



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE VENENO DE
ARAÑA SOBRE UN CANAL IÓNICO DE POTASIO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARÍA DEL ROCÍO GARCÍA MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente Prof. José de Jesús García Valdés
Vocal Prof. Martha Leticia Jiménez Pardo
Secretario Prof. Francisco Javier Plasencia de la Parra
1^{er} Suplente Prof. José Eleazar Martínez Barajas
2^o Suplente Prof. Oscar Armando Pérez Méndez

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Facultad de Química, UNAM

José de Jesús García Valdés

María del Rocío García Martínez

Dedicatoria

Este trabajo es dedicado a mi **mamá**, Marcelina, por brindarme su apoyo incondicional en los momentos más importantes de mi vida.

A Saúl:

Por darme su apoyo incondicional durante todo este tiempo, por su paciencia, cariño, y sobre todo por nunca perder la confianza en mí. Muchas gracias por estar a mi lado y enseñarme que día a día hay que esforzarse y ser mejor.

A mis hermanos Noé y David:

Por apoyarme en los momentos más difíciles.

A mis amigos:

En especial a Angélica por darme su gran apoyo hasta el último momento y a Elisa por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José de Jesús García Valdés.
Por darme la oportunidad de trabajar con él.

Al Dr. Possani Posta y a la M. en C. Herlinda Clement.
Por proporcionar las fracciones de veneno.

A la Dr. Sobeida Sánchez, Dr. Abraham Landa, Dr. Luis Vaca.
Por permitirme hacer uso de los equipos.

A la M. en C. Roxana Noriega Navarro y a la M en C. Karla Juárez.
Por su dedicación y tiempo durante mi estancia en el laboratorio.

Índice general

Índice	I
Índice de abreviaturas	IV
Índice de figuras	VII
Resumen	VIII
1. Introducción	1
1.1. Generalidades de los canales iónicos.	1
1.2. Estructura molecular de los canales iónicos.	4
1.3. Canales iónicos de potasio.	5
1.4. Canales iónicos dependientes de voltaje.	7
1.5. Canal de potasio TASK-3	9
1.6. Generalidades de la araña.	13
1.7. Venenos de araña.	17
1.8. Expresión de TASK-3 de rata en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	19
1.9. Fijación de voltaje por dos electrodos: TEVC.	21
Objetivos	23

2. Material y Métodos.	24
2.1. Transcripción in vitro.	24
2.2. Extracción de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	27
2.3. Inyección de RNA.	28
2.4. Estudio electrofisiológico del canal TASK-3 de rata.	28
2.5. Expresión heteróloga del RNAm y caracterización del canal. . . .	30
2.6. Efecto del veneno de tarántula <i>A. serratum</i> en el canal de potasio TASK-3.	31
3. Resultados	34
3.1. Transcripción in vitro	34
3.2. Expresión heteróloga del canal iónico TASK-3 de rata en ovocitos.	35
3.3. Efecto del veneno de tarántula sobre el canal de potasio TASK-3 .	37
4. Discusión de Resultados.	40
4.1. Expresión y Caracterización de TASK-3.	41
4.2. Efecto del veneno de la tarántula <i>A. serratum</i> sobre el canal TASK- 3.	42
5. Conclusiones	43
Bibliografía	44

Índice de abreviaturas

aa	aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
°C	grados centígrados
CIK	Canales Iónicos de Potasio
DSS	Dodecil Sulfato de Sodio
g	gramos
h	hora
HEPES	Ácido 4-(2- hidroxietil)-1-piperazinetanesulfónico
HPLC-RP	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
I	Corriente
K ⁺	Ión potasio
Kb	Kilobase
KCl	Cloruro de potasio
M	molar
mg	miligramo
min	minuto
mL	mililitro
mm	milimetro
mM	milimolar
ms	milisegundo
mV	milivolts
MΩ	mega ohms

μA	microamperios
μg	microgramo
μL	microlitro
nA	nanoamperios
ng	nanogramos
nL	nanolitros
nm	nanometros
nts	nucleótidos
pb	pares de bases
pH_e	pH extracelular
RNA _m	Ácido desoxirribonucleico mensajero
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
t	tiempo
TEVC	Two Electrode Voltage Clamp
TM	Transmembranal
v	volumen

Índice de figuras

1.1. Estado abierto y cerrado de un canal iónico.	2
1.2. Estructura de un canal iónico	5
1.3. Estructura de un canal de potasio	7
1.4. Subunidades α y β	8
1.5. Tipos de inactivación	9
1.6. Secuencia nucleotídica y secuencia primaria del canal TASK-3 (KCNK9) de rata	11
1.7. Anatomía de la tarántula	16
1.8. Estructura de una poliamina.	17
1.9. Estructura de toxinas polipeptídicas.	18
1.10. Rana y ovocitos de la especie <i>X. laevis</i>	20
1.11. TEVC	22
2.1. Extracción de ovocitos de <i>X. laevis</i>	28
2.2. Equipo utilizado en la inyección de RNAm de TASK-3 en ovoci- tos de <i>X. laevis</i>	29
2.3. Equipo empleado	29
2.4. Protocolo empleado en la caracterización de TASK-3 de rata en ovocitos	31
2.5. HPLC	33
3.1. Productos de la reacción de transcripción in vitro.	35

3.2. Expresión del RNAm de TASK-3	36
3.3. Efecto del veneno	39

Resumen

El canal iónico TASK-3 pertenece a una nueva familia de canales de potasio con cuatro segmentos transmembranales y dos segmentos formadores del poro (4TM/2P), el cual se encuentra en diferentes tejidos, principalmente en cerebro. Este canal se ha encontrado sobreexpresado en células cancerígenas y está involucrado con la muerte celular programada (apoptosis). Hasta la fecha no se ha encontrado ningún bloqueador o activador específico para este tipo de canales. En el presente proyecto se trabajó con el canal iónico de potasio TASK-3 de rata, utilizando el veneno *Aphonopelma serratum* tarántula, originaria de Tepoztlán, Estado de Morelos. De ésta especie no se encontró ningún reporte sobre la actividad de su veneno en canales iónicos de potasio, por esta razón se pretende trabajar con esta especie.

A partir de DNA complementario se llevó a cabo la reacción de transcripción del canal iónico de potasio TASK-3 de rata, después de verificar la integridad del RNAm obtenido, se realizó la expresión en ovocitos de *Xenopus laevis* utilizando la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos (TEVC). Se llevó a cabo la caracterización electrofisiológica de TASK-3 obteniendo registros de corrientes de ovocitos control, ovocitos inyectados con agua y ovocitos inyectados con el canal de potasio con el fin de determinar si el canal iónico se expresaba de manera funcional en la membrana de los ovocitos. Una vez que se determinó la funcionalidad del canal de potasio TASK-3 en los ovocitos, se probaron 6 fracciones de veneno de *Aphonopelma serratum*.

Se observó que la actividad del canal TASK-3 disminuía ligeramente con el tiempo, característica mostrada por cierto tipo de canales iónicos de Na⁺, K⁺, Cl⁻ y receptores de GABA provocando inestabilidad de corriente.

Con las fracciones de veneno utilizadas en el presente trabajo, no se encontró ninguna actividad (bloqueadora o activadora) sobre el canal de potasio TASK-3 de rata, sin embargo, este trabajo servirá para futuras investigaciones del canal de potasio TASK-3, utilizando venenos de animales ponzoñosos que no se han estudiado a la fecha.

Capítulo 1

Introducción

1.1. Generalidades de los canales iónicos.

Hay cuatro familias de canales agrupados de acuerdo a la selectividad iónica que presentan: Na^+ , K^+ , Ca^+ y Cl^- . De ellos, el poro del canal de K^+ es del que se tienen más detalles [11, 12]. Los canales iónicos son proteínas cuya estructura consiste de un poro acuoso transmembranal formado y rodeado por diferentes segmentos de subunidades transmembranales del canal [11]. Los canales son poros acuosos estrechos bien definidos, para funcionar adecuadamente deben de convertirse en excelentes agentes químicos: a) Para percibir diferentes señales biológicas en el ambiente y responder rápidamente cambiando de estado cerrado al abierto y viceversa. b) En la adaptación del estado abierto conductor para discriminar entre diferentes iones inorgánicos con el fin de conducir al ión correcto [31] (figura 1.1).

Los canales iónicos controlan el flujo de los iones, manteniendo abierto o cerrado el conducto, mediante cambios de conformación. Los iones atraviesan la membrana plasmática mediante difusión a través del poro; el cual contiene un filtro de selectividad por tamaño y carga de los iones [11, 46]. La conformación de la proteína del canal alterna dinámicamente entre dos estados generales: abierto y

cerrado. Esto, a través de un proceso conocido como apertura o “gating” en inglés, mecanismo por el cual el poro del canal se abre y cierra mediante el movimiento de compuertas [11, 12]. Según el tipo de factores que los activan, se distinguen tres clases de canales iónicos:

1) **Los canales iónicos dependientes de voltaje**, dependen de las diferencias de potencial generadas en la membrana. Poseen un sensor de voltaje de modo que el conducto se abre o se cierra en respuesta a cambios en el potencial de membrana, característico para cada canal en particular. Existen canales dependientes de voltaje para Ca^{2+} , Na^+ y Cl^- .

2) **Los canales iónicos dependientes de ligando**, requieren la unión de neurotransmisores y hormonas para su apertura y cierre.

3) **Los canales iónicos regulados por proteínas G**, operan de tres formas: inhiben a proteínas efectoras, regulan el canal a través de segundos mensajeros o proteínas cinasas, y por la asociación física directa entre las subunidades de la proteína G y el canal iónico [11].

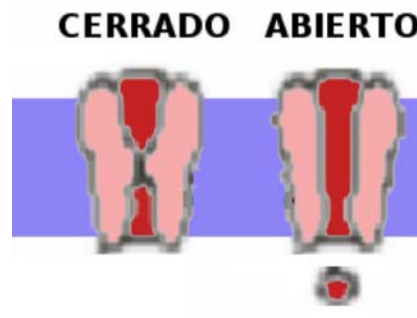


Figura 1.1: Estado abierto y cerrado de un canal iónico. Estado abierto: conducción de iones. Estado cerrado: no conducción de iones. (figura modificada: www.uam.es/docencia_red/qo/17/recon.html)

El ensamblaje de los canales iónicos es el proceso mediante el cual las subunidades constituyentes del canal se pliegan y acoplan para dar lugar a un canal iónico funcional. Se ha propuesto que el mecanismo general de plegamiento consiste en transportar el RNAm hacia la membrana del retículo endoplásmico (RE), lugar donde inicia el ensamblaje. Tales eventos son co-traduccionales e incluyen la inserción de las subunidades del canal en la membrana, así como una serie de procesos post-traduccionales como la adición de una secuencia de hidrólisis o glicosilaciones. Debido que los eventos de ensamblaje de los canales iónicos son co-traduccionales, inician desde el amino hacia el carboxilo terminal estableciendo un patrón de ensamblaje, en donde los distintos dominios proteicos interactúan entre sí formando enlaces disulfuro [16].

Las proteínas de los canales iónicos tienen gran relevancia fisiológica por su selectividad, es decir, su capacidad de permitir el paso de algunos iones. Regulan una amplia gama de funciones biológicas como la señalización neuronal, la excitabilidad cardíaca y las respuestas del sistema inmune [15]. Estas proteínas modulan la excitabilidad eléctrica regulando el paso de iones a través de la membrana lipídica de una manera altamente regulable. Se ha reportado que, en general, el flujo de iones a través de los canales son positivos a favor de un gradiente de potencial electroquímico correspondiente de manera rápida (de aproximadamente 1×10^6 a 1×10^9 iones por segundo) y eficiente (error 0.1. %) [8, 32]. Sin embargo, se sabe que existen fenómenos de saturación, competición e inhibición específica [19].

Los iones que se transportan deben deshacerse de la mayoría o de todas las moléculas de agua asociadas para pasar, dependiendo fundamentalmente del diámetro del conducto y de la naturaleza de los grupos químicos que forman la zona más estrecha del canal, lo que se conoce como filtro de selectividad, limitando su velocidad de paso [1]. El flujo de la corriente iónica a través de las membranas celulares

está determinada por tres factores: el potencial de membrana, la composición electrolítica de los fluidos tanto extra e intracelulares y el tipo de canales iónicos que se encuentren en las células. La diferencia es la composición electrolítica entre los fluidos intra y extracelulares que determina la fuerza electroquímica impuesta a un ion particular por el potencial de reposo. Las proteínas de los canales iónicos responden a cambios en el potencial de membrana o en la concentración de alguna molécula, y alteran su configuración tridimensional de un estado no conductor a un estado conformacional que permite el paso de la corriente iónica [15].

1.2. Estructura molecular de los canales iónicos.

Desde el punto de vista molecular los canales iónicos son sistemas complejos formados por la asociación de varias proteínas llamadas subunidades α . Las distintas propiedades biofísicas de los canales están determinadas fundamentalmente por el tipo de subunidad α contenida en el complejo del canal (figura 1.2). La estructura molecular de las distintas subunidades consiste de seis segmentos hidrofóbicos (1TM-6TM) embebidos en la membrana plasmática con los dominios amino y carboxilo terminal de la proteína posicionados intracelularmente. El segmento transmembranal (4TM) contiene un arreglo muy particular de cargas positivas que funcionan como sensor de voltaje. La región que conecta 5TM y 6TM posee el dominio que conforma el poro del canal. La mayoría de los canales de K^+ funcionales se forman cuando cuatro subunidades α se agregan para producir una estructura hetero u homotetramérica (figura 1.2). Sin embargo, existe evidencia de algunos canales de K^+ conocidos como rectificadores entrantes poseen solamente dos segmentos (1TM, 2TM), similares a 5TM y 6TM de las subunidades α descritas previamente.

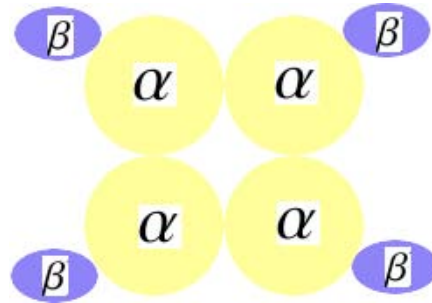


Figura 1.2: **Estructura de un canal iónico.** Los canales de K^+ sensibles al voltaje se ensamblan a partir de proteínas integrales de la membrana (α) y citosólicas (β). Un canal funcional de K^+ se forma por cuatro subunidades α agrupadas alrededor de un poro central.

1.3. Canales iónicos de potasio.

Los canales iónicos de potasio (CIK) se encuentran ampliamente distribuidos en los reinos: animal, vegetal, protista y procariota [21]. La apertura de esos canales permite el control y movimiento rápido de los iones K^+ a través de la membrana celular. Este mecanismo está relacionado con una gran variedad de procesos biológicos como: el establecimiento del potencial de reposo, la generación de potenciales de acción, la señalización eléctrica y decodificación en neuronas; el mantenimiento de actividad en músculo, cerebro, corazón y el sistema nervioso, regulación del volumen celular y turgencial, liberación de hormonas y neurotransmisores, crecimiento; en levaduras regulan gemación, transporte y almacenamiento de nutrientes; en las plantas la regulación, apertura de los estomas, movimiento de las hojas y germinación entre otras [12, 21, 27, 32, 42, 46].

La actividad de los CIK esta regulada por el estado metabólico de la célula, por hormonas, neurotransmisores y por cambios en el potencial de membrana [11, 21]. Se sabe que las mutaciones y disfunciones en los CIK están relacionadas con ciertas patologías comúnmente conocidas como canalopatías, entre las que destacan

enfermedades neurológicas como Parkinson, Alzheimer, epilepsia, cáncer, invasión tumoral y metástasis, disfunciones neuromusculares, parálisis muscular, ataxias, sordera arritmias cardíacas e infartos al miocardio [8, 21, 25, 32].

Los CIK son canales de poro largo multi-iónicos ya que albergan hasta cuatro iones en una sola fila y esto facilita su disociación de los sitios de unión mediante repulsiones electrostáticas [12, 21]. Los CIK son capaces de discriminar perfectamente entre los iones K^+ (1.33 Å) y Na^+ (0.95Å) basándose en su tamaño. El poro de los CIK se bloquea con iones tetraetilamonio y algunas neurotoxinas. Al parecer existe una conservación estructural entre los CIK presentes en eucariotes y procariotes, ya que se ha demostrado que tienen esencialmente la misma constitución del poro [11, 12, 21, 28]. Los CIK contienen secuencias críticas de aminoácidos ya que mutaciones en estos residuos eliminan la capacidad del canal para discriminar entre los iones K^+ y Na^+ [11, 12, 28].

Los CIK se clasifican de acuerdo a la topología de segmentos transmembranales (TM) que presenta la subunidad α formadora del poro. Se agrupan en cuatro principales clases de estructuras 2TM, 4TM, 6TM u 8TM regiones transmembranales (TM) y 1 ó 2 dominios conservados formadores del poro (P), esenciales para permitir la selectividad al ión K^+ [6, 23]. Se han identificado canales de potasio con cuatro dominios transmembranales y dos dominios formadores del poro (4TM/2P) (figura 1.3), por lo que las subunidades α dimerizan para formar el poro selectivo a iones K^+ [6, 39].

Los canales de K^+ (4TM/2P) se encuentran ampliamente distribuidos en varios tejidos. Hasta la fecha existen dieciséis miembros de la familia (TRAAK, TREK-1, TREK-2; TALK-1, TALK-2, TASK-2; KCNK7, TWIK-1, TWIK-2; TRESK-1, TRESK-2, THIK-1, THIK-2; TASK-1, TASK-3, TASK-5) conocida como KCNK [20]. El primer miembro de la familia que se caracterizó se conoce como TWIK-

1 (KCNK 1) por sus siglas en inglés (Tandem of Two Pore domains in a weak inward rectifying K^+ channel), siendo un canal de K^+ rectificador entrante débil [26]. Estos canales de potasio muestran una compleja regulación por estímulos físicos y químicos, incluyendo tensión membranal, sensibilidad al oxígeno (hipoxia), cambios en la osmolaridad, pH extra o intracelular. Algunos de ellos pueden ser modulados intracelularmente por segundos mensajeros, ácidos grasos y/o neurotransmisores.

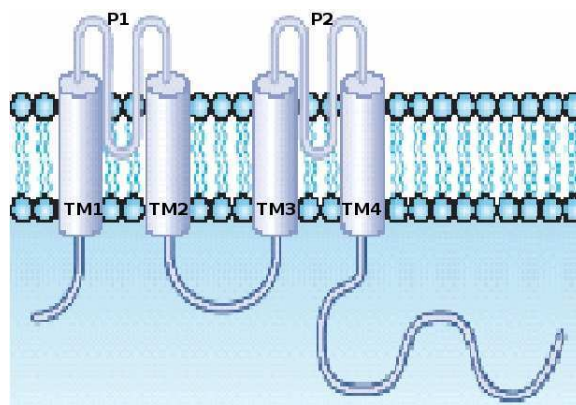


Figura 1.3: Estructura de un canal de potasio con cuatro segmentos transmembranales y dos dominios formadores del poro (4TM/2P) (figura modificada de: Swartz, 2004)

1.4. Canales iónicos dependientes de voltaje.

La super familia de canales iónicos dependientes de voltaje está compuesta por un gran conjunto de proteínas que son activadas por los cambios en el potencial de membrana, este cambio es monitoreado por algunos residuos de aminoácidos localizados en un motivo protéico sensible al voltaje [46]. Estas proteínas exhiben selectividad diferente para aniones y cationes mono y divalentes, por lo que son comúnmente divididos en: Na^+ , K^+ y Ca^{2+} [25, 46]. El papel fisiológico más

importante de los canales iónicos dependientes de voltaje es la generación, determinación y transducción de señales eléctricas en las células.

Al activarse los canales iónicos dependientes de voltaje, exhiben un cambio conformacional, que se refleja como la permeabilidad selectiva de iones a través del poro. A partir de este estado de apertura, algunos canales iónicos dependientes de voltaje pueden ser inactivados por un cambio conformacional, estableciéndose un estado de no conducción o pueden ser desactivados regresando a su estado cerrado. De todas estas proteínas, los canales de potasio son los más abundantes y el grupo más diverso [32].

Canales de potasio dependientes de voltaje (Kv).

Estos canales se activan durante la despolarización celular y, por su distinta cinética de activación-inactivación, participan en las diferentes fases de la repolarización del potencial de acción celular, modulando la frecuencia y morfología del mismo. Los canales funcionales resultan del ensamblaje entre 4 subunidades α y 4 β , formando homo o heterotetrámeros (figura 1.4).

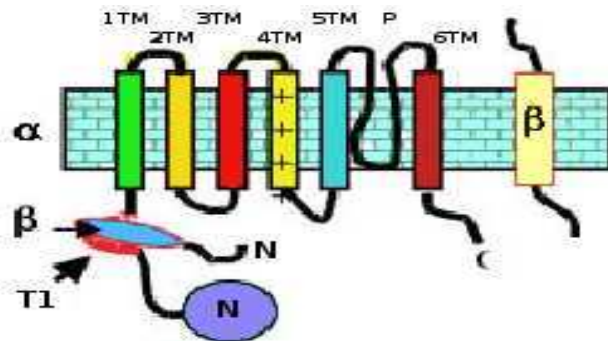


Figura 1.4: Representación clásica de las subunidades α y β de un canal voltaje dependiente de K^+ . La subunidad α consta de 6 segmentos transmembrana (1TM-6TM) y en su extremo N-terminal presenta la zona de tetramerización (T1). Las subunidades β se disponen bien a nivel citoplasmático o en forma de un segmento transmembranal.

La activación de los canales de Kv está mediada por cambios en el potencial de membrana (E_m) los cuales son monitoreados por sensores (el segmento 4TM y algunos aminoácidos del 2TM) que originan un cambio conformacional del canal y que permite la permeabilidad de los iones potasio [21]. La inactivación de estos canales está mediada por la despolarización de la membrana, que se puede dar a través de dos mecanismos conocidos como de tipo N y C (figura 1.5). El primero, involucra que el amino terminal de una subunidad del canal ocluya la región citoplasmática del poro ocasionando la inactivación de éste. La inactivación de tipo C se da en ausencia del amino terminal de las subunidades y a diferencia del mecanismo anterior, éste afecta la región externa del poro del canal [21].

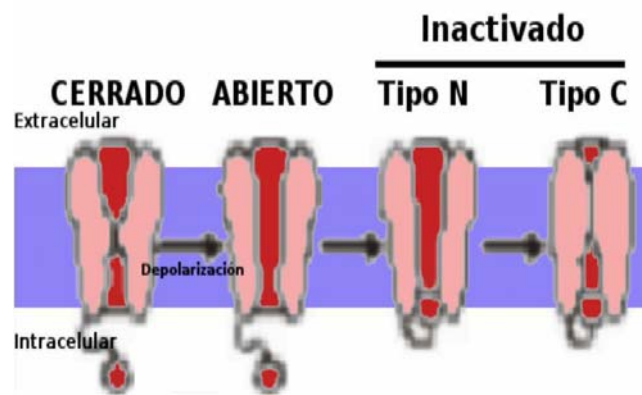


Figura 1.5: Esquema general de los tipos de inactivación N y C (tomado y modificado de Terlau y Stühmer, 1998)

1.5. Canal de potasio TASK-3

De la familia de canales de potasio 4TM/2P, tres especies han sido clasificadas como ácido-sensibles, debido a que exhiben alta dependencia al pH extracelular (pH_e) cerca del intervalo fisiológico: TASK-1, TASK-3, TASK-5 [13, 23, 39]. El

canal TASK-3 de rata es un polipéptido de 1185 pares de bases que codifican a 395 aminoácidos (Figura 1.6). El canal presenta 54 % de identidad con el canal TASK-1. Este canal se expresa en varios tejidos: riñón, hígado, pulmón, colon, estómago, bazo, testículos, músculo esquelético y en el sistema nervioso central [23, 6, 45]. TASK-3 es un canal basal selectivo a iones de K^+ , rectificador saliente, activo en el intervalo fisiológico de potenciales de membrana, contribuyendo a fijar el potencial de reposo de las células que los expresan [39, 6].

Debido a la gran identidad que existen entre TASK-1 y TASK-3, estos canales tienen características y comportamientos similares. Cuando sus RNAm son expresados, en la misma célula se forma el heterotetrámero [9], el cual se ha observado en células del granulo cerebral y neurosecretoras magnocelular del núcleo supraóptico aproximadamente en la misma cantidad, lo que podría regular la excitabilidad celular en respuesta a neurotransmisores y durante el crecimiento celular, cuando los niveles de expresión del canal cambian [48, 18, 4].

Una propiedad funcional importante de TASK-3 es su alta sensibilidad a los cambios en el pH externo (pH_e) [13, 23, 39, 30]. Esta sensibilidad al pH_e sugiere que TASK-3 podría regular la excitabilidad de neuronas durante el incremento de la actividad cuando el espacio extracelular llega a ser más ácido. Se ha reportado que durante la exocitosis, para interrumpir la actividad sináptica se requiere una acidificación mínima de 0.06 unidades de pH [36], se sugiere que los canales TASK podrían estar presentes en el nervio terminal, detectando estos cambios en el pH_e y alterando la eficiencia pre-sináptica, así como respuestas pos-sinápticas.

Los canales TASK-3 de rata son blancos de neurotransmisores que se unen a receptores de proteínas G del subtipo $\alpha q/11$ (Gq/11). En ciertas neuronas, el canal TASK-3 es inhibido por neurotransmisores y hormonas peptídicas como serotonina, norepinefrina, hormona liberadora de tirotrópina y angiotensina II por activa-

```

cgtagtagcggaggcttagtcgcgcccggcgtgcactgggattctcgcggcttggttcatctccccttggcatctccttcttggcgcc
ATGAAGCGGCAGAACGTGCGTACCTGTCTTGATCGCCTGTACCTTCACCTACCTGCTGGTGGGTGCCGGTGTTCGACGCCCTCGAG
M K R Q N V R T L S L I A C T F T Y L L V G A A V F D A L E 30
TCGGACCATGAGATGCGCGAGGAGGAGAACTTAAAGCAGAAGAGGTCCGCCTCAGAGGCAAGTACAACATCAGCTCCGATGACTACCAG
S D H E M R E E E K L K A E E V R L R G K Y N I S S D D Y Q 60
CAGCTGGAGCTGGTAATCCTGAGCTCTGAGCCCCACCGCGTGGTGTCCAGTGGAAAGTTCGCCGGTCCCTTCTACTTCGCTATCACTGTC
Q L E L V I L Q S E P H R A G V Q W K F A G S F Y F A I T V 90
ATCACAACTATCGGATATGGACATGCTGCACCTGGAAACCGATGCTGGCAAGGCCCTTCTGTATGTTCTATGCTGTGCTGGGTATCCCTCTG
I T T I G Y G H A A P G T D A G K A F C M F Y A V L G I P L 120
ACGCTGGTTATGTTCCAGAGCCTGGGCGAGCGCATGAACACCTTCGTGCGTACCTGCTGAAACGGATCAAGAAGTGTGTGGCATGCGC
T L V M F Q S L G E R M N T F V R Y L L K R I K K C C G M R 150
AACACTGAAGTTTCTATGGAGAACATGGTGACCGTCGGCTTCTTTTCTTGATGGCCTCGTGCCTTGGGCGGCTGCCTTTTCCAGTGC
N T E V S M E N M V T V G F F S C M G L V P W A A A F S Q C 180
GAAGATGGAGCTTCTCCACGCTTACTACTACTGCTTCATTACACTGACTACTATAGGGTTCGGCGACTTTGTGGCCCTGCAATCCAAG
E D W S F F H A Y Y Y C F I T L T T I G F G D F V A L Q S K 210
GGTCCCTGCAGAGGAAGCCATTCTACGTGGCCTTCAGCTTCATGTATATCCTGGTGGCCTGACCGTCATCGGTGCCTTCTCAATCTT
G A L Q R K P F Y V A F S F M Y I L V G L T V I G A F L N L 240
GTGGTCTGCGATTCCCTGACCATGAATACCGATGAAGATCTTCTGGAGGGAGAAGTTGCCGAGATACTTGCTGGAAACCCAAAGACGGGTG
V V L R F L T M N T D E D L L E G E V A Q I L A G N P R R V 270
GTTGTCCGTGTGCCCTCAGAGTCGCAAGAGGCACCACCCCATGTACTTCTCAGGAAATACGGCCGAACCTGTGTATCTCTGCTTCCCT
V V R V P Q S R K R H H P M Y F L R K Y G R T L C Y L C F P 300
GGTGCCAACTGGGGTGATGATGATGACGATGATGATGACGCGTCGAGAATGTCGTAGTTACTACTCTGTCTCTCTGCTGTTGCTGCT
G A N W G D D D D D D D A V E N V V V T T P V P P A V A A 330
GCTGCTGCTGCTACTCCCTGGTCCCAGTACCAGGAATGTCCGGGTACAGTCCACTCGGTTTCTGCAAGGTTGAAGAGATCCCTCCG
A A A A A T P G P S T R N V R A T V H S V S C R V E E I P P 360
GACGTGCTGAGGAACACCTACTTCCGGTCCCCATTCGGCGCCATCCCTCCTGGAATGCACACCTGCGGGGAAAACACAGGCTGCACATC
D V L R N T Y F R S P F G A I P P G M H T C G E N H R L H I 390
CGTCGCAAGTCCATCTAAGTGTGGGGAGGGAAGTACACGGAAGAATCATTGTCATGCAGATGTAAGTTTCATTGTCCCAACTCTCTCT
R R K S I * 395
ccctcctatttattattattctcttttttggcttacagtcacatcattcctttctctctcctcctcctcctgggttcatttcttt
ccgacctttccagccagycagagctgtccaaagggcaaatagaggcccatcctctctgaaagctcgcacctgagcatgaagcatggattcc
ttcctttctccccaccagagttatgccttacatttctccccaccctgcctcctctctctgggttgcttcttaggacaggtgtgagaac

```

Figura 1.6: Secuencia nucleotídica y secuencia primaria del canal TASK-3 (KCNK9) de rata. Cuatro segmentos transmembranales (subrayados) y dos dominios P (encerrados en un rectángulo). Posibles sitios consenso de N-glicosilación (encerrado en un cuadro), fosforilación por proteína cinasa A (subrayado con una línea gruesa) y proteína cinasa C (subrayado con doble línea)(figura tomada de Kim 2000)

ción de receptores acoplados a Gq/11 [22, 10, 45, 7]. TASK-3 también es bloqueado por bario (57 %, 3mM), Zn^{2+} (70 %, 100 μ M), rojo de rutenio (70 %, 10 μ M), bupicaína (50 %, 100 μ M), lidocaína (62 %, 1mM), didocaína (62 %, 1mM), quini-na (40 %, 100 μ M), quinidina (37 %, 100 μ M), y por el alfaxolono (49 %, 100 μ M) [23, 30, 37]. Es importante mencionar que el rojo de rutenio no causa ningún efecto sobre las corrientes de TASK-1 o del heterotetrámero TASK-1/3, haciendo de este bloqueador una herramienta útil para diferenciar a TASK-3 de esos canales. Sin embargo, todos ellos son bloqueadores inespecíficos de TASK-3, ya que llegan a inhibir a otros canales, siendo inadecuados para el estudio de este canal en sistemas vivos [10, 24].

El único activador de TASK-3 reportado es el anestésico halotano (65 %, 1mM), probablemente contribuye a la hiperpolarización inducida por el mismo, así como a su inmovilización y efectos sedativos, observada en neuronas. Un estudio de la relación estructura-función de TASK-3 indicó que una región corta del citoplasma es crítica para la activación por anestésico. Por otra parte, TASK-3 interacciona con 14-3-3, proteínas expresadas abundantemente y relacionadas con varios procesos celulares como la división celular, apoptosis, traducción de señales, síntesis y liberación de neurotransmisores, receptores y función de canales iónicos, expresión de genes, entre otros [39]. Así mismo, regula la excitabilidad de la célula y cambia el restablecimiento en la conductancia del K^+ cuando es necesario [35].

La apoptosis o muerte celular programada está asociada con un flujo excesivo y reducido en la concentración intracelular de K^+ en algunos tipos de células [5, 51]. La sobre expresión de TASK-3 en neuronas del hipocampo induce apoptosis, proporcionando evidencias de que el flujo de K^+ se lleva a cabo por medio de canales TASK. Interesantemente, TASK-3 es sobreexpresado en cáncer de mama, pulmón, colon y próstata metastásica [33, 37]. Se encontró que la sobreexpresión de TASK-3 en líneas celulares promueve la formación de tumores y confiere resistencia a

hipoxia y privación de suero [33]. La mutante no funcional (G95E) elimina la actividad del canal TASK-3 cuando son expresados juntos, inhibiendo además su propiedad oncogénica. Incrementando el restablecimiento de la conductancia de K^+ en puntos críticos durante el crecimiento celular, el canal TASK-3 puede ser oncogénico o podría potenciar las actividades de otras sustancias oncogénicas. Inhibidores de TASK-3 pueden prevenir la asociación de TASK-3 como potencial oncógeno en estos tejidos [24].

1.6. Generalidades de la araña.

Las arañas forman parte un grupo (científicamente llamado *Phylum*) de animales conocidos como artrópodos. Hay aproximadamente un millón de especies identificadas de artrópodos, lo que representa más o menos el 85 % de todos los organismos vivientes conocidos. Los artrópodos carecen de esqueleto interno como el que tienen los mamíferos, los peces, reptiles o las aves, en su lugar tienen una estructura rígida externa (exoesqueleto o dermatoesqueleto) formada por estratos de hidratos de carbono y proteínas, principalmente por un compuesto químico llamado quitina. Los artrópodos viven prácticamente en cualquier hábitat y muchos pueden adaptarse a condiciones tan adversas que se cree que serán los últimos sobrevivientes de la Tierra. La palabra artrópodos significa patas articuladas, se aplica en animales como insectos, ciempiés, cangrejos, escorpiones, garrapatas y arañas [49].

Del grupo de los artrópodos los más numerosos son los arácnidos. Se conocen alrededor de 35000 especies de arañas y sólo 30 de éstas tienen un veneno potente para el ser humano [29]. En México, dentro de las especies que pueden ser mortales para el hombre se encuentra la popular viuda negra (*Latrodectus mactans*), que se distingue por sus manchas rojas en el vientre. Otra es la violinista (*Loxosceles*) que causa con su mordedura una úlcera muy grave. Las arañas no tienen

una cabeza sino seis pares de apéndices insertados en su parte delantera, llamada cefalotórax. Tienen seis u ocho glándulas secretoras de seda, situadas en la base del abdomen, de donde extraen con sus patas la seda líquida. Ésta se endurece rápidamente y se transforma en hilos muy resistentes, tanto que llegan a ser 500 veces más resistentes que uno de acero del mismo calibre. La seda de las arañas suele ser utilizada tanto para tejer redes como para cubrir a sus crías. Algunas arañas cavan hoyos en la tierra, otras viven en el suelo o dentro de un tronco o bien dentro de una flor[50].

Las tarántulas pertenecen al grupo de las *Orthognathas*, alcanzan hasta los 25cm, son terrestres, solitarias, su cuerpo y patas están cubiertos de vello o pelaje (figura 1.7), algunas tejen pequeñas telas y viven en madrigueras o entre troncos. Independientemente del tamaño, todas son depredadoras, las mayores pueden capturar insectos grandes, escorpiones, reptiles, pequeños mamíferos y pájaros. No son agresivas, solo muerden al sentirse amenazadas. La lesión producida por los quelíceros de la tarántula produce dolor discreto, edema y eritema que se calma con analgésicos. Las patas posteriores desprenden los pelos de la región posterior del abdomen, los cuales son muy irritantes, pueden persistir por horas y requiere manejo sintomático con hielo y antihistamínicos[29].

Las tarántulas poseen:

Pedipalpos: Actúan como órganos sensoriales o para manipular los alimentos. Los machos también las usan para transmitir el esperma durante la cópula.

Quelíceros: Son las mandíbulas con dos colmillos. En la mayoría de las especies contienen conductos venenosos.

Garras: Muchas arañas tienen garras dentadas y con pelos que les ayudan a sostenerse en la tela.

Cefalotórax: Incluye la cabeza y el tórax, a este se encuentra unidas las patas y los quelíceros.

Ojos: Algunas arañas tiene vista excelente, otras son ciegas.

Músculos: Están unidos a la parte inferior del exoesqueleto.

Patas: Todas las arañas tiene ocho patas articuladas. Las patas traseras a veces tienen garras especiales para envolver las presas con hilo de seda.

Abdomen: Contiene las glándulas productoras de seda, los pulmones y otros órganos vitales.

Hileras: Segregan el hilo de seda formado en las glándulas.

Corazón: Es largo y delgado, recorre la parte superior del abdomen.

Cerebro: La parte superior conecta con los ojos, la parte inferior conecta con el resto del cuerpo. Es el principal centro de control del cuerpo; el corazón bombea la sangre con nutrientes a los órganos vitales. La mayoría de las arañas obtiene el oxígeno de dos maneras. El aire se filtra a través de las ranuras del abdomen hasta llegar a los pulmones.

Pulmón laminar: Se le llama así porque contiene muchas láminas, como las páginas de un libro. Estas láminas aumentan la superficie del pulmón con lo que las arañas pueden conseguir más oxígeno a través de este órgano, también llamado filotráquea.

Pelaje: El cuerpo y sus patas están cubiertas por éste.

Mandíbulas: Se abren verticalmente con respecto al eje del cuerpo y atacan a la presa hacia abajo, de forma análoga de los colmillos de una serpiente o de un gato. No ingieren comida sólida, por lo que inyectan a su presa enzima digestiva que convierte al tejido de los órganos internos en líquido.

Órganos sexuales: El macho posee cierta cantidad de testículos, situados en la parte inferior del abdomen. Las hembras tienen un par de ovarios, tienen esperatecas son pequeños sacos donde almacena esperma del macho.

Aparato respiratorio: Los migalomorfos respiran sólo mediante los pulmones fasciculados, que no poseen tráquea como las arañas [29, 49].

Los científicos que estudian las arañas se les llama aracnólogos, algunos trabajan

con arañas muy peligrosas, obteniendo muestras de veneno para producir antídotos para la mordedura de arañas, o desarrollan medicinas para enfermedades como cáncer o las cardiopatías. Otros estudian la seda de las arañas, ya que se le han descubierto aplicaciones como la producción de hilo para suturar heridas o telas más resistentes para los chalecos antibalas. Desde hace algunos años, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, ubicado en Cuernavaca, se trabaja con veneno de alacranes y recientemente con el de arañas y tarántulas con el propósito de hacer una caracterización bioquímica de sus toxinas para eventuales aplicaciones médicas. El aracnario resguarda 520 ejemplares de tarántulas. Entre las especies de tarántulas están *Brachypelma smithi*, *ruhnaui*, *vagans*, *verdezy*, *auratum*, *klassi* y *emilia*, hoy todas en peligro de extinción. Del género *Aphonopelma* destaca *seemani*, llamada cebra por su aspecto rayado entre otras especies más [53].

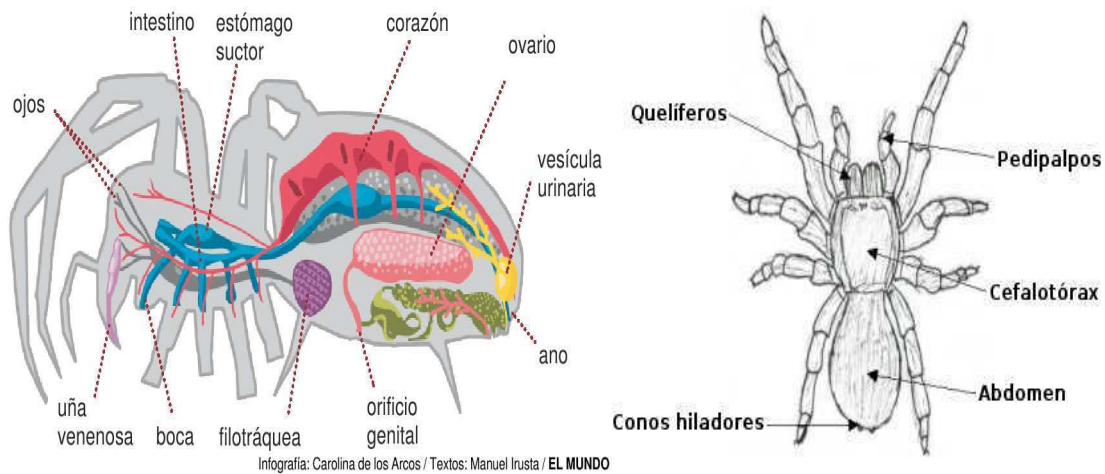


Figura 1.7: Anatomía de la tarántula. Tomado de “El Mundo”.

1.7. Venenos de araña.

El veneno es el principal mecanismo de defensa de las arañas. El veneno es una mezcla de diversas sustancias, algunas de ellas son principios activos tóxicos (proteínas) que interfieren con algún proceso interno del organismo. La mayoría de la arañas poseen venenos neurotóxicos. Estas neurotoxinas son multicomponentes, pero contienen tres principales grupos de compuestos tóxicos: poliaminas, polipéptidos y proteínas. Otros componentes del veneno incluyen iones inorgánicos y sales. La excitabilidad de la membrana de las células y la transmisión de señales eléctricas a través de una sinapsis. Consecuentemente, los receptores, los canales iónicos o las proteínas neuronales de la membrana implicados en la liberación de neurotransmisores son atacados por los venenos.

Poliaminas. Trabajan bloqueando uniones neuromusculares en insectos para prevenir la liberación de glutamato, un neurotransmisor principal, dando como resultado parálisis. Estas toxinas tienden a ser específicas para insectos y no para vertebrados.

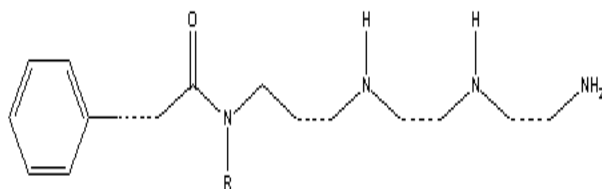


Figura 1.8: **Estructura de una poliamina.** La estructura de la poliamina de la araña consiste en una región hidrofóbica, aromática del ácido carboxílico conectada a una cadena hidrofílica de la amida de la poliamina.

Polipéptidos. Se unen a los canales iónicos y son los principales componentes de las toxinas de las arañas. Todas tienen la misma estructura básica, como se ilustra en la figura 1.9. A continuación doy algunos ejemplos de toxinas polipeptídicas que afectan a los canales iónicos:

1. ω -Agatoxina (30-40 aminoácidos peptídicos) de la tarántula *Agelenopsis aperta*, bloque canales de calcio.
2. μ -agatoxinas (36-37 aminoácidos peptídicos), cuyo efecto es estimulante en canales de sodio, al igual que la δ -atractoxinas de las tarántulas *Atrax robustus* y *Hadronyche versutus*.
3. Anatoxinas (35 aminoácidos peptídicos) de la tarántula *Grammastola spatulata* con efecto activador en canales de potasio[54].

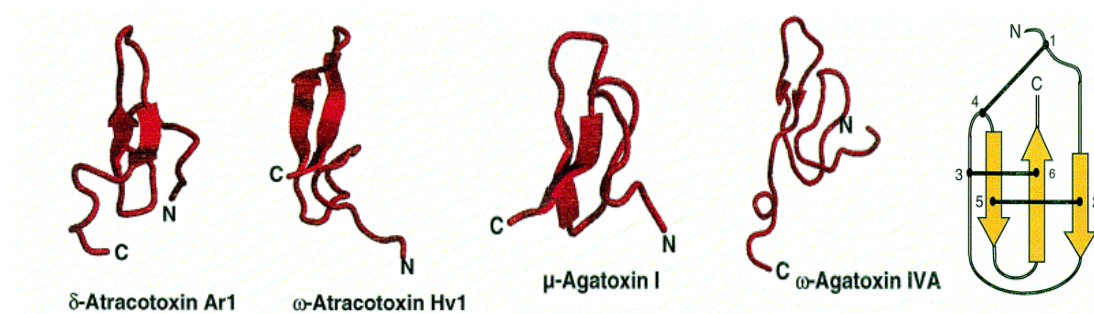


Figura 1.9: Estructura de toxinas polipeptídicas y diagrama esquemático de un nudo cisteína. Una sola molécula polipeptídica es doblada de tal manera que se forma una hoja β consistente de tres partes. La estructura general del péptido se denomina “nudo cisteína”.

Proteínas. Un ejemplo de proteína neurotóxica es la α -latrotoxina de la viuda negra (*Latrodectus mactans*). Altamente tóxica para vertebrados, causa liberación masiva de neurotransmisores.

A continuación se da una descripción breve de los tipos de venenos y sus efectos:

Venenos Neuróxicos: Afectan el funcionamiento del sistema nervioso y la capacidad de controlar los músculos, tienen actividades enzimáticas específicas que alteran rápidamente la coagulación sanguínea. La viuda negra (*Latrodectus mac-*

tans) tiene este tipo de veneno. La viuda negra está bastante extendida en el continente americano, su mordedura es poco dolorosa, posteriormente provoca dolores muy intensos, algunos minutos después se experimenta una sensación de ahogo y angustia, finalmente se produce un brusco aumento de la presión arterial y violentas contracciones musculares. Otro ejemplo de araña con veneno neurotóxico es la araña Australiana *Atrax robustus*, está ampliamente extendida en las afueras de Sidney, su mordedura provoca un dolor intenso que no siempre es seguido de efectos secundarios; en algunos casos provoca vómito, salivación y lágrimas incontroladas, acompañado de dificultades para respirar seguido de un descenso de la presión arterial.

Venenos Necróticos: Destruyen el tejido situado alrededor de la mordedura. El genero (*Loxosceles*), que habita en regiones tropicales posee uno de los venenos más virulentos de este tipo. Su mordedura es poco dolorosa y desapercibida normalmente, la herida se abre adquiriendo el aspecto de una quemadura profunda.

1.8. Expresión de TASK-3 de rata en ovocitos de *Xenopus laevis*.

En 1971 se demostró que los ovocitos de *Xenopus laevis* (rana con garras) del sur de África, eran capaces de sintetizar hemoglobina después de la inyección del RNAm de la proteína correspondiente [17], desde entonces, los sistemas de expresión heteróloga en ovocitos de *X. laevis* han permitido el estudio molecular y la caracterización funcional de muchos canales iónicos y receptores de neurotransmisores existentes. Además de su habilidad para traducir eficientemente RNAm exógenos en proteínas, estos ovocitos proporcionan ciertas ventajas: son fáciles de manejar, ya que su diámetro es de 1.1-1.3 mm, son muy resistentes y se encuentran totalmente equipados con todos los sustratos que necesitan para su

crecimiento y síntesis de proteínas; expresan un pequeño número de sistemas de transporte endógeno, lo que hace que el ruido de fondo de las proteínas con respecto a la proteína expresada de forma heteróloga sea pequeño. De acuerdo a su tamaño, los ovocitos tienen seis diferentes estados de desarrollo (I-VI), los de las etapas V y VI varían muy poco en apariencia y tamaño, sólo difieren en su estado metabólico, por lo que son utilizados para ensayos electrofisiológicos. Estos deben ser tratados previamente con colagenasa para remover la membrana folicular y mantenerlos en medios especiales con gentamicina a 15°C para prevenir contaminación (figura 1.10).



Figura 1.10: **Rana y ovocitos de la especie *X. laevis***. A la izquierda se presenta un ejemplar de la rana africana *Xenopus laevis*. A la derecha, ovocitos de los estadios V-VI, que son los que se utilizan para los ensayos electrofisiológicos.

El RNAm se sintetiza a partir de un plásmido que contiene el promotor fuerte de un bacteriófago en el inserto de DNAc. Para una eficiente traducción de proteínas se debe inyectar de 1-5 ng de RNAm, cantidad suficiente para obtener una elevada expresión. Bajo condiciones adecuadas, los ovocitos pueden ser almacenados hasta por 10 días después de la inyección [47].

1.9. Fijación de voltaje por dos electrodos: TEVC.

La técnica de fijación de voltaje por dos electrodos (TEVC) por sus siglas en inglés (Two Electrode Voltage Clamp), es la herramienta electrofisiológica más utilizada para medir las corrientes de los canales iónicos expresados en ovocitos de *X. laevis*, permitiendo el control del potencial de membrana [43]. La membrana de los ovocitos es penetrada por dos microelectrodos, uno que detecta el voltaje y el otro que inyecta corriente. El potencial de membrana se mide por un electrodo que se encuentra conectado a un amplificador donde la señal se compara con un voltaje de mantenimiento suministrado por un generador. La diferencia de potencial altamente amplificada de estas señales se aplica como una corriente a través del electrodo que inyecta corriente, a través de la membrana y a un electrodo de referencia que se encuentra en el baño conectado a tierra (figura 1.11). Así, la corriente inyectada registra para proveer una medida de la corriente total de la membrana. Todos los iones electrogénicos o sustancias que fluyen a través de la membrana son medidos como una deflexión de la corriente base [3, 47]. Los microelectrodos se preparan empleando capilares de vidrio, pulido con calor para evitar dañar la capa de AgCl del electrodo de $Ag^0/AgCl$, cuando éste se inserta dentro del capilar. Ambos electrodos se llenan con una solución de KCl 3M y se conectan al amplificador. La resistencia de los electrodos debe ser de 0.3 - 2 M Ω [41, 42, 34]. Los microelectrodos se insertan dentro del ovocito con la ayuda de un microscopio estereoscópico y micromanipuladores. La inserción y manipulación se monitorea en el modo de fijación de corriente (donde ambos electrodos sienten el potencial de membrana) por la rápida deflexión del potencial eléctrico, el cual está usualmente entre -35 a -45 mV, dependiendo de la proteína expresada. Sólo después de la inserción de los dos electrodos el amplificador cambia el modo de fijación de voltaje [42].

El sistema se monitorea sobre una tabla neumática anti-vibracional que reduce

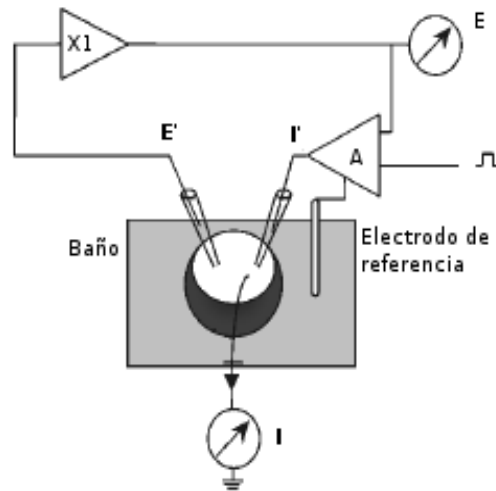


Figura 1.11: TEVC. I' es el electrodo que inyecta la corriente necesaria para fijar el potencial del ovocito al potencial de membrana deseado, el cual es medido por el electrodo de voltaje E'. A es el amplificador que mide la corriente, el potencial e inyecta la corriente (tomado de Baumgartner *et. al.*, 1999; Wagner, 2000)

las oscilaciones que puedan dañar la membrana alrededor del sitio de implantación de los electrodos [47]. Además, se emplea una caja de Faraday para eliminar cualquier efecto de los campos electromagnéticos en el ambiente. Las corrientes son medidas con un Amplificador (Axon, Dagan, Heka) y registradas con un convertidor analógico digital (ADInstruments, Digidata, ITC16, Labmaster) en una computadora para almacenar los datos y analizarlos posteriormente usando el software. La corriente de los canales iónicos se miden activando a los canales con diferentes pulsos de voltaje a un tiempo determinado y fijando un potencial de mantenimiento.

Objetivos

1. Objetivo general

Determinar si fracciones de veneno de *Aphonopelma serratum* producen activación o inhibición de las corrientes del canal de potasio TASK-3.

2. Objetivo específico

Obtener RNAm del canal TASK-3.

Llevar a cabo registros control de ovocitos de *Xenopus laevis* sin inyectar RNAm y ovocitos inyectados con agua.

Registrar las corrientes producidas en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con el RNAm del canal TASK-3.

Probar la actividad de fracciones de veneno de *Aphonopelma serratum* en corrientes iónicas producidas por el canales TASK-3.

Capítulo 2

Material y Métodos.

2.1. Transcripción in vitro.

La transcripción de DNA es el primer proceso de la expresión genética, donde las secuencias de DNA son copiadas a RNA mediante una enzima llamada RNA polimerasa. La transcripción produce RNA mensajero, como primer paso de la síntesis de proteína.

Para la reacción de transcripción in vitro del canal TASK-3 de rata se utilizó el kit mMESSAGE Mmachine (Ambion Company, Cat.n.1344). El procedimiento se realizó en cuatro pasos y en condiciones adecuadas para evitar contaminación la reacción con RNAasas:

a) Preparación del templo de DNA

1. El plásmido se digirió con BamHI (New England Biolabs) en el sitio de restricción del vector, en posición 3' o carboxilo terminal, a la región que codifica la proteína. La mezcla de reacción se preparó de acuerdo a la siguiente tabla , incubando a 37°C por 3h.

Reactivo	Volumen(μL)	Concentración final
Plásmido	2	0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
BSA (100X)	0.5	100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (1X)
Amortiguador (10X)	5	1X
Agua	40.5	-
Enzima	2	20 unidades
Volumen total	50	-

- La reacción de transcripción se analizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio.
- Una vez completa la reacción de digestión, se precipitó con la adición de 125 μL de etanol absoluto frío y 5 μL de acetato de sodio (Sigma Aldrich) a una concentración de 3M y un pH=5.2. Se mezcló, enfrió a -20°C por 60 min.
- Transcurrido el tiempo de precipitación, se centrifugó a 12 880Xg por segundo y se eliminó el líquido con una micropipeta. Finalmente se resuspendió el DNA linealizado en agua libre de RNAsas, obteniendo una concentración aproximada de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

b) Reacción de transcripción

- Para la reacción de transcripción se utilizó la RNA polimerasa correspondiente al promotor T7, el cual se encuentra en la posición 5' o amino terminal a la región que codifica el canal TASK-3.
- Todos los reactivos fueron descongelados, centrifugados a baja velocidad y colocados en hielo, con excepción del amortiguador que se adicionó a

temperatura ambiente.

3. Se preparó la siguiente mezcla de reacción de acuerdo a la siguiente tabla.

Reactivos	Volumen (μL)	Concentración final
H ₂ O (Libre de RNAasas)	4	
NTP/CAP (2X)	10	1x
Amortiguador (10X)	2	1X
Plásmido linealizado (0.5 $\mu\text{g/L}$)	2	0.05 $\mu\text{g/L}$
RNA polimerasa (T7)	2	-
Volumen final	20	-

4. Se mezcló suavemente con la punta de la micropipeta, se centrifugó ligeramente y se incubó por 1h a 37°C.
5. Terminada la reacción de transcripción, se adicionó 1mL de DNAasa I (Ambion), libre de RNAasa, a una concentración de 2U/ μL , se mezcló bien y se incubó nuevamente por 15 min. a 37°C.

c) Recuperación de RNA

1. Posteriormente, se detuvo la reacción y precipitó el RNA adicionando 30 μL de H₂O libre de RNAasas y 30 μL de LiCl (Ambion). Se mezcló cuidadosamente y se enfrió por 30 min. a -20°C
2. Se centrifugó a 12 880Xg por 15 min. a 4°C. Cuidadosamente se removió el sobrenadante. Se lavó el sólido con 1 mL de etanol al 70 % (v/v), ligeramente se centrifugó, para eliminar los nucleótidos no incorporados y nuevamente se removió el etanol.

d) Cuantificación del producto de reacción

1. Finalmente se resuspendió el RNA en 70 μL de H_2O libre de RNAasas, se cuantificó por absorbancia a una longitud de onda de 260 nm, se analizó cualitativamente por electroforesis en gel de agarosa al 2 % y se almacenó a -70°C .

2.2. Extracción de ovocitos de *Xenopus laevis*.

Los ovocitos se obtuvieron mediante la disección de ranas africanas de la especie *Xenopus laevis*. La rana se anestesió sumergiéndola en agua con hielo por 40 min, se le colocó en una cama de hielo y se le cubrió con el mismo a excepción de un lado del abdomen. Posteriormente se realizó una incisión (0.5 cm) en la parte baja y se extrajeron uno o dos lóbulos ováricos. Éstos se disgregaron mecánicamente con pinzas de disección (Fine Science Tools, Dumont # 55) hasta formar pequeños cúmulos de 4 a 6 ovocitos, los cuales se depositaron en una solución con medio ND96 a pH=7.0 (figura 2.1).

Los ovocitos seleccionados se lavaron 4 a 6 veces en una solución con medio OR-2 “libre de calcio” a pH=7.0 y posteriormente se incubaron en una solución de colagenasa Tipo IV (1mg/mL) de *Clostridium histolyticum* (Sigma, Cat. No. 5138) con medio OR-2 “libre de calcio” en agitación suave y constante por 45 min. Finalmente, los ovocitos se lavaron 4 veces con medio ND96 y se mantuvieron en una incubadora (Revolutionary Science, RS-IF-201) a 17°C en medio ND96 con Gentamicina (Genkova) a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta su utilización, después de 4 a 24 h post-extracción. El medio se cambió diariamente.

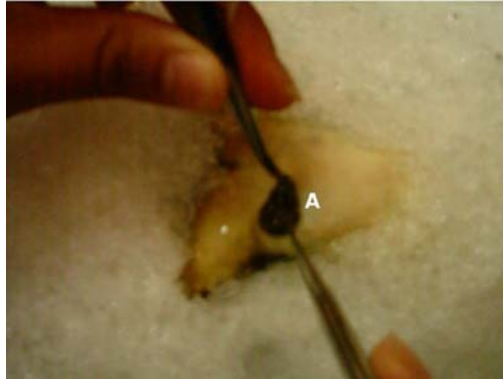


Figura 2.1: **Extracción de ovocitos de *X. laevis***. En “A” se muestra el lóbulo ovárico que contiene los ovocitos en sus diferentes etapas (I-VI).

2.3. Inyección de RNA.

En esta parte el área e instrumentos se desinfectaron con etanol y usaron guantes. Se empleó un microinyector manual (Drummond), se inyectaron $\sim 50\text{nL}$ del RNAm ($\sim 2\text{ng}$) de la subunidad α del canal iónico TASK-3 de rata, a cada ovocito de *X. laevis* previamente preparados para los ensayos electrofisiológico (figura 2.2). Se incubaron a 17°C durante 24 horas en una solución de ND96 con gentamicina ($50\mu\text{g}/\text{mL}$). La solución de cultivo se cambió diariamente. Posteriormente se registraron las corrientes iónicas de los ovocitos viables.

2.4. Estudio electrofisiológico del canal TASK-3 de rata.

Los ovocitos inyectados se incubaron en el medio ND96 con gentamicina a una concentración final de $50\mu\text{g}/\text{mL}$, a 17°C por 1 ó 2 días. En todos los ensayos electrofisiológicos se usó la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos (TEVC). El equipo empleado (figura 2.3) fue un amplificador (Dagan Corpora-



Figura 2.2: Equipo utilizado en la inyección de RNAm de TASK-3 en ovocitos de *X. laevis*.

tion, CA-1B High Performance Oocyte Clamp), una interfase (Axon, DigiData 1200) y un osciloscopio (GoldStar, ES20). Las células se observaron a través de un microscopio estereoscópico (Nikon, SMZ2T) y los capilares se manejaron con micromanipuladores (World Precision Instruments, M3301)



Figura 2.3: Equipo empleado en el estudio electrofisiológico del canal TASK-3 de rata. A la izquierda, microscopio, cámara de perfusión y micro manipuladores. A la derecha, osciloscopio, interfase, amplificador y software.

En los registros de corrientes del canal se usaron dos capilares de vidrio (VWR

Internacional, Cat. No. 53432-921). Los capilares se llenaron con una disolución conductora de KCl 3M y se insertó un electrodo de $Ag^0/AgCl$. Únicamente se emplearon los capilares cuya resistencia fuera de 0.3 a 0.5 $M\Omega$ para el electrodo de corriente y 0.8 a 1.2 $M\Omega$ para el electrodo de voltaje. Las mediciones de la corriente se filtraron a 2KHz y se almacenaron en una computadora para analizarlos con los programas Clampfit versión 6.0.3 (Axon Instruments) y Microsoft Excel versión 2000.

En todos los experimentos se trabajó con mínimo 3 lotes diferentes de ovocitos, realizando tres series de experimentos (incluyendo con RNAm, H_2O y sin inyectar), cada uno mínimo cinco diferentes ovocitos, estímulos a diferentes valores de potencial cinco veces. Los ovocitos se mantuvieron en una cámara con 240 μ L de ND96 a un pH =7.4, todos los registros se realizaron a temperatura ambiente ($\sim 20^\circ C$).

2.5. Expresión heteróloga del RNAm y caracterización del canal.

Para determinar si el RNAm del canal iónico TASK-3 de rata se expresaba en los ovocitos de *X. laevis*, estos fueron sometidos a cambios de voltaje conocidos como protocolo de pulsos. La expresión heteróloga del RNAm de este canal de potasio, se llevó a cabo un protocolo de pulsos parecido al de la caracterización del canal (figura 2.4). Se trabajó en un intervalo de potencial de +80 a -140 mV, en incrementos de potenciales de -20 mV. Se registró la corriente de ovocitos inyectados con RNAm, con agua y sin inyectar, para observar las corrientes endógenas del mismo y se comparó con la corriente de los ovocitos. Se llevo acabo la caracterización electrofisiológica de TASK-3, con el fin de determinar si el canal iónico se expresaba de manera funcional en la membrana de los ovocitos. En este estudio

los ovocitos fueron estimulados con el siguiente protocolo de pulsos (figura 2.4):

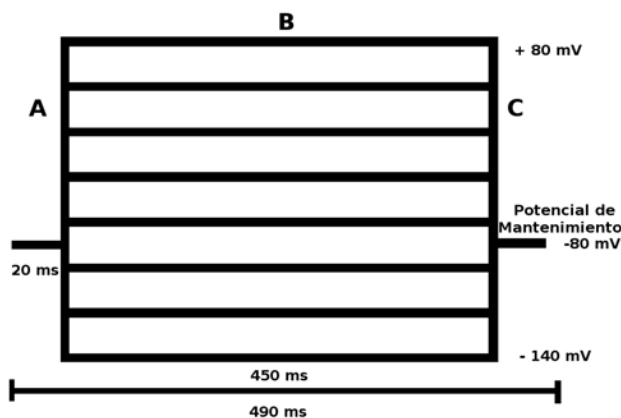


Figura 2.4: Protocolo empleado en la caracterización de TASK-3 de rata en ovocitos.

2.6. Efecto del veneno de tarántula *A. serratum* en el canal de potasio TASK-3.

Los ensayos electrofisiológicos se realizaron bajo las mismas condiciones antes mencionadas, empleando la técnica TEVC. Se probaron fracciones liofilizadas del veneno de tarántula *A. serratum*. Las fracciones fueron proporcionadas por el Dr. Lourival D. Possani Postay y la M. en C. Herlinda Catalina Clement; obtenidas por HPLC, en el departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura del Instituto de Biotecnología de la UNAM. En la figura 2.5 se presenta el cromatograma de HPLC del fraccionamiento de veneno de *A. serratum*, se separó mediante un gradiente 0-60 % en 60 min., flujo de 1 mL/min en una columna C₁₈ analítica con una concentración aplicada de 2 mg/100 μ L. Se obtuvieron seis fracciones, y son las que se probaron sobre el canal de potasio TASK-3 de rata.

Las fracciones I-VI se resuspendieron en H₂O miliQ hasta una relación de 3.5 μ g/mL del veneno en la cámara de perfusión en medio ND96. Se utilizó un protocolo de pulsos que nos permitiera medir las corrientes propias del canal en ausencia y presencia de las diferentes fracciones de veneno. Los pulsos del protocolo se realizaron a un potencial de +80 mV repitiéndose cada 3 segundos en un promedio de 315 episodios por experimento. Se trabajó a un potencial de mantenimiento de -80 mV, la duración de los segmentos A, B y C (ver figura 2.4) fueron 20, 450 y 20 ms respectivamente, obteniendo una duración del tren de pulsos de 490 ms. Todos los experimentos se trabajaron por duplicado y a temperatura ambiente.

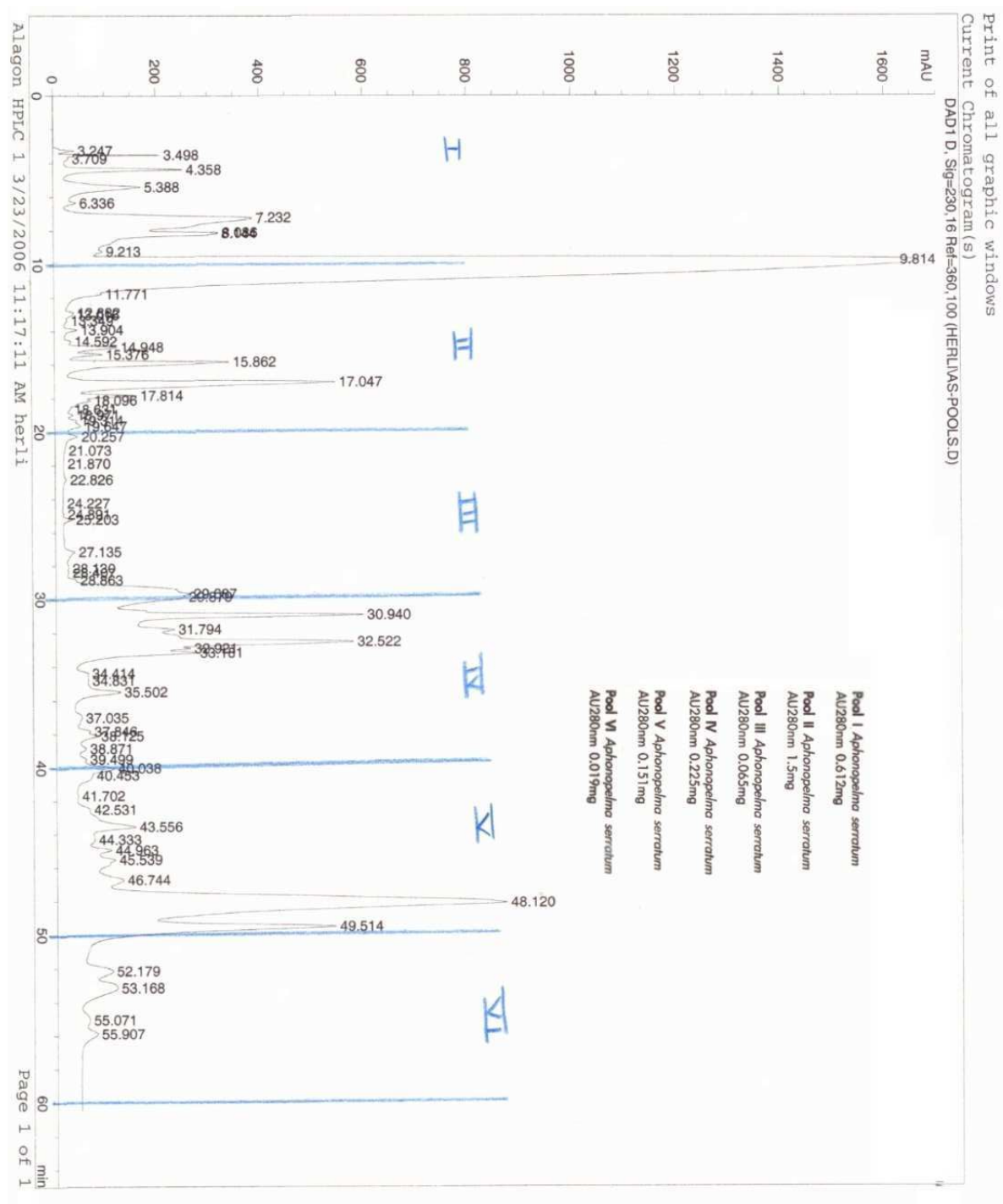


Figura 2.5: HPLC. HPLC del veneno de *Aphonopelma serratum*. Gradiente 0-60 % en 60 min., volumen inyectado a un flujo de 1mL/min en una columna C₁₈ analítica con una concentración aplicada de 2 mg/100 μ L.

Capítulo 3

Resultados

3.1. Transcripción *in vitro*

Para la obtención de RNAm del canal TASK-3 de rata, se realizó una transcripción *in vitro* a partir de DNAc. Con el plásmido linearizado se realizó la reacción de transcripción *in vitro* mediante T7 RNA polimerasa, a través del cual se obtuvo el RNAm del canal (1185 nts, que codifica una proteína de 395 aa). Éste se cuantificó espectrofotométricamente a 260nm obteniéndose una concentración de 266.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, también se analizó cualitativamente mediante un gel de agarosa al 2% para corroborar su integridad y se observó una sola banda sugiriendo que no hubo degradación (figura 3.1).

A través de estos análisis se determinó que la calidad y cantidad de RNAm del canal TASK-3 de rata era adecuada para ser utilizado en los pasos subsecuentes.

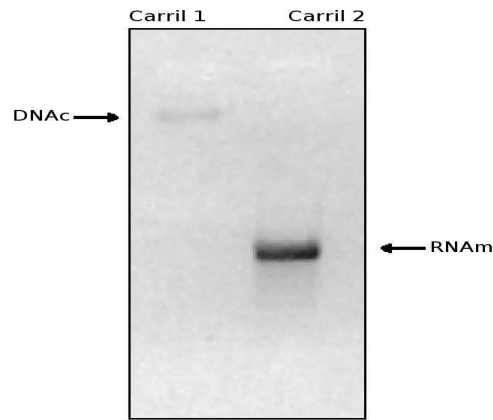


Figura 3.1: **Productos de la reacción de transcripción in vitro con la T7 RNA polimerasa.** En el carril 1: plásmido sin transcribir, 2: muestra de RNA TASK-3 sintetizado in vitro.

3.2. Expresión heteróloga del canal iónico TASK-3 de rata en ovocitos.

A los ovocitos utilizados para la expresión heteróloga del canal iónico, previo tratamiento con colagenasa, se les inyectó 50 nL con 2 ng de RNAm del canal de potasio TASK-3 de rata. Después de la inyección los ovocitos se mantuvieron a 17°C hasta su uso. Para verificar la expresión del canal, se compararon las corrientes de los ovocitos inyectados con RNAm del canal TASK-3 y la de los ovocitos, inyectados con agua y sin inyectar (fig. 3.2). Comparando los registros en las figuras 3.2 A y B, se observa una marcada diferencia entre las corrientes endógenas de los ovocitos (fig. 3.2 A) y las corrientes registradas en los ovocitos inyectados con RNAm (fig. 3.2 B). Las corrientes medidas en los ovocitos dependen del potencial del protocolo de pulsos como se muestra en la figura 3.2 C. Las corrientes endógenas son menores de 0.2 μA , las cuales tomaremos como despreciables. Las corrientes en los ovocitos inyectados con RNAm llegan a ser mayores a 7 μA . En resumen, podemos concluir que hubo una eficiente expresión del RNAm.

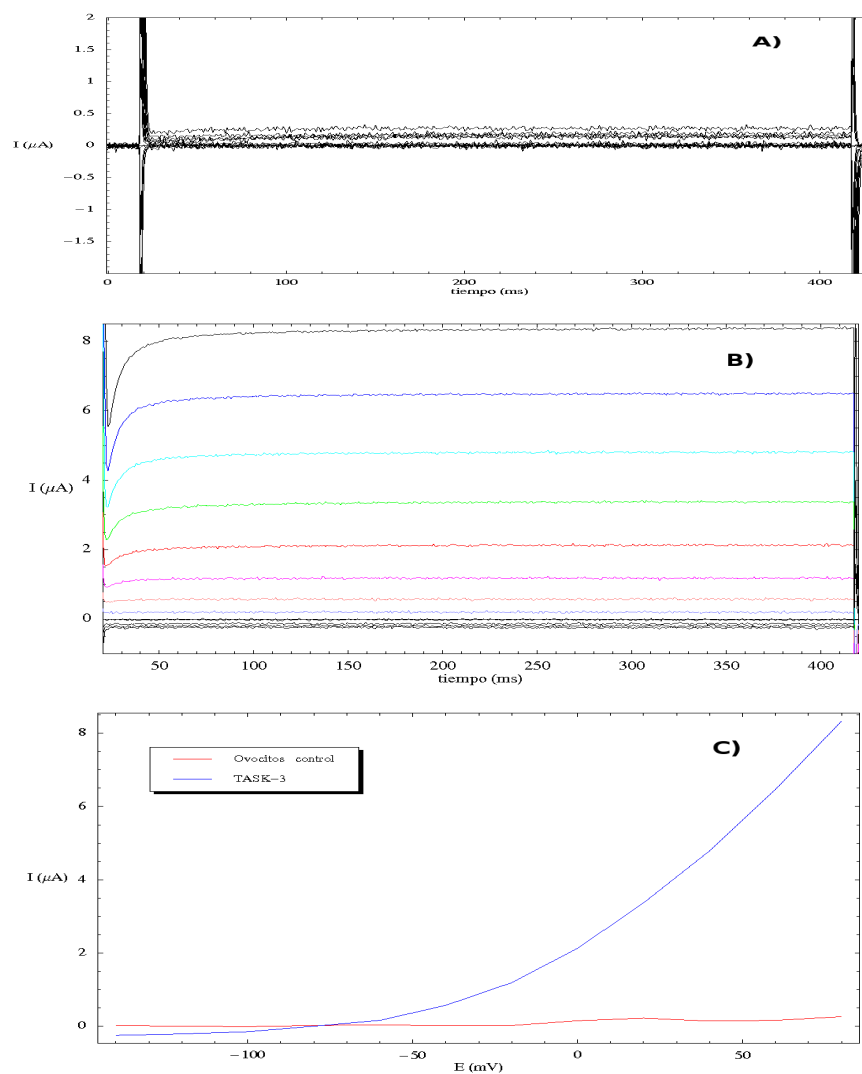


Figura 3.2: Expresión del RNAm de TASK-3. A) Registro de las corrientes generadas por ovocitos nativos inyectados con agua y sin inyectar. B) Ovocitos inyectados con RNAm del canal TASK-3, estimulados con un protocolo de pulsos. Los ovocitos se mantuvieron a un potencial de mantenimiento de $-80mV$, con potenciales de $+80$ a $-140mV$ y variaciones de $-20mV$. C) Comparación del efecto del voltaje sobre la corriente de los ovocitos inyectados con el canal TASK-3 (en azul) y los ovocitos control (en rojo).

3.3. Efecto del veneno de tarántula sobre el canal de potasio TASK-3

En este proyecto se probaron seis fracciones de veneno de tarántula que habita en la República Mexicana (Tepoztlán, Morelos), *Aphonopelma serratum*, sobre el canal de potasio TASK-3. Ninguna de las seis fracciones presentó actividad sobre el canal.

Las fracciones no poseían la misma cantidad de veneno, como se muestra en la figura 2.5, por lo que se les agregó una cantidad diferente de agua para obtener muestras con una concentración aproximada de $3.5 \mu\text{g/mL}$. Una vez que se agregó la cantidad de agua a cada fracción de veneno, se guardaron a -20°C . En la siguiente tabla se muestra la cantidad de agua utilizada para resuspender las fracciones.

Fracción	Volumen de Agua miliQ(μL)
I	174
II	428
III	18
IV	64
V	43
VI	5

Antes de agregar las fracciones de veneno, la cama de registro se perfundió tres veces con medio ND96 a pH 7.4 para descartar la presencia de sustancias diferentes a las fracciones. Después se verificó que las corrientes de los ovocitos inyectados con el canal TASK-3 fueran suficientemente grandes para notar el efecto del veneno. Se descongelaron las fracciones a temperatura ambiente, se homogenizaron cuidando que no se formaran burbujas y se centrifugaron durante tres segundos. Posteriormente se adicionaron una a una las fracciones de veneno homogenizadas

en la cámara de registro, se esperó un tiempo para observar si las fracciones tenían efecto sobre el canal. Entre cada adición de fracción, se perfundió tres veces con medio ND96 a pH 7.4 para retirar los restos de la fracción anterior.

Una vez que se demostró que el canal TASK-3 se expresó en la membrana de los ovocitos, se probaron las fracciones del veneno de tarántula con el fin de observar su efecto sobre el canal. Las fracciones se adicionaron directamente en la cámara de registro, donde se encontraba el ovocito expresando el canal TASK-3. Los ovocitos se estimularon empleando un protocolo de pulsos descrito en la parte experimental, las corrientes se registraron continuamente durante los ensayos.

Antes de iniciar los ensayos con las fracciones de veneno de tarántula, se midió la estabilidad de las corrientes durante un tiempo aproximado de 180s. Posteriormente se adicionaron periódicamente fracciones de veneno en intervalos de aproximadamente 80 segundos y se observó su efecto sobre el canal TASK-3. Finalmente se perfundió con 3 mL de ND96, esto con la finalidad de retirar las trazas de las fracciones y determinar si la corriente inicial continuaba con su comportamiento inicial.

Se probó el veneno dividido en seis fracciones sobre el canal TASK-3 con una concentración de 3.5mg/mL. En la figura 3.3 se presenta el efecto de las fracciones I a VI sobre el canal de potasio TASK-3. Se observó que las corrientes no disminuyen de manera importante con el tiempo durante el experimento al adicionar y eliminar el veneno, por lo que concluimos que ninguna fracción presenta efecto alguno sobre las corrientes del canal, y por tanto, se considera que no tiene ninguna actividad activadora o bloqueadora sobre éste.

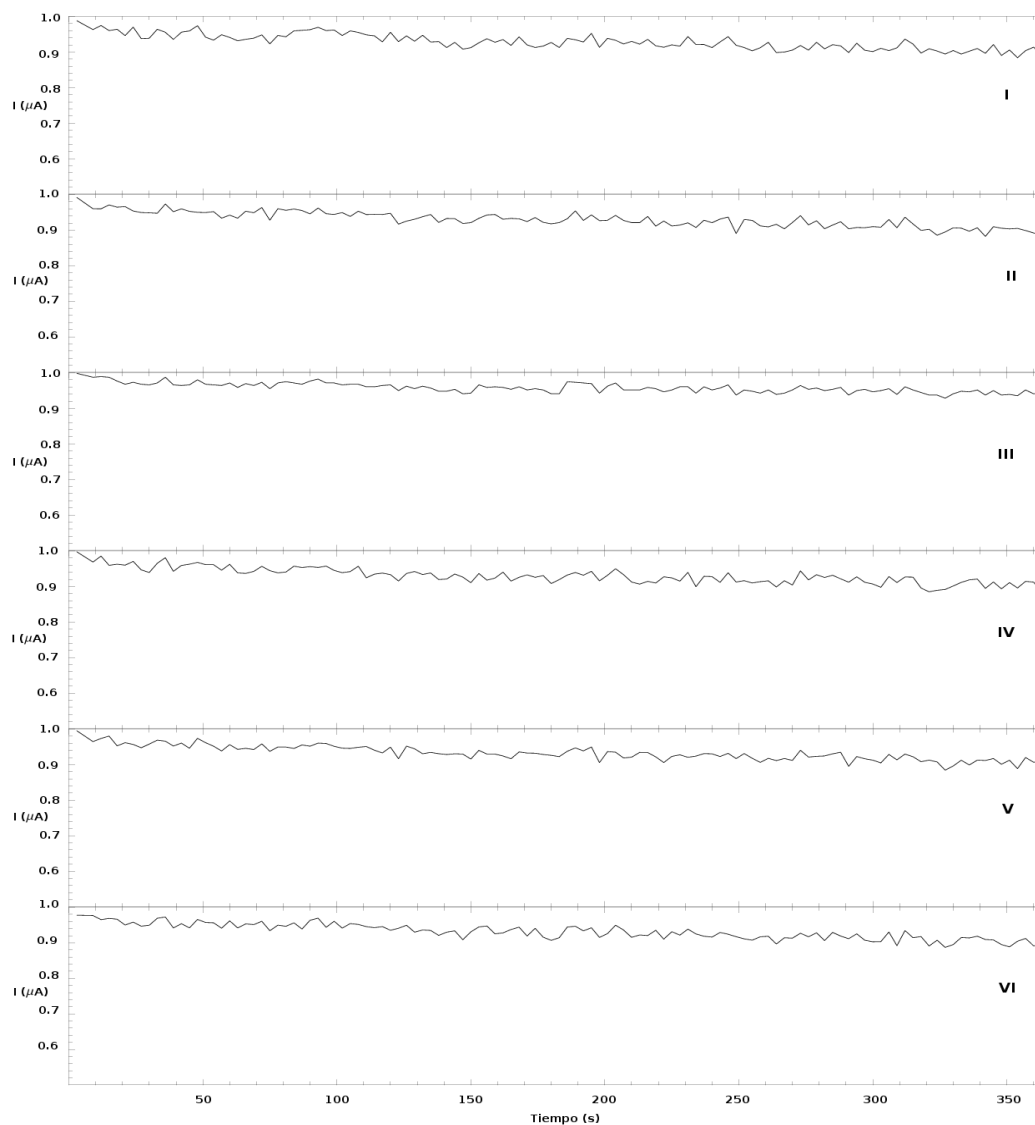


Figura 3.3: Efecto de las fracciones de veneno de *A. serratum* sobre el canal TASK-3. No se aprecia efecto alguno de las fracciones de veneno sobre las corrientes de los ovocitos inyectado con RNAm del canal en ND96 a $\text{pH}=7.4$, estimulados en un protocolo de pulsos. A los 180 segundos se adicionaron las fracciones, la perfusión se llevo a cabo a los 300 segundos. Los ovocitos se mantuvieron a un potencial de mantenimiento de -80 mV con pulsos continuos cada 3 segundos. En la gráfica, las corrientes están normalizadas a la unidad.

Capítulo 4

Discusión de Resultados.

En la literatura se encuentra una serie de toxinas bloqueadoras de canales. Por ejemplo, para el Na^+ se encuentran las toxinas Tetrodoxina, Saxitoxina y la Clorpromazina. Para el Ca^{2+} se encuentra la Verapamila (Verapamil), la Diltiazem (Diltiazem) y la α -conotoxina (alpha-conotoxin). Para los fines de este trabajo, el caso del que nos interesa es el del potasio, para el K^+ se encuentra la Caribtoxina, la 4-Aminopiridina y la Anatoxina [38]. Para ninguno de estos casos se reporta acción bloqueadora sobre el canal TASK-3.

El canal de TASK-3 pertenece a una nueva familia de canales de K^+ de 4TM/2P. Se ha encontrado sobre expresado en algunas líneas de células cancerígenas y también se encuentra involucrado en la apoptosis [39]. Sin embargo, aún no se ha encontrado ningún ligando natural que actúe sobre este tipo de canales. Dada la importancia de este canal se decidió realizar este trabajo con el propósito de determinar si en el veneno de tarántula *Aphonopelma serratum* existen toxinas que actúen sobre este canal.

4.1. Expresión y Caracterización de TASK-3.

El canal de potasio TASK-3 se ha expresado en células COS-7, HEK293 y en ovocitos de *X. laevis*, formando un canal de potasio funcional [6, 39, 23]. En este trabajo, el canal de TASK-3 de rata se expresó y caracterizó en ovocitos de la rana *X. laevis* por el fácil manejo de estas macromoléculas. Se siguió el protocolo de trabajo de estas células [47], donde el RNAm se sintetizó a partir de DNAc. Se inyectaron 2 ng de RNAm a cada ovocito desfoliculado, después de 24h se observó la expresión de los canales empleando la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos (TEVC). Para diferenciar entre la activación exitosa del canal TASK-3 y algún error experimental, se utilizaron ovocitos control inyectados con agua y ovocitos sin inyectar. Se registraron corrientes alrededor de $10 \mu\text{A}$ en ovocitos inyectados con RNAm, en comparación con los ovocitos control, inyectados con agua o sin inyectar, que presentaron corrientes menores a $0.2 \mu\text{A}$ a un potencial de 80 mV, por lo que podemos concluir lo siguiente: El canal TASK-3 se expresó de forma funcional en los ovocitos de *X. laevis*, dado que los datos obtenidos concuerdan con los reportados en la literatura a cerca del comportamiento de este canal estudiado en ovocitos[24].

Durante la realización experimental, se observó un efecto interesante pero experimentalmente inconveniente (ya que interfiere con la recopilación de datos) llamado “efecto de lavado”. Este efecto es una característica mostrada por canales iónicos, incluyendo cierto tipo de canales de Na^+ , K^+ , Cl^- y receptores de GABA y NMDA [52]. Debido al efecto de lavado, se observó que la actividad del canal TASK-3 disminuía ligeramente con el tiempo. La actividad del canal desaparece cuando la membrana es perturbada, excitada o la célula es dializada internamente, causando cambios en el comportamiento de apertura de los canales iónicos [44]. Por esta razón para el estudio del efecto del veneno de tarántula sobre el canal TASK-3 se utilizó un protocolo de pulsos distinto al empleado para la caracteri-

zación del mismo. Este protocolo consistió de un pulso de voltaje repetitivo a un potencial de 80 mV cada 3 s, que permitió distinguir entre el comportamiento de lavado y algún efecto bloqueador del veneno de tarántula sobre la actividad del canal TASK-3 de rata.

4.2. Efecto del veneno de la tarántula *A. serratum* sobre el canal TASK-3.

Existen alrededor de 100 subtipos de canales de K^+ y sólo se han encontrado un número relativamente pequeño de péptidos que afectan la función de éstos, actuando principalmente sobre canales de K^+ activados por voltaje o calcio[31].

En el estudio de la biofísica y farmacología de canales iónicos se han usado péptidos-ligandos específicos aislados de veneno de animales como alacranes, anémonas, caracoles marinos (conus), serpientes entre otros. Esto ha dado paso a nuevas líneas de investigación. Parte de este proyecto tuvo como objetivo probar fracciones de un veneno de una tarántula que habita en la república Mexicana: *A. serratum*. Del veneno de esta tarántula no hay información acerca de su estructura ni de su actividad sobre canales de potasio, en contraste con el caso del veneno de la tarántula *Grammostola spatulata* (tarántula chilena) cuyo efecto es activador.

Al probar las fracciones del veneno de la tarántula *A. serratum* no se observó efecto sobre las corrientes de los ovocitos en los que se expresó exitosamente el canal TASK-3, con lo que concluimos que las fracciones de veneno que utilizamos no tienen efecto activador o bloqueador sobre este canal.

Capítulo 5

Conclusiones

Se llevó a cabo exitosamente la expresión heteróloga del canal TASK-3 de rata en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Se caracterizó el canal TASK-3 de rata usando la Técnica de Fijación de Voltaje con dos electrodos (TEVC).

Se probaron seis fracciones de veneno de tarántula *A. serratum* sobre el canal TASK-3 de rata.

Con las fracciones de veneno utilizadas en el presente trabajo. No se observó efecto alguno del veneno de tarántula *A. serratum* sobre el canal TASK-3 de rata.

Bibliografía

- [1] **Alberts, B. (2002).** *Molecular biology of the cell.* 4th edition; Garland Science; USA. 631-633.
- [2] **Barres, BA.; Chun, L.L.Y.; Corey, D.P. (1990).** Ion channels in vertebrate glia. *Annu. Rev. Neurosc.* **13**, 441-474.
- [3] **Baumgartner, W.; Islas, L; Sigworth, F.J. (1999).** Two Microelectrode Voltage Clamp of *Xenopus* Oocytes: Voltage Errors and Compensation for Local Current Flow. *Biophysical J.* **77**, 1980-1991.
- [4] **Berg. A.P;Taller, E.M.; Manger, J.P.; Bayliss, D.A. (2004).** Motoneurons Express Heteromeric TWIK-Related Acid-Sensitive K⁺ (TASK) Channel Containig TASK-1 (KCNK 3) and TASK-3 (KCNK9) SUBUNITS. *J Neurosci.* **24**. 6693-6702.
- [5] **Borther, C.D.; Hughes, F.M. Jr; Cidlowki, J.A. (1997).** A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**, 32463-32442.
- [6] **Champman C.G; Meadows, H.J.; Godden,R.J.; Campbell, D.A.; Duckworth M.; Keisell, R.E.; Murdock, P.R.; Randall, A.D.; Rennie, GI., Gloger I.S. (2000).** Cloning, localization and functional expression of a novel human, cerebellum specific, two pore domain potassium channel. *Mol. Brain Res.*. **82**. 74- 83.
- [7] **Chen. X.; Taller, E.M.; Patel, N.; Gomis, A.; McIntire, W.E.; Dong, B.; Viana, F.; Garrison, J.C.; Bayliss, D.A. (2006).** Inhibition of a background potassium channel by Gq protein a subunits. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 3422-3427.

- [8] **Cooper, E.C.; Jan, L.Y. (1999)**. Ion Channel Genes and Human Neurological Disease: Recent Progress, Prospects and Challenges. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 4759-4766.
- [9] **Czirják, G.; Enyedi, P. (2002a)**. Formation of Functional Heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 Two-pore Domain Potassium Channel Subunits. *Mol. Pharmacol.* **63**, 646-652.
- [10] **Czirják, G.; Enyedi, P. (2002c)**. TASK-3 Dominates the Background Potassium Conductance in Rat Adrenal Glomerulosa Cells. *Mol. Endocrinol.* **16**(3), 621-629.
- [11] **Dascal, N. (2001)**. Ion Channel Regulation by G Proteins. *Trends Endocrinol. Metabol.* **12**, 391-398.
- [12] **Doyle, D.A.; Morais, C.J.; Pfuetzner, R.A.; Kuo, A.; Gulbis, J.M.; Cohen, S.L.; Chait, B.T.; MacKinnon, R. (1998)**. The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. *Science*. **280**, 69-77.
- [13] **Duprat, F.; Lesage, M.; Reyes, R.; Huerteaux, C.; Lazdunski, M. (1997)**. TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J.* **16**, 5464-5471.
- [14] **Fedida, D.; Kesketh, J.C. (2001)**. Gating of Voltage-Dependent Potassium Channels. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **75**, 165-199.
- [15] **Friederich, P. (2003)**. Basic Concepts of Ion Channel Physiology and Anaesthetic Drug Effects. *Eur. J. Anesthesiol.* **20**, 343-353.
- [16] **Green, W.N. (1999)**. Ion Channel Assembly: Creating Structure that Function. *J. Gene. Physiol.* **113**, 163-169.
- [17] **Gurdon, J.B. ; Lane, C.D.; Woodiand, H.R.; Mairbaix, G. (1971)**. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*. **223**, 177-182.

- [18] **Han, J.; Truell, J.; Gnatenco, C.; Kim, D. (2002).** Characterization of four types of background potassium channels in rat cerebellar granule neurons. *J.Physiol.* **542**, 431-444.
- [19] **Herrera, E. (1996).** *Bioquímica. Biología Molecular y Bioquímica Fisiológica. 2ª* Reimpresión; McGraw-Hill Interamericana; España, Madrid. vol **II**, 1113-1117.
- [20] **Holt, A.G.; Asako, M.; Duncan, R.K.; Lomax, C.A.; Juiz, J.M.; Altschuler, R.A. (2006).** Deafness associated changes in expression of two-pore domain potassium channels in the rat cochlear nucleus. *Hearing Res.* 216-217,146-153.
- [21] **Jan, L.Y.; Jan, N.Y. (1997).** Cloned Potassium Channels from Eukaryotes and Prokaryotes. *Ann. Rev. Neurosci.* **20**, 91-123.
- [22] **Karschin, A. (2001).** Expression Pattern in Brain of TASK-1, TASK-3, and a Tandem Pore Domain K⁺ Channel Subunit, TASK-5, Associated with the Central Auditory Nervous System. *Mol. Cell. Neurosci.* **18**, 632-648.
- [23] **Kim, Y.; Bang, H.; Kim, D. (2000).** TASK-3, a New Member of the Tandem-Pore K(+) Channel Family. *J. Biol. Chem.* **275** (13), 9340-9347.
- [24] **Kim, D. (2005).** Physiology and Pharmacology of Two-Pore domain Potassium Channels. *Curr. Pharmaceutical Design.* **11**, 2717-2736.
- [25] **Lehmann, H.F.; Jurkat, R.K. (1999).** Voltage-Gated Ion Channels and Hereditary Disease. *Physiol. Rev.* **79** (4), 1317-1372.
- [26] **Lesage, F.; Guillemare, E.; Fink, M.; Duprat, F.; Lazdunski, M.; Romey, G.; Brarhanin, J. (1996a).** TWIK, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J.* **15**, 1004-1011.
- [27] **Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, L.S.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. (2002).** Células Nerviosas. *Biología Molecular y Celular.* Ed. Médica Panamericana. España. 912-967.

- [28] **MacKinnon, R.; Cohen, S.L.; Kuo, A.; Lee, A.; Chait, B.T. (1998).** Structural Conservation in Prokaryotic and Eukaryotic Potassium Channels. *Science*. **280**, 106-109.
- [29] **Matthew, R. (1998).** Insectos y arañas. Ed. Océano de México,S.A de C.V. 48-53.
- [30] **Meadows, H.J.; Randall, A.D. (2001).** Functional characterization of human TASK-3, an acid-sensitive two-pore domain potassium channel. *Neuropharmacology*. **40**, 551-559.
- [31] **Miller, C. (2000).** Ions Channels: doing hard chemistry with hard ions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 148-151.
- [32] **Minor, D.L. Jr. (2001).** Potassium Channels: Life in the Post-Structural World. *Curr. Opi. Struct. Biol.* **11**, 408-414.
- [33] **Mu, D.; Chen, L.; Zhang, X.; See, L.H.; Koch, C.M.; Yen, C. et.al. (2003).** Genomic amplification and oncogenic preoperties of the KCNK9 potassium channel gene. *Cancer Cell*. **3**, 297-302.
- [34] **Muller, C.M. (1992).** Intracelular microelectrodes. In: Gatyn R, Kettenmann H (eds.): Practical electrophysiological methods: A ghuide for in mitro studies in vertebrate neurobiology. 1st ed. New York, USA, 3-5.
- [35] **O'Kelly, I.; Butler, M.H.; Zilberg, N.; Goldstein, S.A. (2002).** Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell*. **111**, 577-588.
- [36] **Palmer, M.J.; Hull, C.; Vigh, J.; Von Gersdorff, H. (2003).** Synaptic cleft acidification and modulation of north-temr depression by exocytosed preotons in retinal bipolar cells. *J. Neurosci*. **23**, 11332-11341.
- [37] **Patel, A.J.; Honoré, E.(2001a).** Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends Neurosci*. **24** (6), 339-346.

- [38] **Phillips, L.R.; Milescu, M.; Li-Smerin, Y.; Mindell, J.A.; Kim, J.I.; Swartz, K.J. (2005).** Voltage-sensor activation with a tarantula toxin as cargo. *Nature*. **436** (7052), 857-860.
- [39] **Rajan, S.; Wischmeyer, E.; Liu, G.X.; Preisig-Muller, R.; Daut, J.; Karschin, A.; Derst, C. (2000).** TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histidine as pH sensor. *J. Biol. Chem.* vol **275**, No 22, 16650-16657.
- [40] **Rudy, B. (1998).** Diversity and ubiquity of K⁺ channels. *Neurosciences*. **25**, 729-749.
- [41] **Stühmer, W. (1992).** Electrophysiological recordings from *Xenopus* oocytes. In: Rudy B., Iverson L.E. : Ion channels. Methods Enzymol. **207**, 319-338.
- [42] **Stühmer, W. (1998).** Electrophysiological recordings from *Xenopus* oocytes. In: Coon MP (ed.): Ion channels. Part B. Methods Enzymol. **293**, 280-300.
- [43] **Stühmer, W.; Parekh, A.B. (1995).** Electrophysiological recordings from *Xenopus* oocytes. In Single-Channel Recording. B. Sakamann and E. Neher, editors. Plenum Press. New York, USA, 341-356.
- [44] **Tang, X. D.; Hoshi, T. (1999).** Rundown of the Hyperpolarization-Activated KATI Channel Involves Slowing of the Opening Transition Regulated by Phosphorylation. *J. Biophysical*. **76**, 3089-3098.
- [45] **Talley E.M.; Sirois, J.E.; Lei Q.; Bayliss, D.A. (2003).** Two-pore-domain (CKNK) potassium channels: dynamic roles in neuronal function. *Neuroscientist*. **9** (1), 46-56.
- [46] **Terlau, H.; Stühmer, W. (1998).** Structure and Function of Voltage-Gated Ion Channels. *Naturwissenschaften Review Article*. **85**, 437-444.
- [47] **Wagner C.A.; Friedrich B.; Setiawan, I.; Lang, F.; Bröer, S. (2000).** The use of *Xenopus laevis* Focytes for the Functional Characterization of Heterologously Expressed Membrane Proteins. *Cell. Physiol. Biochem*. **10**, 1-12.

- [48] **Watkins, C.S.; Mathie, A. (1996).** A non-inactivating K⁺ current sensitive to muscarinic receptor activation in rat cultured cerebellar granule neurons. *J. Physiol.* **491**, 401-412.
- [49] **Wayne, R.; Walls J. (1995)** Tarántulas y escorpiones. Ed. Barcelona Hispano Europa.
- [50] **Yves, M. (1996)** Las arañas, Ed. Barcelona De Vecchi.
- [51] **Yu, S.P. (2003).** Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog. Neurobiol.* **70**, 363-386
- [52] **Zhen, X-G; Yamada, Y.; Zhang, Y.; Doyle, C.; Yang, J. (2006).** A single amino acid mutation attenuates rundown voltage-gated calcium channels. *FEBS lett* **580** (24), 5733-5738.
- [53] Revista “El Faro”, Ciudad Universitaria, UNAM, Febrero 2 2006, Año V, Número **59**
- [54] Página de internet, www.chm.bris.ac.uk/motm/spider/