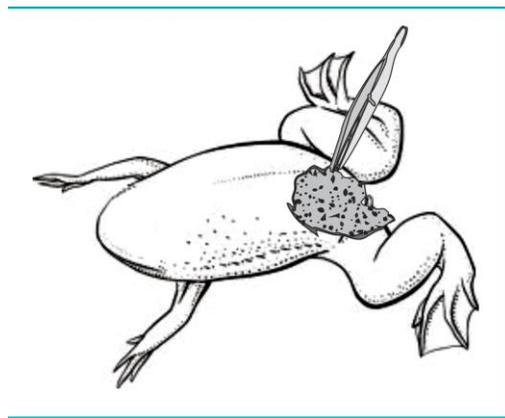


Figura 16. Fotografía y esquema de la extracción de ovocitos mediante ovariectomía parcial.

Una vez libreados los ovocitos, se lavan cuidadosamente con medio nutritivo ND96 con Ca^{+2} y se incuban a 18°C con gentamicina en el medio [80mg/ml] para evitar contaminación.

5.4 Ensayos previos con la progesterona en ovocitos.

La maduración *in-vitro* de los ovocitos se indujo con progesterona (>99% sigma-aldrich). Previa a la micro inyección *in vitro* del RNAm de los canales, se realizaron varias pruebas para determinar a qué concentración maduraba el 50% del total de los ovocitos en un lapso de 24 horas.

Los ovocitos se escogieron en el sexto estadio de la ovogénesis. Se usó un total de 175 ovocitos por ensayo, 125 con progesterona y 50 para el control. Para los ensayos con progesterona se usaron 5 cajas de Petri con 25 ovocitos cada una. A cada caja se le añadió una concentración diferente: 20, 40, 60, 80 y 100 nM (Tabla 1). Se emplearon dos cajas más como controles: Control 1: Sólo medio ND96, se empleó para saber si algún ovocito maduraba en ausencia de la progesterona. Control 2: se empleó para verificar que el etanol (solvente) no tuviera algún efecto en la maduración (Tabla 1).

Tabla 1. Cajas de prueba con su respectiva concentración de progesterona.

Caja	Progesterona [nM]	Etanol 100%
Control 1	----	----
Control 2	----	40 μL
1	20	8 μL
2	40	16 μL
3	60	24 μL
4	80	32 μL
5	100	40 μL

Los ovocitos se incubaron por un lapso de 48 horas y se revisaron cada 12 horas para identificar los ovocitos maduros. El GVBD se observa como un punto blanco que se forma del lado del polo animal del ovocito. Cuando existía duda sobre si el punto blanco era causa de la maduración o no, se realizaba el corte del ovocito del lado del polo animal para identificar la presencia del núcleo celular. La ausencia del núcleo corroboraba la maduración del ovocito.

5.4.1 Curva dosis-respuesta para determinar la dosis eficaz 50 de progesterona.

Se realizaron 3 ensayos con el procedimiento anterior, con 3 lotes diferentes de ovocitos, es decir, de 3 ranas distintas. Se diseñó una gráfica que muestra las concentraciones y la cantidad de ovocitos que maduraron respecto al tiempo transcurrido (Gráfica 1). Con estos ensayos se logró establecer la concentración de progesterona que produce la maduración del 50% de los ovocitos en un lapso de 24 horas. Una vez obtenida la concentración indicada, se procedió a las pruebas con la microinyección del canal GIRK5.

5.5 Microinyección del mRNA de los canales GIRK5 y sus mutantes.

La microinyección *in vitro* del mRNA del canal GIRK5-WT y de la mutante GIRK5Y16A, se realizó con un total de 100 ovocitos, 25 para cada mRNA y 25 más como control (Tabla 2).

Los ovocitos se inyectaron bajo el microscopio estereoscópico mediante el uso de un microinyector cargado con mRNA diluido con TE (Tris-EDTA). Cada ovocito se inyectó en el polo vegetal con 20 ng de mRNA en 50 nL [1ng/2,5nL] (Fig-18). Se mantuvieron en el incubador a 18°C por un lapso de 48 hrs, para asegurar la expresión del canal. Estudios previos en el laboratorio demostraron, mediante la técnica de Fijación de Voltaje (Voltage-Clamp), que los ovocitos expresaban los canales dos días después de la microinyección del mRNA (Figura 19).



Figura. 18. Micro-inyección *in vitro* del mRNA mediante un manipulador fijo y un microinyector.

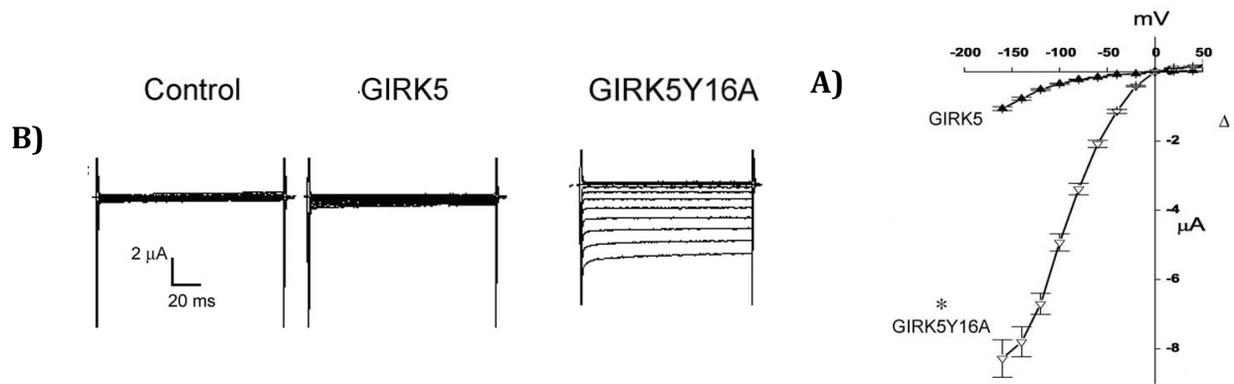


Figura 19. Expresión funcional del canal GIRK5Y16A. A) Registro de las corrientes de los ovocitos inyectados con mRNA del canal GIRK5 y GIRK5Y16A. B) Relación corriente voltaje (I/V) del canal GIRK5 y GIRK5Y16A. La amplitud de las corrientes se midió a -160 mV. Los ovocitos inyectados con 50 nL de H₂O se utilizaron como control. El incremento en el nivel de la corriente entrante de K⁺ que se registra con el canal Y16A demuestra su expresión en la membrana plasmática del ovocito. Los registros se realizaron con la técnica fijación de voltaje con dos microelectrodos en una solución de registro de 118 mM de K⁺ dos días después de la microinyección. (Tomada de Mora & Escobar 2005).

Tabla 2. Pruebas aplicadas a un total de 100 ovocitos.

Caja	# de ovocitos	Tipo de prueba	Ovocitos
1	25	Control	En medio ND96
2	25	GIRK5	Inyectados con mRNA del canal GIRK5
3	25	GIRK5Y-16A	Inyectados con mRNA del canal GIRK5Y16A

Los ovocitos se observaron cada 12 horas. Posterior a la expresión del canal, los ovocitos se trasladaron al medio nutritivo con la concentración de progesterona que se eligió previamente (20 nM); se hizo un conteo de los ovocitos maduros a las 24 y 48 horas posteriores a la adición de progesterona.

El procedimiento anterior se realizó en diversos lotes de ovocitos, es decir, obtenidos a partir de distintas ranas.

6. RESULTADOS

6.1 Obtención de la Curva dosis-respuesta para determinar la dosis eficaz 50 de progesterona.

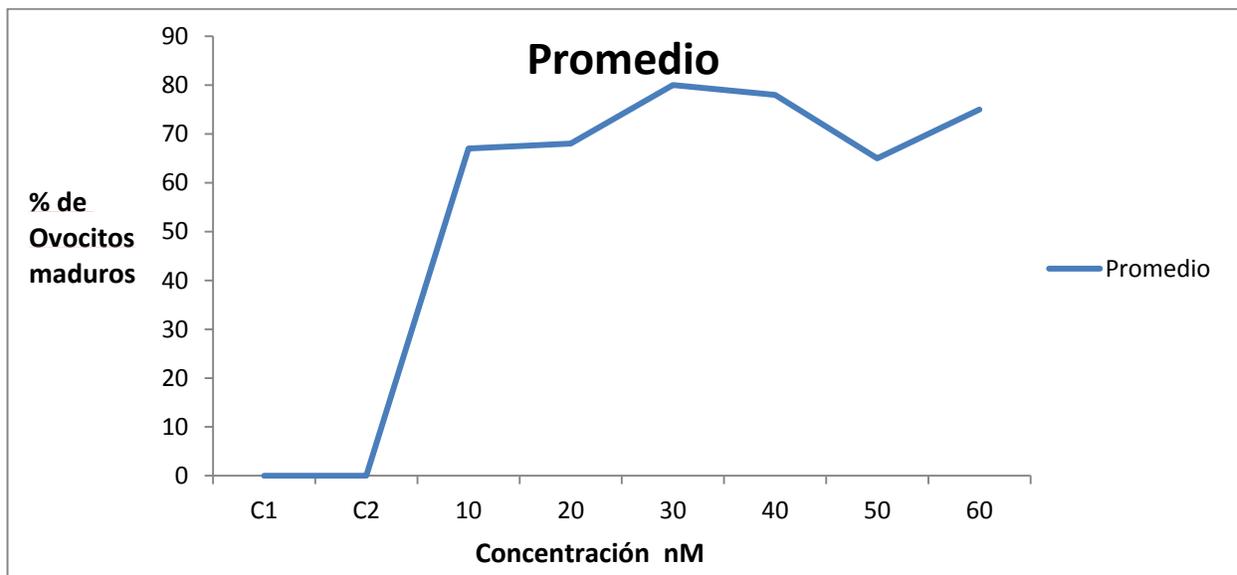
Cuatro lotes de ovocitos se incubaron con concentraciones distintas de progesterona (Tabla 1).

Se determinó la dosis a la cual maduraba el 50% del total de ovocitos utilizados (Tabla 3).

Tabla 3. Frecuencia de GVBD ocurrida bajo distintas concentraciones de progesterona. Número de ovocitos maduros generado por cada concentración de progesterona, por el control 1 (ND96) y por el control 2 (etanol). Se muestran 4 lotes, cada uno con 30 ovocitos en total. Las concentraciones de progesterona iban de 10 a 60nM.

()nM	Lote I	Lote II	Lote III	Lote IV	Promedio
C1	0	0	0	0	0
C2	0	0	0	0	0
10	17	19	16	15	17
20	14	20	14	20	17
30	21	21	17	21	20
40	18	19	21	20	20
50	5	20	18	22	16
60	15	21	20	19	19

La dosis eficaz 50 aproximada que generó la maduración de los ovocitos a las 24hrs fue la de 10 nM (Gráfica 1) y la más baja que se probó.



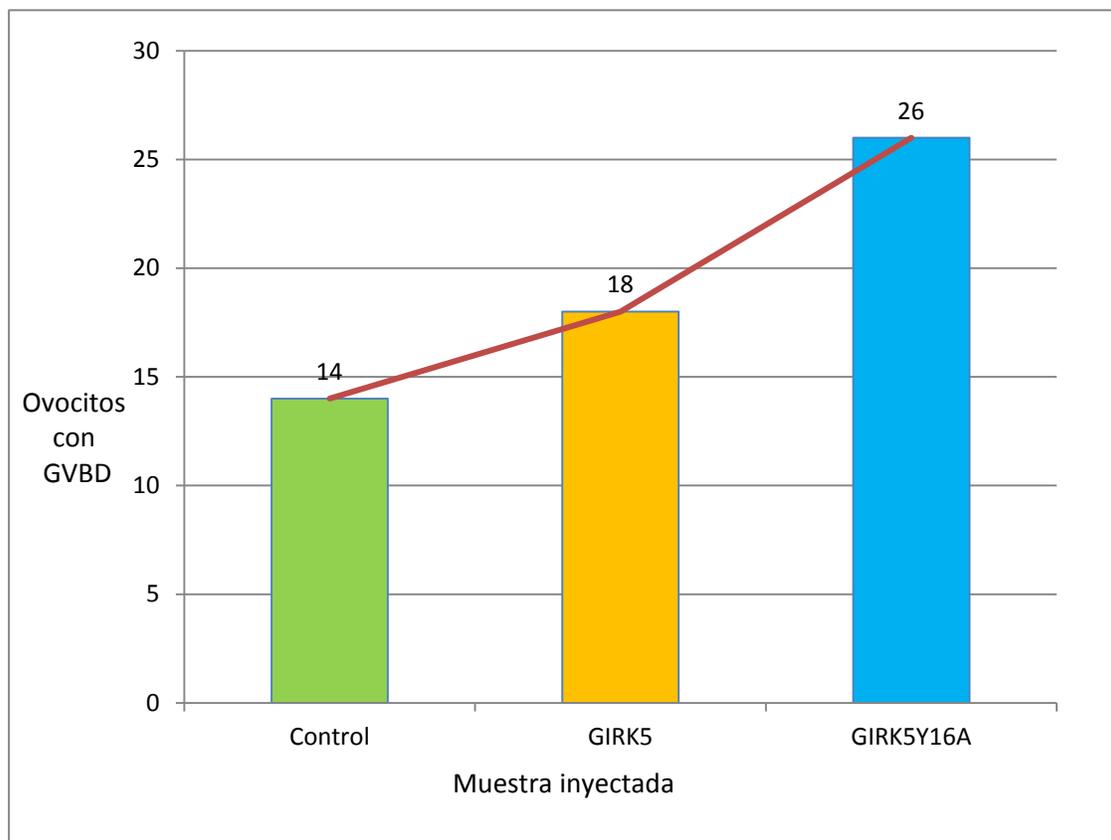
Gráfica 1. Curva dosis-respuesta para determinar la dosis eficaz 50 de progesterona. Porcentaje de ovocitos maduros respecto a cada concentración de progesterona. La línea muestra el promedio de cuatro lotes.

6.2 Efecto de la expresión del canal GIRK5 y del canal GIRK5Y16A en la maduración del ovocito.

Una vez realizada la microinyección de los mRNAs (20 ng por ovocito), se dejaron transcurrir 48hrs para su expresión. Se agregó la progesterona al medio y 24hrs después se realizó el conteo de los ovocitos con la formación del GVBD. En la tabla 4 y gráfica 2 se muestra el total de ovocitos maduros generados por cada muestra, en un total de 3 lotes.

Tabla 4. Frecuencia observada de la formación del GVBD bajo tratamiento con progesterona. Se muestra el número de ovocitos maduros generados por cada muestra (control, GIRK5 y Y16A) que fueron sometidos al tratamiento con progesterona. Se utilizó un total de tres lotes.

	Muestra inyectada			Lote
	Control	GIRK5	GIRK5Y16A	
Frecuencia de formación del GVBD en ovocitos.	5	5	10	1
	4	5	6	2
	5	8	10	3
	14	18	26	Total



Gráfica 2. Gráfica de la frecuencia de la maduración con progesterona. Total de ovocitos maduros generados por cada muestra (control, GIRK5 y Y16A). Se muestra la suma de tres lotes.

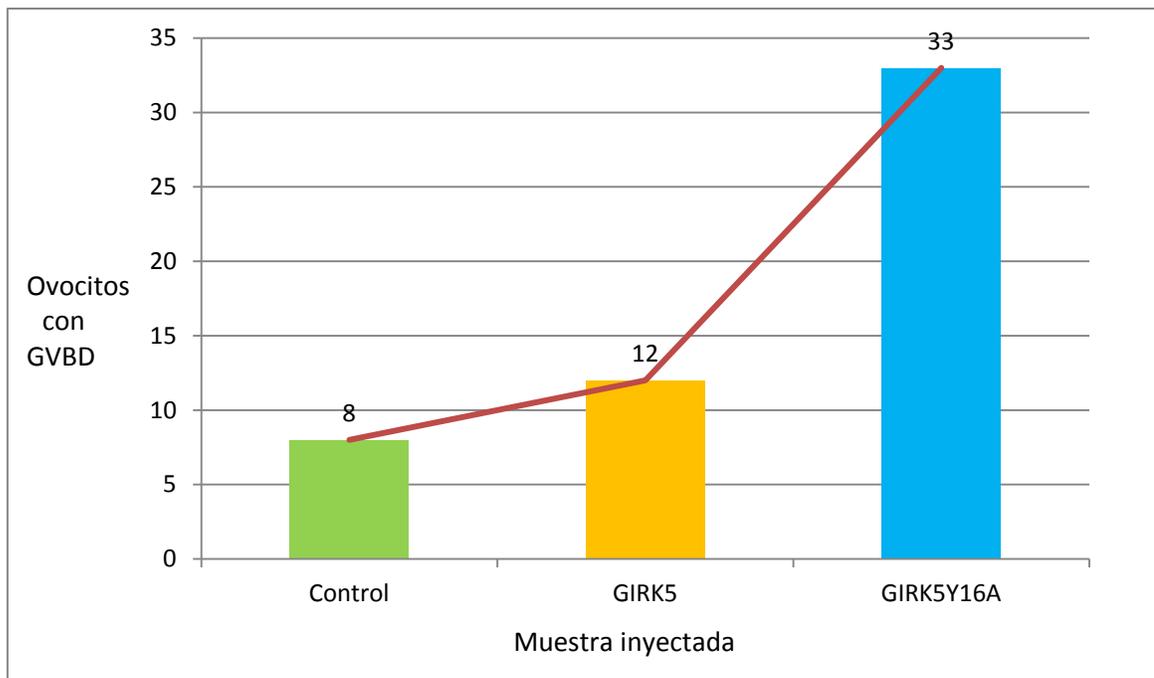
La muestra que provocó una cantidad mayor de ovocitos maduros fue la del canal Y16A, con 26 ovocitos con formación del GVBD a diferencia de 18 ocasionados por el canal WT y 14 de la muestra sin inyección.

6.3 Efecto de la expresión del canal GIRK5 y del canal GIRK5Y16A en la maduración del ovocito, sin tratamiento de progesterona.

En algunos lotes ocurrió la maduración de los ovocitos a las 48 hrs después de la microinyección del mRNA de los canales sin la progesterona. Se hizo el conteo del GVBD en los lotes que no requirieron someterse al tratamiento con la hormona. (Tabla 5 y Gráfica 3).

Tabla 5. Frecuencia observada de GVBD sin tratamiento de progesterona. Número de ovocitos maduros por cada muestra. Se realizó el conteo a las 48 hrs después de la inyección de los canales, previo a la adición de la hormona. Se muestran cinco lotes.

	Muestra inyectada			
	Control	GIRK5	GIRK5Y16A	Lote
Frecuencia de formación de GVBD en ovocitos.	2	4	12	1
	4	5	9	2
	2	0	6	3
	0	1	3	4
	0	2	3	5
Total	8	12	33	



Gráfica 3. Frecuencia de maduración, sin progesterona. Total de ovocitos con formación de GVBD generados por cada muestra en ausencia de la progesterona. Se muestra la suma de cinco lotes.

En las pruebas sin tratamiento de progesterona, la muestra que obtuvo un mayor número de ovocitos con GVBD fue con el canal mutante Y16A, con un total de 33 ovocitos maduros, a diferencia de los 12 ocasionados por el GIRK5 y sólo 8 por la muestra control, ocurridos en un total de cinco lotes. Es importante subrayar que la expresión del canal endógeno GIRK5 sin la tirosina Y16 fosforilada, también contribuiría a que los ovocitos sin inyectar favorezcan la presencia de la GVBD.

En las pruebas sin tratamiento de progesterona, la muestra que obtuvo un mayor número de ovocitos maduros fue la Y16A. Se obtuvieron 33 ovocitos con GVBD ocasionados por el canal Y16A, a diferencia de 12 por el canal GIRK5 y sólo 8 por la muestra control, ocurridos en un total de cinco lotes.

Es importante tomar en cuenta que estos resultados ocurrieron a las 48 hrs después de la inyección de los mRNAs y sin el efecto de la progesterona *in vitro*, es decir 24 horas antes del tiempo fijado para el conteo. Si se comparan los resultados entre las pruebas con progesterona (Gráfica 2) y sin progesterona (Gráfica 3) se puede apreciar que en los ovocitos sin la hormona la discrepancia entre el efecto del canal Y16A y el control es mucho mayor que en los ovocitos con progesterona.

6. 4 Prueba estadística

Debido a que los datos obtenidos por la formación del GVBD son datos de tipo cualitativos, se decidió utilizar la prueba chi cuadrada (X^2) para el análisis de frecuencias de variables cualitativas; es decir la frecuencia de GVBD generada por las variables: Control, GIRK5-WT y GIRK5Y16A. Se compararon las frecuencias observadas con las esperadas, para determinar si se acepta o se rechaza la hipótesis nula (H_0).

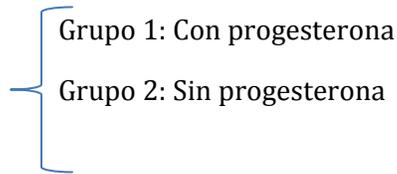
Contraste de hipótesis:

Hipótesis nula (H_0): No existen diferencias significativas en la maduración de los ovocitos sin y con los canales GIRK5.

Hipótesis alterna (H_a): Existen diferencias significativas en la maduración de los ovocitos en función del canal GIRK5 inyectado.

Muestras:

- A) Control y GIRK5-WT
- B) Control y GIRK5Y16A
- C) GIRK5-WT y GIRK5Y16A.



Aplicando la fórmula:

$$X^2 = \sum^H \sum_{N=1} (f_o - f_e)^2 = \frac{\quad}{f_e}$$

Se hizo la comparación entre el valor calculado (X^2_c) de cada muestra y el valor tabulado (X^2_t) para cada caso (Tabla 6), con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Los grados de libertad para todos los casos fue $gl=1$ y el valor de tablas $X^2_t = 3.841$.

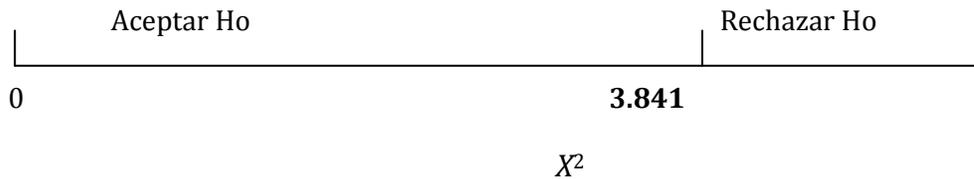


Figura 19. Zona de aceptación y rechazo para la prueba X^2 . El valor de tablas fue de 3.841, con un $\alpha = 0.05$ y 1 grado de libertad.

6.4.1 Prueba estadística para las muestras del grupo 1.

Tabla 6. Comparación estadística entre las muestras Control, GIRK5 y GIRK5Y16A, con tratamiento de progesterona. A) Control y GIRK5: El valor X^2_c fue menor que el valor X^2_t , por lo que se aceptó H_0 . B) Control y GIRK5Y16A: $X^2_c > X^2_t$; se rechaza H_0 C) GIRK5 y GIRK5Y16A: $X^2_c > X^2_t$; se rechaza H_0 .

A) GVBD				B) GVBD				C) GVBD			
	Sí	No	Total		Sí	No	Total		Sí	No	Total
Control	14	44	58	Control	14	44	58	GIRK5	18	42	60
GIRK5	18	42	60	GIRK5Y16A	26	18	44	GIRK5Y16A	26	18	44
Total	32	86	118	Total	40	62	102	Total	44	60	104
$X^2_c = 0.512760626 < X^2_t = 3.841$ Se acepta H_0				$X^2_c = 12.82323289 > X^2_t = 3.841$ Se rechaza H_0				$X^2_c = 8.801322314 > X^2_t = 3.841$ Se rechaza H_0			

Interpretación de la prueba:

Entre las muestras control y GIRK5 el valor X^2_c fue menor al valor X^2_t , cayendo en la zona de rechazo (Figura 19), por lo que se aceptó H_0 (Tabla 6, A), es decir que no existen diferencias significativas en el número de ovocitos maduros ocurridos en ambas muestras. Ya que se considera que la muestra GIRK5 no es diferente de la muestra control, quiere decir que el canal WT no intervino acelerando la maduración.

Para el grupo B el valor X^2_c fue mayor al valor X^2_t , por lo que se rechazó H_0 ; el efecto en la maduración por las muestras control y GIRK5Y16A fue significativamente diferente uno del otro. Esto indica que el canal mutante Y16A intervino acelerando la maduración de los ovocitos (Tabla 6, B).

Para el grupo C se rechazó H_0 , es decir que el efecto de los canales en la maduración de los ovocitos fue significativamente distinto uno del otro. (Tabla 6, C).

6.4.2 Prueba estadística para las muestras del grupo 2.

Tabla 7. Comparación estadística entre las muestras Control, GIRK5 y GIRK5Y16A, sin tratamiento de progesterona. A) Control y GIRK5: El valor X^2_c fue menor que el valor X^2_t ; por lo que se aceptó H_0 . B) Control y GIRK5Y16A: $X^2_c > X^2_t$; se rechaza H_0 C) GIRK5 y GIRK5Y16A $X^2_c > X^2_t$; se rechaza H_0 .

A)				B)				C)			
GVBD		Total	Total	GVBD		Total	Total	GVBD		Total	Total
Sí	No			Sí	No			Sí	No		
Control	8	88	96	GIRK5	11	86	97	Control	8	88	96
GIRK5	11	86	97	GIRK5Y16A	33	44	77	GIRK5Y16A	33	44	77
Total	19	174	193		44	130	174	Total	41	132	173
$X^2_c = 0.491504564 < X^2_t = 3.841$				$X^2_c = 28.16356949 > X^2_t = 3.841$				$X^2_c = 28.3450776 > X^2_t = 3.841$			
Se acepta H_0				Se rechaza H_0				Se rechaza H_0			

Interpretación de la prueba:

Para el grupo de muestras sin progesterona se obtuvieron los mismos resultados que para el grupo con progesterona: Se aceptó H_0 para el grupo A (Tabla 7, A) y se rechazó H_0 para los grupos B y C (Tabla 7, B y C).

Grupo A: Se aceptó H_0 .- No existen diferencias significativas entre las muestras.

Grupo B: Se rechazó H_0 .- Existen diferencias significativas en el efecto en la maduración por las muestras.

Grupo C: Se rechazó H_0 .- Existen diferencias significativas en el efecto en la maduración por las muestras.

7. DISCUSIÓN

7.1 La mutante GIRK5-Y16A favorece la maduración de los ovocitos.

Recientemente nuestro laboratorio publicó que el canal GIRK5-WT se encuentra retenido en el retículo endoplásmico a diferencia del canal GIRK5-Y16A, que es funcional y, por consiguiente, se expresa en la membrana plasmática.

En todos los casos el canal que generó un mayor número de ovocitos maduros fue el Y16A. A los resultados se les aplicó una prueba estadística. En ambas pruebas se obtuvo que entre la muestra control y el canal GIRK5-WT no hay diferencias significativas en el efecto sobre la maduración, en cambio, entre el control y el canal Y16A el efecto fue significativamente distinto. El hecho de que el canal Y16A sea funcional y el WT esté retenido, indica que la maduración se ve afectada cuando el canal es funcional.

7.2 Maduración sin progesterona

En la mayoría de los lotes utilizados para las pruebas, ocurrió el GVBD de los ovocitos previo a la adición de la hormona. Como se mencionó anteriormente, el proceso de maduración se regula por vías intracelulares distintas que no dependen solo de la progesterona. Por ejemplo, está la vía de los receptores de insulina IGF1 (Schmitt & Nebreda, 2002) o la de los receptores de andrógenos AR (Lutz *et al.*, 2001). Aún en la vía de la maduración inducida por progesterona, la hormona es la que desencadena la cascada de señalización, pero no es un elemento indispensable para reanudar la meiosis.

Esto sugiere que la expresión del canal puede provocar la activación de alguna de las vías que regulan la reanudación de la maduración, lo que permite que los ovocitos salgan del estado arrestado, sin la necesidad de una hormona.

A pesar de que no se puede descartar la posibilidad de una exposición previa a alguna otra de las hormonas esteroideas producidas por las células foliculares, o a la acción de la colagenasa como factores que pudieron provocar la maduración anticipada, finalmente todos los ovocitos utilizados fueron tomados al azar, por lo que tuvieron la misma probabilidad de madurar por alguna de estas causas. Al final, para todos los casos, el canal que provocó más ovocitos con GVBD en un tiempo menor, fue el Y16A.

En ambas pruebas, con y sin progesterona, el efecto del canal Y16A en la maduración fue significativamente diferente del control, pero en particular, en las pruebas sin tratamiento esta discrepancia fue considerablemente mayor (gráfica 3), esto indica que aún en el caso de que los ovocitos hubiesen madurado por el efecto de la progesterona *in vitro* y no por la expresión del canal, en las pruebas sin progesterona sí ocurrió la maduración de los ovocitos, en una cantidad mayor y en un tiempo más corto, lo que comprueba que fue efecto del canal y no de la hormona lo que provocó que salieran del estado arrestado.

Quizá la frecuencia de formación del GVBD tan similar entre las tres muestras para las pruebas con tratamiento de progesterona, puede explicarse en función del efecto de la hormona por sí sola, pero el efecto diferente que se obtuvo para los ovocitos sin tratamiento, comprueba que la maduración ocurrió por la expresión del canal y no por efecto de la progesterona.

Esto sugiere que la expresión del canal Y16A participa acelerando la maduración en algún punto de la vía, independiente de la progesterona.

7.3 La mutante GIRK5-Y16A y las subunidades G $\beta\gamma$ y G α_s .

Ya que la maduración del ovocito depende de una compleja red de vías y de mensajeros intracelulares, es difícil determinar con exactitud en qué punto interviene la expresión del canal. No obstante, lo que se conoce sobre la activación de los canales GIRK, sus propiedades biofísicas y sus moduladores, nos puede ofrecer una idea más clara de cómo participa en este proceso.

Los canales GIRK son activados por las subunidades G $\beta\gamma$. Las proteínas G $\beta\gamma$ se necesitan para su activación por lo que los canales GIRK5 actúan como agentes “secuestrantes” del dímero, disminuyendo su concentración en el medio intracelular. Por consiguiente, aumentan las subunidades G α_i libres. Si hay más proteínas G α_i en el espacio intracelular estas pueden inhibir a la adenilato ciclasa (AC), lo cual provoca el descenso de la concentración de AMPc y, con ello, aumenta la velocidad de la maduración.

Por otra parte, al activarse los canales GIRK5-Y16A, la membrana del ovocito se hiperpolariza y la actividad de las subunidades G α_s decrece. Si esto ocurre, la AC no será estimulada y el AMPc dejará de sintetizarse, provocando la activación del MPF y la formación del GVBD.

7.4 Efecto del canal GIRK5-WT en la maduración.

El efecto ocasionado por el canal WT no se consideró significativo, sin embargo, la maduración ocurrida en algunos ovocitos puede explicarse en función del efecto de las fosfatasas endógenas. Ya que la fosforilación del residuo de tirosina Y16 mantiene la retención del canal, algunas fosfatasas endógenas podrían desfosforilar al canal y hacerlo funcional, provocando la maduración de los ovocitos. Una vez que el canal está desfosforilado, se podrá expresar en la membrana plasmática, lo que provoca el GVBD.

La abundancia de las fosfatasas endógenas puede variar entre los lotes, es por ello que en algunos casos ocurrió el GVBD de los ovocitos con el canal WT.

El uso de un inhibidor específico de fosfatasas como el ácido okadaico, evitaría que las fosfatasas endógenas provoquen la desfosforilación del canal WT. Sin la intervención de las fosfatasas, se podrá evaluar mejor el efecto del canal.

7.5 Canales de potasio y progresión del ciclo celular en células cancerosas.

Los canales de K⁺ juegan un papel importante en una gran variedad de procesos celulares y su función anormal está relacionada con diversas enfermedades (Ouadid & Ahidouch, 2013). La investigación de los canales de K⁺ y su participación en el ciclo celular se ha incrementando en las últimas décadas por su importante relación con el desarrollo del cáncer.

La expresión, regulación o localización irregular de los canales de K⁺ puede alterar la actividad de la maquinaria del ciclo celular, estas perturbaciones resultan en una ilimitada proliferación, confiriendo resistencia a apoptosis y permitiendo el desarrollo del cáncer.

Los iones de K⁺ son importantes para el mantenimiento del potencial de membrana, la fuerza conductora del flujo de Ca⁺² y regulan el volumen de las células en crecimiento; tales funciones están relacionadas con la proliferación celular.

Diversos experimentos han demostrado que la inhibición genética o farmacológica de los canales de K⁺ detienen el crecimiento celular (Ouadid & Ahidouch, 2013) pues son necesarios para controlar puntos específicos en la progresión del ciclo, en las transiciones: G0/G1, G1/S y G2/M. La inhibición de la actividad de ciertos canales de K⁺ puede inducir el

arresto en la fase G₀/G₁ en células cancerosas, y son esenciales para la transición de G₁/ S (Lansu & Gentil, 2013).

El estudio de los canales de K⁺ y su intervención específica en la regulación del ciclo celular, ofrece la oportunidad de desarrollar herramientas más específicas para la terapia contra el cáncer.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el canal de potasio GIRK5 podría participar en la progresión del ciclo celular, en la transición de G₂/M. El modelo propuesto para la activación del canal GIRK5 involucra un cambio en el potencial de membrana, una hiperpolarización que altera la regulación de las proteínas G, implicadas en la señalización de la reanudación de la fase M.

El estudio de la participación de un canal de K⁺ en el ciclo celular de una célula germinal, como el ovocito, resulta trascendente y ofrece un amplio campo de estudio por investigar.

El ovocito de la rana *Xenopus* es una herramienta versátil que brinda múltiples oportunidades de investigación. Ésta célula ha ampliado el conocimiento biológico de manera contundente y aún ofrece numerosas técnicas por explotar que seguirán impulsando el conocimiento científico.

8. CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que el canal GIRK5 funcional favorece la maduración del ovocito de *Xenopus laevis*. La maduración de los ovocitos de *X. laevis* ocurrida en ausencia de la progesterona *in vitro*, sugiere que la expresión del canal mutante Y16A puede intervenir en algún punto de la vía de la maduración. La maduración sin hormona sugiere que el canal participa en una vía alterna a la vía activada por progesterona.

9. PERSPECTIVAS

Para complementar los resultados de este trabajo, en futuras investigaciones se tiene como perspectiva:

- Silenciar la expresión del canal endógeno mediante un RNA de interferencia o morfolino RNA anti sentido. Se evaluará el efecto que tiene la inhibición del canal endógeno en la maduración.
- Utilizar un inhibidor de fosfatasas endógenas para poder evaluar mejor el efecto del canal y sus mutantes en la maduración.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewia, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P.** (2004). *Molecular biology of the cell*. 4th edition. Garland science. USA *et al.* *Biología molecular de la célula*. Barcelona: Omega. ISBN 54-282-1351-8.
- Bailey, C. P., & Kelly, E.** (2011). Elucidating Agonist-Selective Mechanisms of G Protein-Coupled Receptor Desensitization Methods for the Discovery and Characterization of G Protein-Coupled Receptors. In C. W. Stevens (Ed.), (Vol. 60, pp. 323–346). Humana Press.
- Berlin, S., Keren-Raifman, T., Castel, R., Rubinstein, M., Dessauer, C. W., Ivanina, T., & Dascal, N.** (2010). G alpha(i) and G betagamma jointly regulate the conformations of a G betagamma effector, the neuronal G protein-activated K⁺ channel (GIRK). *The Journal of biological chemistry*, 285(9), 6179–85.
- Barish, M.E.** (1983). A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. *J. Physiol.* 342:309-25.
- Bauer, C. K., Falk, T. & Schwarz, J. R.** (1996). An endogenous inactivating inward-rectifying potassium current in oocytes of *Xenopus laevis*. *Pfl ugers Archiv* 432, 812—820
- Bichet, D., Haass, F.A. y Jan, L.Y.** (2003). Merging functional studies with structures of inward-rectifier K⁺ channels. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 957-67.
- Boonyaratanakornkit V, Edwards DP.** Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. *Semin Reprod Med* 2007; 25: 139-53.
- Chaves, H., Villalba, C., Lagos, L. Vargas, R., Martínez-Wittinghan, F., Clavijo, C. Camacho, M.** (2003). Expresión de canales de potasio voltaje Dependientes en ovocitos de *Xenopus laevis* (Amphibia). *Acta Biológica colombiana Volumen 8 N.1*
- Choe, S.** (2002). Potassium channel structures. *Nature Rev. Neurosci.* 3:115-121.
- Crane, R., Gadea, B., Littlepage, L., Wu, H., & Ruderman, J. V.** (2004). Aurora A, meiosis and mitosis. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 96(3),
- Deng, J., Lang, S., Wylie, C., & Hammes, S. R.** (2008). The *Xenopus laevis* isoform of G protein-coupled receptor 3 (GPR3) is a constitutively active cell surface receptor that participates in maintaining meiotic arrest in *X. laevis* oocytes. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 22(8), 1853–65.
- Díaz-Bello B, Rangel-García CI, Salvador C, Carrisoza-Gaytán R, Escobar LI** (2013) The Polarization of the G-Protein Activated Potassium Channel GIRK5 to the Vegetal Pole of *Xenopus laevis* Oocytes Is Driven by a Di-Leucine Motif. *PLoS ONE* 8(5): e64096.
- Dumont, J. N.** (1972), Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.*, 136: 153–179.
- Evans BJ, Kelley DB, Tinsley RC, Melnick DJ, Cannatella DC.** A mitochondrial DNA phylogeny of clawed frogs: phylogeography on sub-Saharan Africa and implications for polyploid evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2004;33:197–213.
- El-Jouni, W., Haun, S., Hodeify, R., Hosein Walker, A., & Machaca, K.** (2007). Vesicular traffic at the cell membrane regulates oocyte meiotic arrest. *Development (Cambridge, England)*, 134(18), 3307–15.
- El-Jouni, W., Haun, S., & Machaca, K.** (2008). Internalization of plasma membrane Ca²⁺-ATPase during *Xenopus* oocyte maturation. *Developmental biology*, 324(1), 99–107.
- Evaul, K., Jamnongjit, M., Bhagavath, B., & Hammes, S. R.** (2007a). Testosterone and progesterone rapidly attenuate plasma membrane Gbetagamma-mediated signaling in *Xenopus laevis* oocytes by signaling through classical steroid receptors. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 21(1), 186–96.
- Gallo, C. J., Hand, a R., Jones, T. L., & Jaffe, L. a.** (1995). Stimulation of *Xenopus* oocyte maturation by inhibition of the G-protein alpha S subunit, a component of the plasma membrane and yolk platelet membranes. *The Journal of cell biology*, 130(2), 275–84.
- Gilbert, S. Singer, S.** (2006). *Developmental Biology*. E.U.A: Sinauer Associates. Inc. Publishers.
- Goris, J., Hermann, J., Hendrix, P., Ozon, R., & Merlevede, W.** (1989). Okadaic acid, a specific protein

phosphatase inhibitor, induces maturation and MPF formation in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS letters*, 245(1-2), 91-4.

Gurdon, J.B., Laskey, R.A. & Reeves, O.R. J. (1975). The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *J Embryol. Exp. Morphol.* 34, 93-112

Gurdon, J. (1996). Introductory comments: *Xenopus* as a laboratory animal. In: *The biology of Xenopus*. Oxford University press.

Gurdon, J. B., & Hopwood, N. (2000). The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *The International journal of developmental biology*, 44(1), 43-50.

Guzmán, L., Romo, X., Grandy, R., Soto, X., Montecino, M., Hinrichs, M., & Olate, J. (2005). A Gbetagamma stimulated adenylyl cyclase is involved in *Xenopus laevis* oocyte maturation. *Journal of cellular physiology*, 202(1), 223-9.

Haccard, O., Dupré, A., Liere, P., Pianos, A., Eychenne, B., Jessus, C., & Ozon, R. (2012). Naturally occurring steroids in *Xenopus* oocyte during meiotic maturation. Unexpected presence and role of steroid sulfates. *Molecular and cellular endocrinology*, 362(1-2), 110-9.

Hammes, S. R. (2003). The further redefining of steroid-mediated signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2168-70.

Hedin, Karen E, Lim, Nancy F, Clapham, David E, Cloning of a *Xenopus laevis* Inwardly Rectifying K⁺ Channel Subunit That Permits GIRK1 Expression of IKACH Currents in Oocytes, *Neuron*, Volume 16, Issue 2, February 1996, Pages 423-429, ISSN 0896-6273

Hille, B. (2001). *Ionic channels of excitable membranes*, Sinauer, Sunderland, Mass., USA. Pp: 2-4, 13-18, 131-160.

Hughes M.K., Hughes A.L. Evolution of duplicate genes in a tetraploid animal, *Xenopus laevis*. *Mol. Biol. Evol.* 1993;10:1360-1369.

Invitrogen (Ed.). (n.d.). *Bacteria MC1061 Ultracomp E.coli*. Retrieved from

http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ultracomp_man.pdf

Ippolito, D.L., Temkin, P.A., Rogalski, S.L. and Chavkin, C. (2002) N-terminal tyrosine residues within the potassium channel Kir3 modulate GTPase activity of Galphai. *J. Biol. Chem.* 277, 32692-32696

Iwashita, J., Kodama, A., Konno, Y., Abe, T., & Murata, J. (2013). Histone deacetylase induces accelerated maturation in *Xenopus laevis* oocytes. *Development, growth & differentiation*, 55(3), 319-29.

Karp, G. 2005. *Biología Celular y Molecular. Conceptos y experimentos*. (4^a ed). McGraw-Hill Interamericana .

Kishimoto T (2003) Cell-cycle control during meiotic maturation. *Curr Opin Cell Biol* 15:654-663.

Krapivinsky G., Gordon E.A., Wickman K, Velimirovic B., Krapivinsky L., Clapham D.E. (1995) The G-protein-gated atrial K⁺ channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K⁺-channel proteins *Nature*, 374 (6518) , pp. 135-141.

Lansu, K., & Gentil, S, (2013). Potassium channel activation inhibits proliferation of breast cancer cells by activating a senescence program. *Cell Death and Disease* 4, e652.

Lei, Q., Jones, M. B., Talley, E. M., Schrier, a D., McIntire, W. E., Garrison, J. C., & Bayliss, D. a. (2000). Activation and inhibition of G protein-coupled inwardly rectifying potassium (Kir3) channels by G protein beta gamma subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(17), 9771-6.

Lesage F, Duprat F, Fink M, Guillemare E, Coppola T, Lazdunski M, Hugnot J-P (1994) Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G-protein coupled K1 channels in the brain. *FEBS Lett* 353:37-42.

Liu, X. Johné. 2006. *Xenopus Protocols: Cell Biology and Signal Transduction Methods in Molecular Biology* vol 322 (Humana Publishing Inc).

Lu L, Montrose-Rafizadeh C, Hwang TC, Guggino WB (1990): A delayed rectifier potassium current in *Xenopus* oocytes. *Biophys J* 57:1117-1123.

Lutz, L. B., Kim, B., Jahani, D., & Hammes, S. R. (2000). G protein beta gamma subunits inhibit nongenomic

progesterone-induced signaling and maturation in *Xenopus laevis* oocytes. Evidence for a release of inhibition mechanism for cell cycle progression. *The Journal of biological chemistry*, 275(52), 41512–20.

Lutz, L. B., Cole, L. M., Gupta, M. K., Kwist, K. W., Auchus, R. J., & Hammes, S. R. (2001). Evidence that androgens are the primary steroids produced by *Xenopus laevis* ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), 13728–33.

Machaca, K, & Hartzell, H. C. (1998). Asymmetrical distribution of Ca-activated Cl channels in *Xenopus* oocytes. *Biophysical journal*, 74(3), 1286–95.

Machaca, Khaled. (2007). Ca²⁺ Signaling Differentiation During Oocyte Maturation. *Journal of Cellular Physiology*, (May), 331–340.

MacKinnon, R. (2003) Potassium channels. *FEBS Lett.* 555:62-5.

Mark, M.D. y Herlitze, S. (2000). G-protein mediated gating of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur. J. Biochem.* 267:5830-6

Martinez, S., Grandy, R., Pasten, P., Montecinos, H., Montecino, M., Olate, J., & Hinrichs, M. V. (2006). Plasma membrane destination of the classical *Xenopus laevis* progesterone receptor accelerates progesterone-induced oocyte maturation. *Journal of*

Mase, Y., Yokogawa, M., Osawa, M., & Shimada, I. (2012). Structural basis for modulation of gating property of G protein-gated inwardly rectifying potassium ion channel (GIRK) by i/o-family G protein α subunit (Gai/o). *The Journal of biological chemistry*, 287(23), 19537–49.

Masui, Y. and Markert, C. L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177, 129-145.

Miledi R, Parker I, Sumikawa K 1982. Properties of acetylcholine receptors translated by cat muscle mRNA in *Xenopus* oocytes. *EMBO J*;1:1307–1312.

Miledi R. 1982. A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* ;215:491–497.

Miledi, B. Y. R., & Parker, I. (1984). Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes. From the Department of Biophysics, University College London, Gower Street, showed only small or no transient outward currents. Transition up to high (ca. +60 mV) positive potentials, 173–183.

Mora, S.I. y Escobar, L.I. (2005). Phosphorylation of a tyrosine at the N-terminus regulates the surface expression of GIRK5 homomultimers. *FEBS Lett.* 579:3019-23.

Murakami, M., Vande, G., (1997). Mechanisms of *Xenopus* oocyte maturation. *Methods in Enzymology*, 283, 584–600. Academic Press, 1997, Volume 283, Pages 584–600, ISSN 0076-6879, ISBN 9780121821845

Müllner, C., Vorobiov, D., Bera, a K., Uezono, Y., Yakubovich, D., Frohnwieser-Steinecker, B., Dascal, N., *et al.* (2000b). Heterologous facilitation of G protein-activated K⁽⁺⁾ channels by beta-adrenergic stimulation via cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of general physiology*, 115(5), 547–58. **Nebreda**, a R., & Ferby, I. (2000). Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Current opinion in cell biology*, 12(6), 666–75.

Nikolov, E. N., & Ivanova-Nikolova, T. T. (2007). Dynamic integration of alpha-adrenergic and cholinergic signals in the atria: role of G protein-regulated inwardly rectifying K⁺ channels. *The Journal of biological chemistry*, 282(39), 28669–82.

Ogawa, A., Dake, J., Iwashina, Y., & Tokumoto, T. (2011). Induction of ovulation in *Xenopus* without hCG injection: the effect of adding steroids into the aquatic environment. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 9(1), 11.

Okada, I., Fujiki, S., Iwase, S., & Abe, H. (2012). Stabilization of actin filaments prevents germinal vesicle breakdown and affects microtubule organization in *Xenopus* oocytes. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 69(5), 312–23.

Oñate, A., Herrera, L., Antonelli, M., Birnbaumer, L., & Olate, J. (1992). *Xenopus laevis* oocyte G α subunits mRNAs. Detection and quantitation during oogenesis and early embryogenesis by competitive reverse PCR. *FEBS Letters*, 313(3), 213–219.

- Ouadid-Ahidouch H** and Ahidouch A (2013) K⁺ channels and cell cycle progression in tumor cells. *Front. Physiol.* 4:220.
- Pfeuty, B.,** Bodart, J.-F., Blossey, R., & Lefranc, M. (2012a). A dynamical model of oocyte maturation unveils precisely orchestrated meiotic decisions. *PLoS computational biology*, 8(1), e1002329.
- Rasar, M. a,** & Hammes, S. R. (2006). The physiology of the *Xenopus laevis* ovary. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 322, 17–30.
- Reed, B. T.** (n.d.) 2005. Guidance on the housing and care of the African clawed frog *Xenopus laevis*.
- Rios-Cardona, D.,** R.R. Ricardo-Gonzalez, A. Chawla, and J.E. Ferrell, Jr. 2008. A role for GPRx, a novel GPR3/6/12-related G-protein coupled receptor, in the maintenance of meiotic arrest in *Xenopus laevis* oocytes. *Dev Biol.* 317:380-8.
- Romo, X.,** Hinrichs, M. V., Guzmán, L., & Olate, J. (2002). G (alpha)s levels regulate *Xenopus laevis* oocyte maturation. *Molecular reproduction and development*, 63(1), 104–9.
- Romo, X.,** Pastén, P., Martínez, S., Soto, X., Lara, P., de Arellano, A. R., Torrejón, M., Montecino, M., Hinrichs, M. V. and Olate, J. (2008), xRic-8 is a GEF for G α and participates in maintaining meiotic arrest in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Cell. Physiol.*, 214: 673–680.
- Rubinstein, M.,** Peleg, S., Berlin, S., Brass, D., & Dascal, N. (2007). Galphai3 primes the G protein-activated K⁺ channels for activation by coexpressed Gbetagamma in intact *Xenopus* oocytes. *The Journal of physiology*, 581(Pt 1), 17–32.
- Ruppersberg, J.** (2000) Intracellular regulation of inward rectifier K⁺ channels. *Pflügers Arch.* 441:1-11.
- García Sáinz, J.** 1996. Hormonas : mensajeros químicos y comunicación celular. (2^a ed) México: Fondo de cultura económica.
- Salvador, C.,** Martínez, M., Mora, S.I., Waskar, E., Farías, J.M., Gamba, G., and Escobar, L.I. (2001). Functional properties of a truncated recombinant GIRK5 potassium channel. *Biochim. Biophys. Acta.* 1512:135–47.
- Salvador, C.,** Mora, S.I., Ordaz, B., Antaramian, A., Vaca, L. y Escobar L.I. (2003). Basal activity of GIRK5 isoforms. *Life Sciences.* 72:1509–18.
- Schindler, K.** (2011). *Cell Cycle in Development.* (J. Z. Kubiak, Ed.) (Vol. 53, pp. 309–341). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Schmitt, A.,** and A. R. Nebreda. 2002. Signalling pathways in oocyte meiotic maturation. *J. Cell Sci.* 115:2457–2459.
- Selenko, P.** & Wagner, G. 2007. Looking into live cells with in-cell NMR spectroscopy, *Journal of Structural Biology*, Volume 158, Issue 2, Pages 244-253, ISSN 1047-8477,
- Sen, A.,** Prizant, H., & Hammes, S. R. (2011). Understanding extranuclear (nongenomic) androgen signaling: what a frog oocyte can tell us about human biology. *Steroids*, 76(9), 822–8.
- Sheng, Y.,** Tiberi, M., Booth, R. A., Ma, C. and Liu, X. J. (2001). Regulation of *Xenopus* oocyte meiosis arrest by G protein betagamma subunits. *Curr. Biol.* 11, 405-416.
- Sheng, Y.,** Montplaisir, V., & Liu, X. J. (2005). Co-operation of G α and Gbetagamma in maintaining G2 arrest in *Xenopus* oocytes. *Journal of cellular physiology*, 202(1), 32–40.
- Smith, P.** Sellers, L. y Humphrey, P. (2001) Somatostatin activates two types of inwardly rectifying K⁺ channels in MIN-6 cells. *J. Physiol.* 532:127-42.
- Sobczak, K.,** Bangel-Ruland, N., Leier, G., & Weber, W.-M. (2010). Endogenous transport systems in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane. *Methods (San Diego, Calif.)*, 51(1), 183–9.
- Solíz, M. R.** Lobos, V. G. Iriarte, W. A. 2004. Antecedentes sobre la biología de *Xenopus laevis* y su introducción en Chile (1a ed). Recuperado de http://boletindeporen.sag.gob.cl/marzo_abril2005/xenopus_laevis_en_chile.pdf
- Standford, J. S.,** Lieberman, S. L., Wong, V. L., & Ruderman, J. V. (2003). Regulation of the G2/M transition in oocytes of *xenopus tropicalis*. *Developmental Biology*, 260(2), 438–448. (03)00259-8
- Suarez, K.,** Garci, A., Martinez, S., Paste, P., Montecino, N., Hinrichs, A. V., Nualart, F., *et al.* (2006). Classical

Xenopus laevis Progesterone Receptor Associates to the Plasma Membrane Through Its Ligand-Binding Domain, 560–567.

Tokmakov, A. A., Iwasaki, T., Itakura, S., Sato, K., Shirouzu, M., Fukami, Y., and Yokoyama, S. (2005) Regulation of Src kinase activity during *Xenopus* oocyte maturation. *Dev. Biol.* 278, 289-300.

Villalobos, G. L., & Walton, A. I. (n.d.). Sobre la Biología de *Xenopus laevis* y su introducción.

Wang, H., Fang, J., Kuang, X., Miao, L., Wang, C., Xia, G., King, M. Lou, *et al.* (2012). Activity of long-chain acyl-CoA synthetase is required for maintaining meiotic arrest in *Xenopus laevis*. *Biology of reproduction*, 87(3), 74.

Weber, W. (1999). Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochimica et biophysica acta*, 1421(2), 213–33.

Wettschureck, N. y Offermanns S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific function. *Physiol Rev.* 85:1159-204.

Werner, P., Hussy, N., Buell, Jones, K. A., y North, R. A (1996). D2, D3, and D4 dopamine receptors couple to G protein-regulates potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol.* 49:656-61.

Yamada, M., Inanobe, A. y Kurachi, Y. (1998). G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Rev.* 50:723-60.

Yamashita M. (1998) Molecular mechanisms of meiotic maturation and arrest in fish and amphibian oocytes. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9:569–579.

Yong-Chao Ma, Jianyun Huang, Shariq Ali, William Lowry, Xin-Yun Huang. 2000. Src Tyrosine Kinase Is a Novel Direct Effector of G Proteins . *Cell* -(Vol. 102, Issue 5, pp. 635-646)

Zhang L, Hu G, Cheng Y, Huang J (2008) Heterotrimeric G protein α and β subunits antagonistically modulate stomatal density in *Arabidopsis thaliana*. *Dev Biol* 324: 68-75.