



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ELECTROFISIOLÓGICA DE SUBUNIDADES
FORMADORAS DE RECEPTORES ANIÓNICOS, ACTIVADOS POR LA HISTAMINA, DEL
TALLO OCULAR DEL ACOCIL *Procambarus clarkii***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. ITZEL SCARLETT MORENO RAMIREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. JUAN MANUEL ARIAS MONTAÑO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. MARIA DEL REFUGIO GARCIA VILLEGAS
CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITECNICO NACIONAL (CINVESTAV-I.P.N)
DRA. ANA VICTORIA VEGA SALCEDO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

CD. MX. FEBRERO, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ELECTROFISIOLÓGICA DE SUBUNIDADES
FORMADORAS DE RECEPTORES ANIÓNICOS, ACTIVADOS POR LA HISTAMINA, DEL
TALLO OCULAR DEL ACOCIL *Procambarus clarkii***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. ITZEL SCARLETT MORENO RAMIREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. JUAN MANUEL ARIAS MONTAÑO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. MARIA DEL REFUGIO GARCIA VILLEGAS
CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITECNICO NACIONAL (CINVESTAV–I.P.N)
DRA. ANA VICTORIA VEGA SALCEDO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

MÉXICO, CD. MX. FEBRERO, 2020

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/092/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas y Biología Evolutiva y Sistemática, del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **04 de noviembre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **MORENO RAMIREZ ITZEL SCARLETT**, con número de cuenta **412023473** con la tesis titulada **“Caracterización molecular y electrofisiológica de subunidades formadoras de receptores aniónicos, activados por la histamina, del tallo ocular del acocil *Procambarus clarkii*”**, realizada bajo la dirección del **DR. JUAN MANUEL ARIAS MONTAÑO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARIA ELVIRA PALACIO GALARRAGA
Vocal: DR. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA
Secretario: DRA. MARÍA DEL REFUGIO GARCÍA VILLEGAS
Suplente: DRA. LEONILA IRMA LAURA ESCOBAR PÉREZ
Suplente: DR. DAVID ERASMO GARCÍA DÍAZ

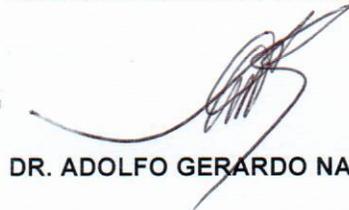
Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 24 de enero de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX

Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme una beca de maestría (477873). De igual forma, agradezco el financiamiento otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), en el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), clave IN218818, al Dr. Juan Manuel Arias Montaña. Y a la Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y Educación de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

A mi director de tesis el Dr. Juan Manuel Arias Montaña, así como la participación de las doctoras María del Refugio García Villegas y Ana Victoria Vega Salcedo en mi comité tutorial.

Agradecimientos

Primero que nada, quiero agradecerles a mis papas, Gabino y Olga que, aunque esta etapa de mi educación ya no dependía de ellos siempre me han brindado su apoyo incondicional y me han motivado a alcanzar todo lo que me he propuesto. Muchas gracias. Los amo

A mi hermana Diana que siempre me escucha y trata de apoyarme en lo que puede, aunque luego no me entienda nada. Te amo.

A todos mis compañeros del laboratorio que siempre me han apoyado con lo que pueden y con ellos las horas en el laboratorio se vuelven más ligeras, en especial a Ivan que se tomó el tiempo para enseñarme a registrar aun cuando él tenía más trabajo que hacer y siempre me anda ayudando con las dudas que tengo. Muchas gracias.

También quiero agradecer a la doctora Refugio y Ana por la revisión y asesoramiento durante la realización del presente trabajo, así como su culminación

Y por último estoy profundamente agradecida con el doctor Manuel, que me ha enseñado tanto y siempre me anda apoyando con lo que puede, así como la oportunidad de trabajar juntos.

Índice

Resumen	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Canales iónicos dependientes de ligando	4
<i>Clasificación.....</i>	<i>5</i>
Superfamilia del receptor del asa Cys.....	8
- <i>Estructura</i>	<i>8</i>
- <i>Diversidad de la familia de receptores del asa Cys</i>	<i>10</i>
Canales–Receptores de cloruro dependientes de histamina	11
<i>Canales de cloruro dependientes de histamina en Procambarus clarkii</i>	<i>15</i>
La capacidad invasora de <i>Procambarus clarkii</i>.....	20
Antecedentes	22
Hipótesis	25
Objetivos	25
<i>General.....</i>	<i>25</i>
<i>Particulares.....</i>	<i>25</i>
Materiales y métodos	26
Resultados	34
Discusión	55
Conclusiones	62
Perspectivas	62
Literatura citada.....	63

Resumen

Los receptores ionotrópicos de histamina son miembros de la superfamilia de canales iónicos dependientes de ligando, específicamente de la familia del asa Cys. Su ligando, la histamina (HA), es el único neurotransmisor conocido que es liberado por los fotorreceptores de los artrópodos, por lo que se ha asumido que la sinapsis histaminérgica está conservada en el sistema visual de este grupo de organismos. Sin embargo, el entendimiento de estos receptores se ha basado en estudios en insectos dejando a un lado a los otros dos grupos de artrópodos por falta de genomas y transcriptomas disponibles. En el acocil *Procambarus clarkii*, se ha reportado la liberación de histamina en sus fotorreceptores, además también se han descrito conductancias de cloruro activadas por HA en neuronas del órgano X del lóbulo óptico, que junto con la glándula sinusal forman la principal estructura neurosecretora en crustáceos. Con el fin de investigar las características moleculares y fisiológicas de estos receptores en *P. clarkii*, clonamos del tallo ocular tres subunidades candidatas a formar estos canales Pc-HisCl1, Pc-HisCl2 y Pc-HisCl3 y los expresamos transitoriamente en células HEK (solo las subunidades Pc-HisCl1 y Pc-HisCl2). La proteína que codifica Pc-HisCl1 comparte una identidad del 50% con Pc-HisCl2 y Pc-HisCl3, mientras estas dos últimas presentaron una identidad de 60% entre ellas. La respuesta de los canales se estudió con la aplicación de histamina, así como agonistas para otros receptores como el GABA, la glicina y el glutamato. Los registros electrofisiológicos mostraron que las subunidades Pc-HisCl1 y Pc-HisCl2 son capaces de formar receptores homoméricos para la histamina, evocando corrientes entrantes con EC_{50} de 59.57 μ M (n_H de 1.58) y 23.11 μ M (n_H de 1.36), respectivamente, mientras los otros agonistas no activaron a estos receptores. Que en el acocil se estén expresando tres subunidades y no dos como en los insectos podría significar variación en el proceso visual entre estas especies. También se clonaron otras dos subunidades denominadas Pc-GlutCl1 y Pc-GlyCl1, sin embargo, la aplicación de los agonistas antes mencionados no evocó corrientes detectables en estos receptores.

Abstract

Histamine ionotropic receptors are members of the ligand-gated ion channel superfamily, specifically Cys-loop receptors. Their cognate ligand, histamine (HA), is the only known transmitter of all arthropod photoreceptors. These histaminergic synapses have been assumed to be conserved among insect visual systems. However, our understanding of the channels in question has thus far been based on insects studies leaving aside the other two groups due to lack of available genomes and transcriptome assemblies. In the crayfish *Procambarus clarkii* it has been shown that photoreceptors release histamine. In addition a histamine-activated Cl⁻ conductance has been described in the X-organ neurons that together with the sinus gland form the main neurosecretory structure of the eyestalk in crustaceans. To investigate the molecular and physiological characteristics of histamine channels from the crayfish *Procambarus clarkii*, we cloned from the eyestalk three candidate histamine ionotropic receptors Pc-HisCl1, Pc-HisCl2 y Pc-HisCl3 that were transiently expressed in HEK 293T cells (only Pc-HisCl1 and Pc-HisCl2 subunits). The encoded protein Pc-HisCl1 share 50% amino acid identity with Pc-HisCl2 and Pc-HisCl3, while Pc-HisCl2 and Pc-HisCl3 presented an identity of 60%. We studied the responses of channels to histamine, as well as to other agonists candidates, namely GABA, glycine and glutamate. Electrophysiological recordings showed that Pc-HisCl1 and Pc-HisCl2 subunits formed homo-oligomeric ionotropic HA receptors and evoked inward currents with EC₅₀ of 59.57 μM (n_H = 1.58) and 23.11 μM (n_H = 1.36), respectively, while the other molecules did not. Three subunits were cloned instead of two in insects, this could mean variation in the visual processing among these species. Furthermore, the cDNA of two subunits, named Pc-GlutCl1 and Pc-GlyCl1 were cloned. No ionic currents were evoked with any agonist.

Introducción

La función de las células nerviosas es recibir, procesar y transmitir información. La transferencia de señales entre las neuronas o de las neuronas a las células efectoras se logra en la unión intercelular especializada denominada sinapsis, la cual generalmente es mediada químicamente. Un rasgo característico de una sinapsis química es la hendidura sináptica; ésta consiste en un espacio extracelular (20–100 nm de ancho) que separa los elementos presinápticos (transmisor) y postsinápticos (receptor) de la sinapsis. Esta discontinuidad evita la transferencia eficiente de corriente entre las neuronas, por lo que es necesario la intervención de sustancias químicas (neurotransmisores) que difundan y transmitan la información (Patel & Feucht, 2011; Suszkiw, 2012).

Basado en sus características morfofuncionales, las uniones sinápticas pueden clasificarse en dos tipos: sinapsis no dirigida o de acción lenta; y sinapsis dirigida o de acción rápida. En la sinapsis no dirigida, los canales de la neurona postsináptica no son directamente dependientes del neurotransmisor, sino más bien de receptores acoplados a proteínas G y sistemas de segundos mensajeros. Estos receptores son denominados metabotrópicos y los potenciales sinápticos generados por la activación de estos receptores son de inicio más lento y más duradero (Greengard, 2001).

En cambio, en la sinapsis dirigida o de acción rápida los neurotransmisores liberados en la sinapsis se unen a canales iónicos dependientes de ligando (LGICs, acrónimo del inglés *ligand-gated ion channels*); este acoplamiento entre el neurotransmisor y el receptor conduce a la activación del canal-receptor permitiendo el flujo iónico a través de éste. El inicio de los potenciales sinápticos generados es rápido y ocurre en una escala de 10–100 ns (Suszkiw, 2012).

Canales iónicos dependientes de ligando

Como ya se mencionó, la activación de los canales iónicos dependientes de ligando dirige la transmisión sináptica rápida. Si bien el pasado evolutivo de los diferentes grupos de canales iónico es desconocido, su presencia se ha generalizado prácticamente en todos los organismos llevando a cabo procesos fisiológicos importantes, tales como la señalización de receptores, el mantenimiento del potencial de membrana en reposo (V_{rest}), la acumulación y transducción de energía electroquímica, así como la generación y propagación de potenciales de acción (Krůšek *et al.*, 2004).

Estos canales–receptores son proteínas integrales de membrana, los cuales forman un poro que permite el flujo regulado de iones a través de la membrana plasmática (Alexander *et al.*, 2009). La estructura es usualmente un oligómero ensamblado de subunidades alrededor de un poro, donde cada subunidad presenta cuatro dominios transmembranales hidrofóbicos, unidos por asas formadas por grupos hidrofílicos (Campbell & Cohall, 2016).

Los canales se abren mediante la unión de un neurotransmisor a un sitio o sitios ortostéricos, los cuales desencadenan un cambio conformacional que resulta en el estado de conducción (Bronson & Konradi, 2010). Una vez que el complejo canal–receptor es activado, un poro central lleno de agua se abre y conduce iones a una gran velocidad (hasta 10^7 iones·s⁻¹); como resultado, el potencial de membrana puede despolarizarse o hiperpolarizarse, dependiendo de la dirección del flujo de iones y del ion involucrado. El flujo iónico es pasivo y está impulsado por el gradiente electroquímico de los iones permeantes, siendo los principales el Ca²⁺, el Na⁺, el K⁺ y el Cl⁻ (Tovar & Westbrook, 2012). De manera similar a otras macromoléculas, los LGICs pueden existir en varios estados: en reposo, desensibilizados, inactivados, activados y diferentes sub–estados inducidos por varios moduladores alostéricos (Krůšek *et al.*, 2004).

Clasificación

Clásicamente en vertebrados, los LGICs se han dividido en tres familias: receptores P2X sensible a ATP; receptores a glutamato; y la superfamilia de receptores del asa Cys. Esta división se basó en criterios de biología molecular (secuencia de aminoácidos) y la estructura de las proteínas (estructura secundaria y terciaria).

La familia de receptores P2X son canales iónicos cuya actividad es excitadora, son dependientes de ATP y presentan una topología trimérica (Figura 1A, Khakh *et al.*, 2001). Cada subunidad presenta un extremo amino y carboxilo intracelulares y dos segmentos transmembranales. Los genes que codifican para las subunidades de los receptores P2X son 7 (P2X1–7) y se han encontrado en diferentes organismos que van desde amibas y gusanos parásitos, hasta peces y mamíferos (Fountain *et al.*, 2007).

Por otro lado, la familia de receptores a glutamato está formada por receptores catiónicos no selectivos (permean Na^+ , K^+ y Ca^{2+}) activados por glutamato que incluyen a los receptores NMDA (*N-metil-D-aspartato*), AMPA (*ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxalepropiónico*) y kainato (Figura 1B). Se ensamblan en estructuras tetrámicas. Cada subunidad del complejo comprende un dominio amino extracelular con su sitio de unión al ligando y tres dominios transmembranales, los dos primeros separados por un asa- p (Lodge, 2009). Están codificados por 18 genes en mamífero que se ensamblan para formar los tres tipos de receptores: AMPA (GluA 1–4), NMDA (GluN1, GluN2A–D, GluN3A y B) y kainato (GluK1–5).

Por su parte, la superfamilia de receptores del asa Cys consiste en un ensamble de cinco subunidades homólogas, dispuestas alrededor de un poro (Figura 1C). El motivo característico, el “asa Cys”, está situado en el dominio amino extracelular de cada subunidad y consiste en dos cisteínas que forman un enlace disulfuro separadas por 13 residuos de aminoácidos, varios de los cuales están altamente conservados para formar una secuencia característica (Remnant *et al.*, 2016). Cada subunidad contiene un dominio amino extracelular largo, un dominio carboxilo

extracelular corto y una región transmembranal formada por cuatro regiones helicoidales. En cada miembro de esta familia se han identificado diferentes tipos de subunidades que en acople forman receptores funcionales; por ejemplo, se han descrito al menos 17 genes que codifican para los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) (α 1–10, β 1–4, γ , δ y ϵ). No todas esas subunidades se asocian aleatoriamente para formar receptores, sino que se ensamblan bajo ciertos parámetros estrictos que conllevan a la formación de una amplia gama de receptores con diferentes propiedades farmacológicas y biofísicas, así como diferentes patrones de expresión dentro del sistema nervioso central (SNC) y en otros tejidos (Dani, 2015). Los avances en el entendimiento de la función al nivel molecular de esta familia de receptores ha resultado útil para el desarrollo de fármacos que permiten tratar una amplia gama de desórdenes como la adicción a la nicotina, la enfermedad de Alzheimer, la esquizofrenia y la depresión en el caso de los humanos (Changeux et al., 2015), mientras que en organismos invertebrados estos receptores se han utilizados como blanco de insecticidas para controlar las poblaciones de organismos específicos.

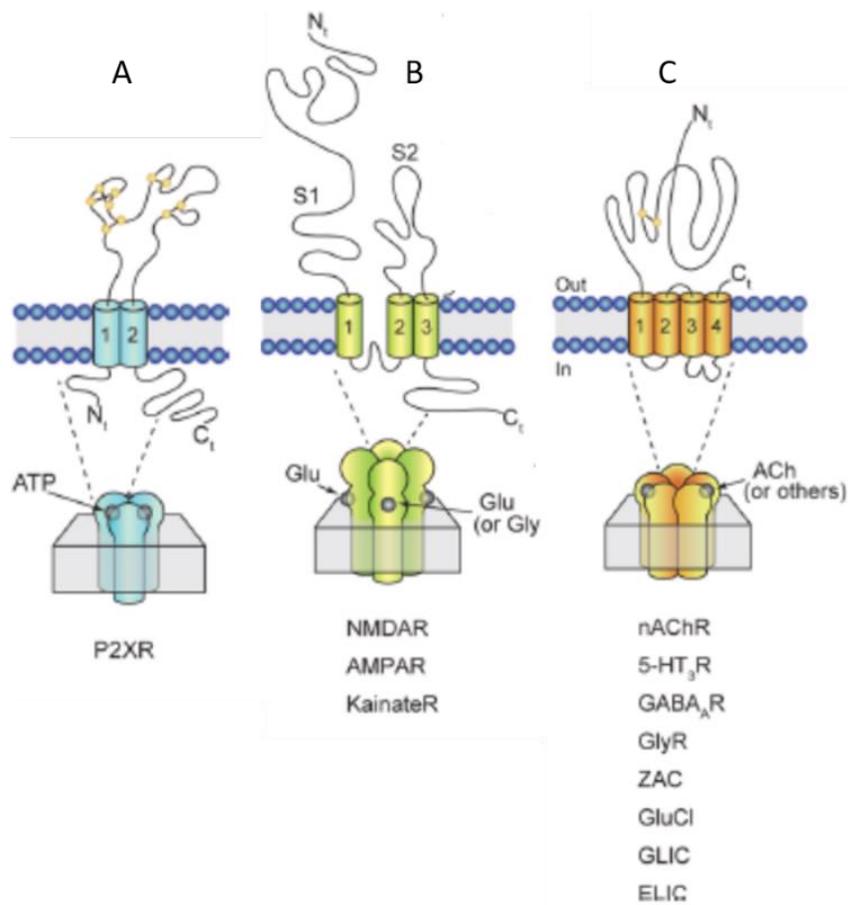


Figura 1. Esquema de las tres categorías estructurales de los canales iónicos activados por ligando. La topografía representativa de cada categoría indica las localizaciones de los extremos intra y extracelulares, el número de segmentos (cilindros enumerados) y los residuos de cisteínas que participan en la formación de los enlaces disulfuro (círculos amarillos). **A)** Receptores P2X; **B)** Receptores ionotrópicos activados por glutamato; y **C)** Receptores del asa-Cys. (Modificada de Lemoine *et al.*, 2012)

Superfamilia del receptor del asa Cys

Los receptores del asa Cys o receptores pentámericos, regulan funciones excitadoras e inhibitorias en el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP), así como en el sistema endocrino en especies que van desde pequeños invertebrados hasta mamíferos altamente evolucionados (Sankaranarayanan & Ryan, 2007).

-Estructura

Con experimentos bioquímicos y estudios de mutaciones sitio-especificas llevados a cabo en los nAChRs, se amplió la información sobre la estructura de los primeros receptores descubiertos de este grupo. Por consiguiente, los nAChRs fueron tomados como base para el estudio de los demás miembros de la familia (Corringer *et al.*, 2000). Con esto, se estableció que los receptores funcionales son formados por el ensamble de cinco subunidades iguales (homómero) o diferentes (heterómero). Cada subunidad consta de un gran dominio amino extracelular (ECD, derivado de sus siglas en inglés *extracellular Cys domain*) que tiene aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, cuatro segmentos transmembranales (M1–M4) que constituyen el dominio transmembrana (TMD, derivado de sus siglas en inglés *transmembrane domain*) y un dominio carboxilo extracelular corto (Figura 2A, Thompson *et al.*, 2010).

Estudios bioquímicos y de etiquetas moleculares dieron a conocer que el sitio de unión al ligando se localiza en el ECD (Figura 2B), específicamente en la interfaz entre dos subunidades adyacentes, las cuales se denominaron subunidad principal y subunidad complementaria (Thompson *et al.*, 2010). El ECD está constituido por 10 cadenas β plegadas, mientras que el sitio de unión está formado por tres asas peptídica (asas A-C) de la subunidad principal y tres hojas β (asas D–F) de la subunidad complementaria (Lynagh & Lynch, 2012). Solo uno o unos pocos aminoácidos dentro de cada asa interactúan con los agonistas, mientras que el resto de los residuos que forman las asas probablemente mantienen la estructura del sitio de unión y/o participan en los cambios conformacionales que resultan en la apertura

de canal (Thompson *et al.*, 2010). Además, gracias a los avances en las investigaciones en el ECD, se fueron identificando más sitios de unión para otros ligandos, que podían modular la cinética de los receptores (por ejemplo benzodiazepinas y anestésicos generales) (Hibbs & Gouaux, 2011).

El TMD de cada subunidad está formado por cuatro α -hélices transmembranales (Figura 2A, TMs: M1–M4), donde el dominio TM2 constituye las paredes del canal iónico; la secuencia de aminoácidos que forman este canal está muy conservada (PARVALGVTT, Unwin, 2014). Uno a uno los dominios TMs se conectan por asas intra y extracelulares; mientras que las asas TM1–TM2 y TM2–TM3 contienen segmentos peptídicos cortos (solo 4 o 5 aminoácidos de longitud con respecto a la estructura del canal nAChR cerrado, Miyazawa *et al.*, 2003), el asa intracelular que conecta al TM3 con el TM4 es más larga y se encuentra asociada generalmente con proteínas del citoesqueleto. A esta gran asa se le ha atribuido la modulación del receptor, la clasificación y el tráfico, y contiene portales (aperturas) que permiten el acceso de iones hacia dentro y fuera del poro, por lo que también influyen en la conductancia de los iones (Miller & Smart, 2010).

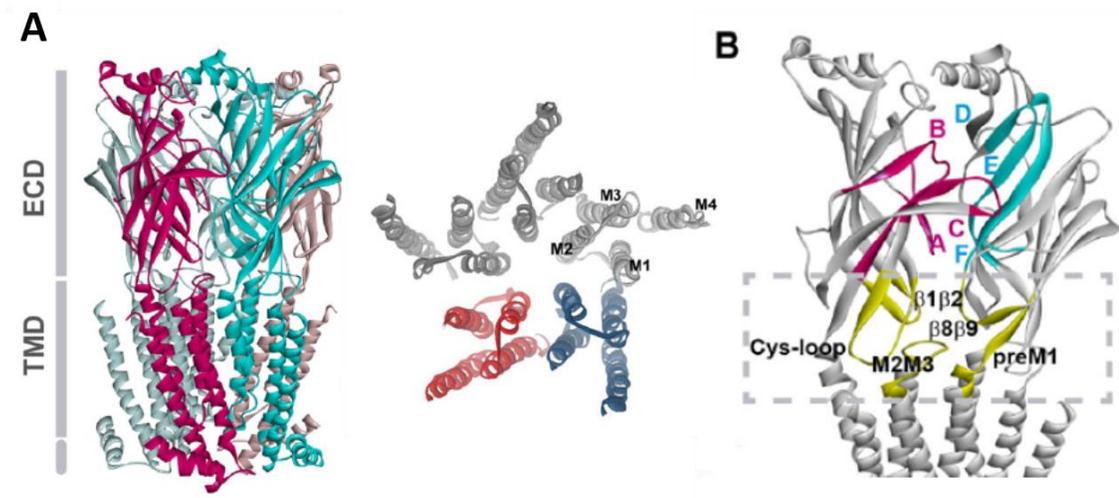


Figura 2. Esquema modelo de un receptor de nACh de la familia del asa Cys. A) Vista paralela a la membrana plasmáticas del receptor con distintos colores para identificar las 5 subunidades que lo compone. Los dominios funcionales incluyen al dominio extracelular (ECD), que forma los sitios de unión en las interfaces de las subunidades, y el TMD (esquema visto de manera transversal en el centro), que está formado por cuatro α -hélices de cada monómero (M1–M4), resaltando al M2 como el formador de las paredes del poro iónico; el dominio M4 está posicionado en la periferia del canal, mientras los dominios M1 y M3 están colocados en la posición intermedia. **B)** Subunidades adyacentes del ECD, que muestra las asas que contribuyen al sitio de unión y la región de acoplamiento (recuadro). Cada monómero ECD del receptor consta de una α -hélice NH₂ terminal y un núcleo de diez cadenas β . La interfaz entre el ECD y el TMD, denominada como la región del acoplamiento, es importante para acoplar la unión del agonista a la apertura del canal. (Modificado de Bouzat & Sine, 2018)

-Diversidad de la familia de receptores del asa Cys

Los miembros de esta familia en vertebrados se han dividido en dos grupos: 1) los canales selectivos a cationes con los receptores a serotonina (5-HT₃), los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) y los receptores activados por zinc (ZAC); y 2) los canales selectivos a aniones que incluyen a los receptores de glicina (GlyR) y los receptores para el ácido γ -aminobutírico (GABA_A, GABA_C) (Jaiteh *et al.*, 2016).

Sin embargo, en comparación con los vertebrados, en los invertebrados a menudo se expresan una variedad más amplia y más diversa de subunidades de los receptores de asa Cys, dependientes del mismo o de otros neurotransmisores (Jones & Sattelle, 2008). Por ejemplo, a pesar de que el GABA actúa de la misma manera que lo hace en vertebrados, es decir, generando hiperpolarización de la membrana plasmática, Beg & Jorgensen (2003) y Gisselmann *et al.*, (2004) reportan que la activación de receptores a GABA formados por las subunidades clonadas de *Drosophila melanogaster* GRD (receptor tipo-GABA/glicina) y LCCH3 (homólogo 3 de un canal de cloruro activado por ligando) y la subunidad EXP-1 en *Caenorhabditis elegans*, respectivamente, son capaces de permitir un flujo catiónico y por lo tanto favorecer la excitación celular por la aplicación del GABA.

Asimismo, otros receptores que presentan miembros con selectividades tanto catiónicas como aniónicas en invertebrados son los receptores nACh, 5-HT₃ y glicina, mientras que los miembros que solo se han encontrado en organismos invertebrados son los canales-receptores selectivos a cloruro dependientes de glutamato, pH e histamina (Lynagh & Lynch, 2012).

Canales–Receptores de cloruro dependientes de histamina

La amina biogénica histamina (HA) es un compuesto reconocido como molécula mensajera en la comunicación intercelular (Kanof & Greengard, 1978). En vertebrados funciona como un transmisor en el cerebro, algunas veces como hormona, así como mediador en sistemas periféricos. En la periferia, es responsable de diferentes acciones como son la contracción del músculo liso, la dilatación capilar y la estimulación de la secreción gástrica. Todos los efectos conocidos de la HA se transmiten a través de un conjunto de cuatro receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G diferentes, denominados H1, H2, H3 y H4 (Gastinger *et al.*, 2006).

De la misma forma que en los vertebrados, en los invertebrados la HA es un neurotransmisor (Witte *et al.*, 2002). El papel de la HA en la neurotransmisión fue por primera vez sugerido al identificar su presencia en neuronas de la babosa *Aplysia* (Weinreich & Yu, 1977), en el ojo compuesto y el lóbulo óptico de algunos

insectos (Hardie, 1987) y en las neuronas estomastogástricas (Marder & Hooper, 1985) y olfativas de la langosta (Orona *et al.*, 1990).

El sitio donde es más importante la acción de la HA es en el sistema visual de los artrópodos (Hardie, 1987; 1989). Por medio de técnicas inmunocitoquímicas se ha probado que los fotorreceptores de todas las clases artrópodos —los crustáceos, los insectos y los arácnidos (arañas y cangrejo herradura) — son reactivos a la HA (Fig. 2) y por lo tanto presumiblemente histaminérgicos (Stuart, 1999). Los botones terminales de las células fotorreceptoras retinales liberan la HA en la lámina ganglionar (Hardie, 1987). En condiciones de iluminación, los fotorreceptores retinianos están despolarizados, manteniendo el potencial de membrana de las células monopolares alejadas del umbral de disparo; al disminuir la intensidad luminosa, los fotorreceptores se hiperpolarizan y liberan menos histamina, lo que permite disminuir significativamente la concentración del neurotransmisor en la hendidura sináptica, excitando por desinhibición a las células monopolares. A pesar de que la sinapsis de los fotorreceptores en vertebrados e invertebrados difieren en varios aspectos, como es el transmisor utilizado (glutamato vs histamina) y la respuesta eléctrica a la luz (hiperpolarización en vertebrados vs despolarización en invertebrados), las células bipolares ON en vertebrados son funcionalmente similares a las células monopolares de la lámina (LMC) en artrópodos (Stuart, 1999).

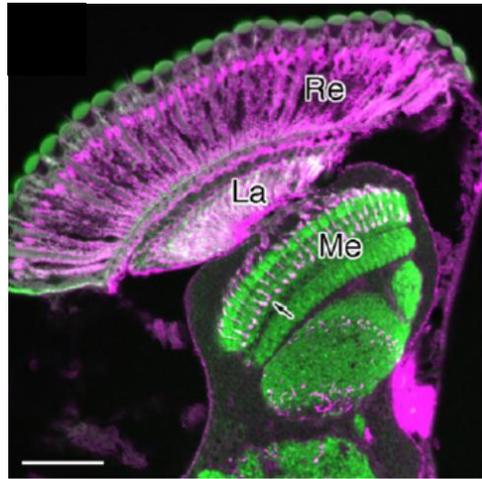


Figura 3. Inmunolocalización de histamina usando el anticuerpo PAN 19C en el lóbulo óptico en *Drosophila*. Sección horizontal congelada del ojo compuesto y lóbulo óptico, con doble etiqueta para histamina (canal magenta) y un marcador de vesícula sináptica, proteína de cadena de cisteínas (canal verde). Re, retina; La, lámina; y Me, médula. La barra de calibración corresponde a 50 μm . (Tomado de Stuart *et al.*, 2007).

Los receptores que transmiten el efecto de la HA en el sistema visual en artrópodos son canales de cloruro (Hardie, 1989). En invertebrados los antagonistas para el receptor tipo H_2 se han utilizado para caracterizar farmacológicamente estos canales, a pesar de que en los artrópodos son receptores ionotrópicos y no metabotrópicos como en los vertebrados (Stuart, 1999). Estos receptores fueron identificados al aislar neuronas de la lámina del primer ganglio visual de los lóbulos ópticos de varias especies de insectos, especialmente en la mosca. Por estudios de “patch clamp” de estas células se ha reportado para estos receptores conductancias unitarias de 40–60 pS y tiempos de apertura breves (<1 ms); con una unión cooperativa entre la HA y el receptor ($n=1.8-2.8$) y una baja afinidad ($K_D=24-50 \mu\text{M}$; los valores dentro de este rango dependen de la especie). En los insectos voladores más veloces los receptores tienden a presentar tiempo de apertura más breves y, por ende, ser más sensibles a la HA, caracterizados por una baja afinidad y una alta cooperatividad.

La clonación y expresión de estos receptores han confirmado su identidad como miembros de la familia del asa Cys. Hasta la fecha solo 6 receptores han sido clonados para los organismos: *D. melanogaster*, *Musca domestica* y *Papilio xuthus* (Akashi *et al.*, 2018; Kita *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2002); para cada organismo se reportaron dos subunidades. En *D. melanogaster* posterior a la clonación de ambas subunidades se pudo identificar que los homómeros HCLA están involucrados en la transmisión sináptica en la lámina, mientras los homómeros HCLB se encuentran localizados en las células gliales de la lámina y en la región de la médula (el segundo ganglio óptico) donde los axones largos de algunos fotorreceptores terminan (Pantazis *et al.*, 2008). Los canales HCLB también son responsables de la activación y mantenimiento del estado de vigilia (Oh *et al.*, 2013).

Mutaciones en *hclA* (inicialmente conocido como *ort*) en *D. melanogaster* conducen a una visión defectuosa, documentada con un electroretinograma (ERG); estos registros carecen de los componentes transitorios on y off. Los estudios de Coombe (1986) demostraron que la falta de componentes transitorios es el resultado de una transmisión sináptica dañada entre los fotorreceptores y sus blancos, las células grandes monopolares de la lámina, lo cual es consistente con los datos de la expresión y nos confirma el papel crucial de estos receptores ionotrópicos dependientes de la HA en el procesamiento de la visión.

La información que se tiene hasta el momento de estos canales solo se ha centrado en insectos, dominando aquellos con genomas y transcriptomas disponibles a pesar de que se ha confirmado la liberación de la HA en los otros grupos de los artrópodos, como son los arácnidos y los crustáceos. Estos últimos incluso entre los artrópodos están poco representados en comparación con los otros dos grupos (Yi *et al.*, 2018).

Desde hace algunos años, en el crustáceo *P. clarkii* se identificó que los fotorreceptores de los tallos oculares liberan HA, así como también se determinó la concentración plasmática de la HA en este organismo, la cual se eleva de manera transitoria de 25 ± 9 a 250 ± 41 μM durante la transición día/noche, manteniendo un bajo nivel basal (38 ± 11 μM) el resto del tiempo (Cebada *et al.*, 2006).

Canales de cloruro dependientes de histamina en *Procambarus clarkii*

Cebada y García (2007) reportaron por primera vez que los fotorreceptores retinianos del tallo ocular de *P. clarkii* eran reactivos a HA. Mediante técnicas de inmunocitoquímica, mostraron la inmunolocalización de la HA en la región de los omatidios y en las capas plexiformes externas e internas, apreciándose que la marca aparece muy localizada en los rabdómeros, estructura que está formada exclusivamente por las prolongaciones membranales de los fotorreceptores que constituyen un omatidio. Además, lograron observar marcas puntiformes en las capas plexiformes, sugiriendo que los botones terminales de las células fotorreceptoras liberan HA en la primera sinapsis de la vía visual (Figura 4A).

El tallo ocular en crustáceos es un grupo de órganos de la percepción visual, por lo que aparte de la retina en donde se localizan los fotorreceptores, también están dispuestas otras estructuras como son la lámina ganglionar, la médula externa, la médula interna, la glándula sinusal (GS) y la médula terminal (Figura 4F). La lámina ganglionar es el primer neuropilo óptico, está compuesto de 10 tipos de neuronas en los crustáceos decápodos. Contiene compartimentos sinápticos, dispuestos en hileras horizontales, cada compartimento sináptico contiene 7 axones terminales y las fibras del eje de ramificación de cinco neuronas monopolares de la lámina de segundo orden. Las fibras de las redes se derivan de axones que pasan del segundo neuropilo óptico, la médula externa. Los otros tipos de células que se pueden encontrar en la lámina son las neuronas amacrinas multicolumnares y dos clases de células tangenciales, neuronas T columnares y células monopolares multicolumnares. En cuanto a la médulas externa e interna todavía no es muy bien conocida su estructura en comparación a la de la lámina ganglionar.

Mientras, en la médula terminal se localizan 120 neuronas monopolares cuyos cuerpos celulares miden entre 20–45 μm , las cuales se agrupan en un núcleo denominado órgano X (OX). Cada una de estas células contribuyen con un axón amielínico para formar el tracto OX–GS que termina en una región muy vascularizada conocida como glándula sinusal (GS), la cual se encuentra en la

porción ventral entre las médulas externa e interna del tallo ocular. A nivel de la neuropila de la médula terminal, las células del OX se arborizan profusamente y es en este sitio donde reciben las entradas sinápticas provenientes de la retina y del ganglio cerebroide, que modula la actividad eléctrica y secretora (Figura 4F, Andrew *et al.*, 1978).

En esta última estructura, la médula terminal el grupo de trabajo de Cebada y García (2007) también encontró neuronas que fueron inmunorreactivas a la HA (Fig. 4B). Una en la región dorsomedial, en la orilla del núcleo órgano X, la cual proyecta su axón primario a través de la cápsula interna y se bifurca en axones más cortos que arborizan profusamente en la neuropila de la médula terminal, mientras que 4 neuronas monopolares fueron localizadas en la región dorsolateral en la médula terminal (Fig. 4C). El segmento inicial de sus axones es de casi 100 μm y después de penetrar la cápsula interna se arborizan de manera muy extensa en la neuropila de la médula terminal. Siendo este hallazgo de gran importancia puesto que el sistema OX–GS es el principal complejo neuroendocrino en los crustáceos, el cual es importante para la supervivencia en estos organismos ya que en él se produce una superfamilia de hormonas llamada Hormona Hiperglicemiante de Crustáceo (CCH), las cuales regulan una amplia variedad de funciones, por ejemplo, la motilidad, los niveles de azúcar en sangre, la reproducción, la posición pigmentaria de la retina y del tegumento, así como la actividad neuronal (Sedlmeier, 1988).

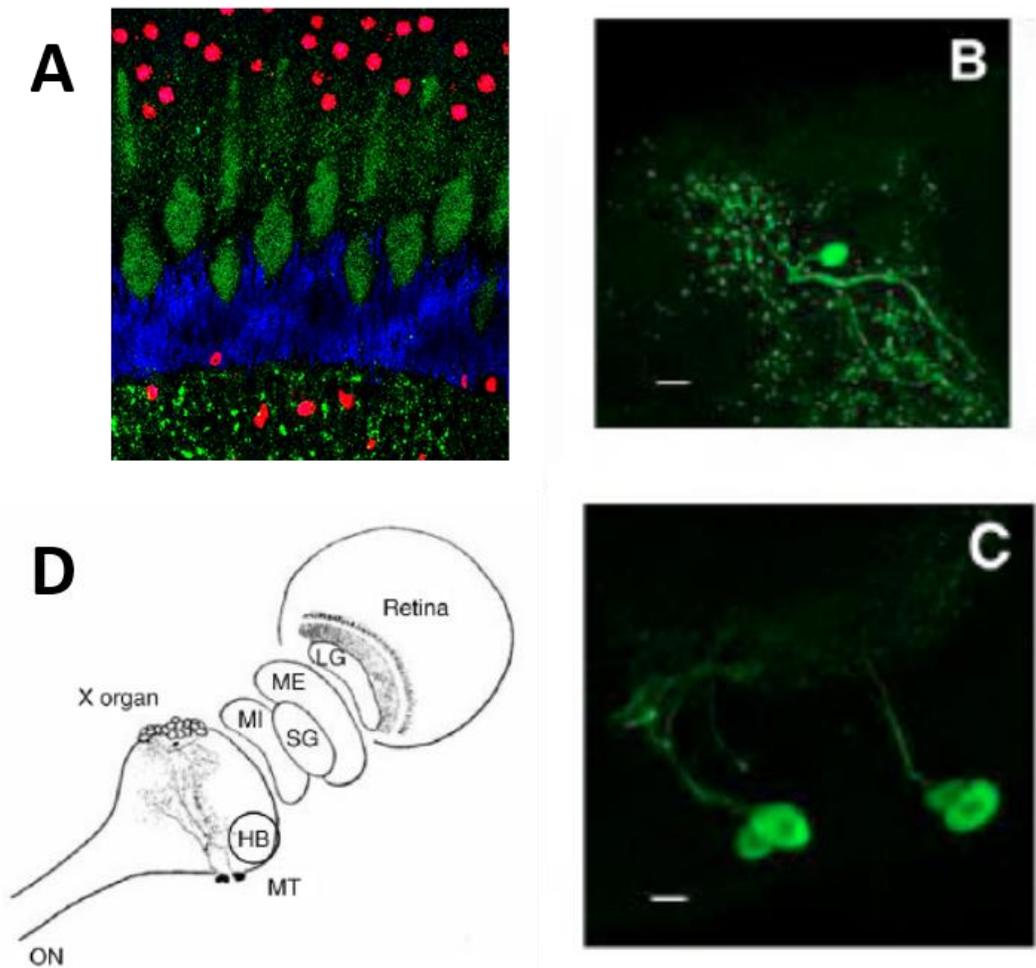


Figura 4. Distribución de la inmunorreactividad de la HA en el tallo ocular de *P. clarkii*. **A)** Micrografía de la retina del acocil obtenida por microscopia confocal, en donde se observa que las células fotorreceptoras (verde) son inmunopositivas a histamina. Los puntos rojos corresponden a los núcleos de los fotorreceptores y células monopolares (por debajo de la membrana basal). La región de color azul corresponde a la autofluorescencia del pigmento reflejante que se encuentra por arriba de la membrana basal. **B y C)** Neuronas inmunorreactivas a histamina localizadas en la médula terminal. **D)** Esquema del tallo ocular que resume la ubicación y la proyección axonal de las células inmunopositivas. LG, lámina ganglionar; ME, médula externa; MI, médula interna; MT médula terminalis; y GS, glándula sinusal. Barras calibración de 50 μ M para A y 20 μ M para B y C. (Las imágenes B, C y F fueron tomadas de Cebada & García, 2007, mientras que la figura A es del mismo grupo de trabajo pero son datos no publicados).

Para establecer el efecto de la HA sobre el sistema OX–GS, Cebada y García (2007) realizaron registros extracelulares multiunitarios de la actividad eléctrica espontánea propagada a través del tracto OX–GS, y simultáneamente registros intracelulares de los cuerpos del OX en la preparación del tallo ocular como se ilustra en la Figura 5A. Ellos reportan que la aplicación de 50 μM de HA reduce notablemente la actividad espontánea que se propaga a lo largo del tracto, provocando una hiperpolarización prolongada por una conductancia de Cl^- que reprimió la activación neuronal en las neuronas tónicamente activas (Figura 5B). Esta corriente se sugirió debido a que la hiperpolarización inducida por la HA estuvo acompañada por una disminución significativa de la resistencia de entrada de la membrana (88%) y dependía de la concentración de HA probada (Figura 5C). Por otra parte, en neuronas aisladas del órgano X, en registros en condiciones de fijación de corriente y voltaje en la modalidad de célula completa, la aplicación de 1.0 y 2.5 μM de HA provocó una corriente saliente sostenida, mientras que a concentraciones mayores de HA (5 y 10 μM) se indujo un componente de desensibilización rápido seguido de un componente de desensibilización lento en la corriente obtenida a un potencial de mantenimiento de -40 mV. La corriente evocada se invirtió en el mismo valor de potencial de equilibrio del Cl^- , con un EC_{50} de 3.3 ± 1 μM y un coeficiente de Hill de 2.6 ± 0.4 para dicha corriente (Figura 6A y B). A pesar de estos estudios todavía no han sido determinadas hasta la fecha las características moleculares de estos receptores en este organismo.

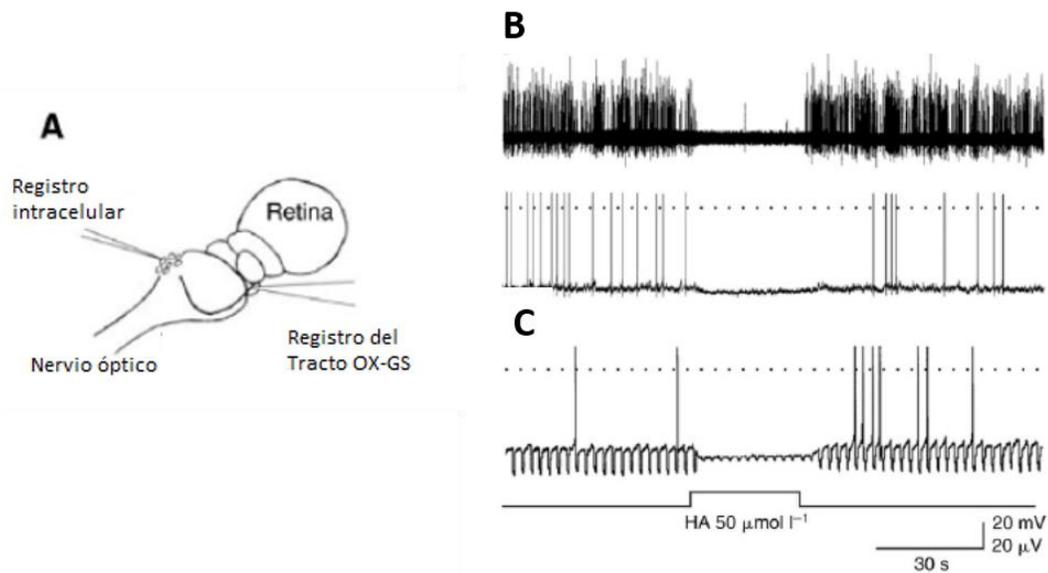


Figura 5. Inhibición de la excitabilidad por la aplicación de HA en el sistema OX-GS de preparaciones de tallo ocular aislado. A) Representación esquemática de la vista dorsal del tallo ocular aislado que ilustra la posición de los electrodos de registro. B) Efecto de la histamina (50 μM), aplicada por perfusión, sobre la actividad eléctrica espontánea, registrada simultáneamente extracelularmente desde el tracto OX-GS (tracto superior) e intracelularmente desde el cuerpo celular (trazo inferior). C) La aplicación de pulsos de corriente hiperpolarizante (20 pA, 750 ms, 0.5 Hz) permitió estimar que la resistencia de entrada provocados por la histamina disminuyo un 88%. (Modificado de Cebada & García, 2007).

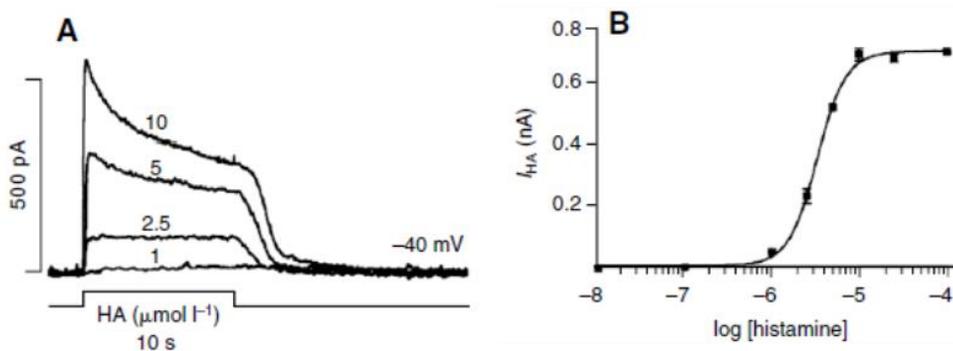


Figura 6. Curva concentración–respuesta para histamina en neuronas aisladas del órgano–X A) Registros de corriente obtenidos de la misma neurona a un potencial de mantenimiento de –40 mV, en respuesta a diferentes concentraciones de histamina (3 min de intervalo entre pulsos). B) Curva concentración–respuesta de la corriente activada por histamina, donde la EC₅₀ fue de 3.3 ± 1 μM. (Tomado de Cebada & García, 2007).

La capacidad invasora de *Procambarus clarkii*

Entre todos los crustáceos, el acocil de agua dulce *P. clarkii* se ha considerado como una de las especies de acociles más invasivas en el mundo. Es nativo del sur de Estados Unidos y del noreste de México, se ha introducido en África, Asia y Europa, principalmente debido a su recolección silvestre e introducción en sitios ajenos a su hábitat (Yi *et al.*, 2018). Algunos de los múltiples impactos de las poblaciones invasivas de *P. clarkii* son la depresión de anfibios (Gamradt & Kats, 1996) y la modificación en el ambiente de lagos debido al consumo de lechos de macrofilos y por la extensa excavación que provocan. Esto conlleva a una reducción consecuente de la penetración de luz que disminuye la producción de plantas; además su presencia genera una fuerte competencia con especies nativas, alterando la cadena trófica (Matsuzaki *et al.*, 2009).

La importancia de este organismo se asocia principalmente con la acuicultura y el comercio en acuarios, siendo la especie de cangrejo de río más cosechada del mundo y por lo tanto la más extendida (Yi *et al.*, 2018). Asimismo, su ciclo de vida corto y de una alta tasa reproductiva (pone de 300 hasta 5,000 huevecillos) ha llevado a esta especie a ser considerado como la de mayor plasticidad ecológica. También tiene el potencial para multiplicarse rápidamente, produciendo una descendencia casi desde el comienzo de su ciclo de vida. Estas características le permiten adaptarse a nuevos ambientes, ser tolerante a niveles bajos de oxígeno, a periodos prolongados de sequía y a permanecer en espacios subterráneos (Manfrin *et al.*, 2019).

De manera interesante, el uso del acocil en el campo científico es alto. Por ejemplo, las neuronas del órgano receptor abdominal han sido usadas para explorar los mecanismos de terapia fotodinámica; esta técnica lleva a la muerte de células expuestas a la luz, la cual resulta importante en el campo del cáncer (Fedorenko & Uzdensky, 2008). Por otro lado, los mecanorreceptores de *P. clarkii* han sido los primeros sistemas biológicos en los cuales se descubrió el fenómeno de resonancia

estocástica, un evento que ha sido útil en aplicaciones biofísicas, tecnológicas, así como en contextos biomédicos (Douglas *et al.*, 1993).

Hasta la fecha, muchos de los estudios moleculares que corresponden al género *Procambarus* se han enfocado a la genética poblacional (Yi *et al.*, 2018) e inmunidad (Zhang *et al.*, 2013). En los últimos años diversos experimentos han incrementado el conocimiento de las neuro-hormonas de crustáceos y de sus estructuras, pero desafortunadamente la información genómica de esos animales aún no es muy amplia (Webster *et al.*, 2012). Sin embargo, la caracterización del transcriptoma del tallo ocular de *P. clarkii* (Manfrin *et al.*, 2015) ha aumentado significativamente el conocimiento molecular que se tiene de esta especie. Este representa una nueva herramienta para identificar hormonas que podrían ser usadas como métodos de interrupción de su migración. Asimismo, se abre la posibilidad de investigar receptores ortólogos como los blancos utilizados en insecticidas para limitar su crecimiento (Hibbs & Gouaux, 2011).

Antecedentes

Los estudios que se han venido realizando sobre la clonación y expresión de los receptores ionotrópicos dependientes de la HA son pocos, pero han permitido determinar que generalmente son codificados por genes que expresan dos subunidades, así como algunas propiedades fisiológicas y características moleculares en insectos que es el grupo en el que principalmente se han enfocado estas investigaciones.

Estos canales-receptores fueron primero identificados en *D. melanogaster*, con una subunidad clonada conocida previamente como *ort* también nombrada como *hclA*, DM-HisCl- α 1, *hisCl2* y *Dm HA-Cl I* por diferentes grupos de trabajo, de 585 aa y otra nombrada como *hclB*, DM-HisCl- α 2, *hisCl1* y *Dm HA-Cl II* de 427 aa (Gisselmann *et al.*, 2002; Witte *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2002). El alineamiento de las secuencias clonadas y el análisis filogenético confirman que ambas subunidades tienen entre sí una identidad del 60–65%, así como una estrecha relación con el receptor ionotrópico a glicina de humano (45% de identidad con HisCl- α 1 y 43% con HisCl- α 2) debido a la posible existencia de un ancestro común. Las dos subunidades son capaces de formar canales de cloruro funcionales ya sea como homopentámeros o heteropentámeros. Cabe resaltar que la expresión de receptores homoméricos y heteroméricos provocan diferencias importantes en la afinidad por la HA, siendo el receptor conformado por la subunidad HisCl- α 2 (EC_{50} = 15.5–166 μ M) el que presenta menor afinidad y el receptor con la combinación de ambas subunidades, el que exhibe una mayor afinidad con un EC_{50} = 0.87–2.3 μ M (Pantazis *et al.*, 2008; Witte *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2002).

Más recientemente, en *M. domestica* el grupo de trabajo de Kita (2017) también clonó dos subunidades formadoras de receptores ionotrópicos a HA, designadas como MdHCLA (471 aa) y MdHCLB (423 aa). La identidad que comparten es del 60% y al comparar la subunidad MdHCLA con HisCl- α 1 de *Drosophila* obtuvieron una identidad del 86%, mientras que con MdHCLB y HisCl- α 2 fue del 89%. Ambas subunidades al ser expresadas fueron capaces de formar receptores funcionales

homoméricos, siendo MdHCLB la subunidad que muestra una sensibilidad 5 veces mayor a la HA con un EC_{50} de $6.28 \pm 1.05 \mu\text{M}$; sin embargo, la magnitud de la corriente de los canales formados por MdHCLA es 1.5 veces mayor que la de los canales MdHCLB. Por otro lado, al coexpresar ambas subunidades no se evocaron corrientes detectables por la aplicación de la HA. Un hecho interesante fue que los receptores formados por la subunidad MdHCLB también fueron activados tanto por GABA (EC_{50} $1.11 \pm 0.06 \text{ mM}$), como por la combinación de GABA-Histamina, el resultado de esta última combinación en las curvas concentración–respuesta se observó en un efecto aditivo por parte del GABA a los de la HA solo en las concentraciones en los rangos de 100 nM – $10 \mu\text{M}$ de histamina, atribuyéndolo a que el GABA puede actuar en el sitio ortostérico de los canales MdHCLB. Este resultado concordó con lo que ya había sido reportado para HisCl- $\alpha 2$ en *D. melanogaster* (Günter *et al.*, 2004b), subunidad que presenta un mayor porcentaje de identidad con MdHCLB. El GABA en ambos trabajos fue reportado como un agonista completo de los canales formados por estas subunidades.

Por último, Akashi y colaboradores (2018) de igual forma clonaron dos subunidades, las cuales denominaron PxHCLA (378 aa) y PxHCLB (427 aa) en la mariposa *P. xunthus*. Usando como referencia la estructura tridimensional de un canal de cloruro dependiente de glutamato que ha sido determinado en *C. elegans* (Hibbs & Gouaux, 2011), este grupo de trabajo identificó en las dos subunidades clonadas cinco aminoácidos que eran más o menos específicos para la unión de la HA en estos receptores: en el asa D la Phe¹¹⁵, en el asa B la Leu²¹², en el asa F la Val²³⁰ y la Ile²³⁵ y en el asa C la Tyr²⁵⁶. La expresión de estas subunidades de forma independiente o en combinación genera receptores funcionales, siendo el formado por la subunidad PxHCLB el que presenta una mayor sensibilidad a la HA (EC_{50} $5.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$), mientras el homómero PxHCLA y el heterómero PxHCLA/B presentan EC_{50} similares, $21.9 \pm 1.6 \mu\text{M}$ y $24.8 \pm 2.9 \mu\text{M}$, respectivamente. No obstante, los canales formados por estas subunidades, ya sea independientes o en conjunto, pueden ser activados por el GABA, y de igual forma que con la HA el

homómero P_xHCLB fue más sensible al GABA (EC₅₀ 2.7± 0.1 mM). Curiosamente, la aplicación simultánea de HA y GABA activan tanto a P_xHCLA y P_xHCLB con más potencia que cualquiera de los agonistas individualmente; consecuentemente, se atribuye estos resultados al efecto sinérgico que presentan la HA y el GABA sobre los P_xHCL en las regiones donde se colocan.

Al comparar los resultados reportados de todos estos trabajos podemos observar que las propiedades fisiológicas de los receptores a HA están básicamente conservadas entre los insectos; sin embargo, presentan diferencias en cuanto a la sensibilidad a la HA entre las subunidades de la misma especie y entre diferentes especies. De igual forma, la respuesta al GABA difiere principalmente entre las especies de moscas y mariposas, lo cual podría implicar variación en el procesamiento visual temprano entre especies, aunque sean del mismo grupo (Akashi *et al.*, 2018). Debido a la importancia del procesamiento visual para la supervivencia de los organismos, es necesario determinar las características moleculares y fisiológicas de los receptores ionotrópicos a histamina, así como sus patrones de expresión que presentan los otros dos grupos de los artrópodos como son los arácnidos y crustáceos, esto puede permitir comenzar a entender su funcionalidad en las células que los expresan, especialmente en el crustáceo *P. clarkii* puesto que como ya se mencionó, estos receptores ionotrópicos aparte de transmitir el efecto de la HA liberada de los fotorreceptores, también ha sido reportado que están presentes en las neuronas del órgano X el cual es parte del sistema OX–GS, el sistema neurosecretor más importantes en crustáceos. Esto puede ser de ayuda para comprender como el procesamiento visual ha divergido entre las especies de artrópodos, por la distinta modulación de estos receptores ionotrópicos, así como poder ser blancos de sustancias tóxicas, insecticidas y endectoparasiticida como lo han sido hasta ahora los canales–receptores de cloruro dependientes de GABA y glutamato (Knipple & Soderlund, 2010).

Hipótesis

Los receptores ionotrópicos para histamina presentes en el sistema visual en los insectos también están en el acocil *Procambarus clarkii*, pero presentan características moleculares y electrofisiológicas diferentes en comparación con los receptores clonados en insectos a pesar de ser especies relacionadas filogenéticamente al pertenecer todos estos organismos al grupo de los artrópodos

Objetivos

General

Realizar un análisis molecular y filogenético de los péptidos codificados por los transcritos identificados en el tallo ocular del acocil *P. clarkii* con potencialidad de formar receptores ionotrópicos para histamina, así como caracterizar electrofisiológicamente estas subunidades cuando se expresan en un sistema heterólogo.

Particulares

1. Identificar en el transcriptoma del tallo ocular de *P. clarkii*, mediante algoritmos de bioinformática, secuencias que potencialmente codifiquen subunidades de receptores ionotrópicos para histamina.
2. Diseñar oligonucleótidos específicos que permitan la amplificación de las subunidades candidatas.
3. Amplificar por transcripción reversa acoplada a la PCR los ADNc de las subunidades seleccionadas en el tallo ocular de *P. clarkii*.
4. Clonar en un vector de expresión de eucariontes las secuencias candidatas a ser formadoras de receptores del asa Cys.
5. Expresar transitoriamente las subunidades clonadas en las células HEK293T, utilizando el método de polietilenimina.
6. Evaluar electrofisiológicamente la funcionalidad de las subunidades clonadas.

Materiales y métodos

Animales, mantenimiento y disección

Todos los experimentos se realizaron utilizando acociles adultos de la especie *P. clarkii*. Los especímenes, provenientes del río Conchos (Chihuahua, México), fueron mantenidos en el bioterio (Cinvestav, Unidad Zacatenco) en agua recirculante a ~20 °C, con ciclos luz/oscuridad de 12 h/12 h y alimentados *ad libitum* con zanahorias. Para la disección, los animales fueron previamente anestesiados colocándolos en un recipiente con hielo durante un lapso de 30 min. El tallo ocular se extrajo cortando cuidadosamente con tijeras de disección y se colocó en solución salina la cual contenía (en mM): 205 NaCl, 5.4 KCl, 13.5 CaCl₂, 2.6 MgCl₂ y 10 HEPES, ajustada a un pH de 7.4 con NaOH. En seguida el exoesqueleto y el tejido conectivo que rodean al tejido nervioso fueron removidos bajo el microscopio. Una vez limpio se colocó en un homogeneizador para la extracción del ARN total.

Extracción del ARN total

El ARN total fue extraído utilizando la metodología basada en Trizol (Sambrook & Green, 2001), lavando previamente el material usado con NaOH 1 N. Se disecaron 6 tallos oculares y se depositaron en un homogeneizador, al cual se le agregaron 600 µl de Trizol. El tejido fue homogeneizado durante 30 s y en seguida transferido a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, se añadieron 2 volúmenes de cloroformo y se agito vigorosamente por 15 s. Posteriormente, la mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 2–5 min; transcurrido este tiempo se centrifugó a 18 000× *g* durante 10 min. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo nuevo (evitando tocar la interfase) y se adicionaron 0.7 volúmenes de isopropanol. Inmediatamente se mezcló el contenido invirtiendo el tubo varias veces y se incubo a temperatura ambiente por 5 min, para finalmente centrifugar la mezcla a 18 000× *g* durante 5 min. El sobrenadante se removió con cuidado, la pastilla se lavó con etanol al 75% y se centrifugó a 18 000× *g* durante 10 min. Finalmente, el etanol se

eliminó por completo, la pastilla se resuspendió con agua libre de nucleasas y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. El ARN total extraído se cuantificó por absorbancia de luz UV en un Epoch™.

Identificación de subunidades a clonar

Para la identificación de subunidades que forman receptores ionotrópicos dependientes de HA en *P. clarkii*, se realizó un alineamiento de la secuencia clonada en *P. clarkii* por Jiménez-Vázquez y colaboradores (2016), PcGABA_Aβ (esta subunidad forma receptores homoméricos selectivos a cloruro) . Para esto se utilizó la herramienta bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), particularmente la herramienta tblastn, utilizando la base de datos de transcriptomas ensamblados (TSA), con los parámetros predeterminados, en la cual se compara la secuencia de consulta (query sequence) con las proteínas potenciales reportadas por los transcriptomas ensamblados (para este caso el transcriptoma ensamblado del tallo ocular de *P. clarkii* elaborado por Manfrin *et al.*, 2015), evaluando identidad, similitud y homología en las secuencias.

Las características que se eligieron para seleccionar las secuencias que formaban posibles receptores ionotrópicos fueron las siguientes: 1) que tuvieran una longitud de 400–500 aminoácidos; 2) que los extremos NH₂ y COOH fueran extracelulares; 3) que mostraran una topología de cuatro segmentos transmembranales (la predicción se realizó por medio del software en línea TMHMM Server v. 2.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>); 4) que presentara el asa de cisteínas (Cys-Loop); y 5) que presentaran los aminoácidos que forman el filtro de selectividad (PARVALGVTT) lo más conservado posible. Una vez seleccionados los transcritos a cada uno se les realizó un Blast general, sin parámetros de exclusión predeterminados para identificar con que posible receptor presentaba mayor porcentaje de identidad.

Diseño de oligonucleótidos y síntesis de ADNc

A partir del análisis bioinformático, se obtuvieron las secuencias de nucleótidos de los transcritos de nuestro interés. Con estas secuencias se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada transcrito (Tabla 1), un par en sentido (forward) y otro par en antisentido (reverse), con el programa Clone Manager 9, Profesional Edition. El diseño de oligonucleótidos se realizó con las especificaciones siguientes: un contenido de GC del 50–60%; se evitaron las secuencias complementarias a sí mismas; el par de oligonucleótidos de una misma isoforma no debía presentar complementariedad entre oligos; una temperatura de fusión (T_m) de 55 °C y el oligonucleótido no se debía unir a otro sitio molde.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la amplificación de las secuencias elegidas

Subunidad candidata	Orientación	Nombre oligonucleótido	Secuencia oligonucleótidos
Pc21483 (secuencia GBEV01021443.1)	Sentido	Pc_GlutC11_f1	ctgtagcaggccatggagtg
		Pc_GlutC11_f2	cacctcaacggtccttcttc
	Antisentido	Pc_GlutC11_r1	ctcccatgccgtagggtttg
		Pc_GlutC11_r2	ggtgcatcctcttcgctttg
Pc25974v (secuencia GARH01020929.1)	Sentido	Pc_GlyC11_f1	cactactagcccgccttac
		Pc_GlyC11_f2	ctccaagactgctccgatag
	Antisentido	Pc_GlyC11_r1	tcagcaccacgagttgattc
		Pc_GlyC11_r2	aagtcaccgccatgagtag
Pc11400 (secuencia GBEV01011372.1)	Sentido	Pc_HisC11_f1	tgagttcgcaaaccaagagg
		Pc_HisC11_f2	gctggtggacgagcgttac
	Antisentido	Pc_HisC11_r1	ggaggtgtggcctttgttg
		Pc_HisC11_r2	gtagagtgctgcttcttcc
Pc-HisC12 (secuencia GBEV01005488.1)	Sentido	Pc_HisC12_f1	tctggtcttcacagctcttc
		Pc_HisC12_f2	ctcctccacacggaaacac
	Antisentido	Pc_HisC12_r1	cgattggtcgggtggtacaag
		Pc_HisC12_r2	ccatcgctgcacttctgag
Pc28241 (secuencia GBEV01028196.1)	Sentido	Pc_HisC13_f1	tgtactcgggtcatcaagtg
		Pc_HisC13_f2	tactgectcgcaacgatac
	Antisentido	Pc_HisC13_r1	aagcggcgtctgtatcac
		Pc_HisC13_r2	tcaagtaggcaggcctttg

El ADNc fue sintetizado a partir del ARN total obtenido utilizando la transcriptasa reversa ProtoScript® II (enzima recombinante de la transcriptasa reversa M-MULV: Moloney Murine Leukemia Virus, New England Biolabs, MA, USA), dNTPs, el oligonucleótido linker-dT (CCTAGGTCGACCGGTGATGAATTC(T)₁₈) y los oligonucleótidos en antisentido diseñados para las secuencias. El volumen final de cada una de las reacciones de retrotranscripción fueron 20 µl y se realizaron en dos fases (se muestran las concentraciones o cantidades finales de cada componente): en la primera fase se utilizaron 5.5 µl de ARN total (2.6 µg), 1 µl de solución de dNTPs (10 mM cada uno), 1 µl de una de dos mezclas equimolares de oligonucleótidos (120 µM total; mezcla 1 linker-dT, PcGlutCl1r1, PcGlyCl1r1 y PcHisCl2r1; mezcla 2 linker-dT, PcHisCl1r1, PcHisCl2r1 y PcGABA_A2, los oligos de esta última subunidad fueron diseñados por Valladares en el 2016 y fue utilizada como control positivo), ajustando el volumen a 12 µl con agua libre de nucleasas; estas mezclas se incubaron a 65 °C durante 5 min y a continuación se enfriaron rápidamente en hielo; en la segunda fase se añadió a cada reacción el regulador para la transcriptasa reversa ProtoScript II (1×), 40 U de inhibidor de ARNasas (Ribolock), 200 U de la transcriptasa reversa ProtoScript® II y 0.01 M de DDT. Posteriormente, la mezcla se incubó a 42 °C durante 60 min con un ciclo final de 20 min a 65 °C para inactivar a la transcriptasa reversa. Una vez terminada la reacción se agregaron 80 µl de H₂O libre de nucleasas al ADNc y éste se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Clonación de las secuencias candidatas de receptores para la histamina y otros agonistas.

Como molde para la amplificación del ADN para cada una de las secuencias elegidas, se utilizó el ADNc sintetizado previamente. Se realizaron dos amplificaciones por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la primera que se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl (se indican las concentraciones finales o cantidades de cada componente): regulador para la polimerasa de ADN Q5 (1×),

dNTPs (0.2 mM cada uno), 0.5 U de la polimerasa Q5 DNA pol (una polimerasa de ADN de alta fidelidad), potenciador de reacción (enhancer, 1×), oligonucleótidos específicos en sentido y antisentido (0.4 μM cada uno) y 5 μl del ADNc sintetizado. Para la segunda amplificación (amplificación anidada) las condiciones fueron similares, excepto que se utilizaron los oligonucleótidos que hibridaban internamente en el amplificado inicial (nombrados f2 y r2 para cada secuencia candidata, Tabla 1) cercanos a los extremos 5' y 3', y el molde que se utilizó fue 1 μl de la primera amplificación. El volumen final de ambas reacciones se ajustó con agua libre de nucleasas.

Una vez ensambladas las reacciones, se incubaron en un termociclador (Veriti® 96-Well Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific) bajo el siguiente esquema: I) 95 °C/2 min; II) 95 °C/30 s, 55 °C/30 s, 72 °C/75 s, 35 ciclos; III) 72 °C/5 min. Para la segunda amplificación las condiciones de ciclado fueron las mismas, solo que el número de ciclos en la etapa II se disminuyó a 25. Los amplicones se identificaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio (EtBr) o con SYBR Gold y purificados por columna de afinidad. La inserción en el vector pJet1.2/blunt se realizó como lo indica el fabricante empleando la liga. Tanto los purificados obtenidos de la amplificación, así como los plásmidos de los amplicones con el vector pJet1.2 fueron analizados utilizando enzimas de restricción y por secuenciación. La amplificación de los plásmidos fue mediante transformación por choque térmico de bacterias *Escherichia coli* de la cepa DH5α.

Las subunidades clonadas PcGlutCl1, PcGlyCl1, PcHisCl1 y PcHisCl2 fueron insertadas en el vector de expresión bicistrónico pIRES2-EGFP. Dicho vector contiene el promotor para el citomegalovirus (CMV) que promueve de manera intensificada la expresión de dichas subunidades.

Análisis de la secuencia de aminoácidos de las subunidades clonadas.

Una vez obtenidas las secuencias de las subunidades clonadas se les realizó un análisis comparativo con las secuencias reportadas por Mafrin *et al.*, (2015), primero

con las secuencias de nucleótidos y posteriormente con la secuencia de aminoácidos, para identificar si se presentó algún cambio importante en la secuencia. También se les volvió a realizar a cada de las secuencias un Blast general, sin parámetros de exclusión predeterminados para corroborar con que posible receptor presentaba mayor porcentaje de identidad.

Para identificar la región del péptido señal, este fue predicho usando servidores CBS del centro de análisis de secuencias biológicas (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>). Para el alineamiento múltiple o de pares de secuencias se usó ClustalW2, una herramienta en línea enfocada en el análisis molecular de secuencias, la cual que se encuentra en el portal <http://www.ebi.ac.uk/Tools>, mientras que para la construcción del árbol filogenético se utilizó el programa MEGA 6 (www.megasoftware.net) mediante el algoritmo “Maximum Likelihood” (Jones *et al.*, 1992).

Mantenimiento y transfección de las células HEK293T

Para evaluar la expresión funcional de las subunidades clonadas, se utilizó la línea celular HEK293T (ATCC® CRL–11268™). Las células se mantuvieron en medio DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, 50 U/ml de penicilina y 50 mg/ml de estreptomina. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Aproximadamente $1-3 \times 10^6$ células fueron sembradas en cajas Petri de cultivo (35 mm) dos días antes de la transfección, la cual se realizó con 2 µg del ADNc de cada subunidad clonada en el vector pIRES2-EGFP, utilizando el método de polietilenimina (PEI, 25 kDa) (Reed *et al.*, 2006). Posteriormente, de 24–72 h después de la transfección, aproximadamente 10^3 células fueron resembradas en cámaras de registro precubiertas con poli-L-Lisina e incubadas al menos 2 h antes de su uso. Las células transfectadas fueron identificadas por epifluorescencia utilizando la GFP como marcador al momento del registro.

Registros electrofisiológicos

Las células HEK transfectadas se registraron en fijación de voltaje utilizando la configuración de célula completa por la técnica de patch clamp (Sakmann & Neher, 1983). Todas las corrientes fueron obtenidas en solución salina normal que consistió (en mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂ y 10 HEPES, pH de 7.4 ajustado con NaOH. La composición de la solución interna fue (en mM): 5 NaCl, 140 KCl, 1 MgCl₂ y 10 HEPES. Las pipetas de registro se fabricaron con capilares de borosilicato (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) con resistencias de 4–7 MΩ las cuales se llenaron de solución interna. La aplicación de los agonistas consistió en disolver GABA, glutamato, glicina e histamina (a una concentración final de 50 μM) en la solución externa y fue aplicado por un sistema rápido de microperfusión conocido como tubo en Y como se muestra en la Figura 7 (Akaike & Harata, 1994), la cual permite modificar dinámicamente las soluciones extracelulares y la aplicación de diversas soluciones de prueba.

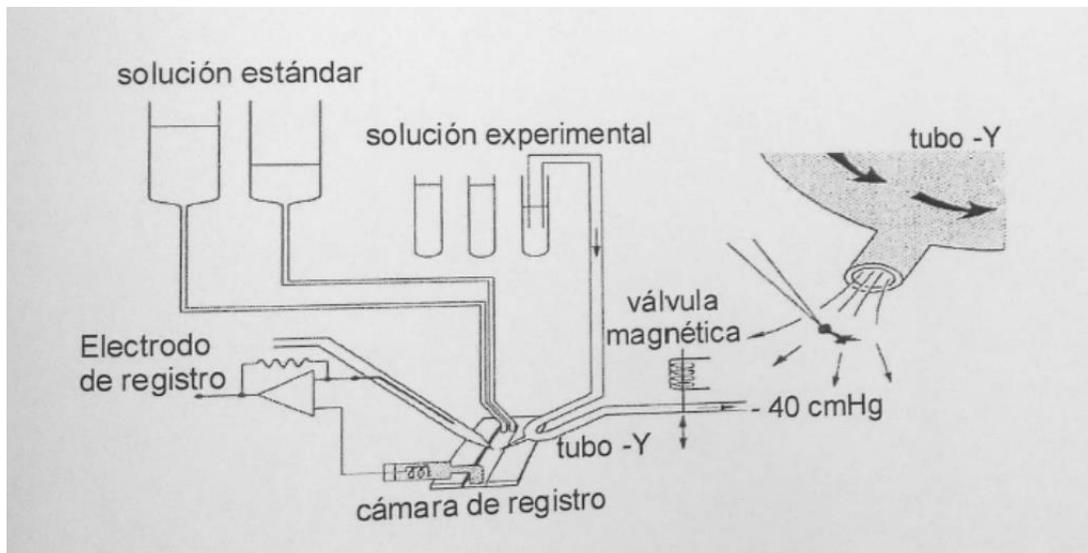


Figura 7. Dispositivo experimental del sistema de perfusión del tubo en "Y". Las células HEK 293T se cultivaron en la cámara de registro, en donde la salida del tubo en "Y" se colocó a cierta distancia de la célula en registro. Nótese que las soluciones de prueba aplicadas con este sistema permiten mantener la perfusión en el baño de manera constante.

Las corrientes fueron registradas con un amplificador Axopatch 200A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) filtradas a 10 kHz y digitalizadas a 5 kHz a la computadora utilizando una interfaz Digidata 1440A en conjunto con pClamp 10 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Tales corrientes evocadas por los agonistas se evaluaron primero a un potencial de mantenimiento de -60 mV; si algún agonista evocó corriente, ésta se evaluó a diferentes potenciales de mantenimiento desde -60 hasta $+40$ mV, en tanto que para la construcción de la curva concentración–respuesta las concentraciones utilizadas fue de 3, 10, 30, 100 y 300 μ M de histamina; para ambos protocolos los intervalos entre aplicaciones fueron de 2 min.

Análisis de resultados

Las corrientes generadas por la aplicación de los agonistas en las células transfectadas se registraron con el programa WinWCP V4.7.3 (University of Strathclyde) y el análisis de éstas, así como la elaboración de las gráficas se realizó usando el software pClamp 10.4 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA); los datos resultantes fueron ajustados con el programa SigmaPlot 14 (Systa Software, San José, CA, USA). Las curvas concentración–respuesta de las células registradas fueron normalizadas con los valores máximos promediados de al menos 6 células si se obtenían. Para el ajuste de las curvas con los datos promedio normalizados se utilizó una ecuación de Hill de cuatro parámetros.

Resultados

Identificación de las secuencias candidatas a clonación por análisis bioinformático.

Tras el análisis por BLAST (con el algoritmo tblastn), usando la subunidad PcGABA_Aβ como secuencia consulta (Jiménez-Vázquez *et al.*, 2016) y las secuencias depositadas en la base de datos por Mafrin *et al.* (2015), en donde se enlistan los transcritos del tallo ocular del acocil *P. clarkii*, se pudieron identificar 17 secuencias que presentaban un porcentaje significativo de identidad con PcGABA_Aβ. De estos transcritos se seleccionaron 5, los cuales cumplían con los siguientes criterios (Figura 8): 1) una longitud de 400–500 aminoácidos; 2) extremos NH₂ y COOH extracelulares; 3) una topología de 4 segmentos transmembranales (Figura 9); 4) presencia del asa de cisteínas (Cys–Loop); y 5) que presentaran los aminoácidos que forman el filtro de selectividad (PARVALGTT) lo más conservados posibles. Al realizar un BLAST general para cada una de las secuencias fue posible identificar homología de ellas con subunidades potenciales para receptores a histamina, glicina y canales de cloruro dependientes de glutamato, por lo que se decidió denominar a cada uno de estos transcritos con el nombre del receptor con el que presentaba una mayor homología, así como el ion permeante en cada uno de estos canales (Tabla 2).

PcGABAAβ	IRP----KYGESHV D VGITM H ILS I SSLSEVQ M DF T LDFYFRQ H WTD P R L SFP D R G GL D E	119
Pc-HisCl3	RPP----QSQGNPTVVYFHVTVMSL S IDESSMTYAADIFFAQ S W K DHRLR F PQ N MTGEY	165
Pc-HisCl1	RPP----KKDGRATTVYFHVTVMG I DSINENSMTYAADIFFAQ T W K DHRLR L PE N MTSDY	114
Pc-HisCl2	RPP----KKEGRPTKVYFHVTVMG I DSINENSMTYVADIFFAQ S W K DHRLR L PE N MTSGY	111
Pc-GlutCl1	IRPSGVNGTVDEPTIVMINMMFRS I QTIDDVKMEYSVQLTFREEV V DERLM F DDLGGRIK	111
Pc-GlyCl1	TWP---NSEASKATTVKI Q MFINSFGSLNAANMDYSIDVFLR Q HWN D PRLS F NHTG K DRF	105
	* . * : : . : : . * : : . : : * * * * : .	
PcGABAAβ	LTVGSEYLQKIWVPD T FFANEKKS Y FHTATT S NEMLRITN Q GKVLRSIRLTI T ASCPMNL	179
Pc-HisCl3	RLLPVSWLKDIWRPD A FFKNAKSVTFQ T MTIPNHYLWLHLD S TILYMKV L TLLLS C AMNF	225
Pc-HisCl1	RLLDLDWLKHLWRP D SFFKNAKQVTFQ T MTIPNH Y VWLFND N KILYMKV L TLLK S CAMNF	174
Pc-HisCl2	RLLEVDWLN D LWRP D SFFKNAKQVTFQ T MTIPNH Y VWLH K DSTILYMKV L TLL S CAMNY	171
Pc-GlutCl1	YL-TL T ETNKV M PD L FFKNEKLG H FHDIILPN V YLRIFP N GGVLYSIRISL T LSCPMNL	170
Pc-GlyCl1	TITNPEMQ R RIW K PD T YFNNV K DAEIHQ V TMPNILLRLYS N GDILYS M RVTLL T LACSM E F	165
	. : * * * : * * * : : * : : : . : * : : : : * * :	

Asa-Cys

PcGABAAβ	<u>QYFPMDRQLCIIIEISFGYSMDHIRLSWHAGDRSVVIESDVS L P Q F R V L G Y N R K T I I S S T</u>	239
Pc-HisC13	QSYPHDTQQCAMKIESLSHTTDDLIFVWDPLVP-LEVDDR I E L P Q L D L V S N E T G D C T Q V Y	284
Pc-HisC11	AIYPHDTQECKLQMESLSHTTEELVFEWESDIP-LVVDDS I E L P Q Q D I T L N Y T S D C T Q V Y	233
Pc-HisC12	AIYPHDTQECKLQMESLSHTTEDLVFDWDADVP-LEVDDNI E L P Q F D L V K N H T A D C T Q V Y	230
Pc-GlutC11	QLYPLDRQTCELLLASYGWTTEDLVFLWREGDP-VQITQNLHLPRFTLEKFLTEYCNSKT	229
Pc-GlyC11	ENYPFDAQVCGSSISSYANTVDVITYEWWKVDP-IQLPDELEIAQFDLLSHETESFTQHF	224
	: * * * * : * . : : : * : : . : : : :	
	TM1	TM2
PcGABAAβ	STGNYSRLLC E I M F V R S M G Y Y L I Q I Y I P S S L I V V I S W V S F W L N R S A T P A R V S L G V T T V L T	299
Pc-HisC13	STGNFTCLEVVFTFKRRLGYLFTYIPTCLIVIMSWISFWIKPEAVPARVTLGVTSLLT	344
Pc-HisC11	STGNFTCLEVVFLKRRRLGYVFTYIPTCLIVIMSWVFWIKPEIAPARVTLGVTSLLT	293
Pc-HisC12	ITGNFTCLEVVFLRRRLGYLFTYIPTCLIVIMSWVFWIKPEAAPARVTLGVTSLLT	290
Pc-GlutC11	NTGAYSCLKVDLLFKREFSYLLTIYIPCCMLVIVSWVFWLDQNAVPARVSLGVTLLT	289
Pc-GlyC11	VTGNFSGLVKVFSLRRQNGYHVLQTYVPTILIVSISWVFWLDPNAVGRVSLGVTLLT	284
	** : : * : : * . * : : : * : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	TM3	
PcGABAAβ	<u>MTTLMSSSTNAALPKISYVKSIDVYLGTCFVMVFASLLEYAAVGYMGKRIQMRKNRI</u> ----	355
Pc-HisC13	LSTQHANSQKSLPPVSYIKAIDFMFSSCTVFVFLSLMEYATVNIILGDMVDQKPEETFM	404
Pc-HisC11	LFTQQAKSQASLPPVSYIKTIDIFMSSCTVFVFMALIEYAVVNIILGDGSGETAKGPTKP	353
Pc-HisC12	LSTQHAKSQASLPPVSYIKIIDFMFSTCTVFVFLALMEYALVNVVLGDGPDTPPKNPKPT	350
Pc-GlutC11	MATQTSGINQSLPPVSYTKAIDVWTVGVCLTFVFGALLEFALVNYASRSDIHREQMKKQR-	348
Pc-GlyC11	LTTLASGIRAO L P P V S Y V K A I D V W I G M C M I M V F G A L L E F T L V N W L A N K K I V N P A S K----	340
	: * : . ** : * * * * : * : * : * : * : * : * : *	
PcGABAAβ	LAI-QKMAEQR-----KAATLDH-----SHASQ-----	377
Pc-HisC13	RRITRKLTLRRPRAQTNRNRNGGDVTLQEA-----	434
Pc-HisC11	EPKPSK-----ATDLAIKESRRF-----	371
Pc-HisC12	EKEAKSLHHHFS----SDKQDGGRLGFGSVSHHPLYSQTHYDHHSDLAAHHSNPYLHNSP	406
Pc-GlutC11	--RQWELEHQA-----ALE-----	360
Pc-GlyC11	---IFKIPKAV-----AED-----	351
	.	
PcGABAAβ	-----DHPDHAPKQTEVRYKLHDPKAHSKGGT-----	404
Pc-HisC13	ENGGLRDPEGEPRI-----MPAGPSLPHS--HH-----	460
PC-HISCL1	-----	371
Pc-HisC12	THGTITLAHGTPIRGPLTHGAALHSPYAHGPQMRPHYIHETPAHHYHSGLAHATPMHGP	466
Pc-GlutC11	-----AE-----HLDSDGPTT-----	371
Pc-GlyC11	-----VE-----DPAAKAPK-----	361
PcGABAAβ	LE-----NTINGRA----DEEAPPIANLLP-	426
Pc-HisC13	-----QHPHHAPAPP	471
Pc-HisC11	-----L-----	372
Pc-HisC12	LAHPIHNTLAHGTPMHATLSHGPPMHGALAHGTPIHVSRGHGNQTYDNVMCPPLPSVPPP	526
Pc-GlutC11	-----FAM-----XARQCEIH----MH	384
Pc-GlyC11	-----	361
	TM4	
PcGABAAβ	--HKDINKGL-----NKLYGCSPSDIDKYSRIVFPVCFVCFNLMYWII	467
Pc-HisC13	PPPPGALGMIAYGSTPNIPRSMATEMKEAREKAILVDRFSRVLFPLSFTVLNLLYWAV	531
Pc-HisC11	LGEPKPAG-----PSPAQIRRGQALMVDVRSRYLFPISFAILNTVYWIS	417
Pc-HisC12	PPPPTRLPG-----PTPAQKRRARAILVDRFSRVFPSTFGLINGVYWLI	571
Pc-GlutC11	PQPPRRCCGS-----WLSKFPSRSKRIDVISRITFPLVFALFNVVYVST	428
Pc-GlyC11	-----TYMNHARAFDRLCRALEPITFFVFNLIIYWPY	392
	. * . * * * * : * : * *	

Figura 8. Comparación de los péptidos codificados por los transcritos seleccionados del transcriptoma del tallo ocular (Manfrin *et al.*, 2015), con la subunidad clonada por Jiménez-Vázquez *et al.*, (2016). Las secuencias Pc-HisCl1, Pc-HisCl2, Pc-HisCl3, Pc-GlutCl1 y Pc-GlyCl1 (número de referencia: GBEV01011372.1, GBEV01005488.1, GBEV01028196.1, GBEV01021443.1 y GARH01020929.1, respectivamente) muestran un par de cisteínas que dan lugar al asa-Cys, así como cuatro segmentos transmembranales (TM1-TM4), los cuales están subrayados e identificados por su nombre correspondiente. En el recuadro en azul se observa la secuencia conservada que forma el filtro de selectividad

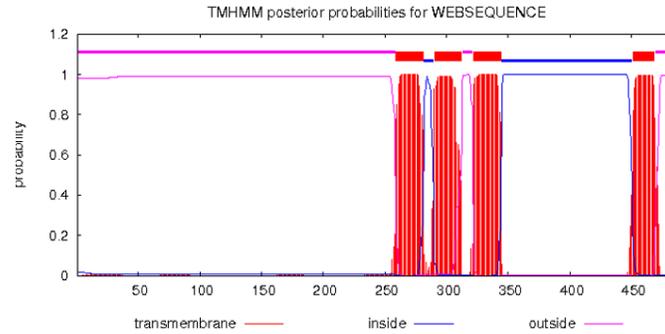


Figura 9. Predicción de los dominios transmembranales presentes en la subunidad Pc-HisCl1. De igual manera se predijeron los dominios para las subunidades Pc-HisCl2, Pc-HisCl3, Pc-GlutCl1 y Pc-GlyCl1 concordado todas las subunidades con lo esperado. Los 4 dominios existentes se encuentran separados por asas localizadas tanto en el lado intracelular como en el lado extracelular.

Tabla 2. Información de las secuencias seleccionadas

	Transcrito seleccionado	Nombre propuesto	Porcentaje de identidad con PcGABA _A β
Histamina	Pc11400	Pc-HisCl1	29.69%
	Pc5510	Pc-HisCl2	34.04%
	Pc28241	Pc-HisCl3	29.31%
Glicina	Pc25974	Pc-GlyCl1	32.01%
Canal de cloruro dependiente de glutamato	Pc21483	Pc-GlutCl1	37.30%

Clonación molecular de las secuencias putativas.

Los oligonucleótidos diseñados para las subunidades identificadas se emplearon para amplificar cada una de las secuencias candidatas mediante RT-PCR. Estos oligonucleótidos hibridan en las regiones 5'- y 3'-UTR (regiones no traducidas) de cada una de las secuencias, como se esquematiza en la Figura 10. En la Tabla 1 se enlistan los oligonucleótidos que fueron utilizados para amplificar cada una de las subunidades.



Figura 10. Esquema de la localización de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de los ADNc de las subunidades formadoras de receptores del asa Cys

Tras la síntesis de ADNc a partir de ARN total obtenido del tallo ocular de acocil y los oligonucleótidos específicos en antisentido (r1), este fue utilizado para realizar una primera amplificación por la PCR con los oligonucleótidos que hibridan más externamente (f1-r1) para cada una de las subunidades (Pc-GlutCl1, Pc-GlyCl1, Pc-HisCl1 y Pc-HisCl2). Como se puede observar en la Figura 11, se obtuvieron amplicones de ~1,600 pb para Pc-GlutCl1 y Pc-GlyCl1 (carriles 1 y 2, respectivamente), de ~2,100 para Pc-HisCl2 (carril 3), mientras que para Pc-HisCl1 (carril 4) no hubo amplificación. Como control positivo se utilizaron los oligonucleótidos diseñados por Valladares (2016) para la subunidad PcGABA_A2 (carril 5, ~1,600pb).

Al obtener resultados positivos en la mayoría de las subunidades se procedió a hacer una segunda amplificación (anidada) con los oligonucleótidos específicos f2-r2 para cada una de los transcritos (Figura 8). Como se observa en la Figura 12, para las subunidades Pc-GlutCl1, Pc-GlyCl1 y Pc-HisCl2 (carriles 1, 2 y 3, respectivamente) se obtuvieron amplicones de tamaños similares a los de la primera

amplificación; en tanto para la subunidad Pc-HisC11 (carril 4) en esta ocasión se obtuvo un amplificado de ~1,400 pb, que concuerda con el tamaño esperado ya que los oligonucleótidos internos están más alejados de los extremos. En el caso de Pc-HisC13, en la Figura 13 se puede ver en la primera amplificación con oligonucleótidos f1-r1 (carril 1) un amplicón del tamaño esperado (~1,800 pb) y al realizar la PCR anidada con oligonucleótidos f2-r2 se obtuvo un tamaño similar al primero como se observa en el carril 3 de la misma Figura.

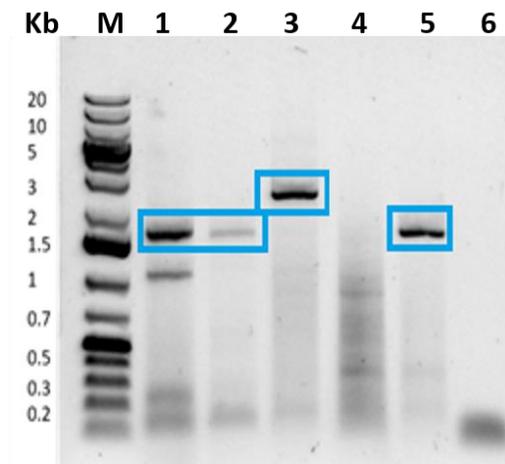


Figura 11. Amplificaciones por RT-PCR de las subunidades predichas Pc-GlutC11, Pc-GlyC11, Pc-HisC11 y Pc-HisC12 con los oligonucleótidos f1-r1. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (teñido con bromuro de etidio) de los amplicones. Carriles 1 y 2 para las subunidades Pc-GlutC11 y Pc-GlyC11, respectivamente, con un tamaño ~1,600 pb (recuadro azul). Para la subunidad Pc-HisC12 se esperaba un tamaño ~2,100 pb (carril 3). En el caso de la subunidad Pc-HisC11 no hubo la amplificación esperada en esta reacción (carril 4). En el carril 5 se utilizaron los oligonucleótidos diseñados por Valladares (2016) para la subunidad PcGABA2 como un control positivo (tamaño de ~1,600 pb). Carril 6, control negativo. (M) marcador de peso molecular para ADN de 1 kpb.

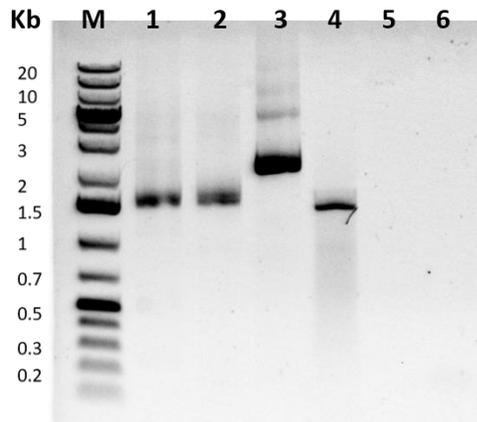


Figura 12. Amplificación por PCR anidada de las subunidades Pc–GlutCl1, Pc–GlyCl1, Pc–HisCl1 y Pc–HisCl2 con oligonucleótidos específicos f2–r2. Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. El molde utilizado fue una alícuota de la primera amplificación; carril 1 y 2 para las subunidades Pc–GlutCl1 y Pc–GlyCl1, respectivamente, con un tamaño ~1,600 pb. En el carril 3, con un tamaño ~2,000 pb, se encuentra el amplificado de la subunidad Pc–HisCl2. Para la subunidad Pc–HisCl1 en esta ocasión sí se observa el amplificado en el carril 4 con un tamaño ~1,400 pb. Carriles 5 y 6 controles negativos, (M) marcadores de peso molecular para ADN de 1kpb.

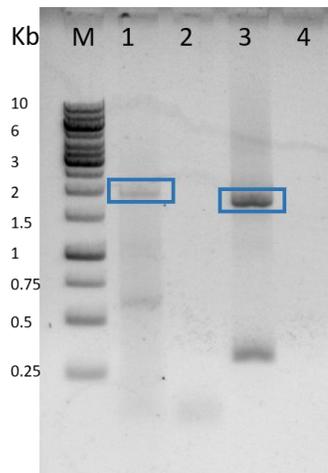


Figura 13. Amplificación de la subunidad Pc–HisCl3. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio. En el carril 1 se muestra la primera amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos f1-r1 con un tamaño de ~1800 pb (recuadro azul), mientras en el carril 3 se observa el amplicon resultante por la PCR anidada con oligonucleótidos específicos f2-r2 con un tamaño de ~1700 pb (recuadro azul). Carriles 2 y 4 controles negativos, (M) marcadores de peso molecular para ADN de 1 kpb.

Si bien los tamaños de los amplificadores concuerdan con lo esperado, estos se caracterizaron por digestión con diferentes enzimas de restricción para corroborarlo. Las enzimas se eligieron para cada subunidad basado en los sitios predichos en las secuencias descritas en el transcriptoma. Las enzimas empleadas en cada caso fueron: BstEII y BsrGI (Pc–HisCl1, Figura 14A); EagI y SphI (Pc–HisCl2, Figura 14B); XhoI y BamHI (Pc–HisCl3, Figura 14C); BstEII y SphI (Pc–GlutCl1, Figura 14D); BclI y EagI (Pc–GlyCl1, Figura 14E). Los fragmentos resultantes de estas digestiones concordaron con los tamaños esperado (Tabla 3).

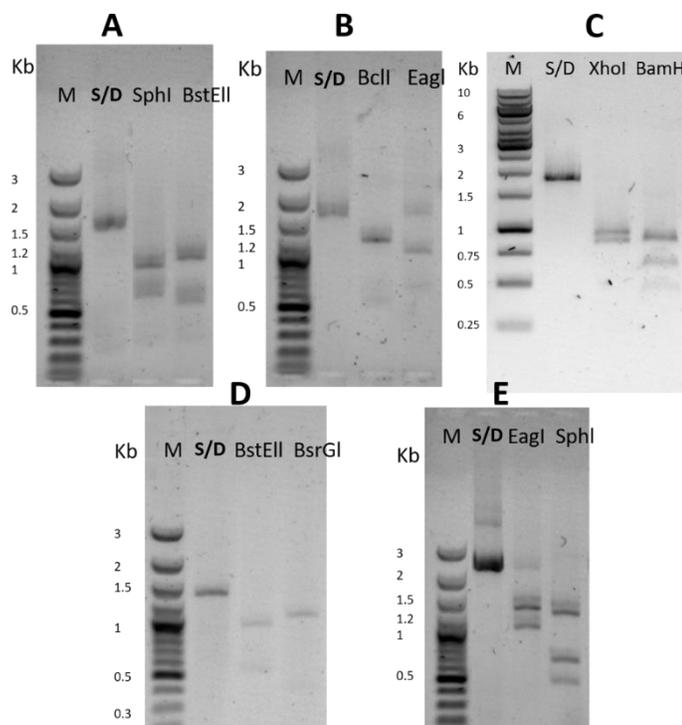


Figura 14. Caracterización por restricción de los amplificadores purificados Pc–HisCl1, Pc–HisCl2, Pc–HisCl3, Pc–GlutCl1 y Pc–GlyCl1. Electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con bromuro de etidio. En paréntesis se indican los tamaños esperados para cada digestión. **A)** Amplificado Pc–HisCl1 digerido con BstEII (461 y 860 pb) y BsrGI (982 y 342 pb) **B)** Análisis de restricción con las enzimas EagI (1,160 y 700 pb) y SphI (950, 560 y 380 pb) del amplicon Pc–HisCl2. **C)** Caracterización del amplificado purificado pc–HisCl3 utilizando las enzimas XhoI (988 y 875 pb) y BamHI (859, 560 y 440 pb) **D)** Digestión del amplicon Pc–GlutCl1 con SphI (800 y 600 pb) y BstEII (500 y 900pb) **E)** Caracterización del amplificado Pc–GlyCl1 con BclI (1,000 y 353 pb) y EagI (560 y 800 pb) (M) marcador de peso molecular de ADN de 100 pb, (S/D) amplificado sin digerir.

Tabla 3. Tamaños esperados tras la digestión de los amplificadores.

Amplificado	Enzima	Tamaño esperado
Pc-HisCl1	BstEII	461 y 870 pb
	BsrG1	982 y 340 pb
Pc-HisCl2	EagI	736 y 1,161 pb
	SphI	950, 561 y 380 pb
Pc-HisCl3	XhoI	988 y 875 pb
	BamHI	852, 560 y 440 pb
Pc-GluCl1	BstEII	500 y 900 pb
	SphI	814 y 601 pb
Pc-GlyCl1	BclI	1,010 y 352 pb
	EagI	560 y 800 pb

Una vez comprobado por análisis de restricción que los amplicones obtenidos corresponden con las subunidades Pc-GlutCl1, Pc-GlyCl1, Pc-HisCl1, Pc-HisCl2 y Pc-HisCl3, se procedió a la clonación de dichas subunidades en el vector pJet1.2; posteriormente clonas de cada una de las subunidades se analizaron por digestión con al menos dos enzimas de restricción. Inicialmente se empleó BglI para poder corroborar los tamaños de los insertos (datos no mostrados). En seguida se eligieron tres clonas para cada una de las subunidades Pc-GlutCl1 (Figura 15A), Pc-GlyCl1 (Figura 15B) y Pc-HisCl3 (Figura 15C), las cuales se caracterizaron con PstI. Debido a que el vector pJet1.2 presenta extremos romos la clonación no es dirigida, lo que tiene como consecuencia que los insertos se ligan en el vector en cualquiera de dos orientaciones posibles, por lo que los patrones esperados para la subunidad Pc-GlutCl1 era de 3,900 y 470 pb si se encontraba en un sentido y de 2,700 y 1160 pb si se encontraba en el otro, mientras para Pc-HisCl3 el patrón esperado era de 2,900 y 1,743 pb para una dirección y para la otra de 3,900 y 681 pb. En cambio, para la subunidad Pc-GlyCl1 la clonación en cualquiera de las dos posibilidades generaba tamaños similares (100, 900 y 250 pb).

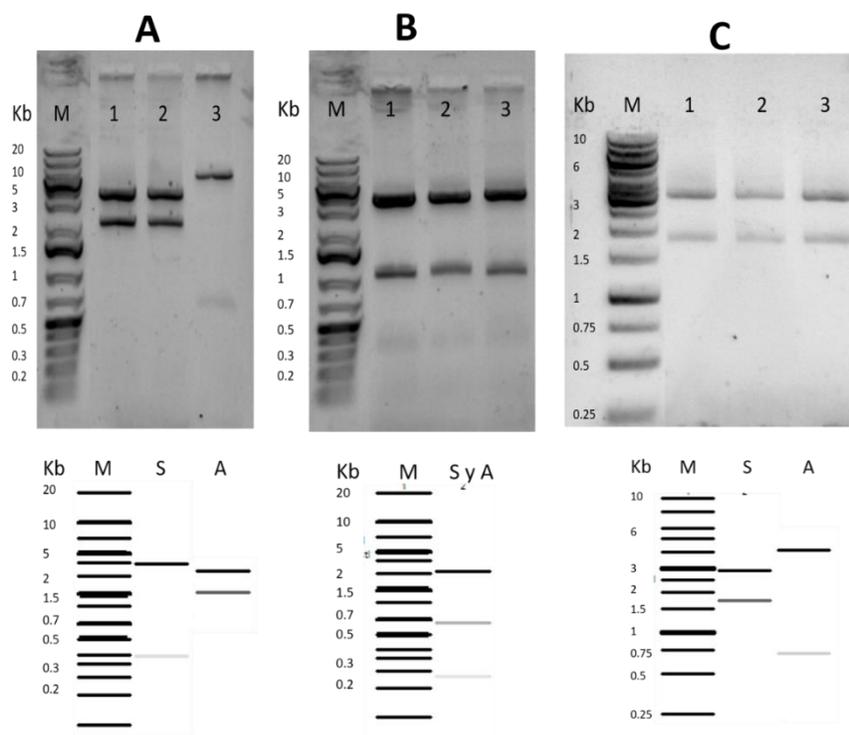


Figura 15. Análisis de restricción con la enzima PstI de 3 plásmidos pJet1.2 con las subunidades Pc–GlutCl1, Pc–GlyCl1 y Pc–HisCl3. Los fragmentos resultantes de las digestiones con PstI para cada subunidad se separaron en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio (parte de arriba). Los patrones *in silico* se muestran bajo de cada uno de los geles con las subunidades ligadas en una u otra orientación (S y A). **A)** Caracterización de los plásmidos pJet1.2 con la subunidad Pc–GlutCl1, los plásmidos seleccionados presentaron ambos patrones de ligación **B)** Análisis de las clonas pJet1.2–Pc–GlyCl1, en las que se puede observar el mismo patrón debido a que la inserción de la subunidad en ambas orientaciones genera tamaños similares **C)** Caracterización de los plásmidos pJet1.2–Pc–HisCl3, todas las clonas presentan los tamaños en la primera orientación (S) como se puede ver en el análisis *in silico*. (M) marcador de peso molecular de ADN de 1 kpb.

En el caso de las subunidades Pc–HisCl1 (Figura 16A) y Pc–HisCl2 (Figura 16B) se caracterizaron con la enzima EagI, y de igual forma se escogieron 3 plásmidos. Para la subunidad Pc–HisCl1 el tamaño encontrado correspondía a los insertos en antisentido de 3,200 y 1,070 pb. Por último, para la subunidad Pc–HisCl2 coincidió con el patrón del inserto en uno de los sentidos (4,000 y 778 pb aproximadamente). Con tales datos se concluyó que se logró clonar con éxito las subunidades

Pc–GlutCl1, Pc–GlyCl1, Pc–HisCl1, Pc–HisCl2 y Pc–HisCl3 por lo que se mandaron a secuenciar las clonas con el fin de corroborar los resultados.

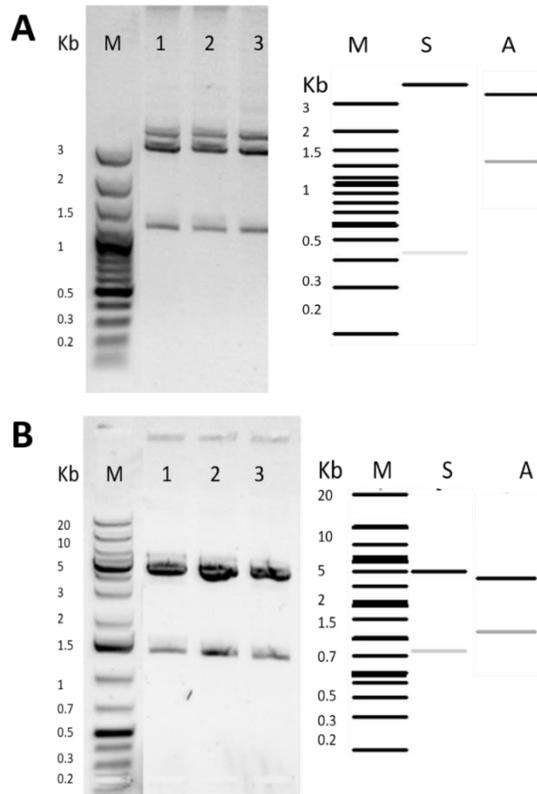


Figura 16. Caracterización por restricción con la enzima EagI de 3 plásmidos pJet1.2 con la subunidad Pc–HisCl1 y Pc–HisCl2. De cada figura en el lado izquierdo se observa una electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (teñido con bromuro de etidio), mientras del lado derecho se presentan los análisis *in silico* de cada una de las subunidades ligadas en una u otra orientación (S y A). **A)** Análisis de las clonas pJet1.2 con la subunidad Pc–HisCl1; los fragmentos resultantes concuerdan con la inserción de la subunidad en la orientación S del análisis *in silico* **B)** Caracterización de los plásmidos pJet1.2–Pc–HisCl2; como se puede observar las 3 clonas presentan el patrón del análisis *in silico* en la orientación S. (M) marcador de peso molecular de ADN de 1 kpb.

Características moleculares de las subunidades formadoras de receptores ionotrópicos a histamina

En general, una vez obtenidas las secuencias de las clonas de todas las subunidades, se observó que hubo diferencias en las secuencias del ADN al compararlas con las del transcriptoma, sin embargo, estos cambios de nucleótidos no causaron la sustitución de aminoácidos en la proteína entre la subunidad clonada y la predicha para el caso de las subunidades Pc–GlutCl1, Pc–GlyCl1, Pc–HisCl1. En las subunidades donde sí se encontró un cambio de aminoácidos fue en Pc–HisCl2, de una Leu a una Arg en la posición 14; este cambio se localiza dentro de los primeros cuarenta aminoácidos, en donde se encuentra la secuencia de aminoácidos del péptido señal (Figura 17). De igual manera, en la subunidad

Pc-HisCl3 se encontró una sustitución de aminoácido, en la posición 53 (His por Gln) como se observa en la Figura 18; una característica de esta subunidad es que aparentemente no presenta péptido señal.

↓

Pc25974	MLCSGTWRLGPP LLLL SIVLASILAHTQASTDGSEGVLT FQDLLPENPKDYDKMRPPKK	60
Pc-HisCl2	MLCSGTWRLGPP LLLL SIVLASILAHTQASTDGSEGVLT FQDLLPENPKDYDKMRPPKK	60

Pc25974	EGRPTKVYFHVTVMGID S INENSMTYVADIFFAQSWKDHRLRLE NMTSGYRLLEVDWLN	120
Pc-HisCl2	EGRPTKVYFHVTVMGID S INENSMTYVADIFFAQSWKDHRLRLE NMTSGYRLLEVDWLN	120

Pc25974	DLWRPDSFFKNAKQVTFQMTIPNHVWLHKDSTILYMKLTL LTLSCAMNYAIYPHDTQE	180
Pc-HisCl2	DLWRPDSFFKNAKQVTFQMTIPNHVWLHKDSTILYMKLTL LTLSCAMNYAIYPHDTQE	180

Pc25974	CKLQMESLSHTTEDLVFDWDADVPLEVDDNIELPQFDLVKNHTADCTQVYITGNFTCLEV	240
Pc-HisCl2	CKLQMESLSHTTEDLVFDWDADVPLEVDDNIELPQFDLVKNHTADCTQVYITGNFTCLEV	240

Figura 17. Comparación de un fragmento de las secuencias de aminoácidos del transcrito Pc25974 (arriba) y la subunidad clonada Pc-HisCl2 (abajo). A pesar de haberse encontrado cambios en la secuencia de nucleótidos, esto no se reflejó en la mayoría de la secuencia de aminoácidos, solo hay un cambio al inicio de la secuencia de esta subunidad (recuadro naranja) de una leucina (L) a una arginina (R). La flecha en azul marca el sitio de corte de la secuencia del péptido señal.

Pc28241	MDAPPASEDTGTGARRNVVESSEEVKKGEGAGGGEGGGRKTEAARGKEARTH QLCWLPS	60
Pc-HisCl3	MDAPPASEDTGTGARRNVVESSEEVKKGEGAGGGEGGGRKTEAARGKEARTH QLCWLPS	60

Pc28241	IPTHLLPLLLLLLLFLLTHVGCVRASAEEDTLEISDILPEDTKSYDKMRPPQSQGNPTV	120
Pc-HisCl3	IPTHLLPLLLLLLLFLLTHVGCVRASAEEDTLEISDILPEDTKSYDKMRPPQSQGNPTV	120

Pc28241	VYFHVTVMSLDSIDESSMTYAADIFFAQSWKDHRLRFPQNTGEYRLLPVSWLKD IWRPD	180
Pc-HisCl3	VYFHVTVMSLDSIDESSMTYAADIFFAQSWKDHRLRFPQNTGEYRLLPVSWLKD IWRPD	180

Pc28241	AFFKNAKSVTFQMTIPNHYLWLHLDSTILYMKLTL LLSCAMNFQSYPHDTQQCAMKIE	240
Pc-HisCl3	AFFKNAKSVTFQMTIPNHYLWLHLDSTILYMKLTL LLSCAMNFQSYPHDTQQCAMKIE	240

Figura 18. Comparación de un fragmento de las secuencias de aminoácidos del transcrito Pc28241 (arriba) y la subunidad clonada Pc-HisCl3 (abajo). A pesar de que se encontraron cambios en la secuencia de nucleótidos, solo se reflejó este cambio en dos aminoácidos (recuadro naranja) de un glutámico (E) a una glicina (G) y de una histidina (H) a una glutamina (Q).

En específico para las subunidades de los receptores a histamina Pc–HisCl1, Pc–HisCl2 y Pc–HisCl3, los análisis predijeron que cada una de estas subunidades es una proteína de 422, 576 y 535 aminoácidos, respectivamente. El análisis filogenético de algunos canales de cloruro que incluyen a estas secuencias mostró que se agrupan de acuerdo con su ligando específico (Figura 19). La identidad que comparten Pc–HisCl1 con Pc–HisCl2 y Pc–HisCl3 es del 50% aproximadamente, mientras Pc–HisCl2 y Pc–HisCl3 presenta una identidad del 46%. Por otro lado, la subunidad Pc–HisCl1 compartió tanto con la subunidad HCLA y HCLB de *Drosophila* una identidad del 60%, mientras Pc–HisCl2 y Pc–HisCl3 presentaron un mayor porcentaje de identidad con la subunidad HCLA (51% y 49 %, respectivamente) esto al realizar alineamientos por separado, ya que con el análisis filogenético podemos observar que las tres subunidades clonadas son homólogas con las subunidades HCLA al agruparse con ella o presentar una mayor homología (Pc–HisCl3). Por último al comparar los aminoácidos conservados del posible sitio de unión a la histamina que dedujo el grupo de trabajo de Akashi y colaboradores (2018), se puede observar que para la subunidad Pc–HisCl1 todos estos aminoácidos están conservados, mientras que para las subunidades Pc–HisCl2 y Pc–HisCl3 se encontró en ambas un cambio de aminoácido, de una Val²³⁰ a un Glu, en el asa F (Figura 20).

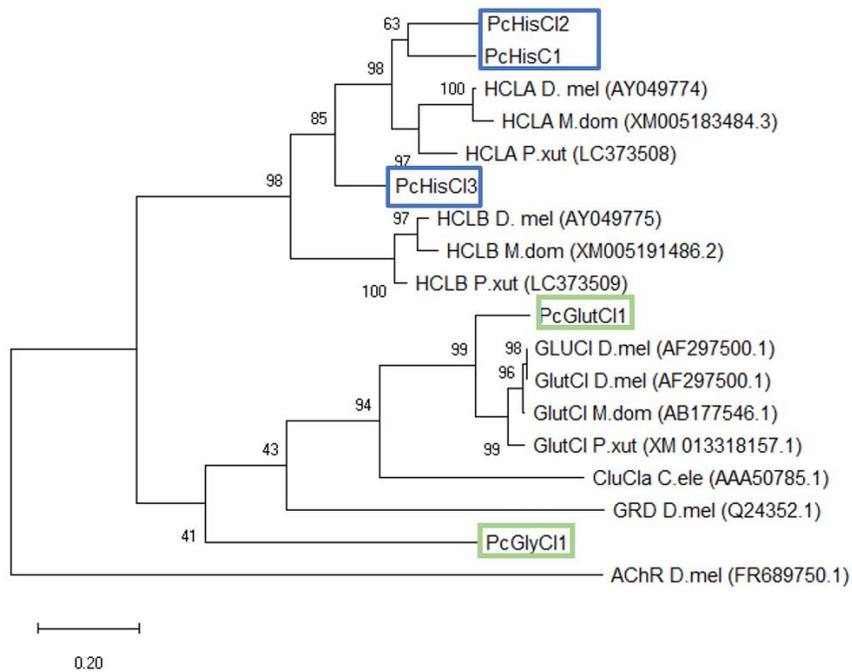


Figura 19: Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de las subunidades clonadas en este trabajo y miembros representativos de canales–receptores de cloruro, específicamente los dependientes de histamina, glutamato y glicina. El recuadro en verde destaca a Pc–GlutCl1 y Pc–GlyCl1, mientras los recuadros en azul resaltan a las subunidades Pc–HisCl1, Pc–HisCl2 y Pc–HisCl3 que se clonaron en este trabajo, y como se puede observar en el árbol es probable que las tres subunidades sean homólogas con la subunidad HCLA. El análisis filogenético inferido por medio del método Maximum Likelihood (Jones *et al.*,1992), basado en el modelo matriz JTT, refleja la relación de las secuencias clonadas con otras secuencias de subunidades de *Drosophila melanogaster* (D.mel), *Musca domestica* (M.dom) and *Papilio xuthus* (P.xut). El canal de cloruro dependiente de glutamato de *Caenorhabditis elegans* (C.ele) se incluyó en el árbol como referencia para deducir los dominios y estructuras parciales de los canales de cloruro del asa Cys. El receptor de acetilcolina (AChR) se incluyó como grupo externo. El porcentaje de árboles en los cuales los taxa asociados se agruparon, se muestra junto a las ramas. Los diagramas filogenéticos iniciales se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor–Joining y BioNJ en una matriz de distancias pareadas estimadas a partir del modelo JTT; consecuentemente, se seleccionó la topología con el valor logarítmico “likelihood” superior. El análisis involucró 18 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contenían gaps y datos faltantes se eliminaron, siendo un total de 306 posiciones en el estudio final. El análisis evolutivo fue realizado con el programa MEGA 6. Los números de acceso al GenBank están indicados al final de cada nombre de las secuencias utilizadas para el análisis. GluCla, subunidad alfa del canal de cloruro dependiente de glutamato; GlutCl, canal de cloruro dependiente de glutamato, HCLA subunidad A del canal de cloruro dependiente de histamina; HCLB subunidad B del canal de cloruro dependiente de histamina; GRD, receptor tipo–GABA/glicina.

	Asa G	Asa D	Asa A	Asa E	Asa B	Asa F	Asa C	
	999	11111111	11111111	11111111	22222	2222222	2222222222	2
	789	11111112	45555555	8888888	11111	33333333	55555555666	7
Posición aminoácidos		4567890	0912345	012345	01234	0123456	23456789012	5
			* ** **		*		*	
GluCl α C.ele (AAA50785.1)	LRT--LTLRESW--PDTFFPN--LYSVRI--ASYAY--QLKVGLS--CTSVTNTGIYSC--S							
GluCl A.mel (DQ667185.1)	VRS--LTFREQW--PDLFFSN--LYSIRI--ASYGW--QVVKNL--CNSKTNTEYSC--S							
GluCl D.mel (AF297500.1)	VRS--LTFREQW--PDLFFSN--LYSIRI--ASYGW--QVVKNL--CNSKTNTEYSC--S							
GluCl M.dom (AB177546.1)	VRS--LTFREQW--PDLFFSN--LYSIRI--ASYGW--QVVKNL--CNSKTNTEYSC--S							
GluCl N.vit (FJ851099.1)	VRS--LTFREQW--PDLFFAN--LYSIRI--ASYGW--QVVKNL--CNSKTNTEYSC--S							
GluCl P.xut (XM13318157.1)	VRS--LTFREQW--PDLFFSN--LYSIRI--ASYGW--QVVKNL--CNSKTNTEYSC--S							
Pc-HisCl1	VMG--IFFAQTW--PDSFFKN--LYMVKL--ESLSH--VVDDSI--CTQVYSTGNFTC--G							
Pc-HisCl2	VMG--IFFAQSW--PDSFFKN--LYMVKL--ESLSH--EVDDNI--CTQVYSTGNFTC--G							
Pc-HisCl3	VMG--IFFAQSW--PDAFFKN--LYMVKL--ESLSH--EVDDRI--CTQVYSTGNFTC--G							
HCLA A.mel (DQ667187.1)	VMG--IFFAQTW--PDSFFKN--LYMVKL--ESLSH--VVDNEI--CTQVYSTGNFTC--G							
HCLA D.mel (AY049774.1)	VMG--IFFAQTW--PDSFFKN--LYMVKL--ESLSH--VVDENI--CTQVYSTGNFTC--V							
HCLA M.dom (XM005183483.3)	VMG--IFFAQTW--PDSFFKN--LYMVKL--ESLSH--VVDENI--CTQVYSTGNFTC--V							
HCLA N.vit (FJ851089.1)	VMG--IFFAQTW--PDSFFKN--LYMVKL--ESLSH--VVDENI--CTQVYSTGNFTC--G							
HCLA P.xut (LC373508)	VMG--IFFAQTW--PDSFFKN--LYMVKL--ESLSH--VVDENI--CTQVYXGNFTC--G							
HCLB A.mel (DQ667188.1)	VLS--IFLAQSW--PDCFFKN--LYMSKL--ESLSH--VVNPEI--CTIEYSTGNFTC--G							
HCLB D.mel (AY049775.1)	VLS--IFLAQSW--PDCFFKN--LYMSKL--ESLSH--VVNTEI--CTIEYSTGNFTC--G							
HCLB M.dom (XM005191486.2)	VLS--IFLAQSW--PDCFFKN--LYMSKL--ESLSH--VVSNEI--CTIEYSTGNFTC--G							
HCLB N.vit (FJ851090.1)	VLS--IFLAQSW--PDCFFKN--LYMSKL--ESLSH--VVNPEI--CTIEYSTGNFTC--G							
HCLB P.xut (LC373509)	VLS--IFLAQSW--PDCFFKN--LYMSKL--ESLSH--VVNPDI--CTIEYSTGNFTC--G							

Figura 20: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la estructura del asa que contiene los sitios de unión al agonista putativo. Lo residuos son deducidos de la estructura tridimensional que ha sido determinada de GluCl α en *C. elegans* (Hibbs & Gouaux, 2011b). Las secuencias que están después del recuadro gris son de las subunidades clonadas del tallo ocular en *P. clarkii* Pc-HisCl1, Pc-HisCl2 y Pc-HisCl3. Los asteriscos (*) indican los sitios conservados en todas las moléculas. Aminoácidos resaltados en un recuadro gris, indican los sitios que difieren entre los canales dependiendo de sus agonistas específicos. Los números de acceso para cada secuencia se muestran en el paréntesis. Las secuencias entre las asas se omiten de la figura y se indican con guiones (-). GluCl α , subunidad alfa del canal de cloruro dependiente de glutamato; GluCl canal de cloruro activado por glutamato; HCLA, subunidad A del canal de cloruro dependiente de Histamina; HCLB, subunidad B del canal de cloruro dependiente de Histamina. C. ele, *Caenorhabditis elegans*; A. mel, *Apis mellifera*; D. mel, *Drosophila melanogaster*; M. Dom, *Musca domestica*; N. vit, *Nasonia vitripennis*; P. xut, *Papilio xuthus*. (Modificado de Akashi et al., 2018).

Evaluación funcional de las subunidades clonadas

Con el fin de evaluar la funcionalidad de cada una de las subunidades clonadas, la línea celular HEK293T fue utilizado como sistema de expresión heterólogo. Estas células se transfectaron transitoriamente con 2 μ g de ADN plasmídico por medio del método del PEI (Reed *et al.*, 2006)

Para determinar la capacidad de las subunidades Pc-GlutCl1, Pc-GlyCl1, Pc-HisCl1 y Pc-HisCl2 para formar receptores homopentaméricos, primero cada una de estas fue insertada en el vector de expresión pIRES2-EGFP, en el sitio BgIII. Posteriormente estas secuencias fueron analizadas con enzimas de restricción. La subunidad Pc-GlutCl1 fue digerida con las enzimas PstI y NheI (Figura 21A), mientras que Pc-GlyCl1 fue digerida con BstEII-NsiI y XhoI (Figura 21B), la subunidad Pc-HisCl1 fue digerida con BsrGI y XbaI-XmaI (Figura 21C), y por último Pc-HisCl2 fue digerida con KpnI y BsrGI (Figura 21D). En todos los casos los patrones de las digestiones concordaban con los tamaños esperados (Tabla 4).

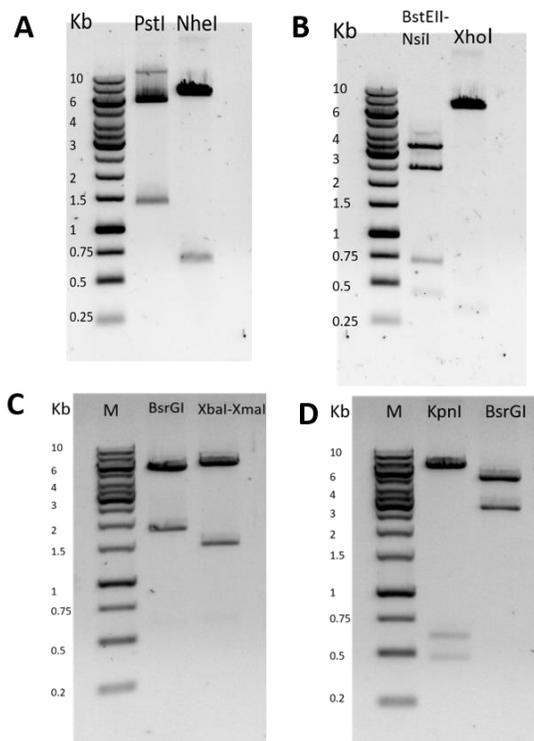


Figura 21. Caracterización por restricción de los plásmidos pIRES2-EGFP conteniendo cada una de las subunidades clonadas. Electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con bromuro de etidio. Se indican entre paréntesis los tamaños esperados para cada digestión. **A)** Análisis de restricción de la subunidad Pc-GlutCl1 digerida con las enzimas PstI (5,400 y 1,400 pb) y NheI (6,100 y 651pb); **B)** Digestión con las enzimas BstEII-NsiI (3,100, 2,300, 690 y 410 pb) y XhoI (6,300 y 260 pb) del plásmido con la subunidad Pc-GlyCl1; **C)** Caracterización con las enzimas BsrGI (4,900 y 1,700 pb) y XbaI-XmaI (5,200 y 1,400 pb) de la subunidad Pc-HisCl1; y **D)** Análisis de restricción de los plásmidos con Pc-HisCl2 con las enzimas KpnI (6,100, 590 y 460 pb) y BsrGI (4,400 y 2,600 pb). (M) marcador de peso molecular de ADN de 1 kpb

Tabla 4. Tamaños esperados tras las digestiones de los plásmidos pIRES2-EGFP conteniendo cada una de las subunidades clonadas.

Subunidad	Enzima	Tamaños esperados (pb)
Pc-GlutCl1	PstI	5,400 y 1,400
	NheI	6,100 y 651
Pc-GlyCl1	BstEII-Nsil	3,100, 2,300, 690 y 410
	XhoI	6,300 y 260
Pc-HisCl1	KpnI	6,100, 590 y 460
	BsrGI	4,400 y 2,600
Pc-HisCl2	BsrGI	4,900 y 1,700
	XbaI-XmaI	5,200 y 1,400

Previo a la evaluación funcional de cada subunidad clonada, primero se probó que las células eran capaz de ser transfectadas con alguna subunidad y que además fueran capaces de responder a la aplicación de agonistas. Para esto se utilizó como control positivo la subunidad clonada por Jiménez-Vázquez *et al.*, (2016), la subunidad PcGABAA β . Los resultados obtenidos con esta subunidad fueron consistentes con lo ya reportado, es decir, esta subunidad es capaz de formar receptores homoméricos funcionales los cuales son permeables al cloruro. En la Figura 22 se muestran los resultados obtenidos de la subunidad PcGABAA β tras la aplicación de GABA 50 μ M a diferentes potenciales de mantenimiento.

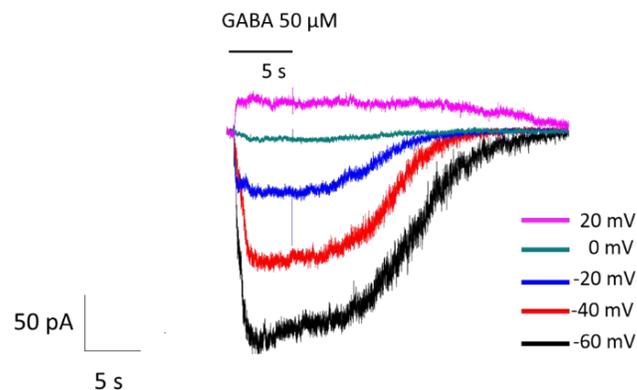


Figura 22. Corrientes evocadas por la aplicación del GABA en las células HEK293T transfectadas con la subunidad PcGABAA β . Registro electrofisiológico de la subunidad PcGABAA β y las corrientes evocadas al aplicar GABA 50 μ M a distintos potenciales de mantenimiento.

Una vez comprobado el sistema de expresión y el protocolo para la evaluación funcional, se prosiguió a la expresión de la subunidad Pc–GlutCl1. De manera similar a como se realizó con PcGABAA β , se transfectó la subunidad Pc–GlutCl1 y se identificaron las células fluorescentes. La aplicación de glutamato (50 μ M) con un potencial de mantenimiento de –60 mV, no evocó corrientes detectables (Figura 23). También se aplicaron otros agonistas como fue el GABA (50 μ M), glicina (50 μ M) e HA (50 μ M) y de igual forma no se produjeron corrientes detectables. Estos resultados sugieren que esta subunidad no es capaz de formar receptores homoméricos funcionales a ninguno de los agonistas utilizados.

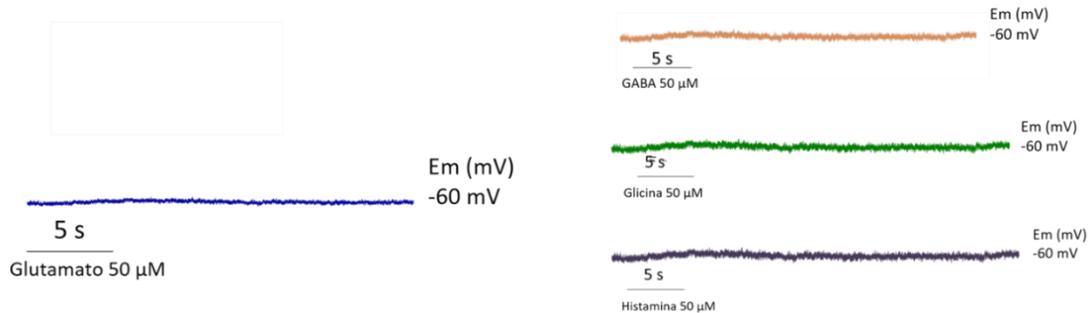


Figura 23. Registro electrofisiológico de células transfectadas con la subunidad Pc–GlutCl1 con aplicaciones de glutamato, GABA, glicina e histamina, todos a 50 μ M. Debido a la ausencia de corrientes detectables se sugiere que esta subunidad no forma receptores homoméricos funcionales.

De manera similar a lo observado con la subunidad Pc–GlutCl1, la aplicación de glicina (50 μ M), glutamato (50 μ M), GABA (50 μ M) e HA (50 μ M) no evoca corrientes detectables cuando las células fueron transfectadas con la subunidad Pc–GlyCl1, como puede observarse en la Figura 24.

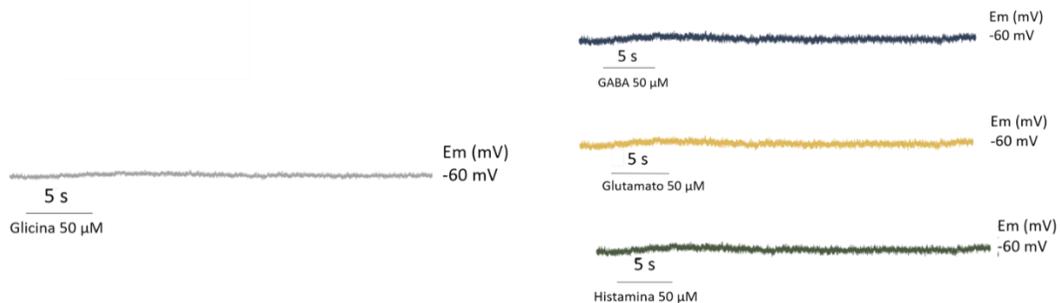


Figura 24. Registro electrofisiológico de células transfectadas con la subunidad Pc–GlyCl1 con aplicaciones de glicina, GABA, glutamato e histamina, todos a 50 μ M. Al igual que Pc-GluCl1, la ausencia de corrientes detectables sugiere que esta subunidad no forma receptores homoméricos funcionales.

En el caso de la subunidad Pc–HisCl1, que presentó una mayor homología con receptores a histamina tras realizar un BLAST general, la transfección de las células seguida de la aplicación de la HA (50 μ M) dio como resultados la posibilidad de registrar corrientes cuya magnitud y sentido es dependiente del potencial de mantenimiento utilizado (Figura 25A). Se sugiere que el receptor puede ser selectivo a cloruro ya que las soluciones de registro externa e interna utilizadas tienen una concentración simétrica del ion Cl^- por lo que el potencial de equilibrio para este anión es 0 mV. Esto pudo ser corroborado en la relación corriente–voltaje de la respuesta a HA (Figura 25B); también en esta relación se puede observar que a valores >20 mV del potencial de mantenimiento hay una rectificación saliente muy marcada. La aplicación de glutamato (50 μ M), glicina (50 μ M) y GABA (50 μ M) no evocaron corrientes detectables en este receptor (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que la subunidad Pc–HisCl1 forma receptores homoméricos funcionales activados por la histamina.

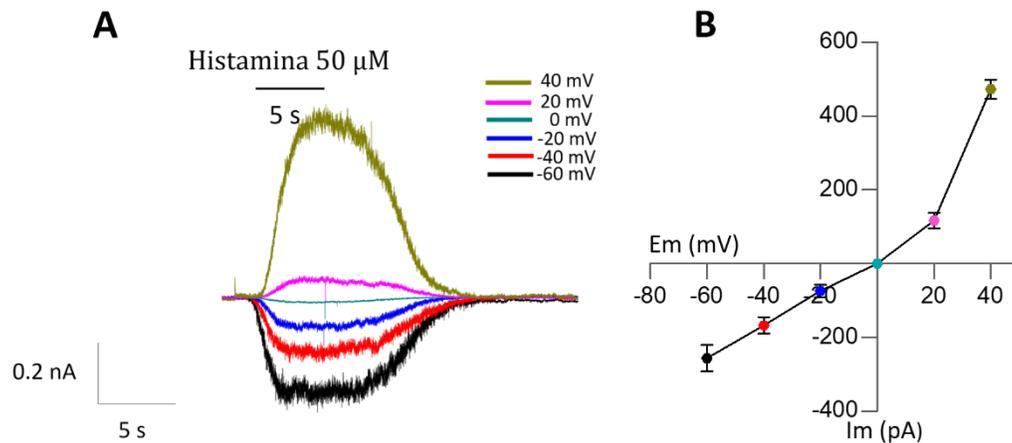


Figura 25. Corrientes evocadas por la aplicación de histamina en las células HEK293T transfectadas con la subunidad Pc–HisCl1. **A)** Se muestra el registro electrofisiológico de la subunidad Pc–HisCl1 y las corrientes evocadas al aplicar histamina 50 μM a distintos potenciales de mantenimiento. **B)** Relación corriente–voltaje de la respuesta a histamina en células que expresaban la subunidad Pc–HisCl1 en la que se puede observar una rectificación saliente prominente. Cada punto representa la media \pm EE de 6 células.

De igual forma, la subunidad Pc–HisCl2 también presentó una gran homología con los receptores a HA. La aplicación de este ligando a células transfectadas con esta subunidad en una concentración de 50 μM evocó corrientes en las células registradas, y de la misma forma la amplitud de las corrientes fueron dependientes al potencial de mantenimiento utilizado (figura 26A). En un potencial de mantenimiento de 0 mV, al igual que en la subunidad Pc–HisCl1, la corriente no fue detectable por lo que proponemos una selectividad del receptor al anión Cl^- ; la relación corriente–voltaje fue lineal, y en consecuencia no hubo rectificación (Figura 26B). En el caso de los otros agonistas utilizados no hubo corrientes detectables al aplicarlos (datos no mostrados). Por lo que de igual forma que la subunidad anterior esto sugiere que la subunidad Pc–HisCl2 forma receptores homopentámicos funcionales a la HA.

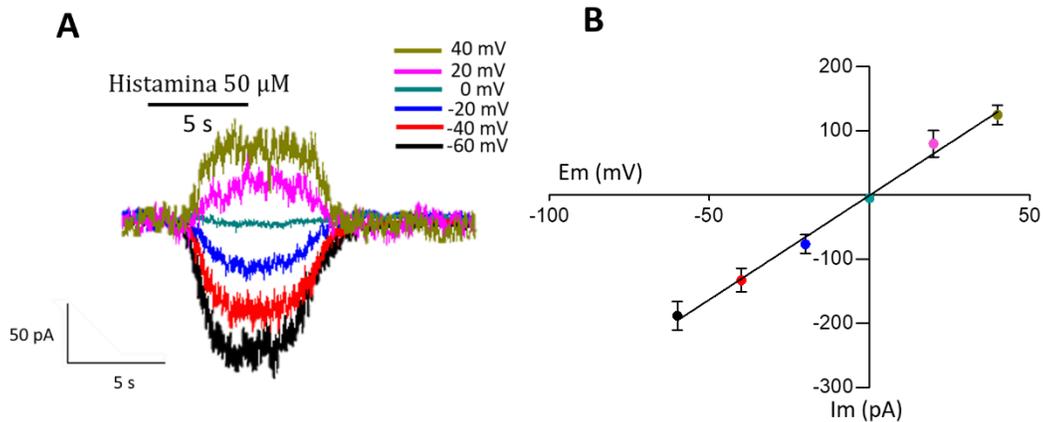


Figura 26. Corrientes evocadas por la aplicación de histamina en las células HEK 293T transfectadas con la subunidad Pc–HisCl2. **A)** Corrientes evocadas por la aplicación de 50 μ M de histamina a distintos potenciales de mantenimiento. **B)** relación corriente–voltaje de la respuesta a histamina en células que expresan la subunidad Pc–HisCl2; en esta gráfica se puede observar que esta relación es lineal. Cada punto representa la media \pm EE de 3 células.

Por último, con distintas concentraciones de histamina utilizadas (en células independientes) se construyeron las curvas concentración–respuesta de los receptores homoméricos formados por las subunidades Pc–HisCl1 y Pc–HisCl2 (Figura 27), la cual se ajustó con la ecuación de Hill, arrojando coeficientes de Hill (n_H) de 1.58 y 1.36, y EC_{50} s de 59.57 μ M y 23.11 μ M, respectivamente.

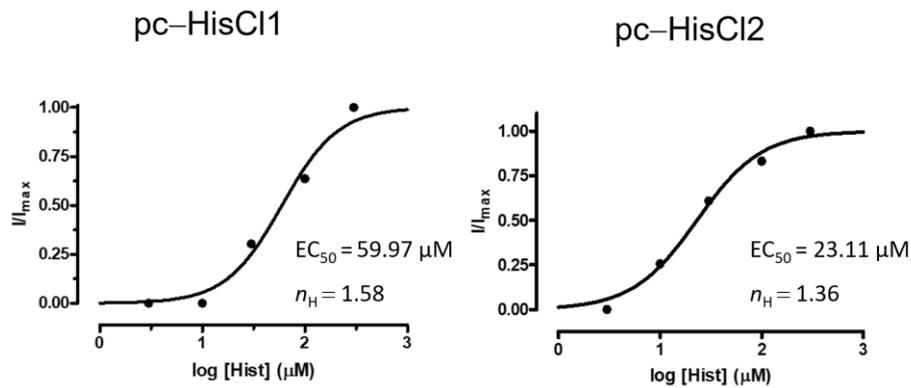


Figura 27. Curvas concentración–respuesta para la histamina de los receptores Pc–HisCl1 y Pc–HisCl2 expresados en células HEK 293T. Se utilizaron concentraciones de 3, 10, 30, 100 y 300 μM . Todas las corrientes fueron obtenidas utilizando un potencial de mantenimiento de -60 mV . Los datos fueron ajustados con la ecuación de Hill de 4 parámetros. Se muestran para cada curva los valores del ajuste de la EC_{50} y el coeficiente de Hill.

Discusión

En los invertebrados existe una gran diversidad de canales iónicos activados por ligando que han sido explorados desde el punto de vista molecular y fisiológico. Muchos de ellos son receptores permeables a aniones que funcionan de manera similar a los canales que se han descrito en vertebrados (French-Constant *et al.*, 1991; Witte *et al.*, 2002). Sin embargo, existen unos cuantos que han sido reportados solo en organismo invertebrados entre los que se encuentran los canales de cloruro activados por la HA (Knipple & Soderlund, 2010).

En los artrópodos se ha documentado ampliamente que la HA es el neurotransmisor del primer relevo sináptico de la vía visual, es decir, se libera por los fotorreceptores (Stuart *et al.*, 2007). La liberación de HA en retinas aisladas y la presencia de inmunorreactividad en los fotorreceptores también fue confirmada en el acocil *P. clarkii*. Además, Cebada y García, (2007) sugieren que las células inmunorreactivas a la HA localizadas en la médula terminal del tallo ocular, que proyectan a la región de la neuropila, podrían ejercer un control histaminérgico en la actividad eléctrica de las células del órgano X y regular la secreción hormonal. Sin embargo, aparentemente hasta la fecha no se ha llevado a cabo algún estudio en el que se trate de determinar la identidad molecular de las subunidades formadoras de estos canales.

Por ello, en el presente trabajo a partir del ARN aislado del tallo ocular del acocil *P. clarkii*, se clonaron 5 ADNc, 3 subunidades formadoras de receptores ionotrópicos dependientes de histamina, denominadas Pc-HisCl1, Pc-HisCl2 y Pc-HisCl3, y 2 subunidades que con base en el BLAST general posiblemente forman canales de cloruro para glutamato y glicina, las cuales se nombraron Pc-GlutCl1 y Pc-GlyCl1, respectivamente.

Características moleculares de los receptores clonados

Las secuencias de los 5 ADNc que se clonaron en este trabajo codifican péptidos que incluyen todas las características estructurales de la superfamilia de los canales

iónicos activados por ligando, específicamente de la familia del asa Cys. Esto quiere decir que incluye una región con 15 aminoácidos en los extremos amino terminal que a su vez forman el asa de dicisteínas. También, los cuatro dominios transmembranales predichos forman parte de la estructura. Adicionalmente, estas secuencias incorporan las diferentes asas intra y extracelulares encargadas de unir a los dominios transmembranales. El asa de mayor tamaño entre los dominios TM3 y TM4 es en donde se presentan las mayores diferencias entre las subunidades clonadas en este trabajo, así como al compararlas con otras subunidades clonadas en otras investigaciones; la razón de esto puede ser que esta asa se ha involucrado en eventos de unión proteína–proteína, así como también en modificaciones postraduccionales las cuales pueden ser específicas para cada subunidad así como la función en la que están involucrados los receptores que forman (Moorhouse *et al.*, 2002).

Con respecto a los receptores a histamina en nuestros resultados se encontraron aspectos interesantes. Primero, se clonaron tres subunidades formadoras de estos receptores, mientras en insectos solo se han encontrado que sus genes codifican dos subunidades de canales ionotrópicos a la HA, principalmente en *D. melanogaster*, *M. domestica* y *P. xuntus* (Akashi *et al.*, 2018; Kita *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2002). Que diferentes organismos presenten distinto número de subunidades para un solo tipo de receptor ha sido comúnmente reportando, un ejemplo de esto son los receptores de nACh en insectos, entre los que se incluyen *D. melanogaster* (Littleton & Ganetzky, 2000), *Apis mellifera* (Jones *et al.*, 2006) o *Bombyx mori* entre otros, los cuales poseen de 10–12 genes de nAChR, mientras que en humano y en el nemátodo *C. elegans* se presentan 16 y 29 subunidades, respectivamente (Jones *et al.*, 2007). Por lo que estas dos subunidades de receptores a HA pueden estar conservadas en los insectos, en tanto que en *P. clarkii*, al no conocerse su genoma completo, no se puede determinar el total de genes que codifican para estos receptores.

En segundo lugar, en insectos las características moleculares de los receptores ionotrópicos para la HA, han permitido diferenciar en dos tipos las subunidades clonadas, HCLA y HCLB. El análisis filogenético sugiere que las tres subunidades clonadas presentan una mayor homología con las subunidades tipo A. Sin embargo, todavía no se puede descartar que sí se presenten subunidades tipo B.

En tercer lugar, el cambio en la secuencia de aminoácidos de la subunidad clonada Pc–HisCl2, como ya se había mencionado, se encuentra dentro de los primeros 30 aminoácidos. En esta zona se encuentra lo que se conoce como el péptido señal; dicho péptido está compuesto por lo general de 16–30 residuos de aminoácidos y es eliminado de la proteína madura mediante una peptidasa específica, por lo que se sugiere que este cambio no estaría provocando un cambio en el canal formado (Parker, 2001). En el caso de la subunidad Pc–HisCl3 es difícil determinar el efecto que podría producir en el canal el cambio de una His a una Gln⁵³ puesto que todavía falta expresarlo para poder establecer si afecta la función, la activación, la afinidad por el ligando, entre otras características, o por el contrario no provocar ningún cambio; por ejemplo en una mutante de los receptores HCLB en el que en la posición 111 se elimina un Trp en *D. melanogaster* provoca una mutación nula, afectando la transmisión sináptica entre los fotorreceptores y sus células blanco, con ello demostrando que esta proteína está involucrada en la vía visual (Yusein *et al.*, 2008).

En relación con el cambio que se presentó también en las subunidades Pc–HisCl2 y Pc–HisCl3, estas se localizan en el sitio de unión predicho de la HA en el asa F de una Val a un Glu. Se sabe que el asa F juega un papel directo en el reconocimiento del agonista según lo reportado en receptores heteroméricos de 5-HT₃, de nACh y GABA (Lynagh & Pless, 2014), situación que no ocurre en los receptores homoméricos GABA_ρ (Khatri *et al.*, 2009). Las mutaciones en diferentes posiciones en el asa F, aun con aminoácidos que son químicamente similares, afectan preferencialmente la afinidad del agonista en diferentes estados de activación; las interacciones entre el agonista y el asa F probablemente cambian

sustancialmente durante la activación inducida por el ligando (Sine *et al.*, 2002). Sin embargo, los canales formados por la subunidad Pc–HisCl2 presentaron una mayor afinidad para la HA comparados con la subunidad Pc–HisCl1, en la que la Val está conservada, por lo que podrían estar comportándose como los receptores GABA ρ en los que las modificaciones en esta asa no influyen en el reconocimiento del agonista. No obstante, más estudios son necesarios para poder confirmar los efectos que las modificaciones de aminoácidos en esta asa provocan en la función del receptor.

Propiedades fisiológicas

Subunidades Pc–GluCl1 y Pc–GlyCl1

En invertebrados se han descrito una gran gama de subunidades capaces de formar receptores ionotrópicos, y algunas de estas subunidades presentan la capacidad de constituir receptores homoméricos funcionales; no obstante, la gran mayoría requiere de otras subunidades para que el receptor formado sea funcional (Beg & Jorgensen, 2003; Gisselmann *et al.*, 2004; Jiménez-Vázquez *et al.*, 2016). Es posible que para las subunidades Pc–GlyCl1 y Pc–GluCl1 sean necesarias otras subunidades ya que la aplicación de glicina, glutamato y otros agonistas no evocaron corrientes detectables en las células transfectadas con estas subunidades.

Además de la necesidad de una o más subunidades para formar un canal funcional, también pueden requerirse otras moléculas para poder activar un receptor, como se reportó en el nematodo *C. elegans* en el que se identificó que sus genes codifican dos subunidades homólogas de canales de cloruro dependientes de glutamato (GluClR), una denominada GluCl α y otra GluCl β ; aunque ambas subunidades forma receptores homoméricos al ser expresados en ovocitos de *Xenopus*, la aplicación de glutamato en los canales GluCl α no evoca corrientes, solo con la aplicación de ivermectina (un antihelmíntico de amplio espectro). Estos receptores son funcionales ya que este fármaco sí evoca corriente en estos canales,

mientras que la subunidad β solo con la aplicación glutamato y no de ivermectina se evocan corriente detectable en los receptores formados por esta subunidad (Degani-Katzav *et al.*, 2016). De igual forma, se requieren más estudios para evaluar si la subunidad clonada en este trabajo se comporta de forma similar a la subunidad α en *C. elegans*.

Subunidades de receptores ionotrópicos dependientes de histamina

Estudios electrofisiológicos de las subunidades clonadas que forman canales ionotrópicos dependientes de histamina han reportado valores de EC_{50} que no son similares, pero tienden a serlo entre el tipo de subunidad al formar receptores homopentaméricos. En el caso de las subunidades tipo A los valores de EC_{50} para *D. melanogaster*, *M. domestica* y *P. xuntus* (25 μ M y 33.1 μ M y 21.9 μ M, respectivamente), presentan menor afinidad por la HA cuando se les compara con las EC_{50} de las subunidades tipo B (14.1 μ M, 6.28 μ M y 5.5 μ M, respectivamente) (Akashi *et al.*, 2018; Kita *et al.*, 2017; Pantazis *et al.*, 2008). Al contrastar estos resultados con los obtenidos en este trabajo se puede observar que la diferencia en la afinidad en *P. clarkii* se sigue presentando, siendo la subunidad Pc–HisCl1 la que presenta un mayor valor de EC_{50} (59.57 μ M), en comparación con la subunidad Pc–HisCl2 con una mayor afinidad (23.22 μ M). Sin embargo, ambas subunidades se agruparon con las subunidades clonadas tipo A y no se encontró ninguna subunidad tipo B en este trabajo.

Una característica que se ha identificado en los receptores de histamina formados por las subunidades tipo B, tanto en *D. melanogaster* como en *M. domestica*, es que pueden ser también activados por GABA como un agonista completo generando una hiperpolarización de la membrana (Gisselmann *et al.*, 2004b; Kita *et al.*, 2017), mientras para la mariposa *P. xuntus* el GABA puede activar los canales homoméricos formados por las subunidades tipo A y B (Akashi *et al.*, 2018). Los EC_{50} que presentaron cada uno de estos canales fueron los siguientes: para *Drosophila* fue de 1 mM, para *Musca* de 1.11 mM y para *P. xuntus* fue de 9.4 mM

(HCLA) y 2.7 mM (HCLB). Concordando con estos resultados, las subunidades Pc–HisCl1 y Pc–HisCl2, al presentar una mayor homología con las subunidades tipo A, la aplicación de GABA (50 μ M) no evocó corrientes detectables en los canales formados. La baja concentración de GABA utilizada en comparación a los otros trabajos fue con base en la concentración plasmática de GABA en el acocil *P. clarkii* determinada por el grupo de trabajo de Cebada *et al.*, (2006) en el que en un periodo de 24 h las concentraciones mínima y máxima de GABA fueron 2 y 10 μ M, respectivamente. Las concentraciones de GABA necesarias para activar a estos receptores son muy grandes al compararlas con las concentraciones plasmáticas de este agonista en *P. clarkii*, siendo esto una posible explicación del por qué las subunidades clonadas presentan una mayor homología con las subunidades tipo A en las cuales el GABA no evoca corrientes, o son necesarias concentraciones hasta 3 veces más grande de este agonista como en HCLA de *P. xuntus* al compararlo con los homólogos HCLB. Dado que se sabe que el GABA sí puede actuar en el mismo canal junto con otros neurotransmisores, como por ejemplo en las fibras musculares del estómago en el acocil *Austropotamobius torrentium*, en el que se reportó que tanto la ACh, el GABA y el glutamato evocan un efecto parecido en el potencial de membrana y resistencia de entrada en el mismo receptor. No obstante las concentraciones utilizadas de GABA son menores a 10 μ M (Zufall *et al.*, 1988).

Una característica que solo se encontró en la subunidad Pc–HisCl1 y no en la otra subunidad clonada fue la marcada rectificación saliente en voltaje positivos; esto no fue observado en las demás subunidades clonadas que forman receptores ionostropicos dependientes de histamina. Solo en las subunidades HCLA en *P. xustus*, Akashi y colaboradores (2018) reportaron una pequeña rectificación en los receptores formados por esta subunidad, pero era dependiente de la concentración de HA utilizada y no del voltaje.

Por último, al comparar nuestros resultados con respecto a los EC₅₀ de las subunidades clonadas Pc–HisCl1 (59.57 μ M) y Pc–HisCl2 (23.22 μ M) con los registros en las neuronas del órgano X aisladas (3.3 μ M, Cebada & García, 2007),

se sugiere que ni la subunidad Pc-HisCl1 ni la Pc-HisCl2 están formando receptores independientes en estas células. Por el contrario, en los estudios electrofisiológicos de los canales nativos en las células monopolares grandes (LMC) en *D. melanogaster* y *M. domestica* han mostrado que los valores de EC₅₀ para histamina (24 μ M y 34 μ M, respectivamente) son similares a los receptores homopentaméricos HCLA expresados *in vitro* (25 μ M y 33 μ M, respectivamente (Kita *et al.*, 2017; Pantazis *et al.*, 2008).

Los patrones de expresión de HCLA y HCLB han sido bien caracterizados en insectos (Knipple & Soderlund, 2010). La subunidad HCLA se expresa predominantemente en las LMC en el primer neuropilo visual (lámina). En contraste, la subunidad HCLB expresada en la lámina está ausente en la LMC, pero está presente en las células de la lámina glial (Pantazis *et al.*, 2008). Por otra parte, en un análisis inmunohistoquímico detallado se identificaron neuronas adicionales y regiones en el sistema nervioso central en la mosca, no relacionadas con las funciones de la vista sino implicadas en la detección de temperatura y cambios en el ambiente. Con la excepción de un pequeño número de neuronas que coexpresan ambas subunidades, las regiones donde se expresan HCLA y HCLB no se sobreponen (Hong *et al.*, 2006).

Estudios posteriores para identificar en que neuronas del tallo ocular se están expresando cada una de las subunidades clonadas, así como si se están expresando de forma combinada o independientes pueden ayudar a entender su funcionalidad en las células que las expresan, como lo ha hecho en los insectos. Asimismo, permitiría comprender mejor el procesamiento visual temprano en crustáceos e identificar diferencias con los insectos, al igual que el papel que presenta en el sistema órgano X- glándula sinusal y el control de la liberación de hormonas.

Conclusiones

Las subunidades Pc–HisCl1, Pc–HisCl2 forman receptores homoméricos funcionales dependientes de histamina. Siendo los canales formados por la subunidad Pc–HisCl2 los que presentan una mayor afinidad para la histamina ($EC_{50} = 23.11 \mu M$) en comparación con la subunidad Pc–HisCl1 ($EC_{50} = 59.97 \mu M$).

Por otra parte, para las subunidades denominadas Pc–GlyCl1 y Pc–GluCl1, todavía se desconoce si no están formando receptores o están formando receptores homoméricos que no son funcionales, puesto que las células transfectadas no evocaron corrientes con la aplicación de los agonistas.

Perspectivas

Se requiere corroborar que la subunidad clonada Pc–HisCl3 forma receptores homoméricos, por lo que es necesario realizar la transfección de los plásmidos con esta subunidad en las células HEK 293T y realizar la posterior evaluación electrofisiológica, en las mismas condiciones en las que se realizaron para las otras subunidades. Asimismo, es necesario realizar la co-expresión de las subunidades Pc–HisCl1 y Pc–HisCl2 para poder determinar si forman receptores heteroméricos entre estas subunidades o con la subunidad Pc–HisCl3. Y de igual forma es necesario realizar una evaluación de las propiedades electrofisiológica y farmacológica de las subunidades expresadas independientemente, o de los receptores heteroméricos generados; esto mediante el uso de agonistas, agonistas parciales, antagonistas y bloqueadores.

También se propone determinar la distribución de expresión de estas subunidades dentro del tallo ocular.

Literatura citada

- Akaike, N., & Harata, N. (1994). GABA A Receptor-Chloride Channel Complex. *Methods in Neurosciences*, 19, 148–165. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-185287-0.50014-4>
- Akashi, H. D., Chen, P. J., Akiyama, T., Terai, Y., Wakakuwa, M., Takayama, Y., Tomimaga, M., Arikawa, K. (2018). Physiological responses of ionotropic histamine receptors, P_xHCLA and P_xHCLB, to neurotransmitter candidates in a butterfly, *Papilio xuthus*. *Journal of Experimental Biology*, 221(21). <https://doi.org/10.1242/jeb.183129>
- Alexander, S. P. H., Mathie, A., & Peters, J. A. (2009). Guide to Receptors and Channels (GRAC), 4th edition. *British Journal of Pharmacology*, 158(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00499.x>
- Andrew, R. D., Orchard, I., & Saleuddin, A. S. M. (1978). Evaluation of the Neurosecretory System in the Crayfish Eyestalk. *Cell and Tissue Structural Research*, 246, 235–246.
- Beg, A. A., & Jorgensen, E. M. (2003). EXP-1 is an excitatory GABA-gated cation channel. *Nature Neuroscience*, 6(11), 1145–1152. <https://doi.org/10.1038/nn1136>
- Bouzat, C., & Sine, S. M. (2018). Nicotinic acetylcholine receptors at the single-channel level. *British Journal of Pharmacology*, 175(11), 1789–1804. <https://doi.org/10.1111/bph.13770>
- Bronson, S. E., & Konradi, C. (2010). Second-Messenger Cascades. En *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 20). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374767-9.00026-3>
- Campbell, J. E., & Cohall, D. (2016). Pharmacodynamics-A Pharmacognosy Perspective. En *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00026-3>
- Cebada, J., Alvarado-Álvarez, R., Becerra, E., Neri-Bazán, L., Rocha, L., & García, U. (2006). An improved method for long-term measuring of hemolymph fluctuations of non-essential amino acids, GABA and histamine from freely moving crayfish. *Journal of Neuroscience Methods*, 153(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.05.025>
- Cebada, J., & García, U. (2007). Histamine operates Cl⁻-gated channels in crayfish neurosecretory cells. *Journal of Experimental Biology*, 210(22), 3962–3969. <https://doi.org/10.1242/jeb.006577>
- Changeux, J. P., Corringier, P. J., & Maskos, U. (2015). The nicotinic acetylcholine receptor: From molecular biology to cognition. *Neuropharmacology*, 96(PB), 135–136. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.03.024>
- Coombe, P. E. (1986). The large monopolar cells L1 and L2 are responsible for ERG transients in *Drosophila*. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology*, 159(5), 655–665. <https://doi.org/10.1007/BF00612038>
- Corringier, P.-J., Nove`re, N. Le, & Changeux, J.-P. (2000). Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annual Review of Pharmacology Toxicology*, 40, 431–458.

- Dani, J. A. (2015). Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. En *International Review of Neurobiology* (1a ed., Vol. 124). <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2015.07.001>
- Degani-Katzav, N., Gortler, R., DGorodetzki, L., & Paas, Y. (2016). Subunit stoichiometry and arrangement in a heteromeric glutamate-gated chloride channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(5), E644–E653. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423753113>
- Douglas, J. K., Wilkens, L., Pantazelou, E., & Moss, F. (1993). Noise enhancement of information transfer in crayfish mechanoreceptors by stochastic resonance. *Nature*, *365*(6444), 337–340.
- Fedorenko, G. M., & Uzdensky, A. B. (2008). Dynamics of ultrastructural changes in the isolated crayfish mechanoreceptor neuron under photodynamic impact. *Journal of Neuroscience Research*, *86*(6), 1409–1416. <https://doi.org/10.1002/jnr.21587>
- Ffrench-Constant, R. H., Mortlock, D. P., Shaffer, C. D., MacIntyre, R. J., & Roush, R. T. (1991). Molecular cloning and transformation of cyclodiene resistance in *Drosophila*: An invertebrate γ -aminobutyric acid subtype A receptor locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(16), 7209–7213. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7209>
- Fountain, S. J., Parkinson, K., Young, M. T., Cao, L., Thompson, C. R. L., & North, R. A. (2007). An intracellular P2X receptor required for osmoregulation in *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, *448*(7150), 200–203. <https://doi.org/10.1038/nature05926>
- Gamradt, S. C., & Kats, L. B. (1996). Effect of Introduced Crayfish and Mosquitofish on California Newts. *Conservation Biology*, *10*(4), 1155–1162. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1996.10041155.x>
- Gastinger, M. J., Barber, A. J., Vardi, N., & Marshak, D. W. (2006). Histamine receptors in mammalian retinas. *Journal of Comparative Neurology*, *495*(6), 658–667. <https://doi.org/10.1002/cne.20902>
- Gisselmann, G., Pusch, H., Hovemann, B. T., & Hatt, H. (2002). Two cDNAs coding for histamine-gated ion channels in *D. melanogaster*. *Nature Neuroscience*, *5*(1), 11–12. <https://doi.org/10.1038/nn787>
- Gisselmann, Günter, Plonka, J., Pusch, H., & Hatt, H. (2004a). *Drosophila melanogaster* GRD and LCCH3 subunits form heteromultimeric GABA-gated cation channels. *British Journal of Pharmacology*, *142*(3), 409–413. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705818>
- Gisselmann, Günter, Plonka, J., Pusch, H., & Hatt, H. (2004b). Unusual functional properties of homo- and heteromultimeric histamine-gated chloride channels of *Drosophila melanogaster*: Spontaneous currents and dual gating by GABA and histamine. *Neuroscience Letters*, *372*(1–2), 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.09.031>
- Greengard, P. (2001). The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science*, *294*(5544), 1024–1030. <https://doi.org/10.1126/science.294.5544.1024>
- Hardie, R. C. (1987). Is histamine a neurotransmitter in insect photoreceptors? *Journal of*

- Comparative Physiology A*, 161(2), 201–213. <https://doi.org/10.1007/BF00615241>
- Hardie, R. C. (1989). A histamine-activated chloride channel involved in neurotransmission at a photoreceptor synapse. *Nature*, 339(6227), 704–706. <https://doi.org/10.1038/339704a0>
- Hibbs, R. E., & Gouaux, E. (2011a). Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Hibbs, R. E., & Gouaux, E. (2011b). Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature*, 474(7349), 54–60. <https://doi.org/10.1038/nature10139>
- Hong, S. T., Bang, S., Paik, D., Kang, J., Hwang, S., Jeon, K., Chun, B., Hyun, S., Lee, Y., Kim, J. (2006). Histamine and its receptors modulate temperature-preference behaviors in *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(27), 7245–7256. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5426-05.2006>
- Jaiteh, M., Taly, A., & Hénin, J. (2016). Evolution of pentameric ligand-gated ion channels: Pro-loop receptors. *PLoS ONE*, 11(3), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151934>
- Jiménez-Vázquez, E. N., Díaz-Velásquez, C. E., Uribe, R. M., Arias, J. M., & García, U. (2016). Molecular cloning and expression of a GABA receptor subunit from the crayfish *Procambarus clarkii*. *Journal of Neuroscience Research*, 94(2), 190–203. <https://doi.org/10.1002/jnr.23695>
- Jones, A. K., Davis, P., Hodgkin, J., & Sattelle, D. B. (2007). The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the nematode *Caenorhabditis elegans*: An update on nomenclature. *Invertebrate Neuroscience*, 7(2), 129–131. <https://doi.org/10.1007/s10158-007-0049-z>
- Jones, A. K., Raymond-Delpech, V., Thany, S. H., Gauthier, M., & Sattelle, D. B. (2006). The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Research*, 16(11), 1422–1430. <https://doi.org/10.1101/gr.4549206>
- Jones, A. K., & Sattelle, D. B. (2008). The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Invertebrate Neuroscience*, 8(1), 41–47. <https://doi.org/10.1007/s10158-008-0068-4>
- Jones, D. T., Taylor, W. R., & Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices. *Bioinformatics*, 8(3), 275–282. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>
- Kanof, P. D., & Greengard, P. (1978). Brain histamine receptors as targets for antidepressant drugs. *Nature*, 272(5651), 329–333. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Khakh, B. S., Buenstock, G., Kennedy, C., King, B. F., North, R. A., Séguéla, P., Voigt, M., Humphrey, P. P. A. (2001). International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacological Reviews*, 53(1), 107–118.
- Khatri, A., Sedelnikova, A., & Weiss, D. S. (2009). Structural rearrangements in loop F of the GABA receptor signal ligand binding, not channel activation. *Biophysical Journal*, 96(1), 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.09.011>
- Kita, T., Irie, T., Nomura, K., Ozoe, F., & Ozoe, Y. (2017). Pharmacological characterization of histamine-gated chloride channels from the housefly *Musca domestica*. *NeuroToxicology*, 60,

245–253. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.04.019>

- Knipple, D. C., & Soderlund, D. M. (2010). The ligand-gated chloride channel gene family of *Drosophila melanogaster*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *97*(2), 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.09.002>
- Krůšek, J., Dittert, I., Hendrych, T., Hník, P., Horák, M., Petrovic, M., Sedláček, M., Susánková, K., Svobodová, L., Tousová, K., Ujec, E., Vlachová, V., Vyklicky, L., Vyskocil, F., Vyklický, L. (2004). Activation and Modulation of Ligand-Gated Ion Channels. *Physiological Research*, *53*(SUPPL. 1).
- Lemoine, D., Jiang, R., Taly, A., Chataigneau, T., Specht, A., & Grutter, T. (2012). Ligand-gated ion channels: New insights into neurological disorders and ligand recognition. *Chemical Reviews*, *112*(12), 6285–6318. <https://doi.org/10.1021/cr3000829>
- Littleton, J. T., & Ganetzky, B. (2000). Ion Channels and Synaptic Organization. *Neuron*, *26*(1), 35–43. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81135-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81135-6)
- Lodge, D. (2009). The history of the pharmacology and cloning of ionotropic glutamate receptors and the development of idiosyncratic nomenclature. *Neuropharmacology*, *56*(1), 6–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.08.006>
- Lynagh, T., & Lynch, J. W. (2012). Molecular mechanisms of Cys-loop ion channel receptor modulation by ivermectin. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *5*(MAY 2012), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00060>
- Lynagh, T., & Pless, S. A. (2014). Principles of agonist recognition in Cys-loop receptors. *Frontiers in Physiology*, *5* APR(April), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00160>
- Manfrin, C., Souty-Grosset, C., Anastácio, P. M., Reynolds, J., & Giulianini, P. G. (2019). Detection and control of invasive freshwater crayfish: From traditional to innovative methods. *Diversity*, *11*(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/d11010005>
- Manfrin, C., Tom, M., De Moro, G., Gerdol, M., Giulianini, P. G., & Pallavicini, A. (2015). The eyestalk transcriptome of red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Gene*, *557*(1), 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.12.001>
- Marder, E., & Hooper, S. L. (1985). Neurotransmitter Modulation of the Stomatogastric Ganglion of Decapod Crustaceans. *Model Neural Networks and Behavior*, 319–337. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-5858-0_17
- Matsuzaki, S. I. S., Usio, N., Takamura, N., & Washitani, I. (2009). Contrasting impacts of invasive engineers on freshwater ecosystems: An experiment and meta-analysis. *Oecologia*, *158*(4), 673–686. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1180-1>
- Miller, P. S., & Smart, T. G. (2010). Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, *31*(4), 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.12.005>
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., & Unwin, N. (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*, *423*(6943), 949–955. <https://doi.org/10.1038/nature01748>

- Moorhouse, A. J., Keramidas, A., Zaykin, A., Schofield, P. R., & Barry, P. H. (2002). Single channel analysis of conductance and rectification in cation-selective, mutant glycine receptor channels. *Journal of General Physiology*, *119*(5), 411–425. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028553>
- Nässel, D. R. (1975). The Organization of the lamina ganglionaris of the prawn, *Pandalus borealis* (Kröyer). *Cell and Tissue Research*, *163*(4), 445–464. <https://doi.org/10.1007/BF00218491>
- Oh, Y., Jang, D., Sonn, J. Y., & Choe, J. (2013). Histamine-HisCl1 Receptor Axis Regulates Wake-Promoting Signals in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, *8*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068269>
- Orona, E., Elle, B. B., Ache, B. W., & Augustine, S. (1990). Evidence for the Putative Inhibitory Neurotransmitters Histamine and Gaba in Lobster Olfactory Lobes. *The Journal Of Comparative Neurology*, *646*, 633–646.
- Pantazis, A., Segaran, A., Liu, C.-H., Nikolaev, A., Rister, J., Thum, A. S., Roeder, T., Semenov, E., Juusola, M., Hardie, R. C. (2008). Distinct Roles for Two Histamine Receptors (hclA and hclB) at the *Drosophila* Photoreceptor Synapse. *Journal of Neuroscience*, *28*(29), 7250–7259. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1654-08.2008>
- Parker, J. (2001). Leader Peptide. *Encyclopedia of Genetics*, 1077–1078. <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.0746>
- Patel, D. R., & Feucht, C. (2011). Basic Concepts of Neurotransmission. *Pediatric Clinics of North America*, *58*(1), 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2010.11.004>
- Reed, S. E., Staley, E. M., Mayginnes, J. P., Pintel, D. J., & Tullis, G. E. (2006). Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors. *Journal of Virological Methods*, *138*, 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.07.024>
- Remnant, E. J., Williams, A., Lumb, C., Yang, Y. T., Chan, J., Duchêne, S., Daborn, P. J., Batterham, P., Perry, T. (2016). Evolution, expression, and function of nonneuronal ligand-gated chloride channels in *Drosophila melanogaster*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *6*(7), 2003–2012. <https://doi.org/10.1534/g3.116.029546>
- Sambrook, J., & Green, M. R. (2001). Molecular Cloning: A LABORATORY MANUAL. En *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th Edition (Vol. 1). <https://doi.org/10.3724/SP.J.1141.2012.01075>
- Sankaranarayanan, S., & Ryan, T. A. (2007). Neuronal Exocytosis. En *Protein Trafficking in Neurons*. <https://doi.org/10.1016/B978-012369437-9/50010-4>
- Sedlmeier, D. (1988). The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) releases amylase from the crayfish midgut gland. *Regulatory Peptides*, *20*(2), 91–98. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(88\)90042-0](https://doi.org/10.1016/0167-0115(88)90042-0)
- Sine, S. M., Shen, X. M., Wang, H. L., Ohno, K., Lee, W. Y., Tsujino, A., Brengmann, J., Bren, N., Vajsar, J., Engel, A. G. (2002). Naturally occurring mutations at the acetylcholine receptor binding site independently alter ACh binding and channel gating. *Journal of General Physiology*, *120*(4), 483–496. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028568>

- Stuart, A. E. (1999). From fruit flies to barnacles, histamine is the neurotransmitter of arthropod photoreceptors. *Neuron*, 22(3), 431–433. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80699-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80699-6)
- Stuart, A. E., Borycz, J., & Meinertzhagen, I. A. (2007). The dynamics of signaling at the histaminergic photoreceptor synapse of arthropods. *Progress in Neurobiology*, 82(4), 202–227. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.03.006>
- Suszkwi, J. B. (2012). Chapter 32 – Synaptic Transmission. En *Cell Physiology Source Book* (Fourth Edi). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387738-3.00032-9>
- Thompson, A. J., Lester, H. A., & Lummis, S. C. R. (2010). The structural basis of function in Cys-loop receptors. En *Quarterly Reviews of Biophysics* (Vol. 43). <https://doi.org/10.1017/S0033583510000168>
- Tovar, K. R., & Westbrook, G. L. (2012). Ligand-gated ion channels. En *Cell Physiology Source Book* (Fourth Edi). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387738-3.00031-7>
- Unwin, N. (2014). Nicotinic acetylcholine receptor and the structural basis of neuromuscular transmission: Insights from Torpedo postsynaptic membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 46(4), 283–322. <https://doi.org/10.1017/S0033583513000061>
- Webster, S. G., Keller, R., & Dircksen, H. (2012). The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting, and reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 175(2), 217–233. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.11.035>
- Weinreich, D., & Yu, Y. -T. (1977). The Characterization of Histidine Decarboxylase and Its Distribution in Nerves, Ganglia and in Single Neuronal Cell Bodies From the Cns of *Aplysia Californica*. *Journal of Neurochemistry*, 28(2), 361–369. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1977.tb07756.x>
- Witte, I., Kreienkamp, H. J., Gewecke, M., & Roeder, T. (2002). Putative histamine-gated chloride channel subunits of the insect visual system and thoracic ganglion. *Journal of Neurochemistry*, 83(3), 504–514. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01076.x>
- Yi, S., Li, Y., Shi, L., Zhang, L., Li, Q., & Chen, J. (2018). Characterization of Population Genetic Structure of red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, in. *Scientific Reports*, (November 2017), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23986-z>
- Yusein, S., Velikova, N., Kuppenova, P., Hardie, R., Wolstenholme, A., & Semenov, E. (2008). Altered ivermectin pharmacology and defective visual system in *Drosophila* mutants for histamine receptor HCLB (Invertebrate Neuroscience DOI 10.1007/s10158-008-0078-2). *Invertebrate Neuroscience*, 8(4), 223–224. <https://doi.org/10.1007/s10158-008-0083-5>
- Zhang, J., Xue, F., Liu, Y., Yang, H., & Wang, X. (2013). The structural mechanism of the cys-loop receptor desensitization. *Molecular Neurobiology*, 48(1), 97–108. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8420-z>
- Zheng, Y., Hirschberg, B., Yuan, J., Wang, A. P., Hunt, D. C., Ludmerer, S. W., Schmatz, D. M., Cully, D. F. (2002). Identification of two novel *Drosophila melanogaster* histamine-gated chloride channel subunits expressed in the eye. *Journal of Biological Chemistry*, 277(3), 2000–2005.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M107635200>

Zufall, F., Franke, C., & Hatt, H. (1988). Acetylcholine activates a chloride channel as well as glutamate and GABA - Single channel recordings from crayfish stomach and opener muscles. *Journal of Comparative Physiology A*, 163(5), 609–620. <https://doi.org/10.1007/BF00603845>