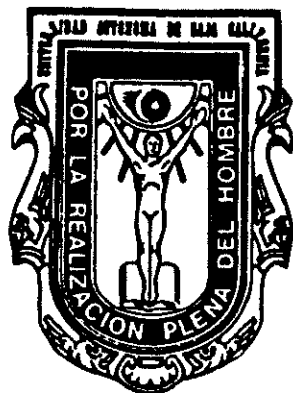


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



**PAPEL DE LA MAP CINASA Y CAMBIOS ELECTROFISIOLÓGICOS
DURANTE LA MADURACION Y LA FECUNDACION DE LA LAPA
COMUN *Lottia gigantea*.**

Tesis Profesional

Que como requisito parcial para
obtener el Título de
BIOLOGO

Presenta
Isela Pérez Quezada

Ensenada, B.C.

Septiembre de 1999

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

**PAPEL DE LA MAP CINASA Y CAMBIOS ELECTROFISIOLÓGICOS
DURANTE LA MADURACION Y LA FECUNDACION DE LA LAPA
COMUN *Lottia gigantea*.**

TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTA
Isela Pérez Quezada

APROBADO POR:



DRA. MEREDITH GOULD CHAMBERS
PRESIDENTE



M.C. FAUSTINO CAMARENA ROSALES
SECRETARIO



M.C. MA. ENRIQUETA MUÑOZ MARQUEZ
SINODAL

AGRADECIMIENTOS

**A mi Familia por su motivación
para culminar exitosamente
mi carrera**

**A mis asesores Meredith y Stephano
por compartir sus conocimientos
con migo**

**A mis amigos que siempre estan
a mi lado dandome ánimos**

**A todos los maestros que han
sido parte del proceso de
mi formación como Biologo**

Resumen de la Tesis de **Isela Pérez Quezada** presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California, México. Septiembre de 1999

PAPEL DE LA MAP CINASA Y CAMBIOS ELECTROFISIOLÓGICOS DURANTE LA MADURACION Y LA FECUNDACION DE LA LAPA CAMUN Lottia gigantea.

Resumen aprobado por:



DRA. MEREDITH GOULD CHAMBERS

RESUMEN

La fosforilación de proteínas es uno de los mecanismos celulares más utilizados para regular las funciones proteicas; la familia de la proteína cinasa de actividad mitogénica (MAPK) está involucrada en la traducción y amplificación de señales. Los estudios realizados en relación al papel que desempeña la MAPK han sido principalmente en ovocitos que arrestan en metafase II, de aquí la importancia de llevar a cabo estudios de la MAPK en organismos que arrestan en metafase I de meiosis, característica de los moluscos, phylum al que pertenece la lapa *Lottia gigantea*.

En el presente trabajo se detectó la activación de la proteína MAPK en maduración en los ovocitos de la lapa, la cual fue desactivada después de la fecundación. Sin embargo la activación de la MAPK no fue necesaria para la ruptura de la vesícula germinal ni para el arresto en metafase I, aunque el mantenimiento del arresto en metafase I sí requirió de la síntesis de otra (s) proteína (s). En la maduración se presenta un potencial de acción cuya base iónica es de Ca^{2+} .

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	4
MAPK en <i>Xenopus</i>	5
MAPK en ratón	6
MAPK en estrella de mar	7
MAPK en otros organismos	8
Cambios electrofisiológicos	8
OBJETIVOS	10
MATERIALES Y METODOS	11
Detección de MAPK	12
Inhibición de MEK	14
Inhibición de síntesis proteica	14
Citología	15
Electrofisiología	16
RESULTADOS	19
Activación de MAPK	19
Inhibición de MEK	25
Inhibición de síntesis proteica	27
MAPK en la fecundación	31
Electrofisiología	38
DISCUSION	48
Inhibidores en maduración	48
MAPK después de fecundación	49
Electrofisiología	49
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFIA	52
ANEXOS	56

INDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Cascada de activación de MAPK	4
Figura 2. Equipo de Electrofisiología	18
Figura 3. Placa de rayos X de inmunotransferencia	19
Figura 4. Datos citológicos de la lapa	30
Figura 5. Registros electrofisiológicos del ovocito inmaduro y maduro de la lapa	42
Figura 6. Primer potencial de acción	43
Figura 7. Segundo potencial de acción	44
Figura 8. Efecto de la nifedipina y del inhibidor PD98059 en el potencial de acción	45
Figura 9. Determinación de la base iónica del primer potencial de acción	46
Figura 10. Efecto de bajo Na⁺ en el potencial	47

INDICE DE GRAFICAS

	Páginas
Gráfica 1. Intensidad de MAPK activa	
ensayo #1 con tratamientos	22
Gráfica 2. Intensidad de MAPK activa	
ensayo #2 con tratamientos	23
Gráfica 3. Intensidad de MAPK activa	
ensayo #3 con tratamientos	24
Gráfica 4. Intensidad de MAPK en	
fecundación ensayo 1	34
Gráfica 5. Registro de intensidad de	
MAPK en fecundación ensayo 2	35
Gráfica 6. Intensidad de MAPK activa	
en la fecundación ensayo 3	36
Gráfica 7. Intensidad de MAPK	
en fecundación ensayo 4	37
Gráfica 8. Relación Corriente – Voltaje	41

INDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla I. Datos citológicos del efecto del inhibidor PD98059	26
Tabla II. Citología del efecto del inhibidor Emetina	29
Tabla III. Desarrollo citológico de la fecundación	33

INTRODUCCION

La lapa común *Lottia gigantea* es un organismo que pertenece al Phylum Molusca que habita en la zona intermareal de la costa de Baja California, fue explotada comercialmente durante los años de 1919 y 1920 en California, en la región se utiliza como alimento. Este organismo es territorialista, con la ayuda de su rádula mantiene limpia su área de competidores y solo permite el crecimiento de algas en la periferia, el territorio que guarda es aproximadamente de 1000 cm². Tiene una longevidad de entre 10 y 15 años, su reproducción la lleva a cabo en el invierno durante los meses de octubre a diciembre; es un organismo monoico y su fecundación es externa (Morris *et al.*, 1980).

El mecanismo de meiosis ha sido poco estudiado en esta especie, así como en el resto de los moluscos. En el ovario, los ovocitos de la lapa se encuentran inmaduros arrestados en profase I de meiosis, fase que se caracteriza porque los cromosomas se encuentran en diplóteno en la vesícula germinal. Estos ovocitos al estar inmaduros no pueden ser fecundados, por lo que es necesario llevar a cabo estímulos hormonales los cuales causan su maduración y típicamente proceden a metafase I (fase en la que los cromosomas se condensan y se rompe la vesícula germinal) de meiosis, donde se arrestan hasta la fecundación (Ortiz, 1996).

La fosforilación de proteínas es uno de los mecanismos celulares más utilizados para regular las funciones proteicas. La familia de las proteínas cinasas puede estar involucrada en la transducción y amplificación de las señales. La proteína cinasa de actividad mitogénica (MAPK por sus siglas en inglés) de 42 KDa pertenece a la familia de las cinasas, se localiza en el citoplasma donde cataliza la fosforilación de otras proteínas, en las células eucariotas la MAPK es empleada para la transmisión de señales para regular proteínas en el citoplasma y en el núcleo. Esta familia y su cascada de activación son altamente conservadas (Huang, 1995).

MAPK es activada al ser fosforilada específicamente en una tirosina y una treonina. Varios estudios realizados en *Xenopus laevis* implican a la cascada de MAPK en la iniciación del rompimiento de la vesícula germinal (RVG). Otros estudios indican

que la MAPK tiene un papel esencial en el factor citostático (FC), la actividad responsable para llevarse a cabo el arresto de los ovocitos en metafase meiotica antes de la fecundación (Sagata, 1997).

Xenopus leavis es el organismo mejor estudiado en cuanto a la cascada de la ruta de activación de MAPK en meiosis. Hasta la fecha se sabe que dentro de las proteínas que intervienen en esta ruta se encuentra Mos, proteína de la familia de las cinasas que cataliza la activación de MAP cinasa cinasa (MEK, MAPK/ERK cinasa), la cual a su vez fosforila a la MAPK para su activación; se sabe que Mos es un componente activo del FC (Sagata *et al.*, 1989), el cual es responsable del arresto de ovocitos fecundados de anuros en metafase II, además de ocasionar la estabilización del factor promotor de maduración (MPF de sus siglas en ingles) que es un complejo entre la proteína cinasa Cdc2 y la proteína Ciclina B. El MPF se encarga de inducir a los ovocitos a iniciar la maduración (Revisado por Stephano, 1993). La actividad de MEK es indispensable para el desarrollo del FC, MAPK constitutivamente activa puede por si misma activar el factor citostático (Haccard *et al.*, 1993). La desaparición de Mos después de la fecundación es la responsable para la desaparición del FC (Sagata *et al.*, 1989 y Watanabe *et al.*, 1989); los estudios realizados por los antes mencionados en relación al papel que desempeña la MAPK han sido llevados a cabo en ovocitos que arrestan en metafase II de meiosis, por lo cual es importante llevar a cabo estudios enfocados en ovocitos que arrestan en metafase I de meiosis para comprender mejor el desarrollo de los organismos a nivel celular y molecular.

Las características de las condiciones electrofisiológicas de la membrana son otro aspecto importante a considerar en la maduración de los ovocitos ya que presenta respuestas a los cambios ionicos que se establecen en el proceso. Se sabe que, durante la maduración es típico que la resistencia de la membrana disminuya y de lugar, en algunos organismos, al registro de un potencial de acción, el cual se produce por corriente eléctrica que se propaga en la membrana lo cual le provocará una despolarización. Los potenciales influyen en el flujo de los diferentes iones que intervienen durante la maduración y la fecundación. En relación a éste último, existen mecanismos en los ovocitos para evitar polispermia, uno de ellos es el bloqueo eléctrico que utilizan varias especies para regular la entrada de los espermatozoides (Jaffe y Gould, 1985). La

caracterización de las propiedades eléctricas de la membrana de ovocitos maduros permite comprender las bases iónicas que se presentan cuando están listos para ser fecundados.

ANTECEDENTES

La proteína cinasa de actividad mitogena (MAPK) interviene en la cascada de señalamientos de proteínas cinasas, teniendo efecto en la regulación de enzimas en el citoplasma y en el control transcripcional del ADN (Fig 1). Para que la proteína sea activa requiere la fosforilación de dos sitios, la treonina y la tirosina que se encuentran en un triplete TEY (Treonina, Acido Glutámico, Tirosina).

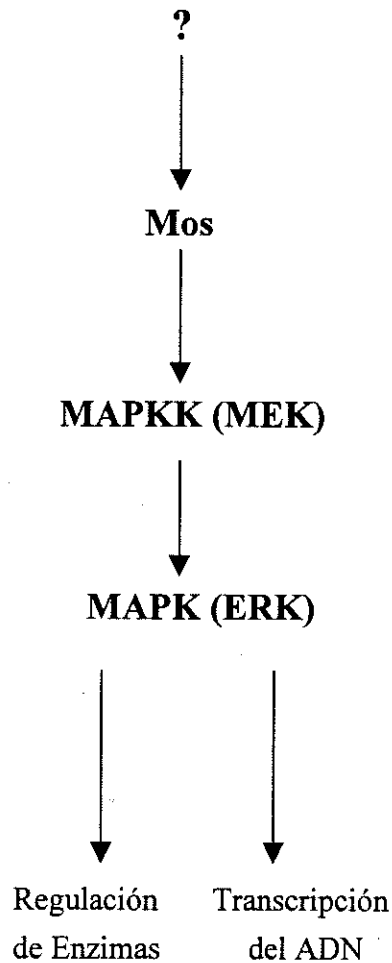


Figura 1. Cascada de activación de MAPK que interviene en meiosis (Mordret, 1993).

El papel de la MAPK en los modelos mejor estudiados hasta el momento son los de *Xenopus*, ratón y estrella de mar. En *Xenopus* la MAPK sólo es necesaria para llevar a cabo la ruptura de la vesícula germinal (RVG), en la transición de metafase I a metafase II y en el arresto en metafase II; en ratón no es requerida para la RVG pero si para el paso de metafase I a metafase II y el arresto en metafase II; en estrella de mar reprime la síntesis de ADN en ovocitos maduros pero solo en algunas especies. En anélidos como en otros invertebrados no se sabe cual es su papel.

MAPK en *Xenopus*

La primera descripción de la posible importancia de la MAPK en meiosis fue realizada por Sagata *et al.*, (1988), llevando a cabo microinyección de oligonucleótidos antisentido específicos para RNA de *c-mos* (proto-oncogen que codifica para la proteína Mos) en ovocitos de *Xenopus*, después de estimularlos con progesterona para obtener su maduración, obtuvieron que no solo se previene la expresión de Mos sino que también bloquea la RVG, indicando así su importancia para la maduración meiótica.

Cuando la proteína Mos fue introducida en ovocitos inmaduros se indujo la activación de MAPK, estos resultados demostraron que la MAP cinasa cinasa (MAPKK) es responsable de la activación de MAPK, que a su vez es necesaria para llevar a cabo la RVG a través de la activación del factor promotor de maduración (MPF) durante el proceso de maduración. Además de que la microinyección del anticuerpo contra MAPKK en ovocitos inmaduros evita la activación de MAPK al inducir su maduración con progesterona y ésto inhibe la RVG (Kosako *et al.*, 1994).

En estudios posteriores cuando se llevó a cabo la inyección de la proteína Mek modificada para inducir maduración meiotica, observaron la RVG de igual forma que cuando los ovocitos se indujeron a maduración con progesterona (Huang *et al.*, 1995).

MAPK activa es capaz de llevar a cabo la activación del factor promotor de maduración (MPF) y promover la RVG en *Xenopus* (Haccard *et al.*, 1995). En años posteriores Roy *et al.*, (1996) determinaron que la microinyección de MAPK activa indujo de nuevo a la síntesis de Mos^{Xe} antes de la activación de MPF, ésto sugirió que debe de existir una retroalimentación entre MAPK y Mos. Se concluyó que la actividad

de MAPK es necesaria antes de la ruptura de la vesícula germinal en ovocitos de *Xenopus*. Cuando se utilizó el inhibidor de síntesis proteica se observó que la síntesis de Mos fue necesaria durante la maduración.

En estudios realizados en *Xenopus* cuando se llevó a cabo la inyección de oligonucleótidos antisentido de *mos* en ovocitos con la vesícula rota, después de formar un cuerpo polar fueron a interfase y síntesis de ADN en lugar de proceder a metafase II. Esto indica que la MAPK también es necesaria para llevarse a cabo la transición de metafase I a metafase II (Furuno *et al.*, 1994).

La onco-proteína c-Mos que se presenta en ovocitos sin fecundar en *Xenopus*, desaparece en la fecundación. La microinyección de RNA sintético de *mos* en embriones de dos células indujo al arresto mitótico, en contraste cuando se inmunoprecipitaron extractos de citoplasma con anti-Mos se perdió la actividad de arresto de los embriones inyectados. Estos resultados demostraron que en *Xenopus* la proteína Mos es parte del Factor Citostático (Sagata *et al.*, 1989).

El resultado obtenido por Haccard *et al.*, (1993) de la microinyección de MAPK activa en embriones de dos células de *Xenopus* fue la inducción al arresto de los embriones en metafase de la misma manera en que lo hace c-Mos, lo cual sugirió que la actividad del FC es mediada por MAPK.

MAPK presenta un incremento en su activación en meiosis I y se mantiene activa hasta después de 30 min de la fertilización, punto en el que se desfosforila y no se detecta de nuevo hasta después de 12 divisiones. En base en estos resultados Ferrell *et al.*, (1991) concluyeron que la MAPK no interviene en mitosis.

MAPK en ratón

Verlhac *et al.*, (1994) observaron el momento en el que actúa la MAPK, al trabajar con la activación de MAPK y MPF. Los ensayos sobre la capacidad de fosforilación de MAPK demostraron que la MAPK se activa después de la RVG, por lo tanto la MAPK no es necesaria para llevarse a cabo el RVG, pero sí en la meiosis.

Durante la progresión de metafase I a metafase II, en la maduración de ovocitos, se mantienen altos niveles de MAPK activa (Moos *et al.*, 1995). En ratones se realizaron ensayos de Inmunotransferencia con un antisuero contra un péptido codificado por el gen *v-mos* para determinar la presencia de c-Mos en ovocitos, observando que la cantidad de c-Mos presente al tiempo de la emisión del primer cuerpo polar fue similar a la observada en ovocitos en metafase II. Después de la fecundación, la degradación de c-Mos ocurre posterior a la degradación de ciclina B e inactivación del factor promotor de maduración (MPF). Aunque Mos es importante para el arresto en metafase, la salida de ésta es debido a otras moléculas, (Weber *et al.*, 1991).

En el estudio realizado por Zhao *et al.*, (1991) usaron un método de transferencia mediante un campo eléctrico para introducir un anticuerpo contra c-Mos en ovocitos inmaduros, los resultados que ellos obtuvieron fueron la RVG y la condensación de cromosomas pero no se formaron cuerpos polares.

Por otro lado, ovocitos de ratones *mos* ^{-/-} (delección del gen) que formaron el primer cuerpo polar pero no el segundo, dejaron de sintetizar ADN y continuaron segmentación (Colledge *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.*, 1994; Choi *et al.*, 1996). Aún no se identifican las causas de la diferencia, aunque si se reconoce que la MAPK activa es necesaria para meiosis normal. En resumen Mos no es requerida para que la RVG se lleve a cabo, sin embargo es necesaria en el arresto en metafase II de ovocitos maduros.

MAPK en estrella de mar

En la estrella de mar *Asterina miniata* la activación del factor promotor de maduración (MPF), precede a la activación de MAPK, lo que sugiere que ésta última no está involucrada en la activación del MPF. Para estudiar esto, Sadler y Ruderman (1998) usaron el inhibidor PD98059 que bloquea la cascada de activación de MAPK cinasa. Cuando los ovocitos son estimulados por 1-Metiladenina (1-MA) en la presencia del inhibidor PD98059, la actividad de MAPK es completamente bloqueada, pero ocurre la activación de MPF y la RVG, lo que sugiere que la MAPK no es requerida para la activación del MPF, la RVG ó la formación del primer cuerpo polar, no así para la segunda división meiotica que fue anormal. Con lo anterior se determinó que la

activación inicial de MAPK, durante meiosis I, es absolutamente dependiente de la nueva síntesis proteica.

Normalmente la MAPK activa se mantiene después de la fecundación, pero cuando se llevó a cabo la inyección de MEK se inhibió la síntesis de ADN y cuando usaron la fosfatasa CL100, en ovocitos no fecundados, se llevó a cabo la síntesis de ADN. Por lo cual concluyeron que la función de la MAPK activa, en estrella de mar, es inhibir la síntesis de ADN antes de la fecundación (Tachibana *et al.*, 1997). Por otro lado Picard *et al.*, (1996) trabajaron con *A. aranciacus* y encontraron que se lleva a cabo la síntesis de ADN antes de la fecundación a pesar de que la MAPK está activa.

MAPK en otros organismos

En *Spisula solidissima* trabajaron en la detección de la MAPK, que fue activada antes de la ruptura de la vesícula y se inactivó después de la aparición del segundo cuerpo polar, pero no se identificó su función (Shibuya *et al.*, 1992).

Finalmente en el anélido *Chaetopterus pergamentaceus* se encontró que la MAPK se activa antes de la ruptura de la vesícula germinal (RVG) pero aún cuando se utilizó PD98059 para inhibir la actividad de MAPK se presentó la RVG (Eckberg, 1997).

Cambios electrofisiológicos en ovocitos

El único estudio realizado con lapa es el de Moreau *et al.*, (1990) trabajaron con *Patella vulgata*, reportando que los ovocitos maduros presentaron un potencial de acción dependiente de Na^+ y Ca^{2+} , y que al agregarles NH_4Cl (10-20mM) la conductancia aumentó para disminuir después de la RVG, con la ocurrencia de un potencial de acción espontaneo que duró aproximadamente de 8 a 10 min.

Alvarado *et al.*, (1996) estudiaron la respuesta eléctrica de los ovocitos inmaduros llevados a madurez con serotonina $0.2\mu\text{M}$ en la almeja Pismo, reportando un incremento drástico en la resistencia en ovocitos inducidos a madurar, quizá debido a la inactivación de canales de K^+ . El potencial de acción siempre estuvo presente en

ovocitos maduros, aunque no siempre fue detectado en ovocitos en profase presumiblemente debido a su baja resistencia.

Los potenciales de acción de Ca^{2+} están presentes en ovocitos inmaduros de estrella, cuando la RVG es inducida por 1-metiladenina disminuye la conductancia llegando a su mínimo alrededor del tiempo de la formación del primer cuerpo polar, donde son más resistentes a la polispermia. Con el decremento en la conductancia se requiere de menor corriente para obtener los potenciales de acción y su duración es mayor, después de la formación del primer cuerpo polar, la conductancia y la polispermia aumentan otra vez.

Estudios en algunos organismos marinos como erizo, estrella de mar y gusano marino *Urechis caupo* comprueban la disminución en la conductancia de la membrana y el potencial de acción más prominente en ovocitos maduros, reforzando el bloqueo eléctrico a la polispermia (Jaffe y Gould, 1985).

En algunos organismos se ha estudiado la regulación del mecanismo meiotico, donde intervienen la proteína cinasa de actividad mitogena (MAPK), pero estos organismos arrestan en metafase II de meiosis. En cambio los estudios son nulos en organismos que arrestan en metafase I de meiosis, característica de los moluscos, grupo al que pertenece la lapa común. Las propiedades electrofisiológicas de la membrana intervienen en la maduración y fecundación de los organismos por lo que al estudiar éstas propiedades se podrá integrar mejor el conocimiento sobre la reproducción de la lapa.

OBJETIVO GENERAL

-Determinar el papel que desempeña la MAP cinasa y los cambios electrofisiológicos en maduración y fecundación de la lapa común *Lottia gigantea*.

Objetivos Particulares

- 1.- Detección y cuantificación de la proteína MAP cinasa activa en los estadios inmaduro, maduro y fecundado de la lapa.
- 2.- Relacionar la activación de la MAPK con el desarrollo citológico.
- 3.- Caracterizar el potencial de reposo y el potencial de acción de la membrana en ovocitos maduros de la lapa.
- 4.- Determinar la base iónica del potencial de acción
- 5.- Analizar el efecto del inhibidor PD98059 y de la Nifedipina sobre el potencial de acción.

MATERIALES Y METODOS

La recolección de lapas de ambos sexos se llevó a cabo en Punta Morro, Ensenada, Baja California (Km 103 de la carretera Tijuana-Ensenada) durante los meses de octubre, noviembre, diciembre y enero (1998-1999) que corresponden a su periodo reproductivo. Las lapas fueron transportadas en un recipiente con agua de mar al bioterio de la Facultad de Ciencias donde se instalaron en acuarios mantenidos a 16°C con filtro biológico y aereación.

Obtención de Gametos.

Los ovocitos se obtuvieron directamente de la gónada de la lapa, para ello se realizó una insición ventral del lado derecho para exponer la gónada, que en el caso de las hembras su color es verde y en los machos es de color amarillo. Una vez expuesta se raspó delicadamente con una pipeta pasteur para evitar daño a los ovocitos y se succionaron para depositarlos en un vaso de precipitado con 20 ml agua de mar a 16°C previamente filtrada (filtro millipore 0.45µm). Se lavaron varias veces para eliminar los ovocitos dañados y restos de tejido.

Para la extracción de los espermatozoides se realizó el mismo procedimiento, solo que estos no se diluyeron y se mantuvieron concentrados en tubos a 4°C. En algunos casos como los espermias no se iban a utilizar de inmediato, no se extrajeron de la gónada y la lapa se mantuvo en hielo hasta el momento de ser utilizadas que no excedió de 8 hrs.

Maduración de Ovocitos *in vitro*.

El estímulo para la maduración de los ovocitos de la lapa fue a través de agua de mar filtrada a un pH 9.0. Para ajustar el pH del agua de mar se agregó gota a gota el NH₄OH hasta ajustar a pH 9.0, para hacer las mediciones se utilizó un pHmetro digital.

Los ovocitos previamente lavados se centrifugaron aproximadamente a 500g y se resuspendieron en un vaso de precipitado con 20 ml de agua de mar filtrada y a un pH 9.0, se dejaron en esta solución durante 30 min para evaluar su maduración

aproximadamente cada 5 min. Con auxilio de un microscopio de luz se pudo observar si la vesícula germinal estaba rota, así como la pérdida de las células foliculares, siendo necesario poner un cubre objetos y hacer presión para poder observar bien si la vesícula realmente se había roto. Una vez madurados los ovocitos se lavaron varias veces con agua de mar normal para eliminar el NH_4OH , ya que éste interfiere en la fecundación (Ortíz, 1996).

En el caso de los espermias, estos no requirieron ningún tipo de estímulo, lo único que se observó fue su motilidad con ayuda de un microscopio de luz antes de su utilización para la fecundación.

Fecundación *in vitro*.

En un vaso de precipitado con 20 ml de agua de mar filtrada se llevó a cabo la fecundación agregando espermatozoides móviles a los ovocitos maduros, manteniéndolos a 16°C y resuspendiéndolos continuamente. Después de la fecundación, se tomaron muestras a los tiempos de 10, 20, 40, 60, 80, 100, y 120 min. En algunos casos los intervalos de tiempo variaron dependiendo de la citología que presentaron. La relación espermatozoide:ovocito que se utilizó fue 2000:1, que es la utilizada por Ortíz, 1996.

Detección de MAPK activa por Inmunotransferencia.

En la técnica de Inmunotransferencia se utilizaron 5 μl de ovocitos concentrados obtenidos de los diferentes tiempos después de fecundación y de los diferentes tratamientos (de inhibición, ver más adelante) a los que fueron sometidos. Estas muestras se prepararon por centrifugación aproximadamente a 500g durante 3 seg, en tubos eppendorf, se les agregó 5 μl de la mezcla de inhibidores de fosfatasa (anexo 1), agitándolos inmediatamente hasta homogenizar para después agregarles 25 μl de solución desnaturante, agitando vigorosamente (anexo 2), se hirvieron por 3 minutos, al enfriarse se agitaron y se centrifugaron por 3 segundos a 14,000g. Posteriormente se colocaron 10 μl de cada una de las muestras preparadas en los pozos de un gel de poliacrilamida-SDS al 10% (anexo 3) y se corrió a 120V.

Para la electrotransferencia se sacó el gel de entre los vidrios, se cortó la parte superior que corresponde a los pozos, se cubrió con amortiguador de electroforesis para enjuagarlo y evitar que se seque (anexo 4). En la construcción del sandwich se puso la base de plástico extendida y sumergida en amortiguador de transferencia frío (anexo 5), sobre la base se puso una esponja seguida de un papel filtro y sobre éste el gel, el cual fue

cubierto por una membrana de PVDF (Polivinildifluorido-ProBlott, Applied Biosystems) que fue previamente sumergida unos minutos en metanol y enjuagada con amortiguador de transferencia, en seguida se cubrió con papel filtro y otra esponja. Como se deben evitar las burbujas se presionó toda la superficie del sandwich con ayuda de una pipeta pasteur. Se cerró la base de plástico del sandwich y se pasó a la cámara de transferencia que contenía un agitador magnético, una barra de hielo y amortiguador de transferencia frío que cubrió completamente el sandwich, la transferencia se realizó por 50 min a 100V a 4°C.

Una vez finalizada la transferencia se lavó la membrana dos veces con 20ml de TBST (anexo 6) con agitación a temperatura ambiente por 5 min cada vez. La membrana estuvo hacia arriba (que corresponde al lado de la membrana que estuvo en contacto con el gel) en todos los lavados. Después de los cuales se bloqueó con 10ml de 1% BSA/TBST (10ml de TBST + 0.1gr de BSA fracción V) por toda la noche en refrigeración, sin movimiento. Al siguiente día se eliminó el bloqueador y se agregó el primer anticuerpo policlonal anti-MAPK activa (PROMEGA) a una dilución 1:1000 en 10ml de 0.1% BSA/TBST con agitación y a temperatura ambiente por dos horas. Colocando la membrana hacia abajo (con respecto al contacto con el gel). Terminado el tiempo de incubación se dieron tres lavados a la membrana con 75 ml de TBST cada vez, con agitación y a temperatura ambiente con una duración de 15 min cada una. Después se agregó el segundo anticuerpo que fue el anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Affinity Bioreagents) diluido 1:1000 en 0.1% BSA/TBST con agitación y a temperatura ambiente por 1hr, se dieron tres lavados iguales a los anteriores. Al terminar de lavarla se quitó el exceso de solución, sin permitir que se secase, la membrana se puso sobre un plástico (Saran wrap) hacia arriba y se le agregó 2ml de sustrato ECL (Amersham; anexo 7). Se dejó actuar por 5 min, se quitó el exceso, se puso sobre otro plástico, se envolvió y se expuso la membrana a una película de rayos X de 13 x 18 cm (BioMax ML) por un tiempo de entre 2 a 15 min, posteriormente se reveló y se fijó (anexos 8 y 9) la película para identificar la proteína y cuantificarse la luminiscencia emitida.

Para llevar a cabo la cuantificación de la proteína MAPK activa se escaneó directamente la película de rayos X con el programa Vista Scan V 2.4.0, de manera representativa se tomó un área de cada una de las bandas. Para cada banda se tomó una área igual de la parte superior para restar el fondo, se cuantificó el valor promedio de la intensidad de los pixeles (0= blanco, 255= negro) con el programa de computo "NIH IMAGE". Esta determinación se considera semi-cuantitativa, porque no se toma en

cuenta el área total de las bandas (por ejemplo en las bandas 2 y 3 del blot 5 la intensidad es similar pero el área varió).

Inhibición de la activación de MAPKK (MEK) por PD98059.

Para conocer el efecto del inhibidor de la activación de MEK1 sobre MAPK se realizaron los siguientes tratamientos:

Tubo	2ml agua de mar	2µl PD* (50µM)	Ovocitos (20µl)	1hr después NH ₄ OH+PD*
1	+	-	+	-
2	+	+	+	-
3	+	+	+	+
4	Con el mismo tratamiento que el 3 pero en lugar de PD se uso DMSO como control			

* PD98059

El tubo 1 y 2 se mantuvieron en tratamiento durante 45 min antes de tomar la muestra para la inmunotransferencia y la citología, mientras que los tubos 3 y 4 después de una incubación de 30 min con NH₄OH se llevo a cabo la toma de muestras.

El PD 98059 (NE Biolabs) fue disuelto en DMSO a 50mM.

A otros tubos se les mantuvo con el siguiente tratamiento durante 45 min.

Tubo	2ml agua de mar pH 9.0	2µl PD* (50µM)	Ovocitos (20µl)
5	+	-	+
6	+	+	+

Inhibición de la síntesis proteica por Emetina.

Para determinar si es necesaria la síntesis de proteínas en maduración de ovocitos se utilizó el inhibidor de síntesis proteica, Emetina (SIGMA) disuelta en etanol a 10mM, con el siguiente tratamiento:

Tubo	2ml Agua de mar	20µl Emetina (100µM)	Ovocitos (20µl)	5min después NH ₄ OH+Eme
1	+	-	+	-
2	+	+	+	-
3	+	+	+	+

El tubo 1 y 2 se matuvieron en tratamiento durante 45 min antes de tomarse la muestra, en el caso del tubo tres se mantuvo en tratamiento con el NH₄ por 30 min.

A otros dos tubos se les mantuvo en el siguiente tratamiento durante 45 min.

Tubo	2 ml de Agua de mar pH 9.0	20 µl Emetina (100µM)	Ovocitos (20µl)
4	+	-	+
5	+	+	+

Todos los tubos se mantuvieron con agitación circular durante los 45 min que duro el tratamiento y a una temperatura de 16°C.

Para determinar el peso molecular de la proteína MAPK, se utilizó un control positivo de la proteína Erk2 fosforilada, que es fosforilada por MEK y tiene un peso molecular de 42 KDa.

Citología para determinar los estadios de desarrollo.

Se puso 1ml de cada muestra de los diferentes tratamientos con PD98059, Emetina y Fecundados en tubos de vidrio, se centrifugaron aproximadamente a 500g durante 30 seg para eliminar el sobrenadante. Los ovocitos se fijaron con tres lavadas en una solución de etanol-ácido acetico (3:1), se dejaron en la solución de la tercera lavada para que se fijaran durante un día o hasta 8 días.

Para la tinción se eliminó la solución fijadora y se les agregó aproximadamente 300µl del Colorante Orceina (anexo 10) para que actuara durante 15min, en seguida se puso una gota de la muestra en un portaobjetos y sobre ésta un cubreobjetos. Para eliminar el exceso de colorante se agregó unas gotas de ácido acetico al 60% en un

extremo del cubreobjetos y absorbiéndose con papel secante en el otro extremo, posteriormente se observaron en un microscopio invertido IX-FLA (OLYMPUS).

La observación de muestras *in vivo* se realizó en microscopio de luz y en microscopio de contraste de fases y se fotografiaron con una cámara Olympus OM-2 equipada con un adaptador adecuado a cada microscopio. En todos los experimentos el tamaño de la muestra analizada fue ≥ 100 ovocitos.

Electrofisiología.

Con una pipeta pasteur se agregaron ovocitos y 1 ml de agua de mar filtrada a una caja de Petri de 3 cm de diámetro, la cual contenía una cinta adherida a la base donde se inmovilizaron los ovocitos contra el borde de la cinta, después se introdujo a la caja un electrodo de 30-60 M Ω , llenado con 3M KCl, auxiliándose de un estereomicroscopio (Wild 100X Heerbrugg Instruments) y un micromanipulador (Narishige). La caja petri que contenía los ovocitos con agua de mar estaba conectada a través de un puente de agar (0.5% en agua de mar) a otra caja que contenía la tierra; se procuró que todo el equipo estuviera conectado a la tierra para evitar interferencia con las lecturas del potencial de la membrana. La temperatura de los ovocitos se mantuvo aproximadamente a 16°C durante el experimento con una placa de metal perforada con flujo de agua a 14°C (Fig 2).

Una vez eliminada la resistencia del electrodo (con el puente en el amplificador) se puso la punta cerca del ovocito cuidadosamente para no dañarlo, y paulatinamente se introdujo ayudándose de pulsaciones eléctricas. Una vez introducido el electrodo en el ovocito se dejó por un tiempo para permitir el sellado de la membrana y la estabilización del potencial de membrana. Se prosiguió a hacer las mediciones correspondientes a las condiciones de la membrana dando pulsaciones eléctricas con un mínimo de 0.018 nA a un máximo de 0.3 nA en sentido positivo y negativo con el estimulador GRASS y amplificando la señal por medio del amplificador AXOCLAMP 2-A.

Se realizaron perfusiones con diferentes soluciones tales como nifedipina (SIGMA) 5×10^{-5} M, inhibidor PD98059 50 μ M, agua de mar artificial (anexo 11), agua de mar con bajo nivel de Na (50mM ó 2mM), de Ca (1mM), \emptyset Ca y agua de mar filtrada pH 9.0 con NH₄OH, con una cámara de perfusión que consiste de una jeringa de vidrio que contiene en la base una manguera delgada de plástico por donde se expulsa la solución hasta uno de los extremos de la caja petri que contiene a los ovocitos, en el

extremo opuesto se encuentra una pipeta conectada a una bomba de vacío que succiona el exceso de la solución. Después de cada perfusión se dieron pulsaciones en cada sentido como al principio del ensayo para detectar los cambios en las propiedades eléctricas de la membrana en respuesta a cada solución para lo cual se usó un osciloscopio TEXTRONIX 511 y un registrador permanente (GOULD-BRUSH).

La resistencia de la membrana se determinó en base a la pendiente de la gráfica de corriente contra voltaje en el rango de -0.14 a $+0.12$ nA en el ovocito maduro y de -0.18 a $+0.14$ nA en el ovocito inmaduro (ver Graf 8).

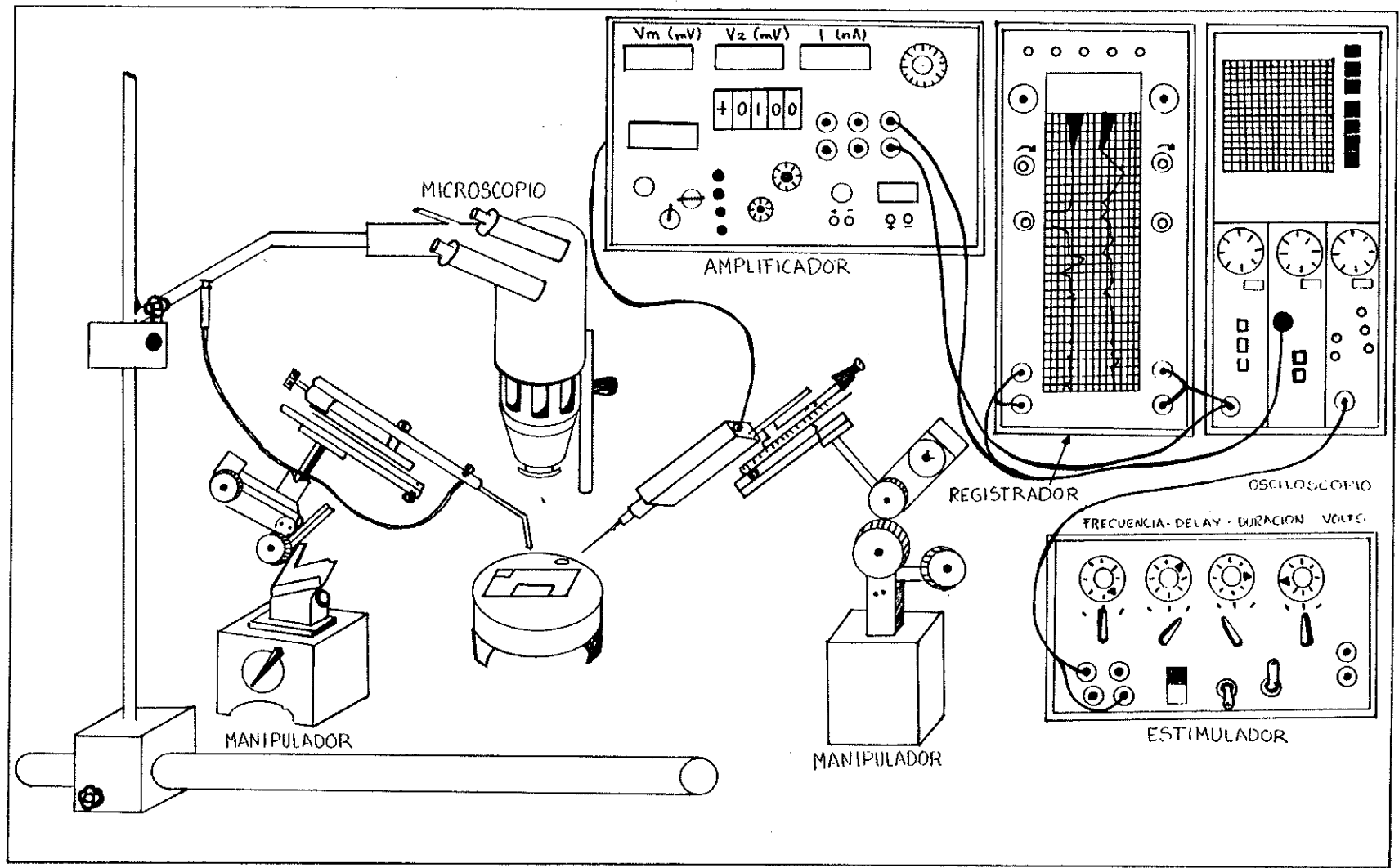


Figura 2. Equipo utilizado en Electrofisiología.

RESULTADOS

Detección de MAPK activa.

El peso molecular de la proteína cinasa de actividad mitogena (MAPK) se obtuvo directamente del gel. Las muestras experimentales migraron a la misma distancia del control positivo utilizado (proteína Erk2 fosforilada), cuyo peso molecular es de 42 KDa, ésto nos indica que el peso molecular de la proteína detectada en las muestras experimentales corresponde al mismo (Fig 3).

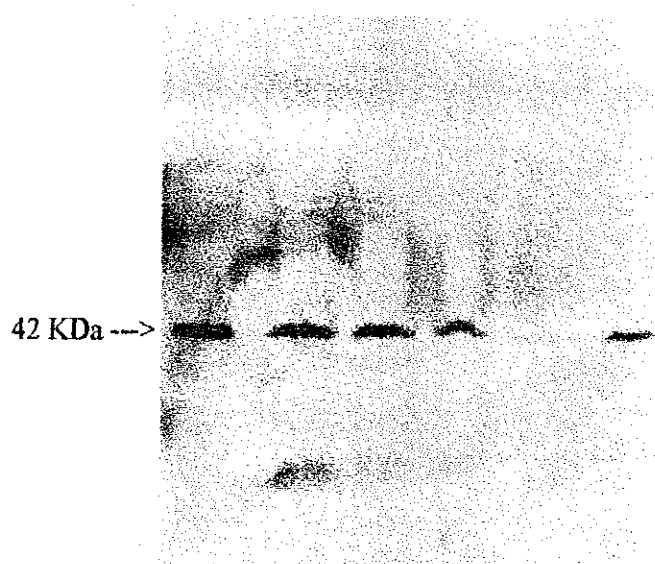


Figura 3. Imagen de película de rayos X donde se detectó la MAPK activa cuyo peso molecular fue el mismo que el del control positivo (42 KDa).

Los datos de las intensidades que se graficaron nos representan los resultados obtenidos de las inmunotransferencias realizadas. En las gráficas 1, 2 y 3 los ovocitos inmaduros representados por el número 1, nos muestran que la MAPK activa no se detecta en este estadio. En contraste, los ovocitos que se indujeron a madurar con NH_4OH quienes son representados por el número 4, en las mismas gráficas, se detecta la proteína MAPK activa con una alta intensidad con respecto a la de los ovocitos inmaduros. Ambas muestras se utilizaron como controles para los resultados obtenidos de los ovocitos tratados con los inhibidores y para los fecundados.

En los ensayos de ovocitos inmaduros tratados con PD98059 (representados por el número 2 en las gráficas y blots 1, 2 y 3) no se detecta la MAPK activa, lo mismo que en los ovocitos inmaduros control, esto es lo esperado por lo cual no podemos establecer una función inhibitoria del PD98059 en éste estadio; la comparación de éstas muestras (número 1 y 2 de las gráficas 1A a la 3A) nos presentan la similitud de los resultados al no detectarse MAPK activa. En los ovocitos inmaduros tratados con NH_4 + PD al mismo tiempo se obtuvo un incremento en la intensidad de la proteína MAPK activa, estas muestras representan el número 5 de las gráficas 1 a la 3. ¿Cómo explicarlo, si PD98059 es un inhibidor de la proteína mitogénica cinasa cinasa (MEK) quien se encarga de fosforilar MAPK para activarla? Una explicación es que el PD98059 tiene efecto sobre MEK, pero se requiere de mayor tiempo para que se lleve a cabo la inhibición total, es por esto que la MAPK se activa aún en la presencia del inhibidor.

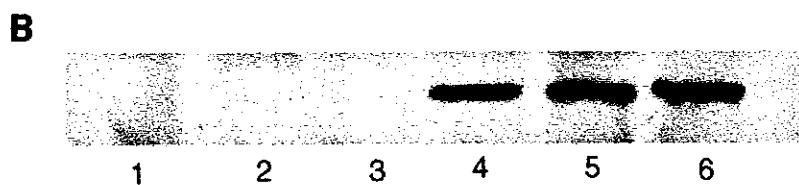
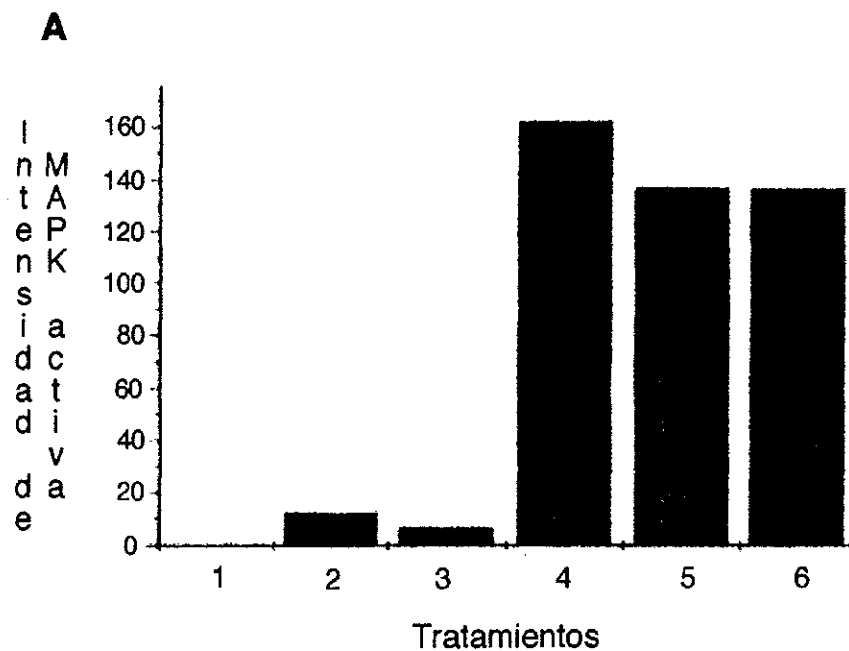
Para corroborar lo planteado se dirigió un experimento en el cual se aumentó el tiempo de exposición (1hr) en el inhibidor PD98059, la presencia del PD fue precisamente para mantener al ovocito en contacto con el inhibidor de manera constante. Como se puede ver en en las gráficas 2 y 3 (número 8) se inhibio la activación de MAPK y aunque no completamente si es mínima su activación, esto se observa mejor al comparar la muestra con el control que se utilizó en este experimento, su solvente DMSO (número 9 en las mismas gráficas).

En resumen, los ovocitos inmaduros de *Lottia gigantea* que se encuentran en profase I de meiosis no presentan MAPK activa, mientras que en los ovocitos maduros (metafase I de meiosis) se incrementa considerablemente la activación con respecto al primero. Para su inhibición se requiere de alrededor de 1 hr de tratamiento con PD98059 ($50\mu\text{M}$) previo a la maduración.

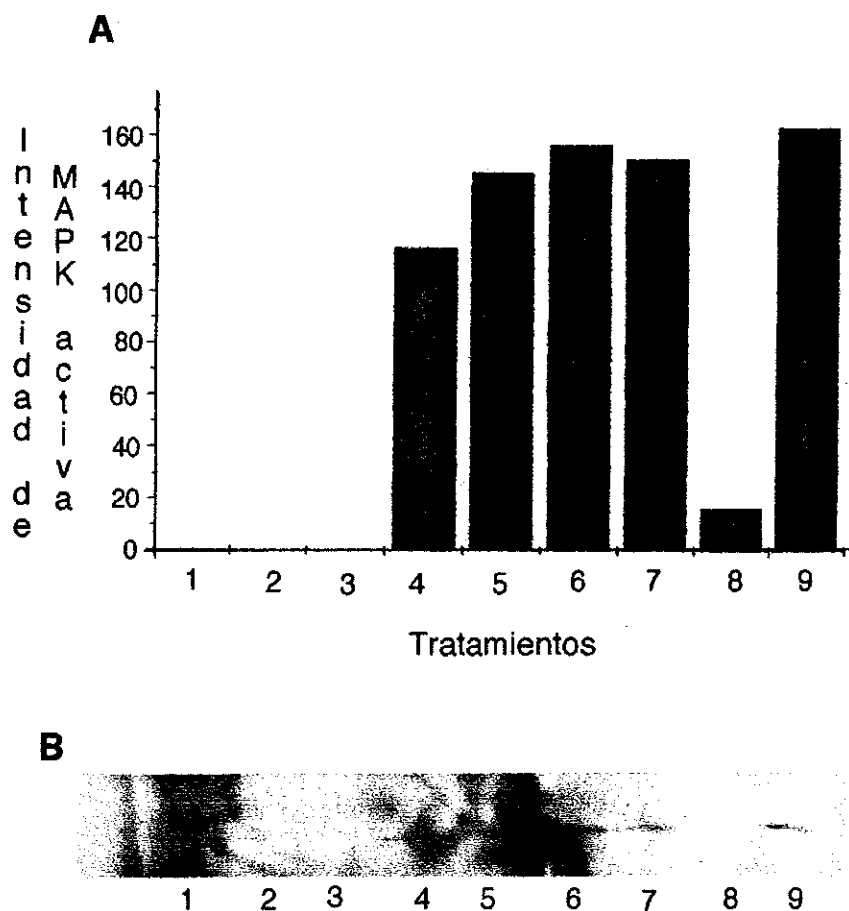
El inhibidor de síntesis proteica, Emetina, fue utilizado para determinar si se requiere de síntesis de proteínas para la activación de la proteína cinasa de actividad mitogénica (MAPK) durante el proceso de maduración. Los datos de las gráficas demuestran que no hay efecto de la Emetina en los ovocitos inmaduros con respecto a la detección de MAPK activa, ya que en este estadio la proteína se encuentra en su forma

inactiva, esto se observa claramente en las gráficas y blots 1, 2 y 3 (número 3) en cuyos experimentos los ovocitos se mantuvieron expuestos a la Emetina durante 45 minutos.

En los puntos número 6 de las gráficas y blots 1, 2 y 3 se observa que la activación de MAPK durante la maduración no se afecta al tratarse los ovocitos con Emetina, aquí se registran altos niveles de intensidad de la proteína activa, muy similares a los niveles de los ovocitos maduros control (número 4) en las tres gráficas, aún cuando se utilizó la Emetina antes (número 7) y durante (número 6) la estimulación a maduración, la MAPK se activó, obteniéndose altos niveles de intensidad como en el resto de los ovocitos inducidos a madurar (gráficas 2 y 3). Por lo tanto la aparición de MAPK activa no es afectada por la inhibición de síntesis proteica en el proceso de maduración.

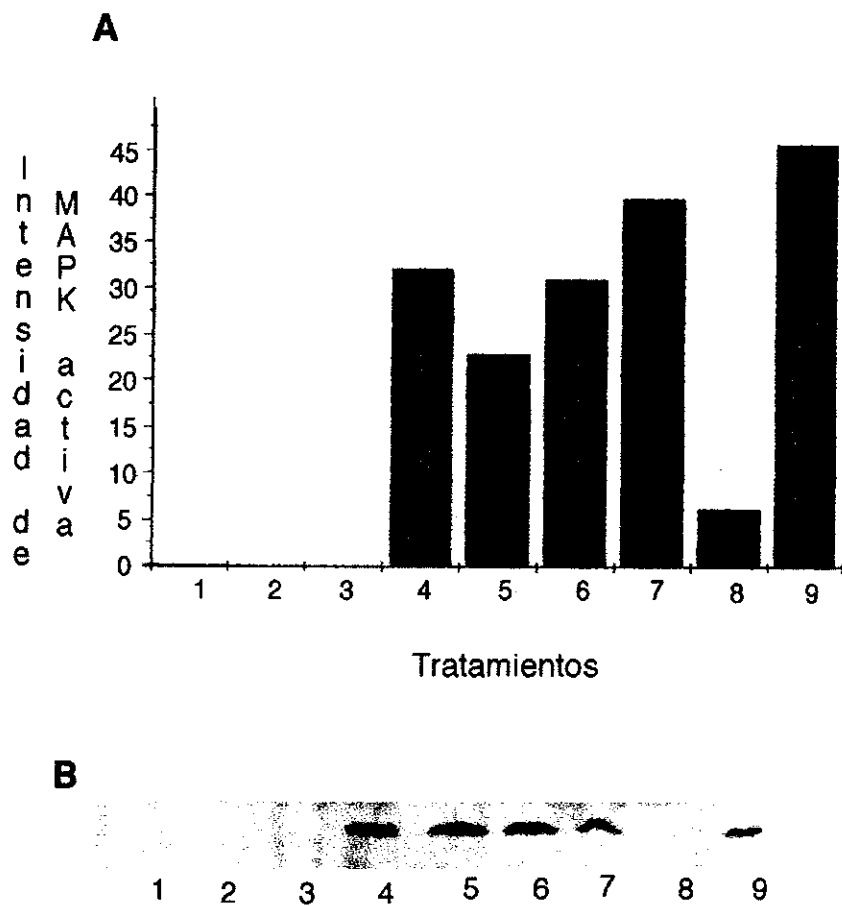


Gráfica 1. A) Intensidad de la MAPK activa detectada en ovocitos de la lapa común *Lottia gigantea* tratados con el inhibidor de MEK (PD98059, $50\mu\text{M}$) e inhibidor de síntesis proteica (Emetina, $100\mu\text{M}$) durante 45 min. B) Imagen de inmunotransferencia de los tratamientos con Emetina y PD. Para A y B, 1 inmaduro control, 2 inmaduro+PD, 3 inmaduro+Emetina, 4 maduro control (NH_4OH), 5 NH_4OH +PD, 6 NH_4OH +Emetina.



Gráfica 2. A) Registro de la activación de la proteína MAPK en ovocitos tratados con PD98059 ó Emetina antes y durante la maduración. Los tratamientos del 1 al 6 fueron durante 45 min y los tratamientos 7, 8 y 9 fueron por 30 min después de agregarles el NH_4OH , el DMSO se uso como control para el tratamiento con PD (8) ya que es su solvente.

B) Película de la inmunotransferencia con el uso de Emetina y PD98059. Para ambos (A y B), 1 inmaduro control, 2 inmaduro+PD, 3 inmaduro+Emetina, 4 maduro control (NH_4OH), 5 NH_4OH +PD, 6 NH_4OH +Emetina, 7 inmaduro con Emetina 5min+ NH_4OH con Emetina, 8 inmaduro con PD 1hr+ NH_4OH con PD, 9 inmaduro con DMSO 1hr+ NH_4OH con DMSO.



Gráfica 3. A) Determinación de la MAPK activa en ovocitos con diferentes tratamientos. La exposición de los tratamientos del 1 al 6 fueron durante 45 min y los tratamientos 7, 8 y 9 fueron por 30 min después de agregarles el NH_4OH , el número 9 es el control para PD con su solvente DMSO. Para ambos (A y B), 1 inmaduro control, 2 inmaduro+PD, 3 inmaduro+Emetina, 4 maduro control (NH_4OH), 5 NH_4OH +PD, 6 NH_4OH +Emetina, 7 inmaduro con Emetina 5min+ NH_4OH con Emetina, 8 inmaduro con PD 1hr+ NH_4OH con PD, 9 inmaduro con DMSO 1hr+ NH_4OH con DMSO.

Análisis citológico de la maduración con NH_4OH en presencia del inhibidor de MEK, PD98059.

En todos los ensayos realizados, los ovocitos inmaduros control, que solo estaban en agua de mar filtrada (1A, 1B y 1C en la Tabla I) y los ovocitos inmaduros en presencia del inhibidor PD98059 (2A, 2B y 2C en la Tabla I), presentan entre un 90 y un 100% de vesícula germinal intacta, ya que aún continúan en profase I de meiosis (Fig 4A), relacionando la citología de éstos ensayos con la activación de la proteína cinasa de actividad mitogena (MAPK) tenemos que no hay activación de MAPK como se observa en las gráficas 1A, B a la 3A, B.

Los experimentos en los que se utilizó el PD98059 durante la maduración nos arrojan resultados muy particulares, ya que tanto en los controles de ovocitos inmaduros+ NH_4OH (Tabla I ensayo 3A, 3B y 3C), como en los tratados con NH_4OH + PD al mismo tiempo (Tabla I ensayo 4A, 4B y 4C) y aún en los tratados con PD98059 por 1hr previa a ser madurados con NH_4OH + PD (6B y 6C de la Tabla I) con su respectivo control donde se usó NH_4OH + DMSO (5B y 5C) se lleva a cabo el rompimiento de la vesícula germinal lo cual representa la maduración (Fig 4B). El porcentaje de metafase presentado en cada uno de los tratamientos fue muy similar, oscilando entre un 98 y un 100% (Tabla I). Al relacionarse los datos citológicos y la activación de MAPK, ésta se activa durante la maduración como anteriormente se mencionó, sin embargo en el punto 8 de las gráficas 2A,B y 3A,B que corresponde a la utilización del PD98059 1hr antes y durante la estimulación a maduración, la MAPK fue inactivada sustancialmente, pero aún así se llevó a cabo el rompimiento de la vesícula germinal en un 100% y los ovocitos llegaron al clásico arresto en metafase, ver tabla I (6B y 6C) y fig 4B.

Después de 9 hr de tratar a los ovocitos con PD98059, no se obtuvieron resultados diferentes a los obtenidos inicialmente (45 min), por lo que podemos decir que, aún cuando los ovocitos son tratados con el inhibidor PD por 1hr antes de la estimulación a maduración se lleva a cabo el rompimiento de la vesícula germinal en la ausencia de MAPK activa.

Tabla I Resumen de datos citológicos obtenidos en los ensayos de tratamientos con inhibidor de MEK, PD98059, que no presento efecto sobre el proceso de maduración con respecto al rompimiento de la vesícula germinal. La gráfica 1 representa el ensayo A, la 2 el ensayo B y la 3 el ensayo C.

Ensayo	Tratamiento de ovocitos inmaduros	Tiempo de Tratamiento	% Profase	% Metafase
1A	Ovocitos + agua de mar	45 min	90	10
2A	Ovocitos + PD	45 min	88	12
3A	Ovocitos + NH ₄ OH	45 min	---	100
4A	Ovoc + NH ₄ OH + PD	45 min	---	100
1B	Ovocitos + agua de mar	45 min	100	---
2B	Ovocitos + PD	45 min	100	---
3B	Ovocitos + NH ₄ OH	45 min	---	100
4B	Ovoc + NH ₄ OH + PD	45 min	2	98
5B	Ovo+DMSO1h+NH ₄ OH+DMSO	30 min	---	100
6B	Ovo + PD 1h + NH ₄ OH + PD	30 min	---	100
7B	Ovocitos + PD	7 hrs	99	1
8B	Ovoc + NH ₄ OH + PD	7 hrs	---	100
9B	Ovo+DMSO1h+NH ₄ OH+DMSO	7 hrs	--	100
10B	Ovo + PD 1h + NH ₄ OH + PD	7 hrs	---	100
1C	Ovocitos + agua de mar	45 min	99	1
2C	Ovocitos + PD	45 min	100	---
3C	Ovocitos + NH ₄ OH	45 min	2	98
4C	Ovoc + NH ₄ OH + PD	45 min	1	99
5C	Ovo+DMSO1h+NH ₄ OH+DMSO	30 min	---	100
6C	Ovo + PD 1h + NH ₄ OH + PD	30 min	---	100
7C	Ovocitos + PD	9 hrs	98	2
8C	Ovoc + NH ₄ OH + PD	9 hrs	---	100
9C	Ovo+DMSO1h+NH ₄ OH+DMSO	9 hrs	--	100
10C	Ovo + PD 1h + NH ₄ OH + PD	9 hrs	---	100

Análisis citológico de la maduración con NH_4OH en presencia del inhibidor de síntesis proteica, Emetina.

Como se denota en la tabla II, en los ensayos 1A, 1B y 1C se obtuvo casi un 100% de ovocitos con vesícula intacta (Fig 4A), los cuales fueron los controles para los ovocitos inmaduros con tratamiento. Estos mismos resultados fueron observados en los ovocitos tratados con Emetina (ensayo 2A, 2B y 2C) durante 45 min.

En los ensayos donde los ovocitos se estimularon con NH_4OH + Emetina 4A, 4B y 4C no se vió efecto del inhibidor sobre el rompimiento de la vesícula germinal la cual se llevó a cabo dentro de los 45 min de tratamiento. Aún cuando se utilizó la Emetina antes y durante la maduración el porcentaje de rompimiento de vesícula fue casi 100% (5B y 5C de la Tabla II). Como era de esperarse, los ovocitos control que fueron estimulados a madurar con NH_4OH presentaron casi un 100% de vesícula rota (ensayos 3A, 3B y 3C).

Al relacionar los datos obtenidos de la inmunotransferencia y de la citología, se identifica que en los ovocitos inmaduros control (1A, B y C) y los tratados con Emetina (2A, B y C) la MAPK se encuentra inactiva (Graf 1, 2 y 3A, B en los números 1 y 3 respectivamente) y la vesícula está intacta, contrario a lo obtenido en los ovocitos estimulados a madurar 3A, 3B y 3C (control) y los tratados además con Emetina (4A, 4B y 4C), donde se presenta un alto porcentaje de rompimiento de la vesícula germinal (RVG) que identifica la maduración (Tabla II) y se registra una alta intensidad de MAPK en comparación a los ovocitos inmaduros. Esto se observa claramente al comparar los puntos 1 y 3 con los puntos 4 y 6 de las gráficas 1, 2 y 3.

A los 45 min de tratamiento no se observó ningún cambio citológico en los ovocitos con NH_4OH + Emetina con respecto a los controles (solo NH_4OH), sin embargo a las 9 hr de iniciado el tratamiento se observaron cambios citológicos en las muestras tratadas con Emetina + NH_4OH ; los ovocitos correspondientes a éstos tratamientos presentaron pequeños círculos que corresponden a núcleos en interfase (Fig 4F) los cuales oscilaron entre 45 y 75% como se presenta en la tabla II ensayo 8C y 9C. La mayoría de los ovocitos presentaron un solo pronúcleo, aunque algunos presentaron 2 ó 3 (Fig 4F); en el caso del ensayo 8C los ovocitos que presentaron un solo pronúcleo

fue del 49% y en el ensayo 9C fue el 42% del total registrado. Al observarse las muestras teñidas al microscopio fue imposible detectar ADN en los círculos, debido a que éste se encontraba descondensado. En los ovocitos control no se presentaron cambios, continuaron en metafase.

Estos resultados citológicos nos indican que el avance de profase I a metafase I de meiosis y la ruptura de la vesícula germinal no requiere de la síntesis de proteínas, pero el hecho de que los ovocitos que están en metafase regresen a interfase demuestra que la síntesis de proteínas es necesaria para mantener a los ovocitos arrestados en metafase.

Tabla II Citología de los ensayos de ovocitos tratados con el inhibidor de síntesis proteica Emetina, el efecto de éste inhibidor se observó hasta las 9hr de tratamiento regresando los ovocitos maduros a pronúcleos femeninos en un alto porcentaje.

El ensayo A corresponde a la gráfica 1, el B a la gráfica 2 y el C a la gráfica 3

Ensayo	Tratamiento de ovocitos inmaduros	Tiempo Tratamiento	% Profase	% Metafase	% pronúcleos femeninos
1A	Ovocitos + agua de mar	45 min	90	10	
2A	Ovocitos + Emetina	45 min	98	2	
3A	Ovocitos + NH ₄ OH	45 min	---	100	
4A	Ovoc + NH ₄ OH + Emet	45 min	---	100	
1B	Ovocitos + agua de mar	45 min	100	---	
2B	Ovocitos + Emetina	45 min	99	1	
3B	Ovocitos + NH ₄ OH	45 min	---	100	
4B	Ovoc + NH ₄ OH + Emet	45 min	3	97	
5B	Ovoc+Eme 5'+NH ₄ +Eme	30 min	---	100	
1C	Ovocitos + agua de mar	45 min	99	1	
2C	Ovocitos + Emetina	45 min	100	---	
3C	Ovocitos + NH ₄ OH	45 min	2	98	
4C	Ovoc + NH ₄ OH + Emet	45 min	3	97	
5C	Ovoc+Eme 5'+NH ₄ +Eme	30 min	---	100	
6C	Ovocitos + agua de mar	9 hrs	100	---	
7C	Ovocitos + NH ₄ OH	9 hrs	1	99	
8C	Ovoc + NH ₄ OH + Emet	9 hrs	2	52	46
9C	Ovoc+Eme 5'+NH ₄ +Eme	9hrs	---	23	77

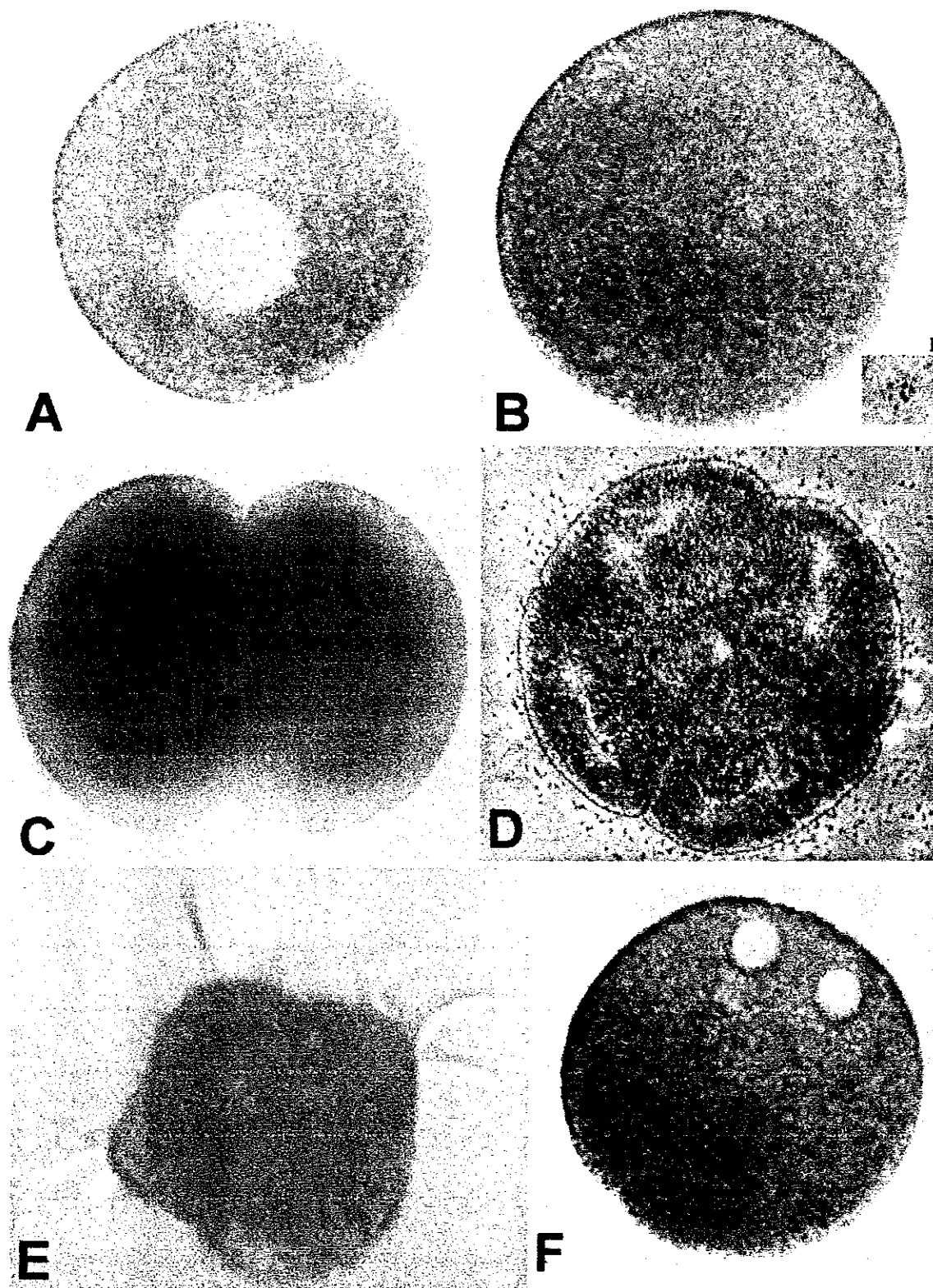


Figura 4. Datos citológicos de la lapa *Lottia gigantea*. A) Ovocito inmaduro con la vesícula germinal. B) Ovocito madurado con NH_4 , I) inserto acercamiento de los cromosomas. C) División de dos células. D) En cuatro células, se está preparando para la división a ocho células. E) Larva Trocofora. F) Ovocito madurado con NH_4 + Emetina que regresó a pronúcleos femeninos.

Características generales de la fecundación en la Lapa común *Lottia gigantea*.

El porcentaje de ovocitos fecundados varió de un 19% (Tabla III ensayo 1, a los 120 min con un cuerpo polar) hasta un 100% (Tabla II ensayo 2, a los 15 min con pronúcleos masculinos). La variación presentada en la fecundación pudo haber sido debido a los espermatozoides, en éstos se observó su motilidad al momento de ser utilizados, en el caso de los espermatozoides que se mantuvieron almacenados a 4°C se observaron al extraerse de la gónada y nuevamente cuando se llevó a cabo la fecundación para verificar que aún tuvieran motilidad, característica muy importante para la fecundación. Como se puede observar en el segundo ensayo de la tabla III la fecundación se presentó muy tempranamente en comparación al resto de los ensayos, en éste experimento fue donde se observó mayor motilidad en los espermatozoides. Esto concuerda con los resultados de Ortíz (1996), quien obtuvo aproximadamente un 100% de fecundación entre los 13 y 65 min.

Conforme pasó el tiempo de fecundación los ovocitos que se encontraban en metafase fueron disminuyendo ya que se inicio el desarrollo del cigoto. Como una buena representación de esto tenemos el ensayo 3 donde a los 45 min se registro un 86% de ovocitos en metafase y a los 160 min ya solo habia un 12% y los pronúcleos iniciaron un aumento en su registro.

En la citología observada, la categoria denotada como nada representa un alto porcentaje (Tabla III, ensayo 1), en este estadio es difícil observar el ADN ya que los cromosomas se encuentran descondensados, en cambio la división celular se observó perfectamente hasta el desarrollo de larvas normales (Fig 4C, D y E). Al tratar de observar los cuerpos polares se tuvo dificultad, por lo cual no hay un buen registro de éstos, como se puede ver en los ensayos de la Tabla III.

Detección de MAPK activa por inmunotransferencia durante fecundación.

En el ensayo de la gráfica 4 no se registró un cambio notorio en los estadios después de la fecundación lo que representa un bajo porcentaje de fecundación, por lo cual se mantiene un alto porcentaje de ovocitos en metafase y con ADN descondensado

(Tabla III, ensayo 1) ésto se refleja claramente en los niveles de MAPK detectada. En el resto de los ensayos (Graf 5, 6 y 7) la disminución de la MAPK activa después de la fecundación es contrastante a la de los ovocitos en metafase; en el caso del ensayo 4 que corresponde a la gráfica 7, el nivel de la proteína activa detectada se mantiene baja, hasta la primera división celular (Fig 4C) donde llega a ser nula. En los ensayos 2 y 3 (Graf 5 y 6 respectivamente) se ve un aumento en la MAPK activa pero no se identificó su significado biológico y después vuelve a disminuir en la primera división celular, sin embargo el momento de la considerable disminución corresponde a la union de los espermatozoides con el ovocito, lo que nos lleva a pensar que el contacto espermato-ovocito interviene en la desactivación de la MAPK.

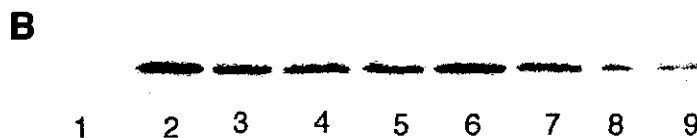
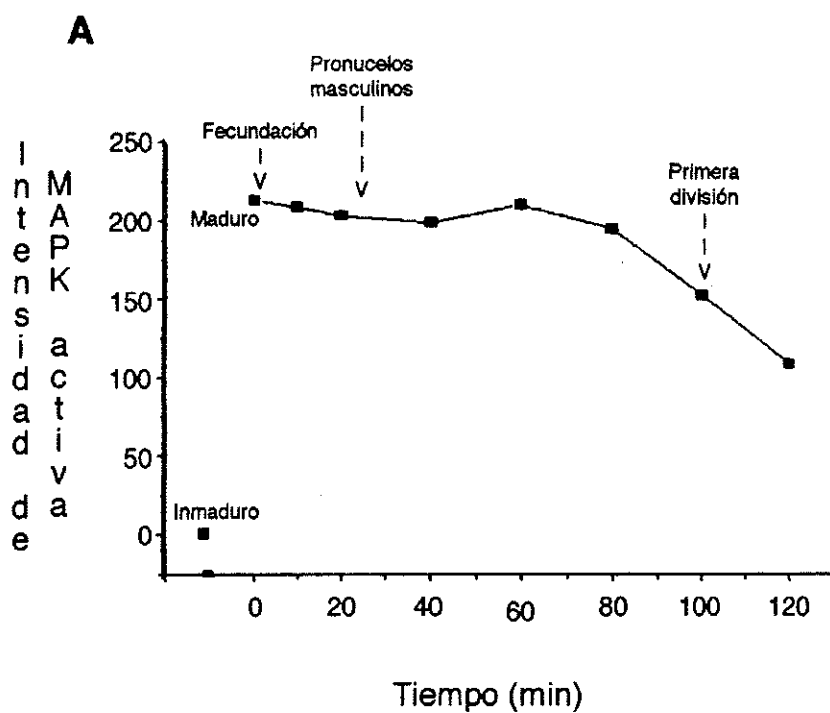
A los 10 min de iniciada la fecundación (ensayo 3 y 4 de la Tabla III que corresponden a las gráficas y blots 6 y 7A, B respectivamente) se observó *in vivo* en el microscopio de luz, que los espermatozoides se estaban uniendo al ovocito, a partir de los 15 min se inició el registro de pronúcleos masculinos donde el porcentaje varió ampliamente entre los experimentos tal es el caso extremo del ensayo 2 donde se registro un 100% de pronucleos masculinos a los 15 min (Graf 5) mientras que en el ensayo 4 (Graf 7) hubo registro de éstos hasta los 45 min (Tabla III). Todos estos datos sugieren que la disminución en los niveles de MAPK activa detectada durante los primeros 15 a 20 min esta relacionada con eventos que se llevan a cabo entre la fecundación y la formación de pronúcleos masculinos.

Un dato que llama la atención en este trabajo es cuando se relaciona la presencia de MAPK activa con la primera división celular de los cuatro experimentos, en donde la aparición de dos células corresponde a la desaparición de la MAPK activa; ensayo 1, 2, 3 y 4; gráficas 4, 5, 6 y 7A, B respectivamente. Esto sugiere que la MAPK no tiene función en mitosis y que cuando se presenta un alto porcentaje de fecundación, la activación de MAPK disminuye.

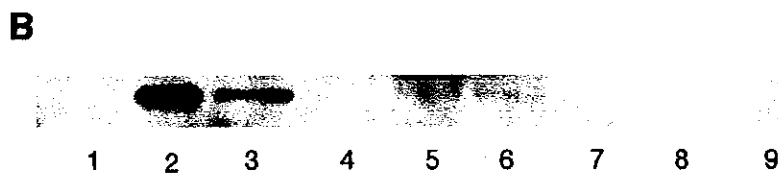
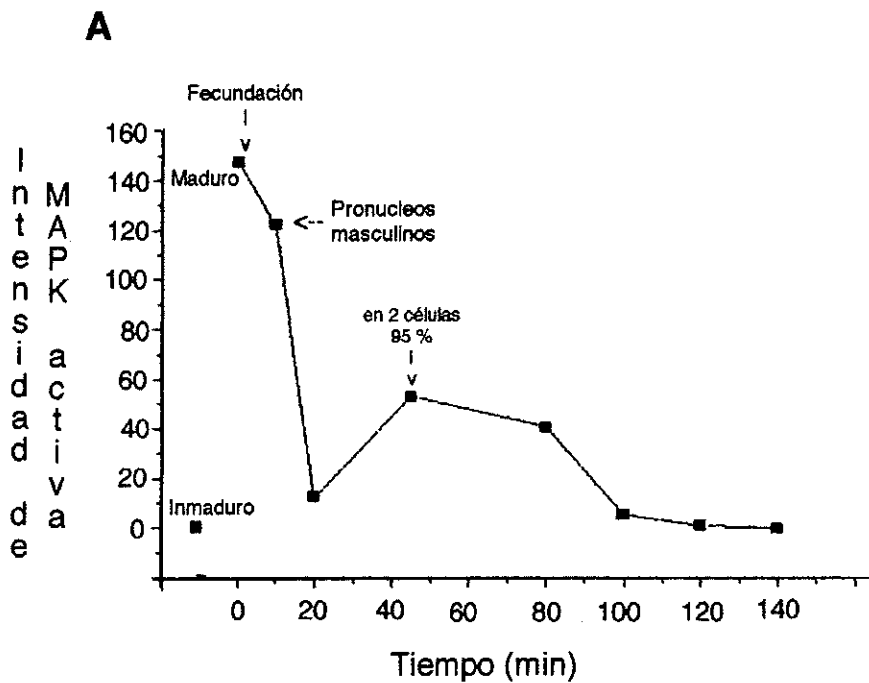
Tabla III Desarrollo citológico presentado en la lapa común *Lottia gigantea* antes y después de la fecundación. Los cuerpos polares fueron difícil de observarse por eso no hay un buen registro de ellos.

# E	Tiempo de fecundación	% Pro	% Meta	% Na	% crom	% O [♂]	% 1 c p	% 2 c p	% 2 céls	% 4 céls	% Am	% Ot
1	Inmaduro	98	2									
	Maduro		94	6								
	10 min		84	10	6							
	20 min		42	54		4						
	40 min		22	72		6						
	60 min			94		2						4
	80 min			74	14		12					
	100 min			70	6	2	12	6	4			
	120 min			59			19	12	10			
	2	Inmaduro	90	10								
Maduro			100									
15 min						100						
50 min				5					95			
65 min				10					87	1.5	1.5	
75 min									+	+		
85 min				18					72	10		
100 min		en	8	cé	lulas							
135 min		en	8	cé	lulas							
150 min		en	16	cé	lulas							
3	Inmaduro	100										
	Maduro		100									
	10 min	uni	on	de	esper	mas	a	ovo	bitos			
	20 min		79	13		8						
	45 min	1	86			10	3					
	80 min	1	43			48	8					
	100 min		46			54						
	120 min		35			65						
	140 min		22			62			3	2	10	
	160 min		12			58			6	4	16	
600 min		49						12	8	30		
4	Inmaduro	99	1									
	Maduro	2	98									
	10 min	uni	on	de	esper	mas	a	ovo	bitos			
	20 min	uni	on	de	esper	mas	a	ovo	bitos			
	45 min	1	70			29						
	80 min	3	37			60						
	100 min	1	13			86						
	120 min		46			50			1	3%	husos	mito
	140 min		48			30			19	2	1	
	160 min		37			43			16		4	

E - Ensayo, Pro - Profase, Meta - Metafase, Na - ADN descondensado, Crom - cromosomas dispersos, O[♂] - pronúcleo masculino, c p - cuerpo polar, céls - células, Am - deforme, Ot - con husos y asteres.

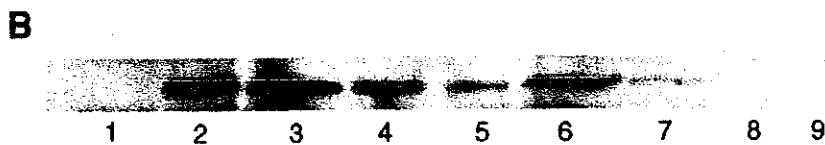
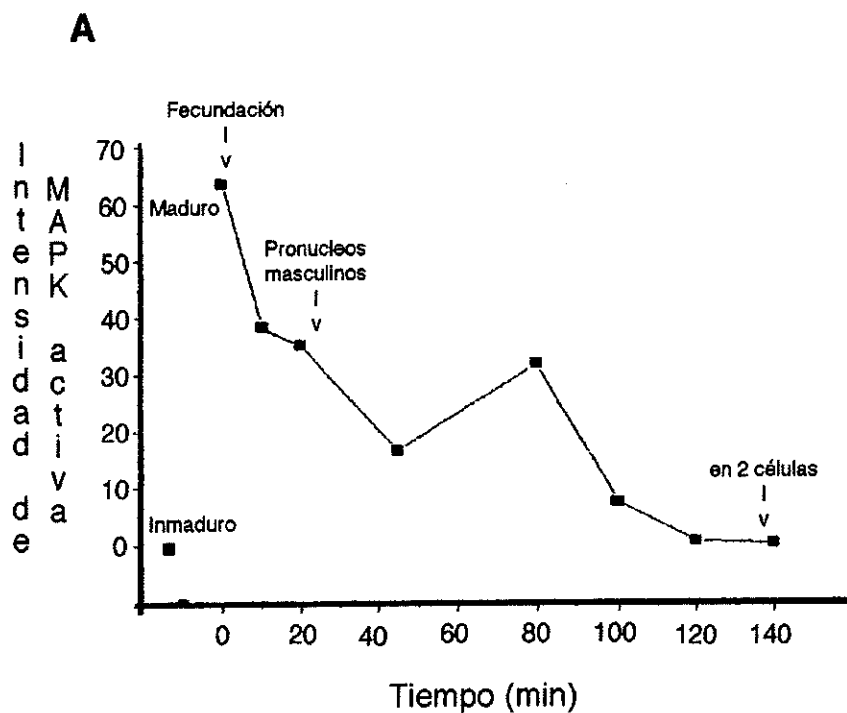


Gráfica 4. A) Intensidad de la MAPK activa en estadios inmaduro, maduro y diferentes intervalos de tiempo después de la fecundación. Los puntos de menor intensidad corresponden a los tiempos de división celular.
 B) Imagen de inmunotransferencia. 1 ovocito inmaduro, 2 ovocito maduro, 3 fecundados 10 min, 4 fecundados 20 min, 5 fecundados 40 min, 6 fecundados 60 min, 7 fecundados 80 min, 8 fecundados 100 min, 9 fecundados 120 min.



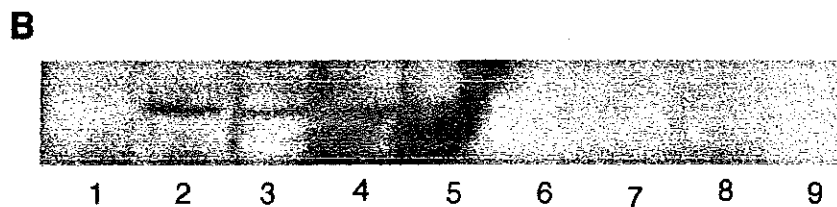
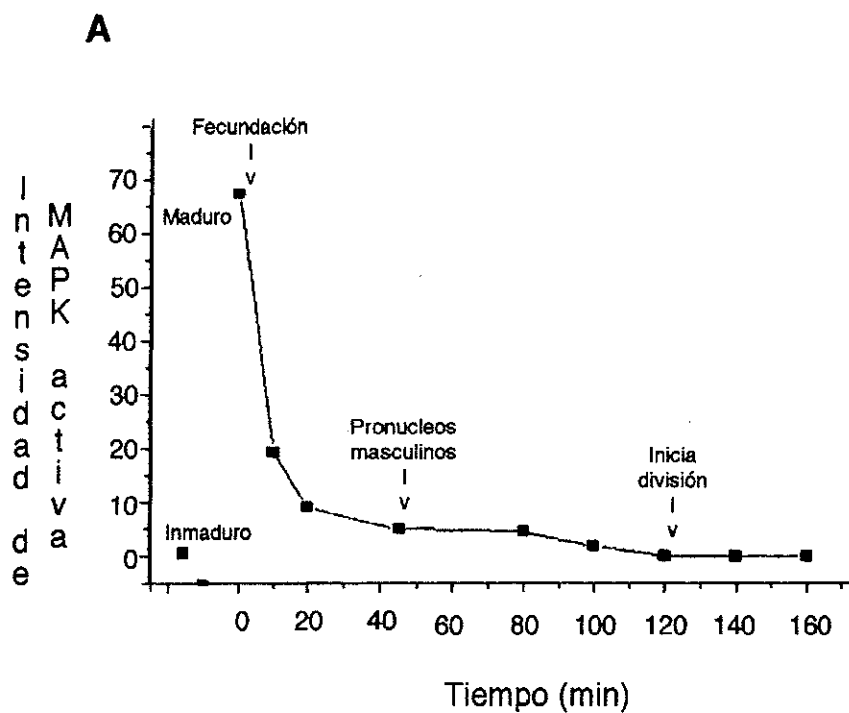
Gráfica 5. A) Registro de los cambios en la intensidad de la proteína MAPK activa del ensayo que presento rápido desarrollo, en el min 45 ya hubo registro de dos células en un alto porcentaje y al min 100 se presentaron ocho células, pero no se registraron cuerpos polares.

B) Imagen obtenida de la película de Rayos X de la inmunotransferencia. 1 ovocito inmaduro, 2 ovocito maduro, 3 fecundados 10 min, 4 fecundados 20 min, 5 fecundados 45 min, 6 fecundados 80 min, 7 fecundados 100 min, 8 fecundados 120 min, 9 fecundados 140 min.



Gráfica 6. A) Intensidad de MAPK activa, después del decremento de la intensidad en la aparición de los pronucleos masculinos se presentó un incremento de la intensidad en la aparición de los cuerpos polares que corresponde a los 80 min.

B) Imagen de la detección de MAPK activa por inmunotransferencia. 1 ovocito inmaduro, 2 ovocito maduro, 3 fecundados 10 min, 4 fecundados 20 min, 5 fecundados 45 min, 6 fecundados 80 min, 7 fecundados 100 min, 8 fecundados 120 min, 9 fecundados 140 min.



Gráfica 7. A) La intensidad de la MAPK activa va disminuyendo después de la fecundación.

B) Imagen de la detección de MAPK activa por inmunotransferencia. 1 ovocito inmaduro, 2 ovocito maduro, 3 fecundados 10 min, 4 fecundados 20 min, 5 fecundados 45 min, 6 fecundados 80 min, 7 fecundados 100 min, 8 fecundados 120 min, 9 fecundados 140 min.

Electrofisiología.

Al analizar las propiedades eléctricas de la membrana se encontró que el potencial de reposo del ovocito en estado inmaduro fue de -65 mV en agua de mar (Fig 5A). Después se hizo perfusión con agua de mar filtrada a pH 9.0, ajustada con NH_4OH , para inducir al ovocito a madurar pero no se obtuvo respuesta inmediata, a los 75 min de iniciada la perfusión se disminuyó el potencial de reposo hasta -48 mV pero continuó sin presentarse potencial de acción, aún cuando el pulso fue de +0.3 nA (no mostrado); no fue sino hasta el min 97 que se registró un potencial de acción requiriendo un pulso de +0.18 nA, su umbral fue de -23 mV pero su tiempo de duración no fue mayor al pulso de corriente aplicada (Fig 5B). La escala utilizada en todas las figuras es la misma; 10 cuadros equivalen a 0.2 nA, 50 mV y 10 seg.

Se obtuvo la resistencia ($R=V/I$; donde R es la resistencia, V es el Voltaje e I es la corriente) de la membrana del ovocito inmaduro y maduro, las cuales se compararon en una gráfica (Graf 8) de corriente (nA) contra Voltaje (mV). La resistencia se obtuvo de la pendiente; el valor de la resistencia del ovocito inmaduro fue de $156\text{M}\Omega$ (-0.176 a 0.14 nA, $r = 0.996$), mientras que en el ovocito maduro en NH_4OH fue casi dos veces menor, $90\text{M}\Omega$ de -0.14 a 0.12 nA ($r = 0.997$). En 4 ovocitos maduros lavados sin NH_4OH estudiados, la resistencia obtenida de la pendiente negativa fue de 167, 172, 250 y 477 $\text{M}\Omega$, a diferencia del ovocito que se perfusionó con agua de mar filtrada a pH 9.0, con NH_4OH , éstos se maduraron con anterioridad y se mantuvieron en agua de mar filtrada sin NH_4OH , por lo que puede ser que el mantener al ovocito en NH_4OH provoque, que su resistencia se mantenga baja.

Una característica que presentaron los ovocitos maduros analizados (5 en 5) fue una serie de oscilaciones (Fig 6A) después de penetrar el electrodo, éstas oscilaciones fueron la respuesta al daño producido y el potencial de membrana permaneció más positivo, cerca del umbral del potencial de acción; como se ve en la figura, una vez que selló la membrana el potencial de membrana tiende a negativo, terminandose los potenciales de acción. El potencial de reposo de éstos ovocitos inició en -50 mV aproximadamente, variando (-30 a -50 mV) durante las perfusiones que se realizaron con diferentes soluciones. Todos los ovocitos maduros mostraron un potencial de acción con

un umbral de -19 a -13 mV que se prolongó después del pulso de corriente, incluso en algunos casos se requirió de un pulso de corriente negativa para cerrarlo (Fig 6B).

Aunque no en todos los casos, se obtuvo el registro de un segundo potencial de acción (2 de 5 ovocitos), éste fue inferior al primero y su duración fue mínima. Las características diferenciales de estos dos potenciales en ovocitos maduros se observan claramente en la Figura 7.

Caracterización del potencial de acción.

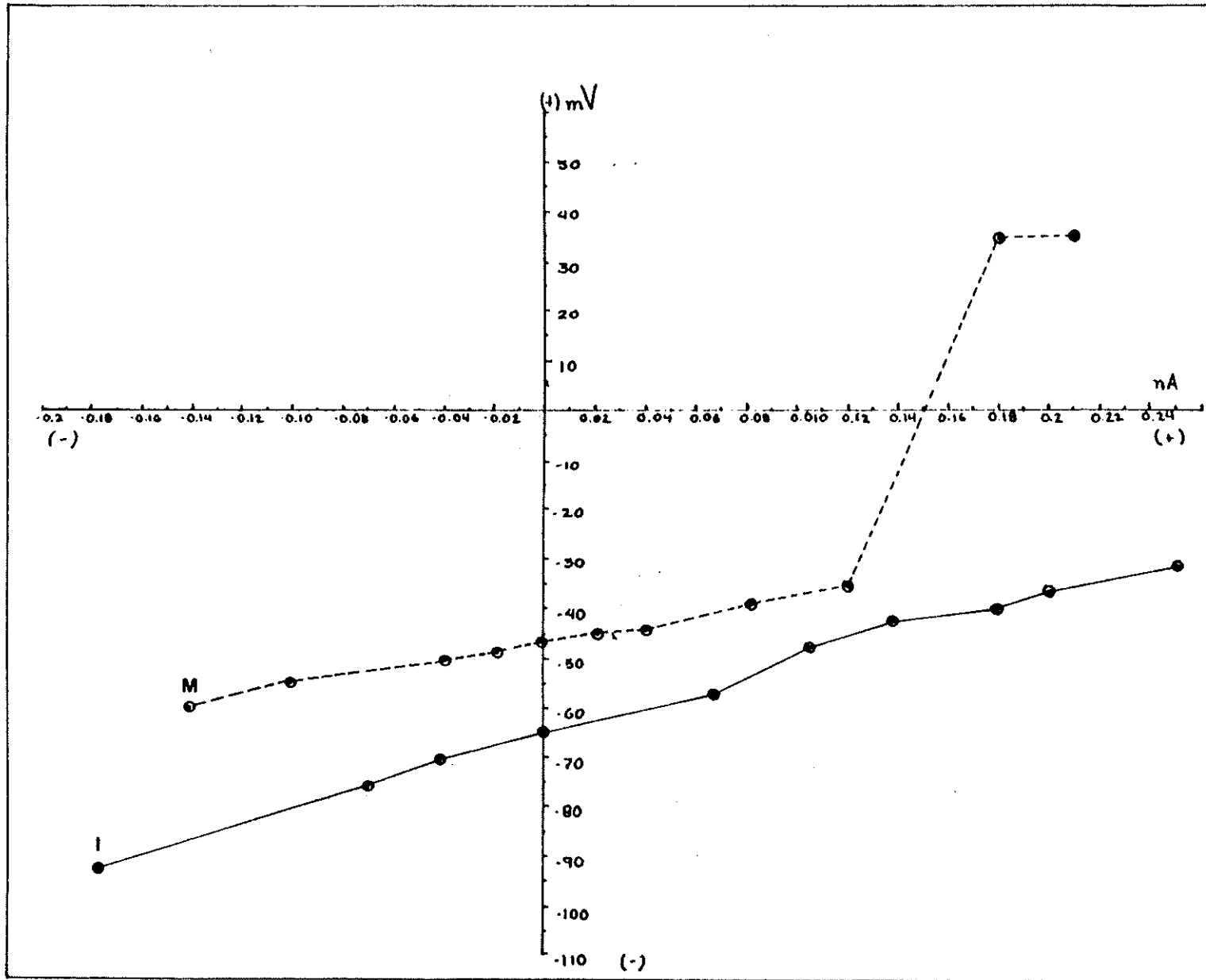
Para caracterizar el potencial de acción se perfusionó con nifedipina 50 μM , un bloqueador de canales de Ca^{2+} tipo L. Se tuvo una serie inmediata del primer potencial de acción sin necesidad de aplicar corriente (Fig 8A), inferimos que la perfusión dañó a la membrana y mientras se sellaba se provocó que se llegara al umbral del primer potencial de acción. En otro experimento después de la perfusión con nifedipina el potencial de membrana se hizo más negativo lo cual nos lleva a decir que estos canales no son sensibles a nifedipina. También se probó con el inhibidor de MAPK, PD98059, el cual se ha visto que bloquea los canales en *Urechis caupo*, el PD98059 no presentó efecto alguno en las propiedades eléctricas de la membrana, el potencial de acción continuó tan prolongado como cuando no se le dio ningún tratamiento al ovocito (Fig 8B).

Para determinar la base iónica del primer potencial de acción se varió las concentraciones de iones en el agua de mar. En la perfusión con agua de mar baja en Na^+ (50mM) y sin Ca^{2+} se vió un efecto sobre el potencial de acción el cual fue drástico, se perdió (Fig 9A). En la siguiente perfusión donde se aumentó la concentración de Na^+ hasta la normal (480mM) continuó sin aparecer el potencial (Fig 9B) pero cuando se aumentó la concentración de Ca^{2+} (normal, 10mM) por perfusión, se registró nuevamente el potencial de acción y se vió que la variación de la concentración de Na^+ no interfirió (Fig 9C) en el registro del potencial.

Aun cuando se varió la concentración de Na^+ a casi 0 (2mM) en el agua de mar artificial utilizada para perfusión, no se registró cambio en la aparición del primer

potencial de acción (Fig 10), lo cual apoya lo antes mencionado, que el primer potencial de acción depende de Ca^{2+} y no de Na^+ .

La relevancia de los resultados obtenidos nos permite determinar que en la caracterización electrofisiológica de los ovocitos del invertebrado marino *Lottia gigantea*, los ovocitos maduros presentan dos potenciales de acción (primario y secundario) que difieren en su umbral -20mV y -55mV y en su amplitud $+50$ y -25mV respectivamente, además de que el potencial de acción secundario es inconstante y la base iónica del primer potencial es dependiente de Ca^{2+} . El inhibidor de MEK (PD98059) no tiene efecto sobre la permeabilidad de la membrana lo que lo hace un buen inhibidor de MAPK en esta especie, pues carece de efecto secundario sobre ella así como tampoco lo tiene la nifedipina. En un ovocito inmaduro disminuye su resistencia durante la incubación con NH_4OH de $156\text{M}\Omega$ a $90\text{M}\Omega$.



Gráfica 8. Relación Corriente – Voltaje (I-V) de un ovocito inmaduro y un ovocito maduro con NH_4OH de la lapa *Lottia gigantea*. La resistencia del ovocito inmaduro fue de $156 \text{ M}\Omega$, mientras que la resistencia del ovocito maduro fue casi la mitad ($90 \text{ M}\Omega$).

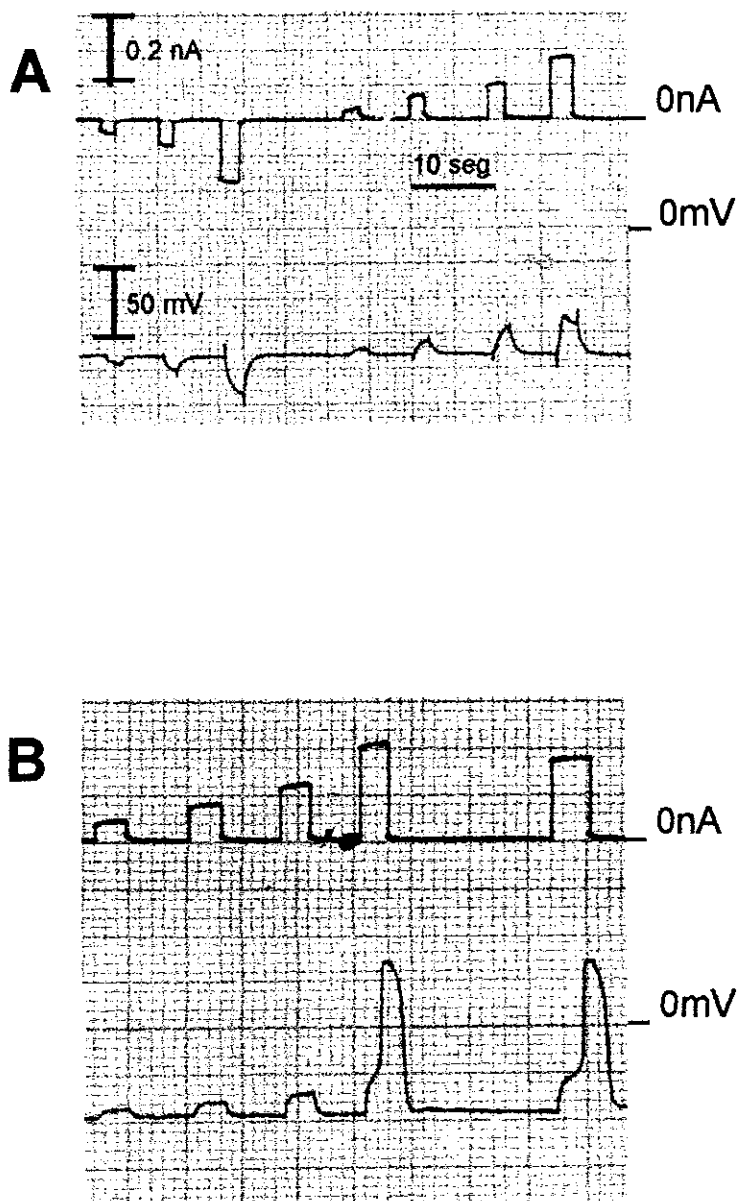


Figura 5. Registros Electrofisiológicos de ovocitos de la lapa *Lottia gigantea*. A) Ovocito inmaduro con un potencial de reposo de -65 mV donde solamente se ve respuestas pasivas a los pulsos de corriente aplicados. B) Ovocito inducido a madurar con una solución de agua de mar pH 9 con NH_4OH a los 97 minutos después de perfundir la solución. Aquí se observa el potencial de acción con un umbral de -23 mV ($>$).

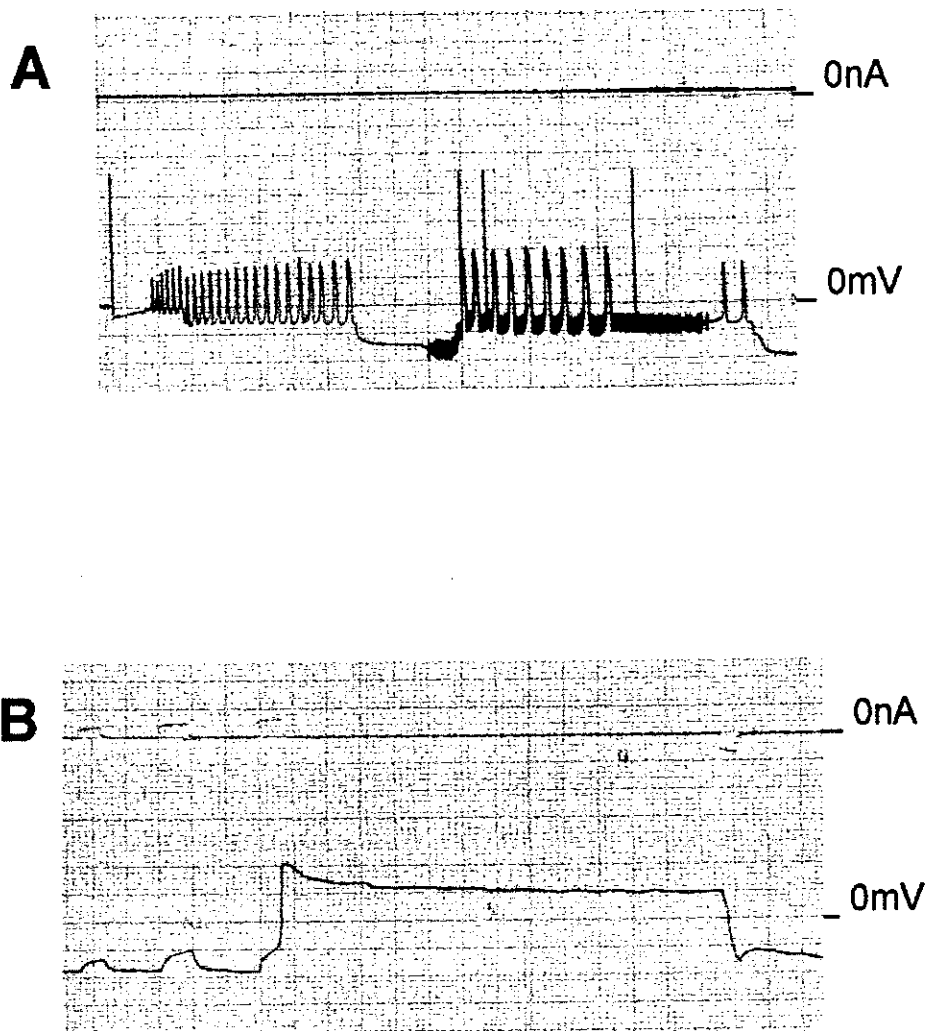


Figura 6. A) Potencial de acción repetido, inducido por la penetración del electrodo en un ovocito maduro. B) Potencial de acción prolongado en un ovocito maduro, los canales quedaron abiertos después de pasar un pulso de corriente positiva y no cerraron hasta que se paso un pulso de corriente negativa.

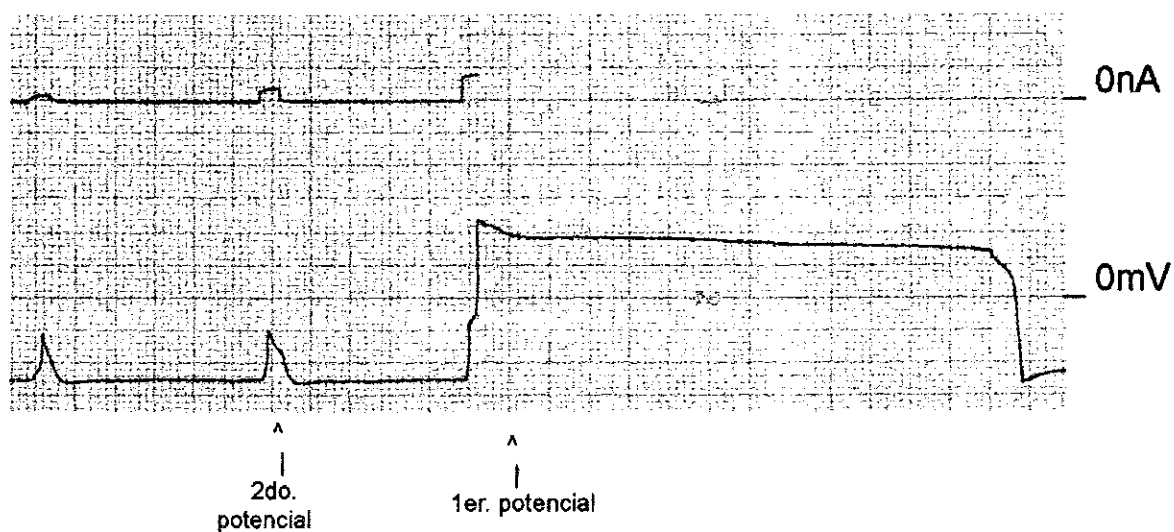


Figura 7. Registro del segundo potencial de acción con un umbral de -55 mV y un pico de entre -30 a -25 mV. Con un pulso de corriente más positivo el potencial de membrana llegó al umbral del primer potencial de acción, cuyos canales no cerraron hasta que se les aplicó un pulso de corriente negativa (el pulso positivo duró 4 segundos y se pasó un pulso negativo indicado por la flecha).

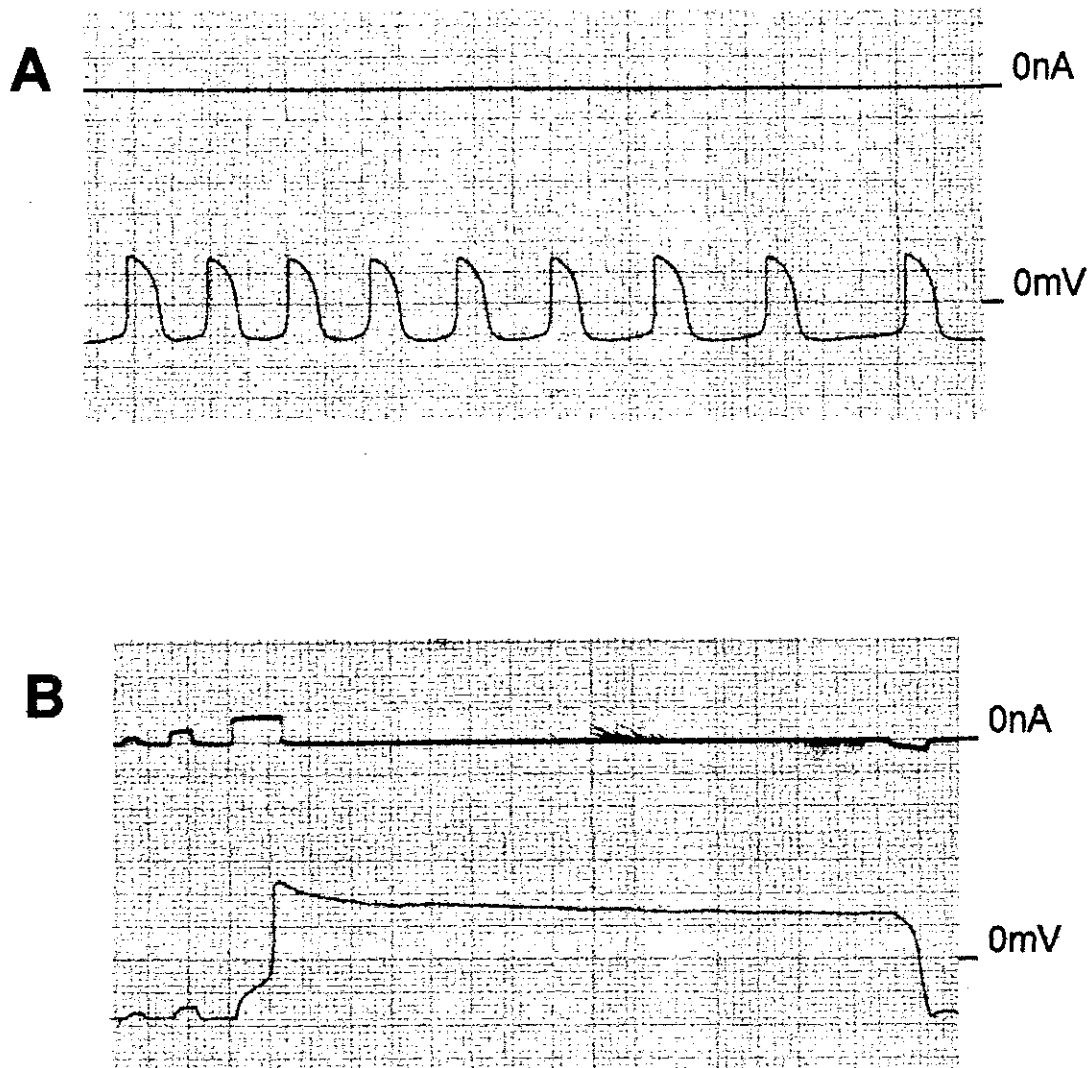


Figura 8. A) Ovocito maduro perfundido con Nifedepina $50\mu\text{m}$, se puede observar una serie de potenciales de acción con un umbral de -20 mV . B) El ovocito maduro en presencia del inhibidor de MAPK PD98059 no presenta ningún efecto sobre las propiedades de la membrana.

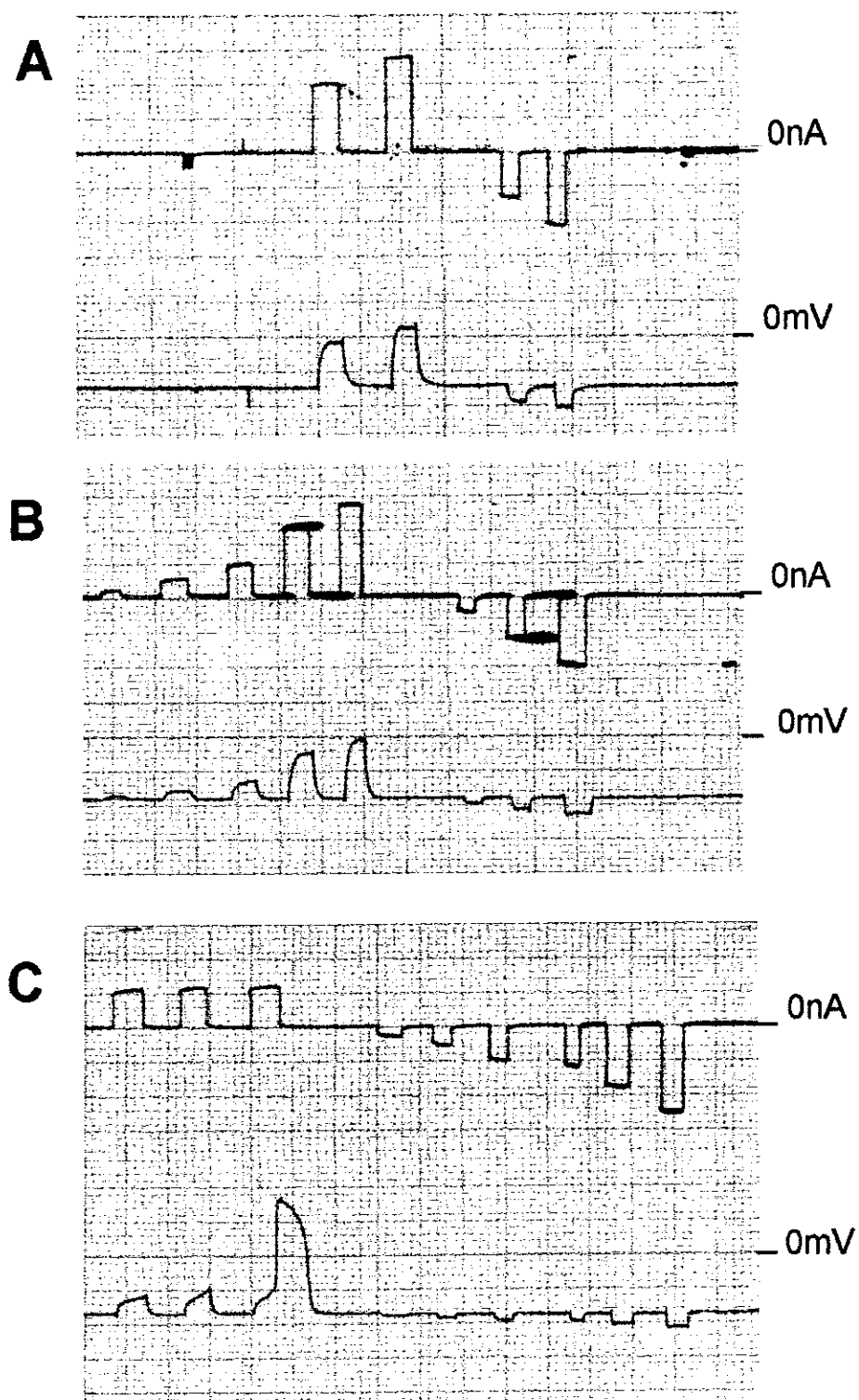


Figura 9. Determinación de la base iónica del primer potencial de acción en oocitos maduros de la lapa común *Lottia gigantea*. A) El potencial de acción desapareció al disminuir la concentración del ion Na hasta 50mM y la de Ca^{2+} a 0, B) al aumentar la concentración de Na a normal el potencial sigue sin registrarse C) pero cuando se aumento la concentración de Ca^{2+} a la normal (10mM) el potencial fue detectado nuevamente.

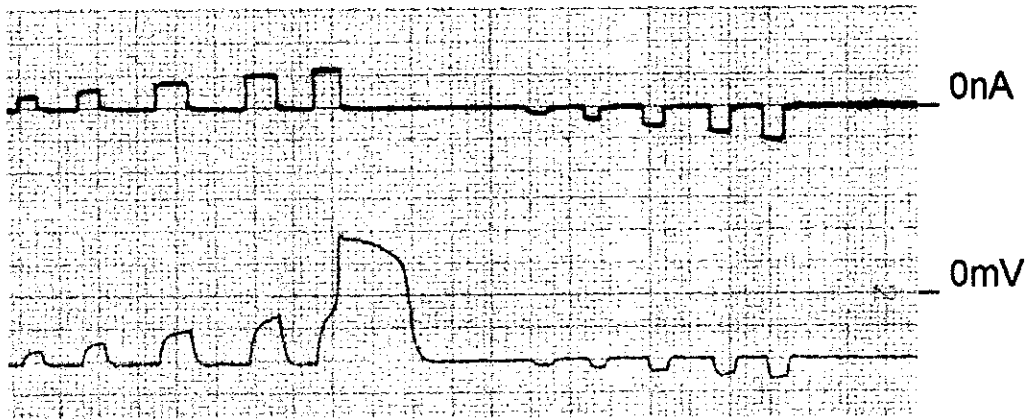


Figura 10. La utilización de una concentración baja de Na^+ (2mM) ayudo para determinar que el primer potencial de acción de la lapa no es dependiente de canales de Na.

DISCUSION

Inhibidores en Maduración.

Los ovocitos de la lapa *Lottia gigantea* se encuentran en profase I de meiosis, para ser estimulados a madurar se utiliza NH_4OH durante un periodo de tiempo en el cual se lleva a cabo el rompimiento de la vesícula germinal y la desaparición de las células foliculares que representan el estado de maduración arrestados en metafase I de meiosis.

Los resultados donde se detectó MAPK activa en ovocitos maduros, no siendo detectada en inmaduros; nos indican que ésta proteína tiene intervención en la maduración al ser activada después del estímulo con NH_4OH .

Sagata *et al.*, (1989) mencionan que la MAPKK (MEK) fosforila directamente a la MAPK para su activación y es indispensable para el desarrollo del FC. Se intentó investigar ésta posibilidad con el uso del inhibidor PD 98059, sin embargo la utilización de PD conjuntamente con el NH_4OH nos demostró que la MAPK aún se activa (Graf 2), y se lleva a cabo el rompimiento de la vesícula, pero cuando hay una permanencia prolongada con el PD98059 (1hr) si se inhibe la activación de MAPK aunque el rompimiento de la vesícula se lleva a cabo así como el resto del proceso de maduración. Por una parte es posible que se requiera de mayor tiempo para que trabaje el inhibidor con una concentración de $50\mu\text{M}$, quizá a una concentración de $100\mu\text{M}$ el efecto sea más rápido. Mientras que por otra parte MEK ya puede encontrarse activa antes del poner el NH_4OH pero la MAPK se encuentre secuestrada y el NH_4OH produzca un cambio en la localización, de esta manera se pueda llevar a cabo la fosforilación de MAPK por medio de MEK.

Se identificó que la activación de MAPK no interviene en el rompimiento de la vesícula germinal ni en la llegada a metafase I. Esto nos sugiere que el NH_4 activa otras moléculas ya existentes las cuales provocan la activación del complejo MPF el cual inicia la maduración. En otros organismos (anfibios) se ha visto que éste complejo es dependiente de la activación de MAPK. No se ha identificado cual es la función de MAPK en maduración en *Lottia gigantea*, y se puede relacionar con una función

importante en los primeros momentos de la fecundación. Consistente con esto, los resultados del presente trabajo demuestran que la inhibición de síntesis proteica no impide que la MAPK se active, utilizando la Emetina antes y durante la maduración. En *Patella vulgata* (Neant y Guerrier, 1988) cuando se inhibe la síntesis de proteínas, el proceso del rompimiento de vesícula germinal y la condensación de cromosomas se lleva a cabo exitosamente, esto mismo sucede en la lapa *Lottia gigantea* hasta completar el arresto en metafase, pero al paso del tiempo los cromosomas se descondensan y se reforma la envoltura nuclear, esto es debido a que la maduración se lleva a cabo con moléculas pre-existentes que se utilizan como iniciadores en el proceso pero no son suficientes para mantener el arresto del ciclo celular en metafase I; por tanto se requiere de una síntesis sostenida de proteínas para mantener el arresto en metafase I.

MAPK Después de Fecundación.

Después de completar meiosis I en la lapa la MAPK activa inicia un decremento después de efectuarse la fecundación, como en la estrella de mar (Picard *et al.*, 1996; Tachibana *et al.*, 1997) en un lapso de tiempo corto. En la aparición de los pronúcleos masculinos se observa una disminución mayor con respecto al ovocito maduro, en ratones esto ha sido presentado igualmente, se desactiva MAPK al aparecer los pronúcleos (Moos *et al.*, 1995). En la lapa la disminución de la actividad de la proteína es reflejada dentro de los primeros 10 min después de la fecundación donde se presenta la interacción entre el espermatozoide y el ovocito, lo que inicia la desactivación de MAPK, esto puede ser en relación al aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular producida por el espermatozoide (Stephano, Ortíz y Gould, no publicado). En ratón Mos es degradada por la proteasa calpaina dependiente de Ca^{2+} (Watanabe *et al.*, 1989), por lo tanto cuando se produce el contacto entre el espermatozoide y el ovocito se inicia un flujo de éste ion por la apertura de sus canales que se puede producir por el espermatozoide y por consiguiente se empieza a degradar Mos lo que propiciará la inactivación del resto de la ruta de MAPK.

Electrofisiología.

Los resultados de la electrofisiología realizada a los ovocitos de *Lottia gigantea* nos señalan que hay cambios en las propiedades eléctricas de la membrana después del

proceso de maduración. Primeramente la disminución de la resistencia de los ovocitos maduros a casi la mitad de la de los inmaduros cuando se mantuvieron en NH_4OH pero cuando se lavaron y se mantuvieron en agua de mar sin NH_4OH la resistencia fue muy similar en ambos ovocitos. Algo similar sucedió en el trabajo realizado por Moreau *et al.*, (1990), cuando se perfusionó al ovocito con NH_4 la resistencia disminuye pero al lavarlo con agua de mar aumento nuevamente y después de un tiempo volvió a disminuir. En contraste En su trabajo Alvarado *et al.*, (1996) reportan que al perfusionar con serotonina la resistencia aumentó.

De los potenciales de acción obtenidos se determinó la base iónica de uno de ellos la cual es dependiente de Ca^{2+} , siendo detectado unicamente en ovocitos maduros mientras que hay registro de que en la lapa *Patella vulgata* se detecta un potencial de acción en ambos estados y éste es dependiente de Ca^{2+} y de Na^+ (Moreau *et al.*, 1990). En el segundo potencial de la lapa, al no presentarse en todos los ovocitos, no se determinó su base iónica e identificarse como propiedad de la membrana, éste punto queda abierto a estudios posteriores para poder establecer alguna conclusión.

Una diferencia notoria en los ovocitos maduros fue la de mostrar un potencial de acción muy prolongado con la aplicación de un bajo estímulo de corriente. Esto puede ser muy importante para el bloqueo eléctrico de la polispermia donde el potencial de membrana positivo (potencial de fecundación) inducido por el primer espermatozoide inhibe la entrada de los demás espermatozoides al ovocito (Jaffe y Gould, 1985). El potencial de fecundación así como estos puntos queda disponible para futuros estudios.

CONCLUSIONES

La proteína MAPK es detectada en forma activa en ovocitos maduros de la lapa común *Lottia gigantea*, pero no en inmaduros.

La actividad de MAPK no es necesaria para llevar a cabo la ruptura de la vesícula germinal y la llegada a metafase I.

El NH_4OH activa moléculas ya existentes para provocar la maduración ya que en la presencia del inhibidor de síntesis proteica ésta se llevó a cabo.

Después de la fecundación se provocó la inactivación de MAPK y permaneció inactiva durante la división mitótica.

La síntesis de proteínas no es necesaria para que se lleve a cabo la ruptura de la vesícula germinal, pero si se requiere una síntesis sostenida para el mantenimiento en metafase I de meiosis.

La resistencia de la membrana disminuye casi a la mitad en ovocitos maduros que se mantienen en NH_4OH pero cuando éstos son lavados aumenta la resistencia nuevamente.

Se detectaron dos potenciales de acción en ovocitos maduros pero solo el primero de ellos fue de manera constante, el cual presenta un umbral de -20mV y un pico de $+50$ a 55mV .

La base iónica del primer potencial de acción que se registro de manera constante en ovocitos maduros es dependiente de Ca^{2+} .

BIBLIOGRAFIA

Alvarado-Alvarez, R; Gould, M; y Stephano J, L. 1996. Spawning, in vitro Maturation, and Changes in Oocyte Electrophysiology Induced by Serotonin in *Tivela stultorum*. *Biology Bulletin*. 19: 322-328.

Choi, T; Fukasawa, K; Zhou, R; Tessarollo, L; Borrer, K; Resau, J; y Vande Woude, G. 1996. The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) Pathway Regulates the Size and Degradation of the First Polar Body in Maturation Mouse Oocytes. *Cell Biology* 93: 7032-7035.

Colledge, W; Carlton, M; Udy, G; y Evans, M. 1994. Disruption of *c-mos* Causes Parthenogenetic Development of Unfertilized Mouse Eggs. *Nature* 370: 65-67.

Eckberg, W. 1997. MAP and *cdc2* Kinase Activities at Germinal Vesicle Breakdown in *Chaetopterus*. *Developmental Biology* 191: 182-190.

Ferrel, J.E; Michael, W; John, C; y Steven, M. 1991. Cell Cycle Tyrosine Phosphorylation of p34cdc2 and a Microtubule-Associated Protein Kinase Homolog in *Xenopus* Oocytes and Eggs. *Molecular and Cellular Biology* 11: 1965-1971.

Furuno, N; Mayumi, N; Kenji, O; Hirutaka, T; Jun, I; Nobushige, N; Yasuki, O; y Noriyuki, S. 1994. Suppression of DNA Replication Via Mos Function During Meiotic Division in *Xenopus* Oocytes. *The EMBO Journal* 13: 2399-2410.

Haccard, O; Lewellyn, A; Hartley, R.S; Erikson, E; y Maller, J.L. 1995. Induction of *Xenopus* Oocyte Meiotic Maturation by MAP Kinase. *Developmental Biology* 168: 677-682.

Haccard, O; Sarcevic, B; Lewellyn, A; Hartley, R; Roy, L; Izumi, T; Erikson, E; y Maller, J. 1993. Induction of Metaphase Arrest in Cleaving *Xenopus* Embryos by MAP Kinase. *Science* 262: 1262-1265.

Hashimoto, N; Watanabe, N; Furuta, Y; Tamemoto, H; Sagata, N; Yocoyama, M; Okazaki, K; Nagayoshi, M; Takeda, N; Ikawa, Y; y Aizawa, S. 1994. Parthenogenetic Activation of Oocytes in *c-mos*-deficient Mice. *Nature* 370: 68-71.

Huang, W; Daniel, K; y Raymond, E. 1995. Biochemical and Biological Analysis of Mek1 Phosphorylation Site Mutants. *Molecular Biology of the Cell* 6: 237-245.

Jaffe, L; y Gould, M. 1985. Polyspermy-Preventing Mechanisms cap. 6 en *Biology of Fertilization* vol. 3. Metz y Monroy. New York. 223-242 pp.

Kosako, H; Yukiko, G; y Eisuke, N. 1994. Requirement for the MAP Kinase Kinase/MAP Kinase Cascade in *Xenopus* Oocyte Maturation. *The EMBO Journal* 13: 2131-2138.

Moos, J; Visconti, P; Moore, G; Schultz, R; y Kopf, G. 1995. Potential Role of Mitogen-Activated Protein Kinase in Pronuclear Envelope Assembly and Disassembly Following Fertilization of Mouse Eggs. *Biology of Reproduction* 53: 692-699.

Moreau, M; David, C; y Azzi, L. 1990. Changes in Membrane Properties During in-vitro Meiotic Maturation of the Limpet *Patella vulgata*. *International Journal of Development Biology* 34: 441-451.

Mordret, G. 1993. MAP Kinase Kinase: A Node Connecting Multiple Pathways. *Biology Cell* 79: 193-207.

Morris, R; Abbott, D; y Haderlie, E. 1980. *Intertidal Invertebrates of California*. Sowerby. California. 249 p.

Neant, I; y Guerrier, P. 1988. Meiosis Reinitiation in the Mollusc *Patella vulgata*. Regulation of MPF, CSF an Chromosome Condensation activity by intracellular pH, Protein Synthesis and Phosphorylation. *Development* 102: 505-516.

Ortíz, B. 1996. Maduración In vitro del abulón *Haliotis rufescens* y lapa *Lottia galathea*. Tesis. Facultad de Ciencias. Baja California, México.

Picard, A; Galas, S; Peaucellier, G; y Doree M. 1996. Newly assembled cyclin B-cdc2 kinase is required to suppress DNA replication between meiosis I and meiosis II in starfish oocytes. *The EMBO Journal* 15: 3590-3598.

Roy, L.M; Haccard, O; Izumi, T; Lattes, B.G; Lewellyn, A.L; y Maller, J.L. 1996. Mos proto-oncogene Function During Oocyte Maturation in *Xenopus*. *Oncogene* 12: 2203-2211.

Sadler, K; y Ruderman J. 1998. Components of the Signaling Pathway Linking the 1-Methyladenine Receptor to MPF Activation and Maturation in Starfish Oocytes. *Developmental Biology* 197: 25-38.

Sagata, N. 1997. What does Mos do in oocytes and somatic cells? *BioEssays* 19: 13-20.

Sagata, N; Nobumoto, W; George, V.W; y Yoji, I. 1989. The *c-mos* proto-oncogene Product is a Cytostatic Factor Responsible for Meiotic Arrest in Vertebrate Eggs. *Nature* 342: 512-518.

Sagata, N; Marianne, O; Terry, C; John, B; y George, V.W. 1988. Function of *c-mos* proto-oncogene Product in Meiotic Maturation in *Xenopus* Oocytes. *Nature* 335: 519-525.

Shibuya, E; Boulton, T; Cobb, M; y Ruderman, J. 1992. Activation of p42 MAP Kinase and the Release of Oocytes from Cell Cycle Arrest. *The EMBO Journal* 11: 3963-3975.

Stephano, J. L. y Gould, M. 1997. The Intracellular Calcium Increase the Fertilization in *Urechis caupo* Oocytes: Activation without Waves. *Developmental Biology* 191: 53-68

Stephano, J. L. 1993. El Factor Promotor de la Fase-M y el Control de la División Celular. *Ciencia* 44: 305-322.

Tachibana, K; Takumitsu, M; Yoriko, N; y Takeo, K. 1997. MAP Kinase Links the Fertilization Signal Transduction Patway to the G1/S-phase Transition in Starfish. *The EMBO Journal* 16: 4333-4339.

Verlhac, M; Jacek, K; Hugh, C; y Bernard, M. 1994. Microtubule and Chromatin Behavior Follow MAP Kinase Activity but not MPF Activity During Meiosis in Mouse Oocytes. *Development Biology* 120: 1017-1025.

Watanabe, N; Vande woud, G; Ikawa, Y y Sagata, N. 1989. Specific proteolysis of the *c-mos* proto-oncogene Product by Calpain on Fertilization of *Xenopus* Eggs. *Nature* 342: 505-511.

Weber, M; Jacek, K; Ralph, A; Jonathan, P; y Bernard, M. 1991. *c-mos* Proto-Oncogene Product is Partly Degraded after Release from Meiotic Arrest and Persists during Interphase in Mouse Zygotes. *Developmental Biology* 148: 393-397.

Zhao, X; Balraj, S; y Bruce, B. 1991. The Role of *c-mos* proto-oncoprotein in Mammalian Meiotic Maturation. *Oncogene* 6: 43-49.

ANEXOS

Anexo #1

Inhibidor de fosfatasa (500 μ l de volumen total)

0.5M β -glicerofosfato	100 μ l
50mM NaF	40 μ l
100mM Na_3VO_4	10 μ l
Proteasa 100X	10 μ l
(Leupeptin, Aprotinin y Pepstatin 0.33 mg/ml de c/u)	
150 mM EGTA pH 7	66.5 μ l
2x d H_2O	273.5 μ l

Anexo #2

Solución desnaturalizante (6 ml de volumen total)

SGB	2.5 ml	(0.2% SDS y Trizma base 0.25M, pH 6.8)
Amortiguador del gel de condensación		
10% SDS	2 ml	(0.2 g de SDS + 2 ml de H_2O)
Glicina	1 ml	
2-Mercaptoetanol	0.5 ml	
Marcador del frente: Azul bromofenol	0.001%	

Anexo #3

Gel poliacrilamida SDS al 10%

Gel de corrido

Agua destilada	625 μ l	
RGB	1875 μ l	(SDS 0.2% y Trizma base 0.75M, pH 8.8 Hcl 6M)
Amortiguador del gel de corrido		
A/MBA	1250 μ l	(30% Acrilamida y 0.86% Bis-acrilamida)
1:10 Temed	12.5 μ l	
Persulfato de amonio	37.5 μ l	(20 mg de persulfato de amonio en 125 μ l de agua destilada)

Gel de condensación al 5%
 Agua destilada 625 μ l
 SGB 937 μ l
 Amortiguador del gel de condensación
 A/MBA 312 μ l
 1:10 Temed 6.25 μ l
 Persulfato de amonio 18.7 μ l

Anexo #4

Amortiguador de electroforesis (10X), 1l de volumen total

0.25M Triz base 30.275 g
 1.92M Glicina 144.13 g
 1% SDS 10 g
 Agua destilada 1 lt

ajustar a pH 8.3

diluir 1:10 con agua destilada antes de usarse

Anexo #5

Amortiguador de transferencia (1X), 1.5l de volumen total

25mM Tris base 4.545 g
 192mM glicina 21.6 g
 Metanol puro 300 ml
 Agua destilada 1200 ml

prepararse momentos antes de usarse en hielo.

Anexo #6

TBST 0.1% de Tween-20 1l volumen total

1M Tris-HCl (pH 7.4) 10 ml
 150mM NaCl 8.8 g
 0.1% Tween-20 1 ml
 Agua destilada 989 ml

Anexo #7

Sustrato ECL (Enhanced Chemical Luminescence)

Solución A	2 ml
Solución B	50 μ l

Anexo #8

Revelador de película de RX 500 ml de volumen total

Revelador Kodak GBX	100 ml
Agua Corriente	400 ml

Anexo #9

Fijador de película de RX 1l volumen total

Fijador Kodak RP X-OMAT (a y b)	
solución a	197 ml
solución b	17.7 ml
Agua corriente	779 ml

Anexo #10

Colorante Orceina 100 ml volumen total

2% Orceina	2 g
60% Acido acetico	100 ml

Anexo #11

Agua de mar artificial (1X) 50 ml volumen total

484mM NaCl	28.28 g/l
10mM KCl	0.746 g/l
27mM MgCl ₂ . 6H ₂ O	5.49 g/l
29mM MgSO ₄ . 7H ₂ O	7.15 g/l
10mM CaCl ₂ . 2H ₂ O	1.47 g/l
2.4mM NaHCO ₃	0.202 g/l

ajustar a pH 8 con 0.5M de NaOH

Agua de mar sin Na^+
484mM Cl de colina 67.6 g/l

Agua de mar 50mM de Na^+
90% de Agua sin Na^+
10% de Agua de mar normal

Agua de mar sin Ca^{2+}
todos los compuestos, excepto CaCl_2