

## EXPRESIÓN DE CANALES DE POTASIO VOLTAJE DEPENDIENTES EN OVOCITOS DE *Xenopus laevis* (AMPHIBIA).

### Voltage gated potassium channels expressed in *Xenopus laevis* (AMPHIBIA) oocytes.

HEDNA CHAVES<sup>1,5</sup>, CARLOS VILLALBA<sup>2</sup>, LUISA LAGOS<sup>3,5</sup>,  
RAFAEL VARGAS<sup>4,5</sup>, FRANCISCO MARTÍNEZ-WITTINGHAN<sup>5</sup>,  
CARLOS CLAVIJO<sup>6</sup> Y MARCELA CAMACHO<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes.

<sup>2</sup>IVIC, Caracas, Venezuela.

<sup>3</sup>Departamento de Química, Facultad de Ciencias,  
Universidad Nacional de Colombia.

<sup>4</sup>Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina,  
Universidad Nacional de Colombia.

<sup>5</sup>Laboratorio de Biofísica, Centro Internacional de Física,  
Bogotá, Colombia.

<sup>6</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,  
Universidad Nacional de Colombia.

Recibido, mayo 21 de 2003. Aceptado, mayo 27 de 2003.

### RESUMEN

La expresión en sistemas heterólogos ha sido una herramienta ampliamente utilizada en los últimos años para el estudio funcional y estructural de proteínas. Para la caracterización de las propiedades biofísicas de canales, bombas y transportadores en general su expresión en ovocitos de *Xenopus laevis*, ha sido fundamental. Este estudio reporta la expresión de dos canales de potasio voltaje dependientes, *Kv1.1* y *Shaker* en ovocitos de *X. laevis* usando un protocolo ajustado a las condiciones de latitud y altitud de Bogotá para la extracción, aislamiento, cultivo y microinyección de éstas células.

**Palabras clave:** ovocito, *Xenopus laevis*, voltaje clamp, *Kv1.1*, *Shaker*, expresión heteróloga.

### ABSTRACT

Heterologous expression has been an important tool for structural and functional characterization of proteins. The study of biophysical properties of ion channels, pumps and transporters has been possible thanks to their expression in *Xenopus laevis* oocytes. Here we report the expression of two voltage gated channels, *Kv1.1* and *Shaker*, in *X. laevis* oocytes using a method for oocyte extraction, isolation, culture, and microinjection adapted to the latitude and altitude conditions of Bogotá, Colombia.

**Key words:** oocyte, *Xenopus laevis*, voltage clamp, *Kv1.1*, *Shaker*, heterologous expression.

## INTRODUCCIÓN

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 transmembrana. La identificación y caracterización de canales iónicos en diferentes sistemas celulares es una herramienta experimental ampliamente utilizada en estudios de neurobiología molecular. La capacidad de los ovocitos de la rana sudafricana *Xenopus laevis* para traducir eficientemente la información genética inyectada en su citoplasma (Gurdon *et al.*, 1971) y de ensamblar e insertar canales iónicos en su membrana para generar respuestas electrofisiológicas, ha hecho de estas células un modelo aceptado para tal fin (Soreq y Seidman, 1992). Esta técnica de expresión permite la caracterización de moléculas de difícil estudio en tejidos intactos, ya que éstas son expresadas por el ovocito con la actividad biológica característica de la molécula nativa (Sumikawa *et al.*, 1984; Leonard *et al.*, 1987; Périer *et al.*, 1992). Hasta donde los autores conocen, todos los estudios realizados usando este modelo se han llevado a cabo a una altitud inferior a 1.320 msnm (promedio de  $210 \pm 291$  msnm,  $n = 42$ ) y al norte del trópico de Cáncer. En nuestra experiencia la estandarización de las condiciones para la aclimatación y producción de ovocitos de *X. laevis* fue determinante antes de poder usar este modelo para la caracterización de canales iónicos. De cuatro lotes de *X. laevis* importados, uno no sobrevivió al proceso de aclimatación a su llegada y la producción y viabilidad de ovocitos en las restantes, fue inferior a lo reportado en la literatura. En este trabajo se presentan las condiciones experimentales con las que se logró la estandarización de estos procesos y la expresión de canales de potasio voltaje dependientes en ovocitos de *X. laevis* en las condiciones ambientales particulares de Bogotá.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### EXTRACCIÓN DE OVOCITOS

Hembras adultas de la especie *Xenopus laevis laevis* (XENOPUS I, Dexter, Michigan) se mantuvieron en acuarios con agua de clorinada a temperatura ambiente (14-18°C) y se alimentaron semanalmente con hígado bovino. Para la extracción de ovocitos, las ranas fueron anestesiadas con MS-222 (ácido 3-amino benzoico etil éster) al 0.23% (Sigma Cat No A5040) a 4°C por 10-15 minutos y sometidas a laparotomía. El abordaje abdominal se realizó a través de una incisión paralela al pliegue inguinal de aproximadamente 1 cm. Se extrajeron 2 ml de lóbulos de ovocitos. Después se suturó por planos y la rana se mantuvo aislada por un período de 24 horas hasta su recuperación de manera óptima (Goldin 1992).

### CULTIVO DE OVOCITOS

Los lóbulos de ovocitos fueron lavados con solución de Barth sin calcio (Tabla 1) y sometidos a separación mecánica con pinzas y química con una solución de proteasas compuesta por colagenasa tipo IA (Sigma Cat No C-9891) 1 mg/ml y tripsina (Sigma Cat No T-7418) 180 µg/ml, en solución de Barth sin calcio con agitación a 70 rpm, a 22°C. El tiempo de digestión se evaluó cualitativamente y se prolongó hasta

obtener 50% de los ovocitos aislados. Para finalizar el proceso, los ovocitos se lavaron cinco veces con solución de Barth sin calcio y se dispersaron en una caja de Petri para su selección. Se eligieron ovocitos intactos en estadio V o VI. Aproximadamente 50 ovocitos por unidad experimental se incubaron en solución de Barth a 18°C.

| Composición  | Medio de cultivo |       |       |         |         |
|--|------------------|-------|-------|---------|---------|
|  | ND96             | NFR   | Barth | Barth T | Barth S |
| NaCl   | 96.0             | 115.0 | 88.00 | 88.00   | 88.00   |
| KCl  | 2.00             | 2.5   | 1.00  | 1.00    | 1.00    |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                 | 1.80             | 1.8   | 0.41  | 0.41    | 0.41    |
| NaHCO <sub>3</sub>                                   | -                | -     | 2.40  | 2.40    | 2.40    |
| MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                 | 1.00             | -     | -     | -       | -       |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                 | -                | -     | 0.82  | 0.82    | 0.82    |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O | -                | -     | 0.33  | 0.33    | 0.33    |
| Hepes  | 5.00             | 10.00 | 20.00 | -       | 20.00   |
| Tris   | -                | -     | -     | 7.50    | -       |
| Suero fetal bovino (%)                               | -                | -     | -     | -       | 5.00    |
| pH   | 7.5              | 7.2   | 7.5   | 7.5     | 7.5     |

Tabla 1. Composición de las soluciones utilizadas. Todas las concentraciones de sales están expresadas en mM.

#### INYECCIÓN DE OVOCITOS

Usando una micropipeta de inyección (Drummond Scientific Company) con micropipetas de vidrio (*Vertical pipette puller*, David Kopf Instruments; capilares: Custom Glass, Drummond Scientific Company), se inyectaron 50 nl/ovocito de cRNA a una concentración de 0.062 µg/µl. Los ovocitos fueron separados en tres grupos experimentales así: un control sin inyección, un control negativo inyectado con agua HPLC y un control positivo inyectado con cRNA del canal de potasio *Kv1.1* (40µg/µl) o *Shaker* (20µg/µl) cuyas características son ampliamente conocidas (donados por el Dr. Walter Stuhmer, Institut Max Planck, Gottingen, Alemania). Luego de la inyección los ovocitos se cultivaron en solución de Barth a 18°C durante 96 horas. La solución de cultivo se cambió diariamente.

#### REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE OVOCITOS

Para los registros electrofisiológicos los ovocitos se bañaron en solución de Barth sin antibiótico en una cámara de plástico y se visualizaron con un estéreo microscopio. Las corrientes totales fueron obtenidas usando la técnica de electrofisiología de *voltage clamp* con dos electrodos usando un amplificador (TEV 200, Dagan Corporation). Las pipetas de registro fueron hechas con capilares para hematocrito, con una solución de KCl 2 M y con resistencias de 0.5-1.0 M $\Omega$ . Luego de ubicar los dos electrodos se midió en el modo de corriente el valor del potencial al cual el flujo neto de cargas fue igual a cero y al que se denominó potencial de reposo ( $V_m$ ); Posteriormente se registró la célula en la modalidad de voltaje. Se generaron pulsos de voltaje desde un

potencial sostenido de -80 mV. Las corrientes fueron filtradas a 1 kHz y digitalizadas a 200  $\mu$ s/punto con una interfase análogo-digital (DigiData 1200 Interface, Axon Instruments, Foster City, CA). La adquisición y análisis de datos se realizó con los programas PCLAMP6 (Axon Instruments, Foster City, CA) y Origin 7 (Microcal). Los datos obtenidos se analizaron utilizando la prueba de ANDEVA. Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### EXTRACCIÓN Y CULTIVO DE OVOCITOS

Con el procedimiento descrito en la metodología, no se lograron las condiciones necesarias para garantizar que los ovocitos aislados y cultivados tuvieran una supervivencia superior a 90% a las 96h. Por lo tanto algunos pasos fueron modificados para cumplir este objetivo. Inicialmente *Xenopus* fueron expuestas al anestésico a 4°C por un período de 30 minutos, tiempo en el cual se logró una buena anestesia. Se realizó laparotomía y se extrajeron aproximadamente 2 ml de lóbulos ováricos, que fueron sometidos a separación mecánica y enzimática. Los siguientes tratamientos con proteasas fueron probados:

1. Colagenasa 0.5 mg/ml + tripsina 90  $\mu$ g/ml por 90 minutos
2. Colagenasa 0.5 mg/ml + tripsina 90  $\mu$ g/ml por 120 minutos
3. Colagenasa 1 mg/ml + tripsina 180  $\mu$ g/ml por 90 minutos
4. Colagenasa 1 mg/ml + tripsina 180  $\mu$ g/ml por 120 minutos
5. Colagenasa 1.5 mg/ml por 45 minutos

Los ovocitos fueron expuestos a estos tratamientos en solución de Barth sin calcio a 22°C con una agitación de 120 rpm. El cultivo fue realizado en solución de Barth + penicilina estreptomicina (100U/ml:100  $\mu$ g/ml) a 20°C en la oscuridad. Los ovocitos fueron observados a las 24, 48, 72 y 96 horas después del tratamiento para calcular su supervivencia y calidad. El porcentaje de supervivencia fue calculado día a día de manera independiente, incluyendo únicamente ovocitos sin alteraciones morfológicas. La supervivencia de los ovocitos tratados con colagenasa y tripsina a diferentes concentraciones y tiempos de exposición fue igual o menor a 80% a las 96 horas (Tabla 2). Se encontraron valores similares de supervivencia con un tratamiento simplificando de colagenasa 1.5 mg/ml por 45 minutos. Este tratamiento enzimático fue escogido para determinar el impacto del medio de cultivo sobre la viabilidad de los ovocitos. Para esto se usaron cinco soluciones diferentes: ND96, NFR, Barth, Barth con suero y Barth con Tris. Todos los grupos de ovocitos fueron seguidos durante 24, 48, 72 y 96 horas. Los valores de supervivencia con la solución ND96 fueron mayores (93%) que los obtenidos con las otras soluciones (Tabla 2) con un riesgo menor de contaminación. Inclusión de 0.6% de ovoalbumina (Sigma) en la solución de lavado para detener el efecto de la colagenasa mejoró la supervivencia a 95%. La acción de la albúmina puede estar relacionada con la propiedad de secuestrar moléculas hidrofóbicas, además de servir de blanco para las proteasas, lo que podría estar ejerciendo una acción protectora sobre los ovocitos.

| Tiempo de supervivencia | Tratamiento* |     |    |     |    |
|-------------------------|--------------|-----|----|-----|----|
|                         | 1            | 2   | 3  | 4   | 5  |
| 24 horas                | 96           | 100 | 96 | 100 | 98 |
| 48 horas                | 100          | 100 | 93 | 96  | 86 |
| 72 horas                | 72           | 53  | 51 | 64  | 80 |
| 96 horas                | 80           | 37  | 50 | 0   | 80 |

Tabla 2. Impacto del tratamiento enzimático en la supervivencia de ovocitos. (\*) Tratamiento como aparece en la sección extracción y cultivo de ovocitos.

#### INYECCIÓN Y REGISTRO DE OVOCITOS

El método de inyección inicialmente propuesto aseguraba la cuantificación del volumen a inyectar, pero la supervivencia de los ovocitos fue pobre. Esta baja eficiencia era resultado del daño mecánico generado por el giro de la micropipeta durante la inyección. El método alterno, escogido para evitar el daño mecánico a los ovocitos, fue inyectar el ARNm por presión. El sistema de inyección por presión consistió de una micropipeta de inyección hecha de capilares de borosilicato (Hilgenberg, Cat No. 14 080 13) conectada a una manguera de 50 cm de longitud y a una jeringa de 10 cm<sup>3</sup>. Con la micropipeta fija a un micromanipulador se inyectaron los ovocitos (Stühmer, comunicación personal). Con este método se inyectaron aproximadamente 100 nl de cRNA de los canales a expresar obteniéndose una supervivencia satisfactoria y buen porcentaje de expresión (9 de cada 10 ovocitos). Todos los grupos de ovocitos fueron registrados con el sistema electrofisiológico *Voltage clamp* con dos electrodos (Stühmer 1992).

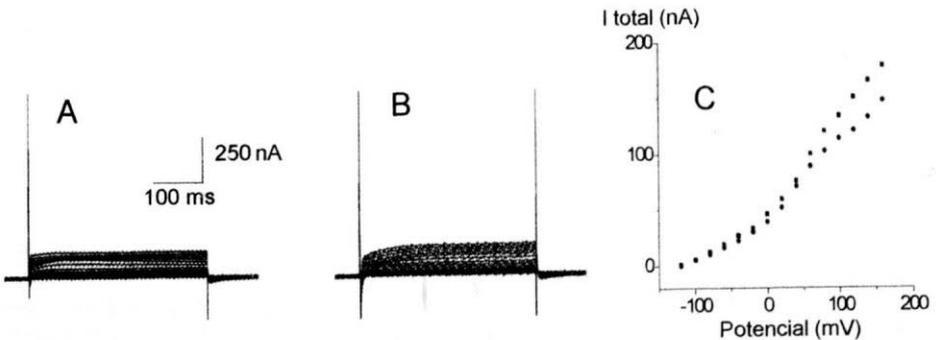


Figura 1. Impacto de la inyección en las corrientes basales de ovocitos de *X. laevis*. A. Registro de las corrientes de base de un ovocito no inyectado. B. Registro de las corrientes de base de un ovocito inyectado con agua. C. Curvas I-V de los registros mostrados en A (círculos) y en B (cuadros).

Inicialmente se midieron los potenciales de reposo de los ovocitos en modo de corriente. El potencial de reposo ( $V_m$ ), una medida de la permeabilidad de la membrana, fue de  $-27 \pm 3.9$  (n = 17) y  $-27.3 \pm 5.3$  mV (n = 13) para ovocitos no inyectados e inyectados con agua, respectivamente. El  $V_m$  no fue diferente entre estos dos grupos ( $p = 0.24$ ) y estos valores fueron similares a los reportados en la literatura. Estos resultados de  $V_m$  indican que la permeabilidad basal del ovocito no se altera por la inyección. Los ovocitos inyectados con cARN de *Kv1.1* tuvieron un  $V_m$  de  $-51.7 \pm 6.7$  mV (n = 9) y este

valor fue significativamente diferente del control de inyección ( $p = 0.0001$ ). Esta diferencia fue el resultado de la actividad del canal expresado y coincide con la evidencia encontrada por otros autores. Una vez medido el  $V_m$ , los demás registros se hicieron en el modo de voltaje. Las corrientes de los ovocitos no inyectados ( $255.0 \pm 53.4$  nA) no fueron significativamente diferentes ( $p = 0.24$ ) de los controles de inyección ( $216.2 \pm 71.0$  nA, Fig. 1), lo que indica que ni el proceso de inyección ni el volumen inyectado afectan las corrientes endógenas del ovocito. En contraste pulsos de voltaje despolarizantes generan corrientes de salida en ovocitos inyectados con ARNm de *Kv1.1* y *Shaker*. *Kv1.1* es un canal cuya amplitud de corriente aumenta con potenciales despolarizantes y su activación es voltaje dependiente (Figs. 2A y B).

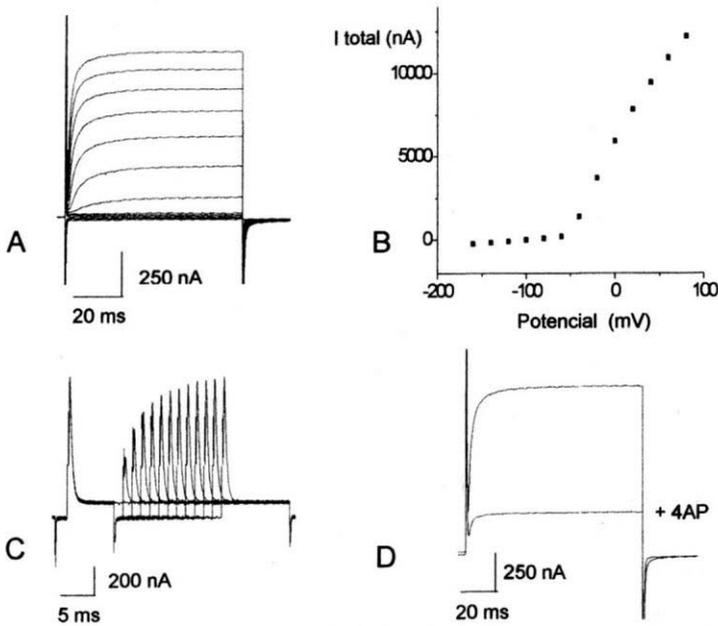


Figura 2. Expresión de canales *KV1.1* en ovocitos de *X. laevis*. A. Corrientes a las 48 horas de expresión de un ovocito inyectado con ARNm del canal de potasio *KV1.1*. Pulsos desde  $-100$  a  $150$  mV, (incremento  $20$  mV).  $V_h = -80$  mV. B. Curva I-V- para A, con ajuste y cálculo de conductancia. C. Experimentos de dos pulsos.  $V_h = -80$  mV. Los pulsos de prueba fueron de  $50$  mV y el tiempo interpulsos se incrementó en  $3$  ms para cada trazo. La amplitud de interpulso fue  $-120$  mV.  $f_s = 40$  kHz,  $f_c = 5$  kHz. D. Corrientes de un ovocito inyectado con ARNm de *KV1.1* antes y luego de la aplicación de  $5$  mM  $4$  aminopiridina en el baño.

Para verificar de manera cualitativa los canales expresados, se ensayó un protocolo de dos pulsos en donde un pulso despolarizante previo, genera una disminución en el tiempo de activación de la corriente. Este fenómeno se debe a que los canales como *Kv1.1* y *Shaker* presentan múltiples estados cerrados (no conductores), lo que tiene como consecuencia que, ante una despolarización, los estados cerrados deban ser superados previa apertura del canal. El retorno a un potencial hiperpolarizante genera

el cierre del canal y la secuencia de estados cerrados es recorrida en sentido contrario. Si un segundo pulso despolarizante es aplicado rápidamente, los canales estarán transitando entre los diferentes estados cerrados previos a la apertura del canal, el número de estados cerrados a pasar será menor, y se abrirán más rápido como se observa en la figura 2C. Para complementar estos hallazgos, este canal fue sometido a la acción de 4-amino piridina (4AP), un bloqueador de canales de potasio. Luego de un minuto de la adición de 5 mM 4AP, la corriente de potasio disminuye 85% (Fig. 2D) y con el lavado del inhibidor la corriente se recupera hasta un 50% del valor inicial (datos no incluidos). Por su parte, *Shaker* es un canal de potasio voltaje dependiente que se inactiva rápidamente. En la figura 3 se muestran los registros de corriente a diferentes potenciales. Como se puede observar, a medida que el potencial transmembrana es más despolarizado se incrementa tanto la velocidad de activación de la corriente como la magnitud de la misma (Fig. 3A). El incremento de la corriente es debido al incremento de la conductancia de la membrana (Fig. 3B) cuya curva IV se ajusta a una función de Boltzman modificada. Para estos registros la conductancia máxima fue  $793 \pm 22$  nS.

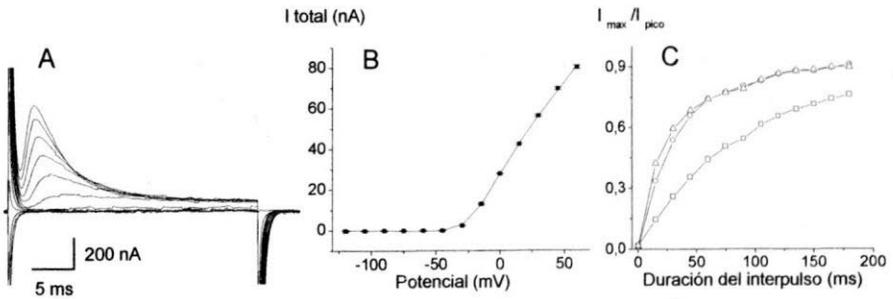


Figura 3. Expresión de canales *Shaker* en ovocitos de *X. laevis*. A. Corrientes a las 48 horas de expresión de un ovocito inyectado con cRNA del canal de potasio *Shaker*.  $V_h = -80$  mV. Pulsos desde  $-120$  a  $60$  mV (incremento  $15$  mV). Frecuencia de muestreo ( $f_s$ ) =  $50$  kHz. Frecuencia de filtrado ( $f_c$ ) =  $10$  kHz. B. Curva IV de las corrientes de ovocitos inyectados con ARNm de *Shaker*. La línea corresponde al ajuste  $V_h = -80$  mV. C. Curvas de recuperación de la actividad versus duración del interpulso. Experimentos de dos pulsos.  $V_h = -80$  mV. Los pulsos de prueba fueron de  $50$  mV y el tiempo inter-pulsos se incrementó en  $15$  ms para cada trazo. La amplitud de interpulso fue (□)  $-60$  mV, (○)  $-120$  mV y (△)  $-150$  mV.  $f_s = 10$  kHz,  $f_c = 2$  kHz.

Para verificar, de manera cualitativa, la calidad de los canales expresados, un protocolo de cambios de potencial (protocolo de pulsos) de dos pulsos fue utilizado. A partir de un potencial de mantenimiento ( $V_h$ ), típicamente a  $-80$  mV, se da un primer pulso de potencial a  $50$  mV, se retorna a un potencial hiperpolarizante (por debajo del potencial de reposo del ovocito) por un tiempo variable, y finalmente se da el segundo pulso de potencial a  $50$  mV. Este protocolo permite ensayar la recuperación

de la corriente una vez ocurrida la inactivación. En la figura 3C se muestran trece registros con inter pulsos de -120 mV y duración desde 0 a 180 ms (incremento 15 ms). Como se puede observar, a medida que aumenta el tiempo de duración del intervalo de tiempo, mayor es la recuperación de la actividad de los canales. El primer pulso tiene una duración de 80 ms que es 20 veces el tiempo medio de la inactivación ( $4.06 \pm 0.025$  ms, a 50 mV, dato obtenido por ajuste a una exponencial). Usando este criterio, se asume que la corriente esta completamente inactivada al final del pulso. Estos experimentos se repitieron para otras amplitudes del interpulso y se encontró que la actividad se recuperaba más rápidamente si el interpulso era más hiperpolarizado. Para un interpulso de -120 mV de amplitud, el tiempo medio de recuperación de la actividad fue  $34.74 \pm 1.45$  ms, mientras que para inter pulsos de -150 y 60 mV, los tiempos medios de recuperación fueron  $30.85 \pm 1.72$  ms y  $90.86 \pm 3.136$  ms, respectivamente (fig. 3D). Los resultados presentados muestran que los canales *Kv1.1* y *Shaker* fueron expresados satisfactoriamente en ovocitos de *Xenopus laevis* mostrando las propiedades funcionales típicas para estas moléculas. Para esto se requirió de modificaciones en los procedimientos para la extracción, cultivo y microinyección de ovocitos de *Xenopus laevis* en las condiciones de latitud y altitud de Bogotá. A la altura de Bogotá la presión de oxígeno es menor que a nivel del mar. En otros anfibios (Hou y Huang 1999), se ha reportado disminución en el consumo de oxígeno, ventilación pulmonar, frecuencia cardiaca, volumen corporal, número de eritrocitos y hematocrito al ser expuestos a hipoxia. Estos cambios pueden asociarse además a alteraciones en la espermatogénesis como ha sido descrito para *Bufo melanostictus* (Biswas *et al.*, 1985). En este estudio no se evaluaron estas variables pero sugerimos que alteraciones similares en ovocitos de *X. laevis* pueden explicar la baja calidad y las dificultades para mantener y registrar estas células. Sin embargo, nuestros resultados muestran que es posible aislar, cultivar y expresar canales iónicos en forma confiable en ovocitos de *X. laevis* a 2.650 m.s.n.m.

### AGRADECIMIENTOS

Colciencias, proyecto: 2228-05-10325, Programa de Ciencias Básicas. Banco de la República, proyecto: Estudios de la permeabilidad de la membrana del protozoario *Leishmania amazonensis*. Convenio Andrés Bello, apoyo recibido por Carlos Villalba. Lewis A. Tyler Trustees' Fund Award, LASPAU: Academic and Professional Programs for the Americas, Cambridge, MA, USA, apoyo logrado por Francisco Martínez-Wittinghan. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Laboratorio de Biofísica, Centro Internacional de Física

### BIBLIOGRAFÍA

- BISWAS H. M., BORAL M. C., GHOSH A. K. 1985. Effect of Hypobaric Hypoxia on Spermatogenesis, Leyding Cells and Delta 5-3 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in Toad. *Indian J. Physiol Pharmacol* 29 (3): 139-145.
- GOLDIN, A. 1992. Maintenance of *Xenopus laevis* and Oocyte Injection. En B. Rudy & L. Iverson (eds.), *Methods in Enzimology*, 207: 266-279. Academic Press.

- GURDON J., LANE C., WOODLAND H. 1971. Use of Frog Eggs and Oocytes for the Study of Messenger RNA and its Translation in Living Cells. *Nature* 233: 177-182.
- HOU P. C., HUANG S. P. 1999. Metabolic and Ventilatory Responses to Hypoxia in Two Altitudinal Populations of Toad, *Bufo Bankorensis*. *Comp Biochem Physiol A Integr Physiol* 124 (4): 413-421.
- LEONARD J., NARGEOT J., SNUTCH N., LESTER H. 1987. Ca Channels Induced in *Xenopus Laevis* Oocytes by Rat Brain mRNA. *J. Neurosci.* 7(3): 875-881.
- PÉRIER F., COULTER K., RADEKE C., VANDENBERG C. 1992. Expression of an Inwardly Rectifying Potassium Channel in *Xenopus* Oocytes. *J. Neurochem.* 59(5): 1971-1974.
- SOREQ H., SEIDMAN S. 1992. *Xenopus* Oocyte Microinjection: From Gene to Protein. En B. Rudy & L. Iverson (eds.), *Methods in Enzimology*, 207: 225-265. Academic Press.
- STÜHMER, W. 1992. Electrophysiological Recording From *Xenopus* Oocytes. En B. Rudy & L. Iverson (eds.), *Methods in Enzimology*, 207: 319-339. Academic Press.
- SUMIKAWA K., PARKER I., AMANO T., MILEDI R. 1984. Separate Fractions of mRNA From *Torpedo* Electric Organ Induce Chloride Channels and Acetylcholine Receptors in *Xenopus* Oocytes. *EMBO J.* 3 (10): 2 291-2294.