



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
ELECTROFISIOLÓGICA DEL CANAL H_v1
DEL CORAL *Acropora millepora***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA

P R E S E N T A:

CECILIA CERVANTES CANO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. GISELA EDITH RANGEL YESCAS

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2022





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.

La presente tesis fue realizada en el laboratorio de Biofísica molecular de canales iónicos, a cargo del Dr. León D. Islas Suárez, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM. Este trabajo fue financiado por el proyecto: “El papel de los canales iónicos permeables a protones en la fisiología del coral *Acropora*”. PAPIIT: IN215621.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A una de las casas más grandes de estudios: la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme sus puertas y tener una gran experiencia estando en ella.

Agradezco enormemente a la Dra. Gisela Rangel Yescas, por apoyarme en cada paso de este trabajo, por su paciencia, por el esfuerzo que me dedicó al asesorarme en todo este tiempo, por sus importantes sugerencias y correcciones.

Al Dr. León D. Islas Suarez por permitirme trabajar en su laboratorio, por sus recomendaciones, por sus comentarios al momento de analizar y hacer cada experimento.

Al M en C. Esteban Suárez Delgado por la gran ayuda en la elaboración de los múltiples experimentos y el respectivo análisis.

A la Bióloga Alejandra Itzel Llorente por su atención y recomendaciones para la realización de los experimentos.

A mis miembros del jurado, Dra. Myrian Velasco Torres, Dra. Carolina Barriga Montoya, Dr. Takuya Nishigaki Shimizu y Dr. José Estuardo López Vera, por sus valiosos comentarios, aportaciones y correcciones de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Dr. León Islas por brindarme sus conocimientos, por su paciencia, asistencia y asesoramiento.

A Gis Rangel, por compartirme sus saberes, por su enorme ayuda, por darme ánimos para continuar. Muchas gracias por tu comprensión y amabilidad. Eres una muy buena asesora.

A Esteban Suárez, por su incontable paciencia, por todas sus enseñanzas, por su linda amistad. Eres un gran maestro y un excelente amigo.

A Teriws Rangel, Miguel Cervantes Rocha y Maru Orozco por su bonita amistad, su gran ayuda y por los momentos divertidos que hemos pasado.

A Ana Sánchez por su amistad y sus consejos al momento de hacer experimentos. A Miriam Garcia y Ayme Castillo por su gran ayuda al momento de resolver cada duda que pudiera tener.

A Andrea Alarcón, aunque tu estancia en el laboratorio haya sido breve, me la pasé muy bien contigo, gracias por escucharme y ayudarme en todo lo necesario.

A Ofe Loyola y a Miguel Peralta, por su amistad, su ayuda y su compañía en tantas ocasiones.

A Anita Aguilar y Meztli Vázquez por acompañarme en todo este largo camino de la Biología, por su increíble amistad, por regalarme muchos momentos inolvidables. Me da una gran alegría y satisfacción que sean mis amigas.

A Michelle Acosta, por ser una valiosa y maravillosa amiga para mí desde hace tanto tiempo. Gracias por cada instante compartido conmigo. Sabes que te tengo un enorme cariño.

A mi familia de León, Guanajuato por su auxilio, por estar al pendiente de mi familia y de mí.

A Jesús (Chucho) por los buenos momentos, por estar ayudándonos a mi familia y a mí constantemente.

A mis hermanas Vero y Claudia, por todo lo que hemos vivido, por apoyarme en cada instante, estar conmigo en los buenos y no tan buenos momentos de mi vida, por confiar en mí y por sus múltiples consejos. Son maravillosas. Las quiero muchísimo.

A mis padres Emma y Salomón, por darme su hermoso amor y cariño, por su cuidado, su paciencia, por brindarme su imprescindible apoyo y no dejarme caer, por proporcionarme las bases para lograr ser una mejor persona cada día. Este logro también es de ustedes. Les quiero muchísimo.

“La única forma es seguir pensando, desinteresarse de uno mismo y ser indiferente a la muerte, porque la muerte no nos golpea a nosotros sino a nuestro cuerpo, y los mensajes que uno deja persisten...”

Rita Levi-Montalcini

Dedicada para mi mamá, mi papá y mis hermanas con mucho cariño

ÍNDICE	Pág.
1. RESUMEN	11
2. INTRODUCCIÓN	12
2.1 CANALES IÓNICOS	14
2.1.1 ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y PROPIEDADES BIOFÍSICAS DEL CANAL H_v1	18
2.1.1.1 Sensor del voltaje del canal H_v1	19
2.1.1.2 Selectividad y modulación por pH del canal H_v1	22
2.1.1.3 Conducción de protones a través del canal H_v1	25
2.1.1.4 Compuestos que pueden modular e inhibir el canal H_v1	26
2.1.1.5 Estequiometría de los canales H_v1	29
2.1.1.6 Importancia fisiológica del canal H_v1	32
2.1.1.7 El canal H_v1 participa en el proceso de calcificación	36
2.2 EL PROCESO DE CALCIFICACIÓN EN CORALES	38
3. JUSTIFICACIÓN	44
4. HIPÓTESIS	46
5. OBJETIVO GENERAL	46
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	46
6. MÉTODOS	47
6.1 IDENTIFICACIÓN DE LA POSIBLE SECUENCIA DEL CANAL PUTATIVO	
H_v1 DE <i>Acropora millepora</i> Y DISEÑO DE OLIGOS	47
6.2 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE <i>Acropora millepora</i>	48

6.3	AMPLIFICACIÓN DEL PUTATIVO CANAL H_v1 POR RT-PCR.....	49
6.4	TRANSFECCIÓN DEL CANAL AmH_v1 EN CÉLULAS HEK293	50
6.5	CONDICIONES DE REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS	51
6.5.1	CONDICIONES DE REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS CON ZINC.....	60
7.	RESULTADOS	63
7.1	IDENTIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DEL CANAL H_v1 DE <i>Acropora millepora</i>	63
7.1.1	AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DEL CANAL H_v1 DE <i>Acropora millepora</i>	69
7.2	CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DEL CANAL H_v1 DE <i>Acropora millepora</i> (AmH_v1) EXPRESADO EN CÉLULAS HEK293	72
7.2.1	DEPENDENCIA DE VOLTAJE Y MODULACIÓN POR ΔpH DEL CANAL AmH_v1	75
7.2.2	CURVAS DE CONDUCTANCIAS (G-V) DEL CANAL AmH_v1 CON DIFERENTES ΔpHs	77
7.2.3	CINÉTICA DE ACTIVACIÓN (T) DEL CANAL AmH_v1 DE CON DISTINTOS ΔpHs	79
7.2.4	COLAS DE CORRIENTE Y POTENCIAL DE REVERSIÓN (E_{REV}) DEL CANAL AmH_v1	80
7.2.5	EFECTO DEL ZINC SOBRE LAS FAMILIAS DE CORRIENTE Y CURVAS I-V DEL CANAL AmH_v1	83

8.	DISCUSIÓN.....	88
8.1	COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DEL CANAL AmH_v1 CON OTROS CANALES H_v1	88
8.2	MODELADO MOLECULAR DEL CANAL AmH_v1	92
8.3	FAMILIAS DE CORRIENTE Y CURVAS I-V DEL CANAL AmH_v1 CON DIFERENTES ΔpHs	93
8.3.1	CURVAS DE CONDUCTANCIAS (G-V) DEL CANAL AmH_v1 CON DIFERENTES ΔpHs.....	94
8.3.2	CINÉTICAS DE ACTIVACIÓN (τ) DEL CANAL AmH_v1 CON DISTINTOS ΔpHs	97
8.4	POTENCIAL DE REVERSIÓN (E_{REV}) Y SELECTIVIDAD DE PROTONES DEL CANAL AmH_v1	99
8.5	EFFECTO DEL ZINC SOBRE LAS FAMILIAS DE CORRIENTE Y CURVAS I-V DEL CANAL AmH_v1.....	101
9.	CONCLUSIONES	103
10.	PERSPECTIVAS	103
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

1. RESUMEN

El canal iónico H_v1 es una proteína integral que permite el paso de protones en respuesta a cambios en el potencial de membrana, está constituida por un dominio sensor de voltaje (*voltage-sensing domain* VSD por sus siglas en inglés) y no posee un dominio de poro. Además, es modulado por ΔpH e inhibido por zinc extracelular. Una vez activo, este canal permite la salida de protones al espacio extracelular, evitando así un pH ácido en la célula. El H_v1 se expresa en diferentes organismos a lo largo de la escala evolutiva. En el humano, por ejemplo, se expresa en diversas células del sistema inmune, participando en la regulación del pH durante la producción de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS por sus siglas en inglés). Por otra parte, se tienen evidencias que el H_v1 se expresa también en cocolitóforos, en donde se sugiere que participa en el proceso de calcificación. Otros de los organismos en donde se lleva a cabo dicho proceso de calcificación son los corales, sin embargo, se desconoce si en estos organismos también se expresan los canales H_v1 . El presente trabajo tuvo como objetivo general identificar y clonar el canal H_v1 perteneciente al coral *Acropora millepora*. Además de la clonación, en este proyecto también se realizó la caracterización electrofisiológica del canal AmH_v1 utilizando la técnica de *Patch-clamp*. Como resultados de este proyecto podemos destacar que: Se logró clonar y secuenciar el canal AmH_v1 , así mismo se realizó la caracterización funcional de dicha proteína. El estudio electrofisiológico se realizó en células HEK293 (*Human Embryonic Kidney cells* por sus siglas en inglés) que expresaban de manera transitoria el nuevo canal AmH_v1 . Nuestros resultados muestran que este canal permea protones de manera selectiva y que es activado por cambios de voltaje, observando corrientes a partir de -40 mV a $\Delta pH = 2$. De acuerdo con los resultados obtenidos, este canal también es modulado por ΔpH , encontrando mayor corriente a $\Delta pH = -2$. Por otra parte, observamos que su cinética de activación es mucho más rápida que la descrita para otros canales H_v1 . Finalmente, se encontró que también puede ser inhibido por la presencia de zinc. De acuerdo con nuestros resultados se puede concluir que el canal H_v1 clonado de *A. millepora* es un canal funcional en sistemas de expresión heterólogos y presenta algunas diferencias electrofisiológicas con respecto a los canales H_v1 reportados en otras especies. En un futuro, será necesario estudiar el papel que este canal pueda tener en el proceso de calcificación de los corales.

2. INTRODUCCIÓN

La membrana plasmática está conformada principalmente por una bicapa de fosfolípidos (Cooper, 2000), cuya estructura consiste en grupo fosfato unido a un glicerol y a dos ácidos grasos. Existen diversos tipos de fosfolípidos y pueden variar en su estructura, algunos de ellos son: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina (Gordon, 2003). Además, la membrana plasmática presenta moléculas de colesterol y glucolípidos, estos últimos sólo representan el 2 % de los lípidos de las membranas plasmáticas. Los lípidos son parte importante en la estructura de la membrana ya que conforman una barrera que limita el paso de moléculas dentro y fuera de la célula. Además de los lípidos, en la membrana celular también se encuentran muchos tipos de proteínas cuya principal función es la de mantener una comunicación entre el medio extracelular y el interior de la célula. El modelo de mosaico fluido (ver Figura 1), describe justamente cada una de las moléculas ya mencionadas y como se organizan en la membrana. Este modelo fue propuesto en 1972 por Jonathan Singer y Garth Nicolson.

De manera general las proteínas se clasifican en dos tipos; proteínas periféricas e integrales, las primeras son proteínas solubles, mientras que las segundas son proteínas transmembranales que están insertadas directamente en la bicapa y sus extremos sobresalen de la membrana (ver Figura 1) (Cooper, 2000). Un ejemplo de proteínas integrales son los canales iónicos, de los cuales se hablará a continuación.

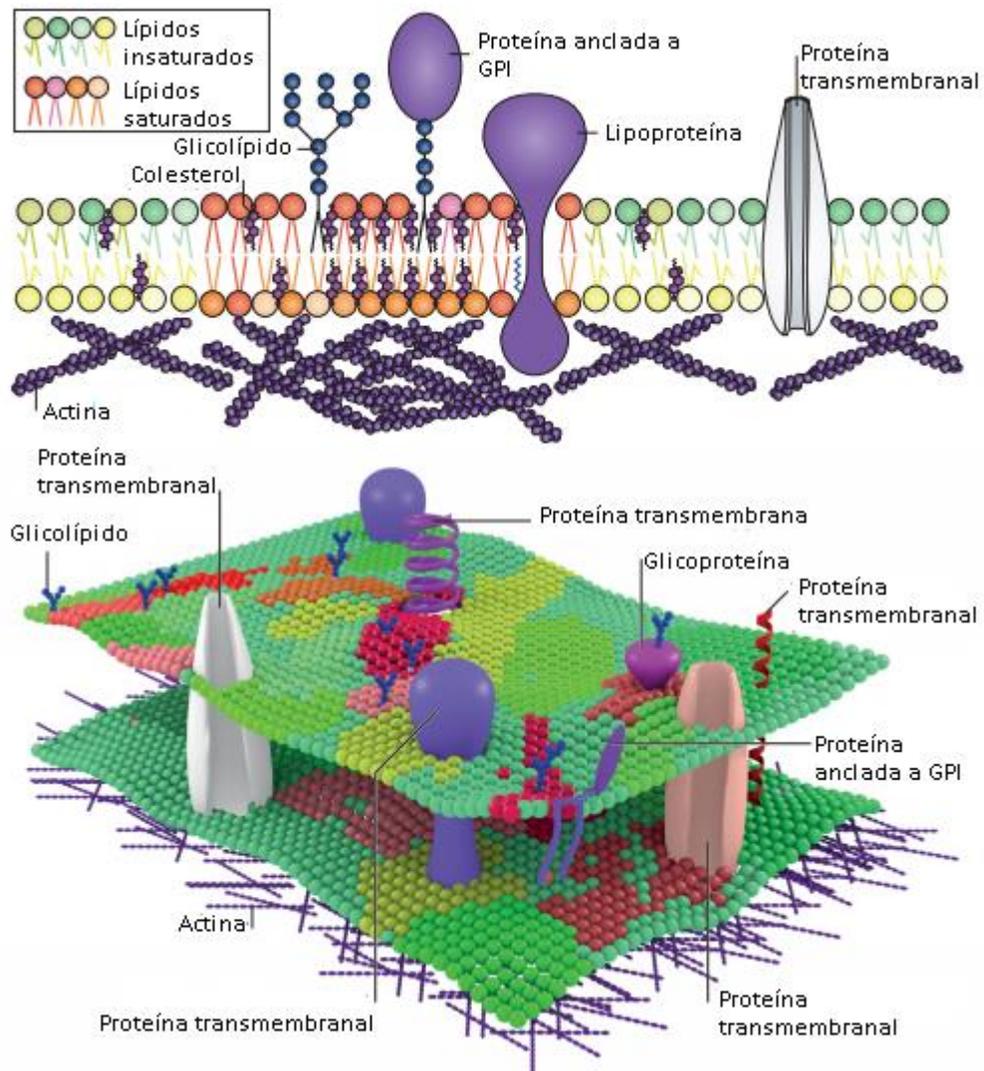


Figura 1. Esquema de la membrana plasmática. Vista dimensional y tridimensional donde se observan algunos de sus componentes, proteínas transmembranales, glicolípidos, proteínas ancladas a GPI y filamentos de actina. Modificado de Sezgin *et al.* (2017).

2.1 CANALES IÓNICOS

Los canales iónicos son proteínas integrales, generalmente multiméricas, que permiten el paso selectivo de iones de un lado a otro de la membrana, los cuales son activados en respuesta a un estímulo (ver Figura 2). Estas proteínas tienen un papel fundamental en las membranas tanto de células excitables como en las no excitables. Los canales están implicados principalmente en la señalización eléctrica de nervios y músculos, sin embargo, también participan en muchos otros procesos fisiológicos a nivel celular. Los canales iónicos responden de manera orquestada a diversas señales intracelulares o extracelulares, dichas señales promueven cambios conformacionales en los canales lo que permite la transición de un estado cerrado a uno abierto, permitiendo con ello el paso de iones (Hille, 2001). También existe el estado inactivado, en ese estado la señal que permite la apertura del canal está presente pero el canal no transita al estado abierto (Hille, 2001 en Sanchez, 2018). Para fines prácticos de este trabajo sólo se esquematiza el estado abierto y cerrado.

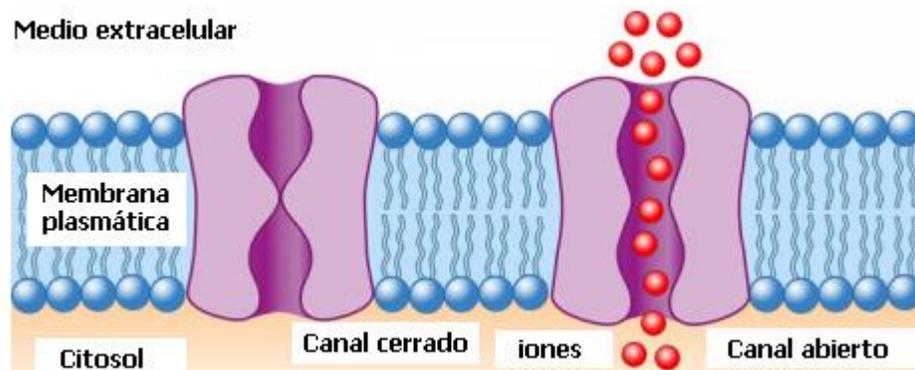


Figura 2. Esquema de la membrana plasmática. Entre los fosfolípidos se encuentra un canal iónico cerrado y uno abierto, éste último conduce los iones. Modificado de Fleig et al. (2014-2021).

Los canales iónicos se encargan de transportar diferentes iones de un lado a otro de la membrana plasmática. A través de ellos pueden pasar de 10^7 - 10^8 de iones por segundo, además, no necesitan energía para mover a los iones, participando en el transporte pasivo de la membrana. Los principales iones que atraviesan un canal iónico son: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- ,

cada uno se difunde rápidamente de acuerdo con su gradiente electroquímico (Hille, 2001; Taleinsnik, 2006).

En la siguiente tabla se muestran las concentraciones promedio de los iones principales en el medio intracelular y extracelular en una célula animal.

Tabla 1. Distribución de iones en medio intracelular y extracelular. La concentración está dada en milimolar (mM). Modificado de Molleman, 2003.

Ión	Intracelular (mM)	Extracelular (mM)
Na ⁺	5-20	130-160
K ²⁺	130-160	4-8
Ca ²⁺	50-1000 nM ^a	1.2-4
Mg ²⁺	10-20	1-5
Cl ⁻	1-60	100-140
HCO ₃ ⁻	1-3	20-30

^a Concentración en nanomolar (nM)

En la tabla puede observarse que existe una mayor concentración de iones de Na⁺ en el medio extracelular, lo que da como resultado mayor carga positiva fuera de la célula y la presencia de cargas negativas dentro de la misma. (Leuchtag, 2008). El potencial de reposo está dado por esta diferencia de concentración iónica dentro y fuera de la célula. Es importante mencionar que en el estado de reposo los canales iónicos están en un estado cerrado de manera general. Al medir la diferencia en la concentración de cargas dentro y fuera de las células se puede obtener un valor cercano a -70 mV (Gordon *et al.*, 2017), que es generalmente el potencial de reposo, aunque este puede oscilar de -20 mV a -120 mV según la célula y el organismo en cuestión (Alberts *et al.*, 2002). Esta diferencia de cargas en el estado de reposo está dada por la presencia de algunas proteínas en la membrana plasmática: a) los canales de fuga que se abren todo el tiempo y permiten que Na⁺ ingrese a la célula y el K⁺ salga de ella, y b) la bomba de Na⁺/K⁺ la cual participa en la entrada de K⁺ y salida de Na⁺ de manera constante (Gordon *et al.*, 2017).

El potencial de equilibrio de cada ion puede medirse por medio de la ecuación de Nernst (Ecuación 1); donde E es el potencial de equilibrio del ion con el que estamos trabajando, R es la constante universal de los gases ($8.3 \text{ Jmol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T es la temperatura en grados Kelvin, z es el estado de oxidación del ion en cuestión, F es la constante de Faraday ($9.65 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$), $[\text{ion}]_o$ y $[\text{ion}]_i$ concentración extracelular y concentración intracelular respectivamente, esta concentración dependerá de los iones con los que se esté trabajando.

Ecuación 1:

$$E = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{ion}]_o}{[\text{ion}]_i}$$

(Molleman, 2003)

Ahora bien, considerando que en la célula están presentes más de un ion que puede permear de un lado a otro de la membrana, para determinar el potencial de reposo se tiene que considerar la concentración interna y externa de cada uno de ellos, por lo que la ecuación más completa que nos permite calcular el potencial de membrana es la Goldman-Hodgkin-Katz (GHK):

Ecuación 2:

$$E_{rev} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_o + P_{Na}[Na^+]_o + P_{Cl}[Cl^-]_i}{P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_o}$$

(Hille, 2001)

En la ecuación P es la permeabilidad que corresponde a cada ion, en este caso los iones permeantes son K^+ , Na^+ y Cl^- . (Hille, 2001).

El potencial en la célula puede cambiar cuando hay algún movimiento de iones. Este movimiento de iones puede ser por ejemplo el resultado de la apertura de canales iónicos.

Los canales pueden tener de manera general un estado abierto y uno cerrado, y pueden pasar de un estado a otro en respuesta a diferentes estímulos. Los estímulos que permiten la activación de los canales son: a) cambio de voltaje a través de la membrana (canales activados por voltaje); b) por estímulos mecánicos (canales mecánicamente controlados); c) por la unión de un ligando al canal, ya sea extracelular o intracelular (canales activados por ligando) (ver Figura 3), es importante mencionar que el ligando puede ser un neurotransmisor, un ión (canales de ion-gated) o un nucleótido (canales de nucleótidos); y d) cambios en la temperatura. Además, la actividad de algunos canales se ve modulada por la fosforilación o desfosforilación de las proteínas, la presencia de algunos iones, o por cambios en el pH (Alberts, 2002).

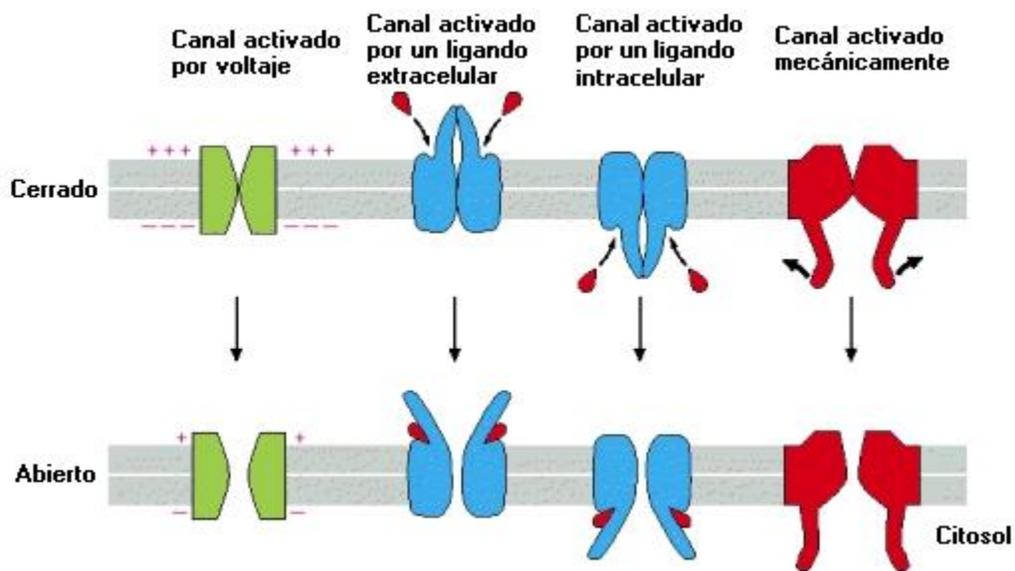


Figura 3. Esquema de los diferentes tipos de estímulos que permiten la apertura de los canales iónicos. Modificado de Alberts et al. (2002).

Hoy en día se sabe de la existencia de más de 100 tipos de canales iónicos, y continuamente se están describiendo nuevos canales. Tan sólo una neurona puede presentar

hasta 10 tipos de canales iónicos. A pesar de esto, los canales no están delimitados a células excitables, podemos encontrarlos en cualquier tipo de célula animal, vegetal o incluso en microorganismos (Alberts, 2002). Es importante mencionar que su importancia fisiológica es muy grande, dado que participan en un sin número de procesos celulares en los organismos donde se expresan.

De acuerdo con los intereses de este trabajo, a continuación, se describirá de manera particular a los canales H_v1.

2.1.1 ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y PROPIEDADES BIOFÍSICAS DEL CANAL H_v1

En el año 2006 fue clonado el gen HVCN1 que codifica para la proteína conocida como canal de protones activado por voltaje (*voltaje-gated proton channel 1*, H_v1 por sus siglas en inglés) o canal sensible a voltaje 1 (*voltaje-sensor-only protein 1*, VSOP por sus siglas en inglés) (ver Figura 9). Dicho canal pertenece a la familia de canales que contiene el VSD. Los primeros canales que fueron identificados con VSD se encontraron en neuronas de caracol en la década de los ochenta, a partir de entonces se realizaron diversos estudios que permitieron describir algunas de sus propiedades biofísicas y su papel biológico. Sin embargo, fue hasta fechas recientes que se logró clonar el gen que codifica para el canal que permea protones el cual es activado por voltaje (Tombola *et al.*, 2009; Clark, 2016; DeCoursey, 2013). El canal H_v1 de humano contiene 273 aminoácidos, estos aminoácidos están dispuestos a través de la membrana formando cuatro segmentos transmembranales, que van del S1 al S4, en dichos segmentos se encuentra el dominio N-terminal rico en prolina, un VSD y un dominio C-terminal (para más detalles ver sección 2.1.1.3). Se sugiere que el canal está formado por dos subunidades (dímero) (ver Figura 11), aunque algunas evidencias indican que se puede expresar también como monómero, tanto las corrientes de monómeros como de dímeros pueden distinguirse electrofisiológicamente (ver Figura 12). Es importante resaltar que cada monómero puede responder de manera independiente al voltaje y que

contienen su propia vía de conducción de protones (H^+), más adelante se abordará este último punto (ver Figura 4) (Clark, 2016; Hong, *et al.*, 2014; Shu *et al.*, 2009).

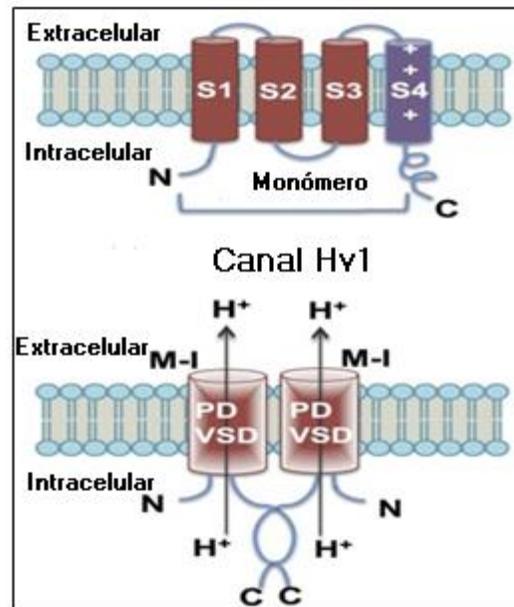


Figura 4. Esquema de la estructura del canal $Hv1$. En la parte superior puede observarse un monómero constituido por 4 segmentos transmembranales que abarcan del S1 al S4, el VSD se encuentra en el S4, así mismo, se observan el N-terminal y el C-terminal en la región intracelular. En la parte inferior de la figura se observan dos subunidades formando un dímero unidos por los C-terminales de cada monómero, al mismo tiempo se observan los VSDs que se encargan de censar el voltaje y de permear los H^+ al exterior de la célula. Modificado de Gianti, *et al.* (2016).

2.1.1.1 Sensor del voltaje del canal $Hv1$

De acuerdo con algunos estudios de mutagénesis puntual, se ha sugerido que ciertos aminoácidos en el segmento S4 del canal pueden participar en la detección del voltaje (Cherny *et al.*, 2015). De manera particular, se ha propuesto que la sensibilidad al voltaje está dada principalmente por la presencia de tres argininas que están cargadas positivamente ubicadas en el S4. Se tienen evidencias que sugieren que estas argininas tienen contacto con la solución interna de la membrana cuando el canal está cerrado, pero cuando el canal se encuentra en el estado abierto, las argininas se desplazan hacia afuera y ahora están en contacto con la solución externa. Se ha propuesto que mientras ocurre la apertura del canal

el S4 se mueve hacia afuera (ver Figura 5) pasando por una región conocida como “centro de transferencia de carga” donde se ubica una fenilalanina altamente conservada; este aminoácido va a mediar el contacto con el medio extracelular o intracelular, por lo tanto, cuando ocurra el movimiento del S4 donde se localizan las argininas, éstas se verán obligadas a desplazarse por dicha región y quedarán en contacto con el medio externo. Además de las Arg que se pueden encontrar en los canales H_v1 , también existen varios aminoácidos conservados en los segmentos que van del S1 al S3 que modulan el estado cerrado o abierto del canal. En otros estudios se ha visto que este movimiento es parecido al que ocurre en los canales dependientes de voltaje (DeCousery, 2018).

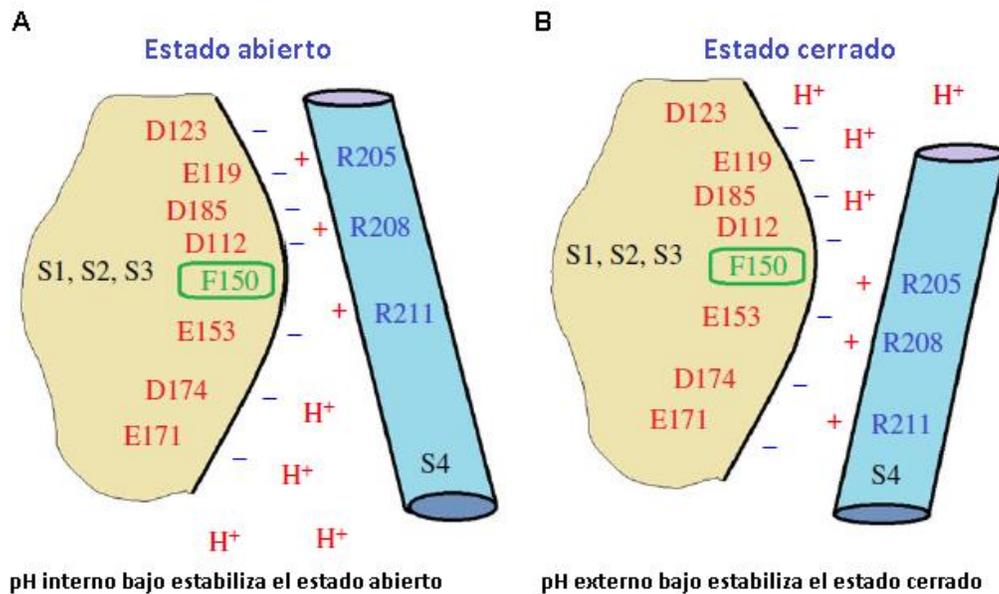


Figura 5. Esquema del estado abierto y cerrado del canal H_v1 . En la parte A, se observa el estado abierto con el movimiento del S4 hacia la parte extracelular, el cual presenta las argininas (en color azul) implicadas en la detección del voltaje y el paso de protones a través de éste para estabilizar el estado abierto disminuyendo el pH intracelular. De lado B, se ilustra el estado cerrado y la extrusión de protones, lo que aumenta el pH externo y logra estabilizar el estado cerrado.

En ambas imágenes se enfatiza la interacción con la F150 (en color verde). Modificado de DeCoursey, 2018.

Como se mencionó anteriormente el canal H_v1 es capaz de “sensar” el voltaje y parte de su activación depende justamente de la despolarización de la membrana. Evidencia de ello son los resultados obtenidos en el estudio de Chae y colaboradores (2017). En el estudio,

ellos registraron corrientes de protones con el método de *Patch-clamp* en configuración whole-cell, en células HEK293 transfectadas con hH_v1, donde aplicaron el siguiente protocolo: potencial de mantenimiento (*holding potential* en inglés) -60 mV. Los pulsos comenzaron en -60 mV a 100 mV con incrementos de 10 mV en 10 mV a pH_i (pH interno) 6.0 y sólo cambiando el pH_o (pH externo) 7.0, 7.4 y 7.8.

De acuerdo con lo observado en las familias de corrientes obtenidas a diferentes valores de pH, encontraron que las corrientes de protones responden de manera eficiente al voltaje y se ven modificadas conforme aumenta el valor del pH_o, es decir, la amplitud de la corriente es más grande y aumenta el umbral de activación a pH relativamente más básico. En el panel A de la Figura 6 se presentan varias familias de corrientes, la primera familia de corrientes con pH_o 7.0 con un valor de corriente máxima alrededor de 1.4 nA, la segunda familia de corrientes con pH_o 7.4, el valor de la corriente máxima es cerca de 1.9 nA y la tercera familia de corrientes con un pH_o 7.8 y un valor de corriente máxima de 3.2 nA, las tres familias de corrientes llegan a ese nivel corriente máxima a un voltaje de 100 mV, sin embargo, presentan depleción. En este mismo estudio también hicieron curvas I-V (ver Figura 6, panel B), que plasman a que potencial se abre el canal, así como su activación por voltaje. La curva I-V con pH_o 7.8, su apertura comienza a -30 mV; las curvas I-V con pHs externos 7.0 y 7.4, la activación del canal ocurre alrededor de 10 mV. Estos resultados coinciden con los esperados para los canales de protones.

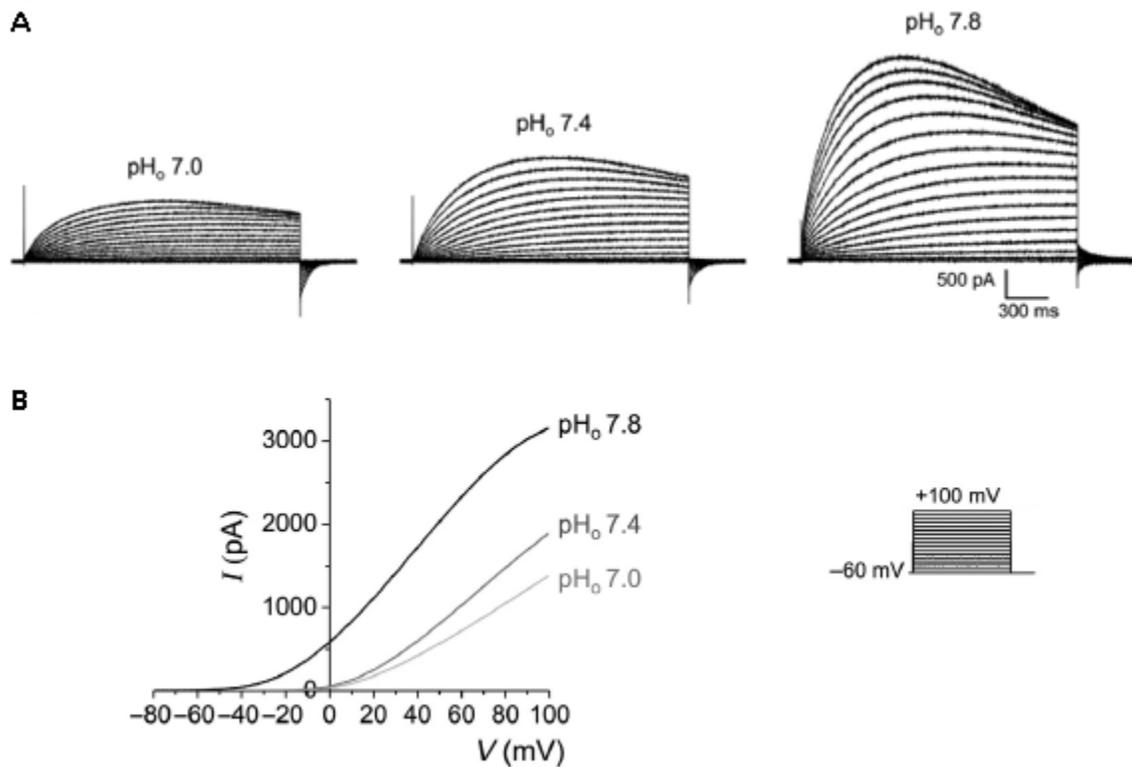


Figura 6. Familias de corriente de humano (hHv1) en células HEK293 (utilizando la técnica *Patch-clamp* en configuración whole-cell) y curva I-V. En la parte (A) se observa como la amplitud es más grande conforme aumenta el pH_o. En la parte (B) se tiene la curva I-V ejemplificando los tres pH_o, donde se observa que el canal se activa a voltajes más negativos si se aumenta el pH_o. Modificado de Chae *et al.* (2017).

2.1.1.2 Selectividad y modulación por pH del canal H_v1

Se tienen registradas alrededor de 40 secuencias de proteínas que pueden o codifican para H_v1, de las cuales 8 de ellas (ver sección 2.1.1.6) se han confirmado que son canales que transportan corrientes de protones, la mayoría son proteínas pequeñas que se componen de 230 hasta 480 aminoácidos (Rangel *et al.*, 2021; DeCoursey, 2013). En todos los canales de protones identificados hasta ahora se ha encontrado que son regulados fuertemente por la diferencia del pH dentro y fuera de la célula o ΔpH; el ΔpH se define como la diferencia de pH que hay entre ambos lados de la membrana plasmática. La activación del canal sólo sucede cuando el gradiente tiene mayor concentración de protones en el lado interno de la célula, por lo tanto, el canal dejará salir la mayor cantidad de éstos hacia el lado externo de

la membrana (DeCoursey, 2018). Se ha visto en el canal de protones humano que su voltaje de activación media cambia alrededor de 40 mV por 1 unidad de ΔpH , ya sea aumentando o disminuyendo el pH externo o interno, esta característica se presenta en canales monoméricos o diméricos (DeCoursey, 2018; Islas, 2018; Seredenina *et al.*, 2015).

La ecuación de Nernst (ver Ecuación 1) como se describió previamente, indica el valor del E_{rev} el cual es un factor imprescindible cuando se trata de determinar la selectividad de algún ion (Hille, 2001).

Chae *et al.* (2017) hicieron registros whole-cell con distintos pHs externos y con un pH interno de 6.0 con el propósito de obtener el E_{rev} , éste último fue calculado a través de la ecuación de Nernst. Los resultados fueron los siguientes: pH_o 7.0: $E_{\text{rev}} = -58$ mV; en pH_o 7.4: $E_{\text{rev}} = -81.2$ mV; pH_o 7.8: $E_{\text{rev}} = -104.4$ mV. Los valores obtenidos experimentalmente fueron: pH_o 7.0: $E_{\text{rev}} = -24$ mV; pH_o 7.4: $E_{\text{rev}} = -63$ mV y pH_o 7.8: $E_{\text{rev}} = -71$ mV. Estos resultados experimentales se obtuvieron a través de protocolos de colas de corriente que iban con un prepulso de 80 mV durante dos segundos, posteriormente obtuvieron una repolarización aplicando voltajes desde -100 mV a 20 mV. (ver Figura 7). Los autores explican que a pesar de que no coinciden los valores experimentalmente con los calculados, el potencial de reversión se movió en favor del gradiente de protones cuando el pH externo era mayor. Ellos mencionan que las diferencias en el potencial de reversión pueden deberse a que muchos protones salen de la célula por lo cual el pH_i de ésta aumenta.

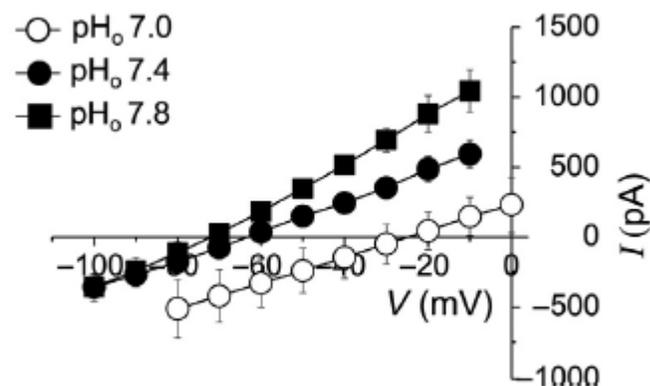


Figura 7. Grafica de colas de corriente. Las colas de corriente con diferentes valores de pH_o : 7.0 (con círculos blancos), 7.4 (con círculos negros) y 7.8 (con cuadrados negros), se obtuvieron aplicando prepulsos de +80 mV para lograr que el canal se despolarice, seguido de una repolarización con pulsos de -100 a 20 mV. Modificado Chae *et al.* (2017).

En este estudio los cálculos se realizaron para H^+ , encontrando que la permeabilidad de los canales H_v1 es exclusiva para protones, ya que el valor del potencial de reversión únicamente corresponde a éstos y no a ningún otro ion (Chae *et al.*, 2017).

Por otra parte, en la Figura 8 se muestran varias familias de corriente sometidas a diferentes ΔpH_s , estas corrientes de protones pertenecen al caracol (*Helisoma trivolvis*) que presenta el canal HtH_v1 . En esta figura puede observarse que las despolarizaciones activan al canal y presenta una cinética de activación rápida, a pesar de esto, conforme subía el pH externo el canal se activó a voltajes más negativos y su cinética de activación aumentó, esto se contrasta con el tiempo en que se abría el canal, a los 50 ms se tiene una apertura total del canal, por lo tanto, H_v1 es sensible a pH externo y es activado con despolarizaciones (Thomas *et al.*, 2018).

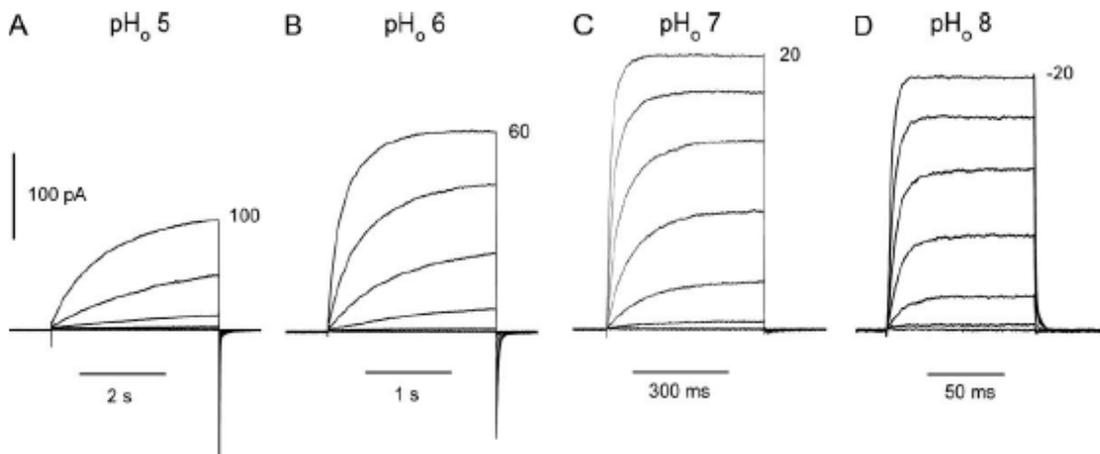


Figura 8. Esta figura representa 4 familias de corriente de protones que pertenecen a HtH_v1 transfectadas en células HEK 293. Los cuatro registros se hicieron con pH 6 intracelular y sólo se cambió el valor del pH externo 5, 6, 7 y 8. El voltaje de mantenimiento fue de -40 mV en A y B, -60 mV en C y -90 mV en D hasta el voltaje que se indica en cada familia de corrientes, en la primera familia de corrientes de lado izquierdo es 100 mV, en la segunda es 60 mV, en la tercera es 20 mV y en la cuarta es -20 mV. El tiempo de registro fue diferente para cada una de ellas. Modificado de Thomas *et al.* (2018).

2.1.1.3 Conducción de protones a través del canal H_v1

Anteriormente se mencionó que el canal de protones está conformado por un VSD y no posee un dominio de poro como tal. De acuerdo con lo anterior se asume que el VSD actúa como sensor de voltaje y al mismo tiempo como poro del canal. Sin embargo, aún quedan varias incógnitas acerca de cómo es que el canal H_v1 conduce los protones. A continuación, se plantean algunas teorías que tratan de explicar cómo se da el transporte de protones a través del VSD.

Se sabe que en el núcleo de H_v1 está formado por puentes de hidrogeno que pudieran ser fundamentales para permitir el paso de protones, así como la activación por medio del voltaje. Se ha propuesto que, cuando el canal se despolariza el S4 se mueve hacia el lado extracelular de la célula y el ácido aspártico en la posición 108 (Asp108) forma puentes salinos con las argininas que están localizadas en el S4, la formación de estos puentes salinos es importante para la conducción de los protones a través del canal. Esto se observó por medio de simulación de dinámica molecular con la proteína CiH_v1 perteneciente a *Ciona intestinalis* (Okamura *et al.*, 2015).

En otro estudio de simulación molecular con el mismo aminoácido Asp108, se observó que este aminoácido sufre desprotonación y protonación en su grupo carboxilo, además es importante mencionar que, las argininas cambian la constante de disociación (pK_a) del aminoácido cuando se encuentran cercanas a éste. Por otra parte, las mismas argininas en el S4 pueden atraer aniones y repeler cationes, lo que se ha comprobado con la mutación en Asp112 en la proteína hH_v1 (Okamura *et al.*, 2015).

Asimismo, se ha observado en el canal de protones humano un ácido aspártico (Asp112) ubicado en el S1, dicho aminoácido es un punto clave para la conducción de

protones. Cuando se generaron mutaciones neutralizantes el canal fue permeable a aniones y la mutación Asp112His atrajo aniones (DeCoursey, 2012; Seredenina *et al.*, 2015). En otro estudio se comparó el canal hH_v1 con el gen de humano C15orf27, el cual presenta también tres residuos de arginina (Musset, *et al.* 2012) y tiene una estructura similar a H_v1, pero no tiene conductancia medible y hasta el momento no se sabe cuál es su función. Con la finalidad de inducir la conductancia en C15orf27, y abolirla en H_v1, se hicieron 5 mutaciones (Asp112, Asp185, Asn214, Gly215 y Ser219), al analizar los resultados, cuatro de las mutantes presentaron conducción selectiva a protones, excepto la mutación Asp112Val donde no se observó una corriente clara, esto indica que la Asp112 es importante para que se dé la conducción de protones (DeCoursey, 2013).

Cuando el canal hH_v1 se encuentra en un estado abierto la Asp112 llega a interactuar con alguna Arg que se encuentra en el S4. Se piensa que en varias H⁺-ATPasas se localiza una Arg altamente conservada, ésta Arg disminuye el pka del residuo de Asp, lo cual permite la salida de protones. Cuando la Asp112 se neutraliza existe una carga positiva no compensada, entonces ahora se presenta una selectividad a los aniones (DeCoursey, 2012; DeCoursey, 2013). En resumen, la permeación de protones depende de varios aminoácidos localizados en distintos segmentos del canal, aunque la mayor evidencia está focalizada en el segmento S4, que es donde se centran más los estudios ya que presenta las tres argininas que son cruciales para la detección del voltaje.

2.1.1.4 Compuestos que pueden modular e inhibir el canal H_v1

Además de ser modulado por el Δ pH, la actividad del canal H_v1 también es afectada por la presencia de algunos cationes divalentes como Zn²⁺ y Cd²⁺. En el caso del Zn²⁺, se ha podido determinar que actúa como un inhibidor de las corrientes de protones. De manera particular se ha visto que en canales H_v1 de mamíferos, este catión se une a dos residuos de histidina (His140 e His193), la His140 está localizada en el S2 y la His193 se localiza entre el S3 y S4 del canal, cuando ocurre dicha unión, la cinética de activación, la corriente y el

voltaje de activación se ven afectadas. Sin embargo, Jardín y colaboradores proponen que el Zn^{2+} sólo se puede unir a uno de estos dos sitios (ver Figura 9) debido a que existe una considerable distancia entre ellos y el Zn^{2+} no podría interactuar con ambos.

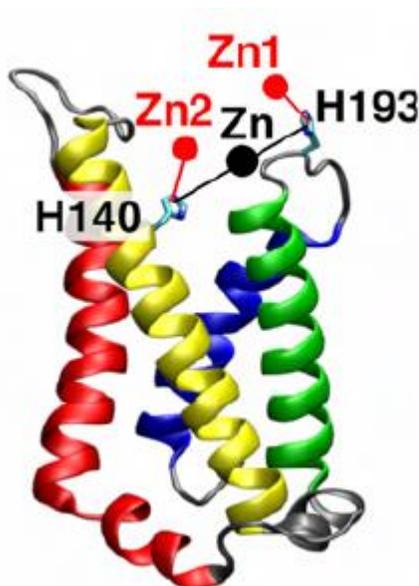


Figura 9. Figura del canal iónico hHv1 con los cuatro pases transmembranales. En rojo se representa el S1, en amarillo el S2, en verde el S3 y en azul el S4. Con letras rojas se señalan los dos sitios con los cuales puede interactuar el zinc, ya sea con His140 o His193 y con letras negras se señalan los únicos sitios de unión de zinc. Modificado de Jardín *et al.* (2019).

La proteína H_v1 también es inhibida por hanatoxina. Dicha molécula es una toxina que está presente en el veneno de la araña *Grammostola spatulata*. Se tienen evidencias de que esta toxina inhibió corrientes de protones, debido a que en el canal tiene una estructura conocida con el nombre de “*paddle motif*” (en español motivo de paleta) localizada entre los segmentos S3 y S4, el paddle motif está implicado en la detección del voltaje no sólo en H_v1 , también en otros canales activados por voltaje. Así como la hanatoxina tuvo un efecto en la corriente, otros compuestos se ha visto que bloquean la corriente de protones como: 2-guanidinobencimidazol (2GBI) y 1- (1,3-benzotiazol-2-il) guanidina (Seredenina *et al.*, 2015) (ver Figura 10).

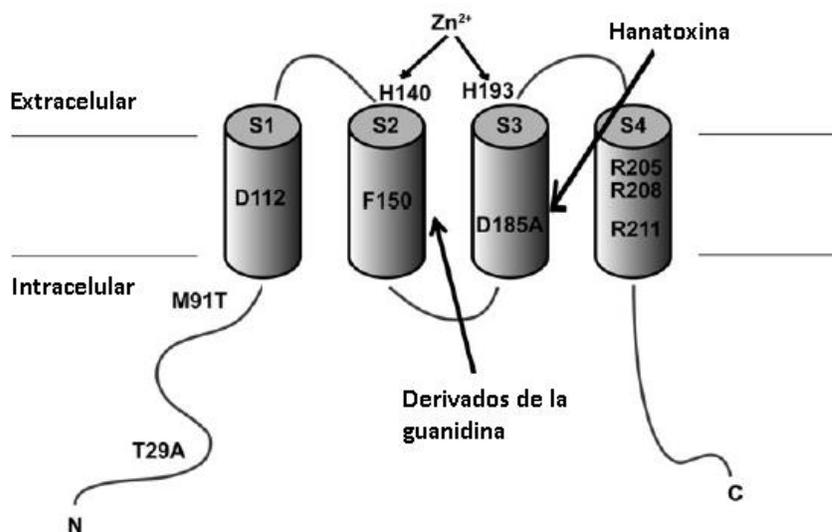


Figura 10. Esquema de H_v1, en él se muestran algunos aminoácidos que están involucrados en la modulación del canal. La T29 es un sitio de fosforilación; la mutación M91T disminuye la detección del pH; H140 y H193 son el sitio de unión con Zn²⁺; D185 sitio de unión a la hanatoxina; R205, R208, R211 aminoácidos que detectan el voltaje. Modificado de Serendina, *et al.* (2015).

Existen otros factores que modulan la actividad del canal de protones, por ejemplo: el estado de fosforilación de la treonina en la posición 29 (T29), facilita la activación del canal, ya que se ha observado un aumento en la conductancia, no sé sabe cómo es el mecanismo que favorece este proceso, pero se tienen varias explicaciones; una de ellas es que el fosfato reúne varios protones cerca de un grupo que puede detectar el pH de manera interna; al mismo tiempo se hicieron mutaciones en la serina (S97) como S97A y S97D porque se sabe que también es un sitio de fosforilación, pero las mutaciones no tuvieron efectos significativos en la activación del canal (Musset *et al.*, 2009). Asimismo, cuando la asparagina localizada en la posición 214 (214N) es mutada a una cisteína, el canal se observa bloqueado por metanotiosulfonato (methanethiosulfonate, MTS por sus siglas en inglés), modificando la vía de conducción (Shu *et al.*, 2009; Tombola *et al.*, 2009).

Por otra parte, el canal tiene otras características que no han sido tan estudiadas, pero también son de importancia, como por ejemplo sería interesante estudiar su modulación por temperatura.

En resumen, el canal puede ser inhibido y modulado por varios factores, pero los principales y de los que se tiene mayor evidencia es el pH interno y externo de la célula, así como la presencia de zinc.

2.1.1.5 Estequiometría de los canales H_v1

La mayoría de las evidencias experimentales sugieren que el canal H_v1 se expresa como un dímero, sin embargo, se ha reportado que también es funcional como monómero. Se sugiere que la dimerización se da como resultado la interacción del dominio C-terminal de ambas subunidades (ver Figura 11). El dominio C-terminal se ha visto en cristalografía de rayos X como una α -hélice que forma una estructura llamada coiled-coil. Debido a la formación de coiled-coil pueden existir varias interacciones entre las dos proteínas como: enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y puentes salinos, las cuales se sugieren que favorecen a la estabilidad del dímero. En el centro del coiled-coil se presentan asparaginas que son capaces de contribuir a la dimerización. Se ha observado en otros estudios también la presencia de cisteínas que pueden de igual forma estar interviniendo en la formación del dímero (Boonamnaj y Sompornpisut, 2018).

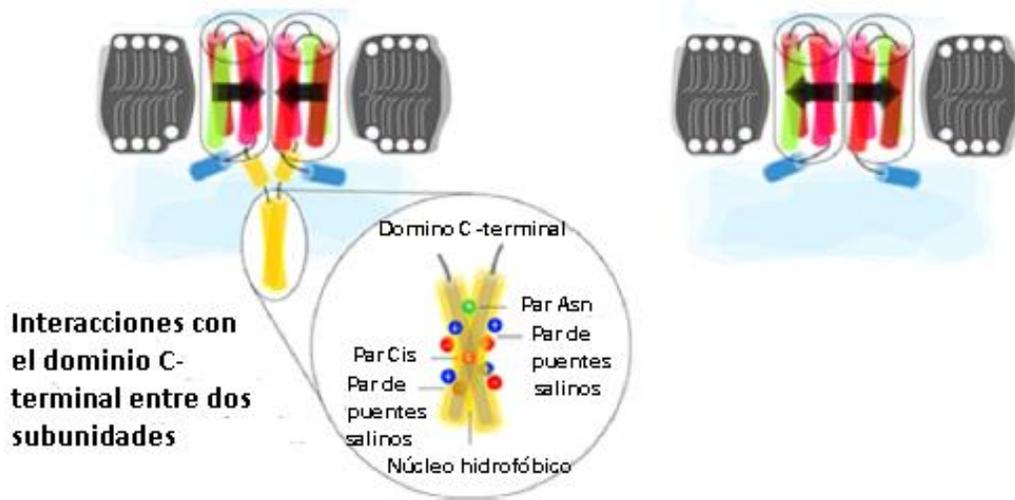
Canal H_v1 con el dominio C-terminal**Canal H_v1 sin el dominio C-terminal**

Figura 11. Formación del dímero entre dos subunidades. De lado izquierdo de la imagen se muestra la formación de un dímero con la interacción de los dominios C-terminal, además de los aminoácidos que intervienen y los puentes salinos que ayudan a la estabilización de este. Del lado derecho se observa el dímero, pero con la carencia del C-terminal.

Modificado de Boonamnaj y Sompompisut, 2018.

Existen algunas diferencias biofísicas entre el dímero de H_v1 y el monómero, la principal de ella es la cinética de activación; el monómero presenta una activación de 3 a 6 veces más rápido que el dímero. Por otra parte, se ha observado que el dímero de H_v1 WT (*wild type* por sus siglas en inglés) comparado con construcciones monoméricas su cinética es aproximadamente 5 veces más lenta, su apertura es de tipo sigmoideal (ver Figura 12), tiene mayor dependencia al voltaje y su curva G-V presenta voltajes de 10 a 15 mV más positivos (Smith y DeCoursey, 2014).

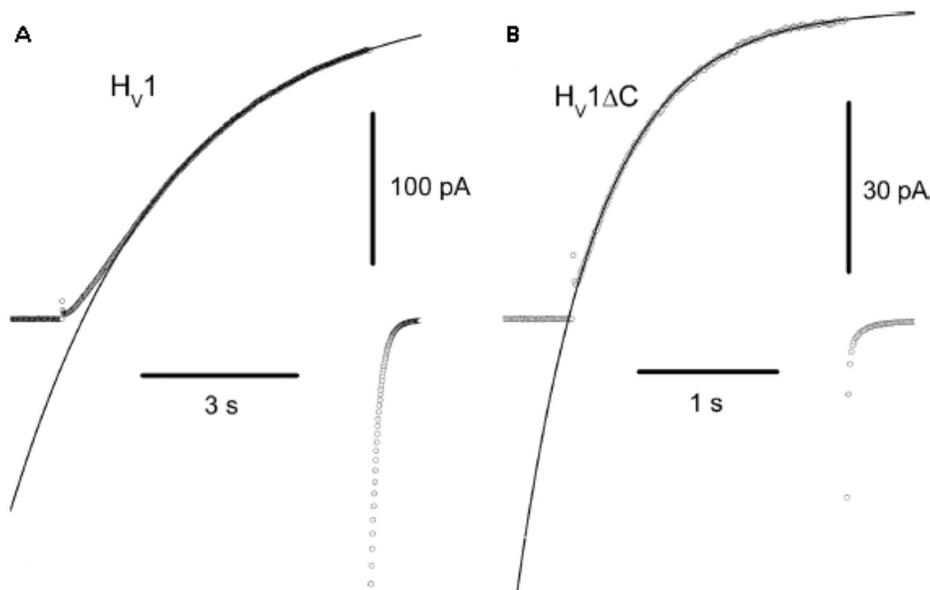


Figura 12. Cinética de activación de H_v1 , dímero y monómero. Se puede notar el curso de tiempo de activación de la corriente en el dímero hH_v1 WT y el monómero truncado correspondiente a CiH_v1 . El canal hH_v1 (A) tiene un comportamiento sigmoideal, mientras que el canal CiH_v1 (B) exhibe un comportamiento tipo exponencial. Modificado de Smith y DeCoursey, 2014.

El hecho de que el dímero tenga una cinética de activación más lenta sugiere que cada monómero tiene que estar en un estado abierto para que ocurra la conducción de protones a través del canal, por lo tanto, los monómeros se activan de manera independiente y existe cooperatividad entre ellos (Castillo *et al.*, 2015).

A pesar de las evidencias mostradas, aún existen varias interrogantes al respecto de la estequiometría del canal, por lo que será necesario realizar más estudios al respecto utilizando otro tipo de metodologías, como por ejemplo FRET (Transferencia de Energía por Resonancia Fluorescente) que es una técnica que puede ayudar a resolver gran parte de las incógnitas que aún existen sobre este tema.

2.1.1.6 Importancia fisiológica del canal H_v1

Las corrientes de protones se han detectado en varios organismos como: caracoles, ajolote mexicano y una rana, así como en diferentes mamíferos como rata, hámster chino y conejo, pero en estos organismos aún no se tiene identificado el gen que codifica para el canal de protones H_v1. Sin embargo, para otras especies ya se tiene identificada la secuencia que codifica para esta proteína, entre ellas están: el coral (*Strongylocentrotus purpuratus*), el urocordado (*Ciona intestinalis*), el dinoflagelado (*Karlodinium veneficum*), la diatomea (*Phaeodactylum tricornutum*), algunas especies de fitoplancton como (*Coccolithus pelagicus* spp *braarudii* y *Emiliana Huxleyi*), así como ratón (*Mus musculus*) y humano (*Homo sapiens*) (DeCoursey, 2013). El canal H_v1 que pertenece a humano es de los más estudiados, por lo tanto, se usará como ejemplo en este trabajo para describir su localización, sus propiedades biofísicas y su importancia fisiología.

En el humano ha sido muy bien caracterizado el papel del canal H_v1, principalmente en el sistema inmune innato (DeCoursey, 2013). En dicho sistema se ha podido identificar la expresión de este canal en células fagocíticas, como: neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y linfocitos (ver Figura 13) (Okamura, 2015). Estas células son las encargadas de fagocitar a agentes patógenos posiblemente letales para el organismo. Cuando ocurre la fagocitosis se producen radicales libres necesarios para degradar los agentes patógenos que ingresan en el sistema, los radicales libres se liberan en un suceso conocido como “estallido respiratorio” o “respiratory burst” (en inglés) (Morera *et al.*, 2015). Se llama estallido respiratorio porque una gran cantidad de oxígeno se ve implicado en esta acción (Okamura *et al.*, 2015). Un factor muy importante al momento que se da el estallido respiratorio es la activación de la enzima NADPH oxidasa (nicotinamida adenina dinucleótida fosfato oxidasa), la mayor parte de la activación de esta enzima ocurre por fosforilación que se lleva a cabo por la proteína quinasa C (DeCoursey, 2013). La activación de la enzima NADPH oxidasa produce compuestos químicos como anión superóxido (O₂⁻) y varios radicales libres que son dañinos, pero ayudan a combatir el patógeno, mientras esto sucede, la enzima transporta electrones a

través de la membrana plasmática del fagocito y esto deja una carga elevada de protones dentro de la célula, es aquí donde participa el canal H_v1. La activación de dicho canal permite un flujo de protones para mantener las cargas equilibradas dentro de la célula mientras ocurre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la enzima NADPH oxidasa (Morera *et al.*, 2015; Okamura *et al.*, 2015).

Además, se ha visto en ratones knockout HVCN1, la producción de anión superóxido y peróxido de hidrogeno se observa bastante reducida, entre un 30 y 50 % (Okamura, *et al.*, 2015). Esto mismo se ha visto en linfocitos B que también son knockout, así como una mayor acidificación celular. H_v1 se expresa en células dendríticas y cuando son expuestas a lipopolisacáridos se observa un mejoramiento en las corrientes de protones, así como un aumento en la producción de ROS (Szteyn *et al.*, 2012; Capasso, 2014).

Por otra parte, se ha demostrado también que los canales de protones están implicados en el asma, ya que liberan mayor cantidad de ácido en la luz alveolar de los pulmones, este ácido extruido provoca una inflamación en el tejido, para disminuir esta inflamación se utiliza zinc que logra inhibir el canal (Morera *et al.*, 2015). Asimismo, las células que se encuentran en las vías respiratorias y presentan la mutación M91T en H_v1, eran menos sensibles al pH, por lo tanto, la actividad del canal se observa reducida, a pesar de esto aún quedan por realizar diversos estudios acerca de esta mutación (Seredenina *et al.*, 2015).

Tipo de célula	¿Expresión de NADPH oxidasa?	Funciones reguladas por HVCN1
Neutrófilos 	Sí	<ul style="list-style-type: none"> -Reequilibrio del potencial de membrana -Aliviar la acidificación -ROS en la muerte microbiana
Eosinófilos 	Sí	<ul style="list-style-type: none"> -Producción extracelular de ROS -¿Eliminación de parásitos? -¿Muerte celular?
Basófilos 	No	<ul style="list-style-type: none"> -Disminución de la acidificación intracelular -Liberación de histamina
Células dendríticas 	Sí	<ul style="list-style-type: none"> -Producción de ROS -¿Presentación de antígeno?
Macrófagos 	Sí	<ul style="list-style-type: none"> -Producción de ROS -Eliminación de microbios
Linfocitos B 	Sí	<ul style="list-style-type: none"> -Producción de ROS -Señalización de BCR -Respuesta de anticuerpos
Linfocitos T 	Sí	<ul style="list-style-type: none"> -Producción de ROS

Figura 13. Tipos de células del sistema inmune que expresa la enzima NADPH oxidasa y la función del gen HVCN1.

Modificada de Capasso, 2014.

El canal H_v1 se localiza también en el espermatozoide humano (ver Figura 14); mientras los espermatozoides están en el epidídimo presentan un pH bajo, pero debido a estímulos fisiológicos sufren una alcalinización, por ejemplo, en el recorrido que hacen los espermatozoides en el tracto reproductivo femenino, sufren de cambios repentinos de pH, que van de 4 a 7, lo que significa una reducción en la concentración extracelular de protones. Se tienen evidencias de que justamente el canal H_v1 se encuentra implicado en dicho cambio

de pH, debido a su función de extrusión de H^+ (Ren, 2010). A continuación, se explica con más a detalle dicho fenómeno.

Los espermatozoides sólo llegan a la etapa final de maduración cuando están en el aparato reproductivo femenino, a esta última fase se conoce como capacitación, donde desarrollan mayor motilidad flagelar (Florman *et al.*, 2010), incrementa la fluidez de la membrana y los hace más receptivos a las señales para lograr la fecundación (Lishko, 2015). Cuando los espermatozoides están en el epidídimo presentan un pH más bajo, al igual que bajan los niveles de AMPc (adenosín monofosfato cíclico), pero conforme ocurre el proceso de fertilización sufre un cambio de pH alcalino y se sugiere que el canal H_v1 debe de estar involucrado en este proceso. Cuando el espermatozoide ingresa al aparato reproductor femenino aumentan los niveles de iones bicarbonato (HCO_3^-), estos iones estimulan la activación de la adenilato ciclasa atípica (ADCY10) para que los espermatozoides entren a la capacitación, disminuye la concentración de zinc en útero y los espermatozoides liberan H^+ de la parte intracelular y así se logra completar la capacitación. (Florman *et al.*, 2010).

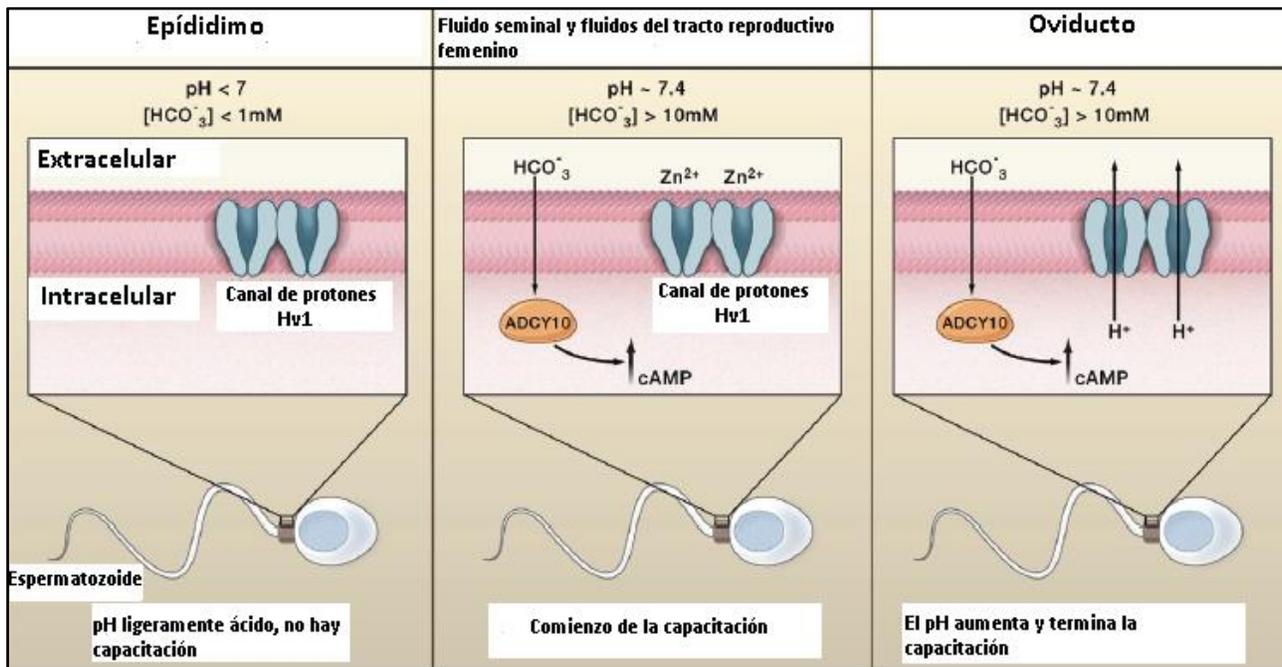


Figura 14. Espermatozoide en el oviducto. Se representa al canal H_v1 encargado de extruir los protones de la célula debido al HCO_3^- con la ayuda de ADCY10 y cAMP. Modificado de Florman *et al.* (2010).

Otro de los procesos celulares en los que se ha visto relacionado el canal H_v1 es el cáncer. Existe un estudio en donde observaron que las pacientes que sufrían cáncer de mama expresaban niveles altos de H_v1 , lo anterior ha sido asociado con un pronóstico desfavorable, debido a que las células tumorales viven en ambientes más ácidos que las células benignas, por lo tanto, las células cancerosas disponen de H_v1 entre varios mecanismos para liberar cantidades extras de H^+ (Wang *et al.*, 2012). Dicho fenómeno produce la secreción de varios tipos de proteasas como: metaloproteinasas de matriz, metaloproteinasas óseas morfogenética tipo 1, proteasas de serina tisulares y proteasas de membrana relacionadas con adamalislina, las cuales se encargan de degradar la matriz extracelular, esta constante degradación produce la metástasis del cáncer. Ahora bien, se ha propuesto que la inhibición de estas proteasas y del canal H_v1 pueden ayudar a detener el crecimiento del cáncer (Fais *et al.*, 2007; Fais., 2010). Es importante señalar que, aún se requieren más estudios al respecto, pero tal vez en algún momento, la expresión de este canal pudiera ser usado como un marcador tumoral para éste u otros tipos de cáncer.

2.1.1.7 El canal H_v1 participa en el proceso de calcificación

La calcificación es el proceso fisiológico en el cual se forma $CaCO_3$ a partir de Ca^{2+} y HCO_3^- . Los principales seres vivos que se distinguen por llevar a cabo la calcificación son los corales; sin embargo, existen otros organismos que también presentan dicho proceso, como los moluscos, debido a que su concha está formada principalmente por iones de calcio y carbonato los cuales se cree que son obtenidos del agua de mar y de su alimento (Furuhashi *et al.*, 2009). Otro grupo que presenta calcificación son las algas, a continuación, profundizaré sobre ellas (Sevilgen *et al.*, 2019; McNeil *et al.*, 2004).

Las algas calcificantes también conocidas como cocolitóforos, pertenecen a la división *Haptophyte*, son predominantemente marinas y pueden encontrarse de forma abundante en los océanos. Estas algas contribuyen al ciclo del carbono porque tienen la capacidad de fijar

el carbono inorgánico disuelto (CID) mediante la fotosíntesis y el proceso de calcificación. Una de las especies que caracteriza a este grupo es *Emiliana Huxleyi*, un alga cosmopolita que puede abarcar grandes extensiones de océano (Brownlee., 2015; Tsuji y Yoshida., 2017).

Los cocolitóforos pueden presentar de 1 a 2 cloroplastos, a su vez estos cloroplastos pueden tener clorofila *a* y *c*. Esta célula está rodeada por una membrana citoplasmática y un retículo endoplásmico subyacente, en la misma célula se encuentran diversas estructuras conocidas como cocolitos que están compuestas por carbonato de calcio. La formación de estos cocolitos depende del Ca^{2+} y el CID que se encuentra en el agua, estos cocolitos se forman en una estructura conocida como vesícula cocolitófora (VC) (Brownlee, 2015; Tsuji y Yoshida, 2017).

Para la calcificación de los cocolitóforos se necesita Ca^{2+} y HCO_3^- que es catalogado como un CID, y tiene como productos finales H^+ y una precipitación de CaCO_3 . Estos protones tienen que ser eliminados de la célula para evitar la acidosis y posteriormente la muerte celular (ver Figura 15.). Se ha demostrado en los cocolitóforos la expresión de canales que son capaces de eliminar el exceso de H^+ generado durante el proceso de calcificación. Dichos canales se activan por voltaje (H_v1) y se modulan por la acidificación del medio, estos canales son capaces de contribuir rápidamente para que el exceso de protones salga de la célula, evitando así la muerte de estos organismos (Brownlee, 2015).

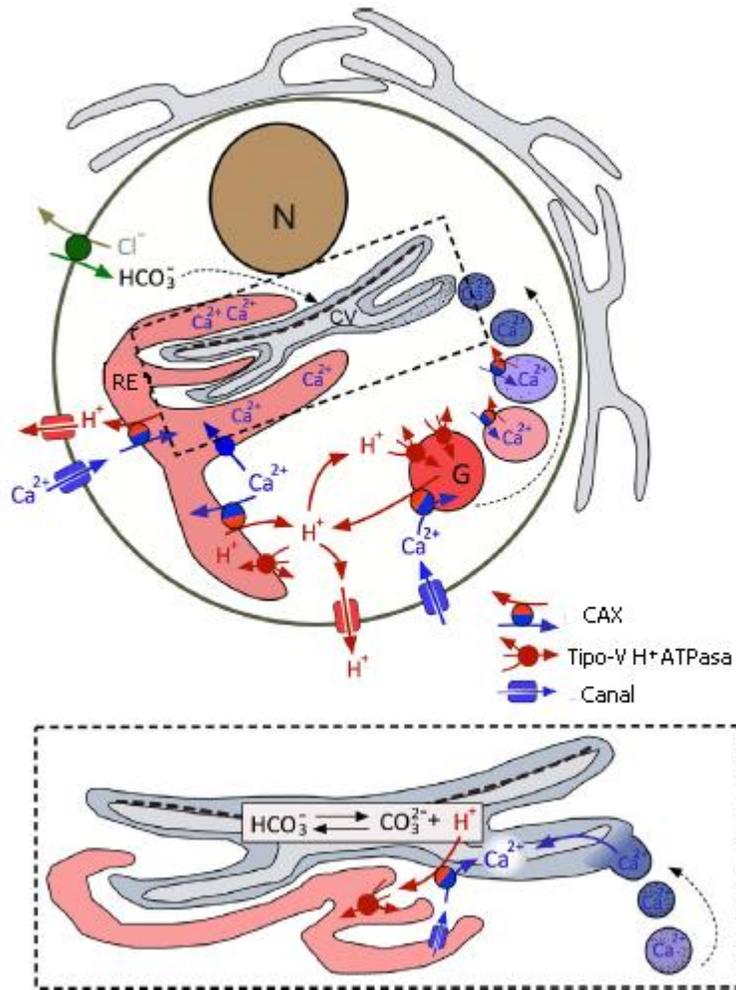


Figura 15. Esquema hipotético de cómo puede llevarse la calcificación en los cocolitóforos. Se observan ATPasas de tipo V y un transportador de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{++}$ (CAX). Los protones que quedan libres son extruidos de la célula a través del canal $\text{Hv}1$. Acumulación de Ca^{2+} en la vesícula cocolitófora, dicha acumulación es mediada por CAX en las vesículas de Golgi (G) e impulsan la ATPasa a medida que ocurre la maduración de la vesícula cocolitófora. Por otro lado, el Ca^{2+} puede acumularse en el retículo endoplásmico por la actividad de CAX, así mismo este ion divalente puede desplazarse por medio de los canales de calcio y la bomba CAX desde el retículo endoplásmico hacia la vesícula cocolitófora. Modificado de Brownlee *et al.* (2015).

2.2 EL PROCESO DE CALCIFICACIÓN EN CORALES

La palabra “coral” incluye a un conjunto de organismos que están clasificados en el filo de los Cnidarios, éstos presentan una forma polipoide y un exoesqueleto calcáreo. Son

estrictamente marinos y pueden hallarse tanto en zonas costeras como a grandes profundidades. Los corales, están incluidos en este grupo de organismos y se caracterizan por ser los principales formadores de arrecifes (Horta y Carricart, 1993).

La anatomía de los corales está conformada por una bolsa unida al esqueleto, pero éste último se halla fuera del animal. Esta bolsa se compone por dos tejidos, un tejido oral que está en contacto con el agua y un tejido aboral que roza la estructura calcárea, ambos tejidos se distinguen por presentar dos capas de células, el ectodermo y el endodermo, a su vez estas capas se encuentran divididas por una matriz de colágeno llamada mesoglea. Estos organismos presentan una cavidad gastrovascular conocida como celenteron o cavidad celenterica. Von Heider (1881) describió además la presencia de varias células en dichos organismos que forman el esqueleto de los corales, a las cuales les llamó calicoblastos. Galloway *et al.* (2007) también reportó estas mismas células, solo que él les llamó calicodermis (Dubinsky y Stambler, 2011) (ver Figura 16)

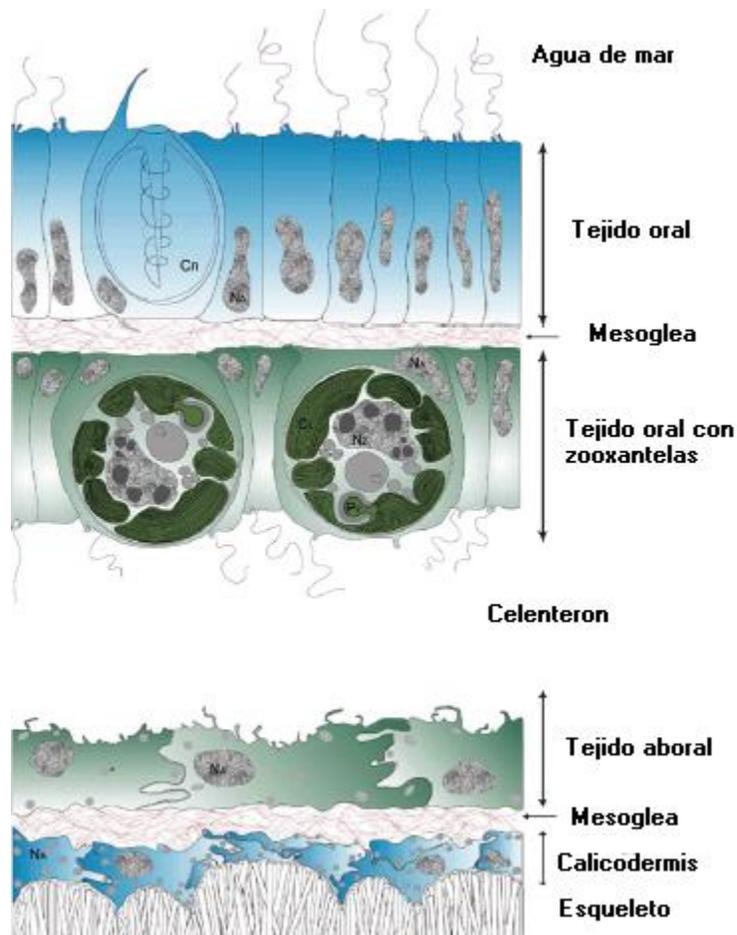


Figura 16. Esquema del corte histológico lateral de un coral. Cn: cnidocito; N_A: núcleo de la célula animal; N_v: núcleo de la zooxantella; C_L: cloroplasto; P_v: pirenoide. Tomado de Allemand et al. (2011).

Algunos de los órdenes que están clasificados en el grupo de los corales son: *Stylasterina*, *Milleporina* y *Scleractinia*, un rasgo en particular de todos ellos es su gran exoesqueleto calcáreo, por tal motivo también son conocidos como corales pétreos (Horta y Carricart, 1993).

Los corales del orden *Scleractinia* contienen varias familias, una de ellas es *Acroporidae*, la cual se distingue por tener dos géneros representativos, *Acropora* y *Montipora*, estos grupos presentan una gran diversidad de especies y ambos están localizados en el Indo-Pacífico. El género *Acropora* cuenta con alrededor de 120 a 140 especies, tiene

un papel representativo en la estructura y biodiversidad en los arrecifes de coral. Además, este género presenta un eficaz crecimiento en su esqueleto calcáreo, el cual está formado por carbonato de calcio (Wallace, 2011).

De acuerdo con los propósitos del presente trabajo a continuación de describirá con detalle una de las especies que pertenece a este género que es *Acropora millepora* (ver Figura 17), cuya clasificación es la siguiente (Ehrenberg, 1834):

Reino: Animalia

Phylum: Cnidaria

Clase: Anthozoa

Subclase: Hexacorallia

Orden: Scleractinia

Familia: Acroporidae

Género: *Acropora*

Especie: *Acropora millepora*

(WORMS, 2018)



Figura 17. Fotografía de *Acropora millepora* en la gran barrera de coral, Australia. Roger Steenre. Tomado de AIMS, 2013.

Algunas de las características de esta especie son: colonias en forma de cojines corimbosos (con forma de racimo), sus ramas son pequeñas con apariencia uniforme (ver Figura 18). Los corales radiales se encuentran compactados, mientras que los corales axiales tienen forma tubular. Puede presentar variación en su coloración, desde ser verde con puntas naranjas, hasta un color salmón intenso o azul. Con frecuencia habita en aguas de poca profundidad, pero también en laderas del arrecife superior (AIMS, 2013).

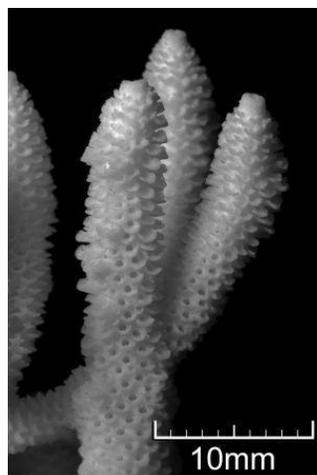


Figura 18. Fotografía de *Acropora millepora*. Gran barrera de coral, Australia. Se pueden observar puntas ramificadas. Tomado de AIMS, 2013.

La calcificación en los corales (al igual que en los cocolitoforos), se da al reaccionar el calcio (Ca^{2+}) con bicarbonato (HCO_3^-), lo que da como resultado iones hidronio (H^+) y carbonato de calcio (CaCO_3) (Allemand *et al.*, 2011). Se han propuesto cuatro rutas que tratan de explicar la entrada de los iones que posteriormente participan en el proceso de calcificación. La primera ruta es conocida como ruta paracelular, las moléculas entran gracias a su gradiente electroquímico, rodeando a las células (ver Figura 19. a); la segunda ruta también es llamada paracelular, pero aquí el agua de mar ingresa a granel entre una célula y otra (ver Figura 19. b); la tercera ruta es transcelular, esto quiere decir que las moléculas se incorporan directamente en la célula, pasando por el citoplasma hasta llegar al otro lado de la membrana (ver Figura 19. c); la cuarta ruta corresponde a los dos procesos: paracelular y transcelular (ver Figura 19. d) (Allemand, 2011). Cabe aclarar que este esquema es ilustrativo y hasta el momento sólo surgen propuestas de cómo puede darse el proceso de calcificación.

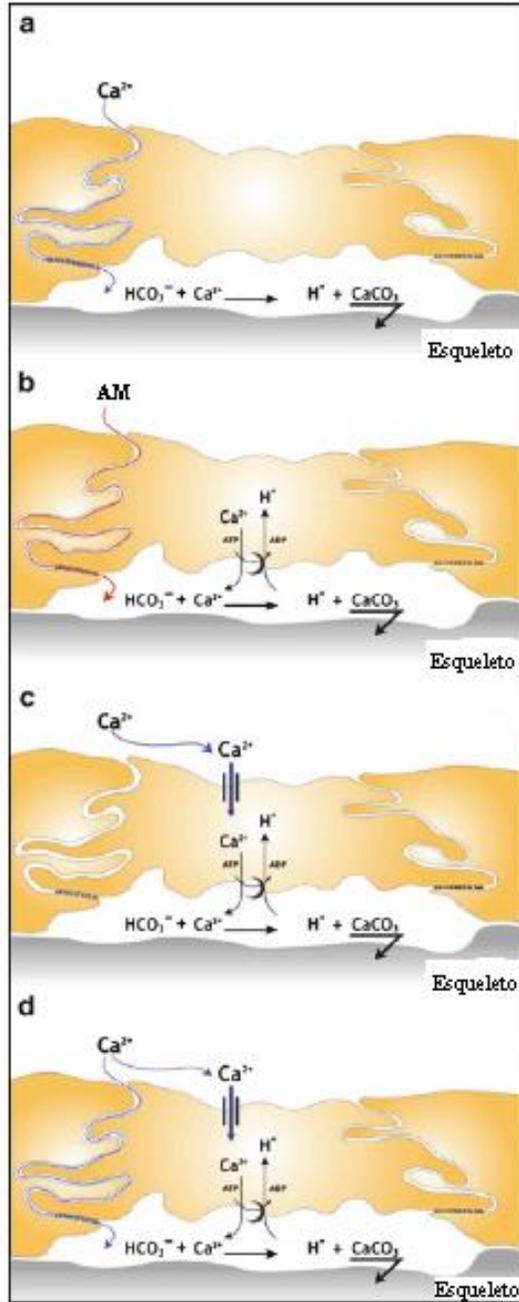


Figura 19. Esquema de las cuatro hipótesis sobre la captación de iones en los corales. a) Los iones entran de manera pasiva entre los calciblastos (representados en color blanco en la parte inferior de cada sección de la imagen). Vía paracelular. b) Los iones son proporcionados por el agua de mar (AM). Vía paracelular c) Los iones entran directamente a los calciblastos. Vía transcelular d) Combinación de ambas vías, paracelular y transcelular. Tomado de Allemand *et al.* (2011).

3. JUSTIFICACIÓN

Como ya se mencionó, se tienen varias hipótesis de cómo es que el Ca^{2+} y el HCO_3^- ingresan a los calicoblastos para formar CaCO_3 , sin embargo, hasta el momento no se ha descrito cómo es que los H^+ generados en el proceso de calcificación son eliminados de estas células para evitar la acidificación. Como se observa en la Figura 20, se ha sugerido la expresión de un intercambiador de iones ($\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$), una ATPasa de H^+ , o un canal iónico (H^+), los cuales pudieran participar en la eliminación de los protones que son producidos durante el proceso de calcificación, evitando así la acidificación de los calicoblastos (Moya *et al.*, 2012). De acuerdo con la idea anterior y considerando lo que se ha reportado para los cocolitóforos, es posible que también los corales expresen una proteína especializada que le permita regular el pH durante el proceso de calcificación. El único indicio directo que se tiene sobre la expresión del canal H_v1 en corales son las secuencias parciales identificadas en un análisis del transcriptoma de *Acropora millepora* y *Acropora digitifera*, las cuales parecen corresponder a un posible canal H_v1 (Números de acceso en el GeneBank XM_015907823.1, XM_015907824.1, XM_029346499.1 y XM_029346498.1).

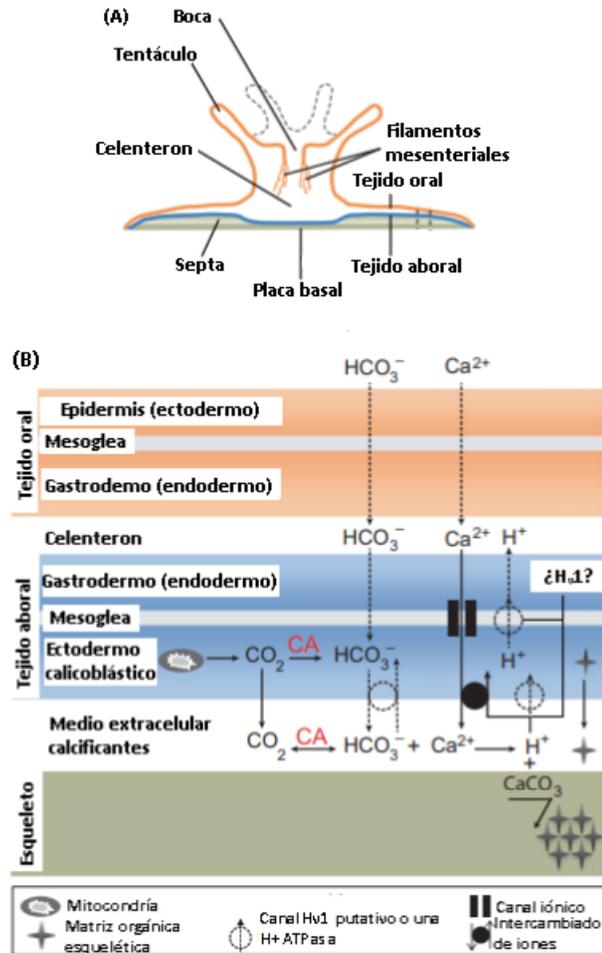


Figura 20. Esquema propuesto para la calcificación en corales. La sección (A) de este esquema representa de manera básica la anatomía de un pólipo de coral. La sección (B) representa las proteínas que intervienen en el proceso de calcificación. Las líneas punteadas son las rutas hipotéticas donde ocurre el transporte de carbonato de calcio. Los círculos punteados representan la anhidrasa carbónica o el canal putativo H_v1, ambos pueden estar involucrados en la eliminación de los H⁺ generados durante la calcificación. Modificado de Moya *et al.* (2012).

Sin embargo, actualmente no existen estudios detallados donde se reporte la expresión de algún transportador o canal selectivo para protones en corales, el cual pudiera participar en la regulación del pH en los calciblastos durante el proceso de calcificación. De acuerdo con los resultados obtenidos en los cocolitóforos y en las secuencias parciales reportadas el análisis de transcriptoma de *Acropora sp.*, podemos plantear la siguiente hipótesis.

4. HIPÓTESIS

Los corales al igual que los cocolitoforos expresan el canal H_v1 , el cual participa en la regulación del pH en los calicoblastos durante el proceso de calcificación.

5. OBJETIVO GENERAL

Clonar y caracterizar por medio de registros electrofisiológicos el canal H_v1 de la especie *Acropora millepora*.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar oligos específicos que nos ayuden a obtener la secuencia completa de dicha proteína a partir de secuencias parecidas al canal H_v1 .
- Extraer ARN de *Acropora millepora* y realizar una RT-PCR para amplificar la secuencia del canal putativo H_v1 .
- Clonar el canal putativo H_v1 en el vector pcDNA3 y realizar la transfección correspondiente en un sistema de expresión heterólogo (células HEK293).
- Realizar la caracterización electrofisiológica del canal putativo H_v1 por medio de la técnica *Patch-clamp*.

6. MÉTODOS

6.1 IDENTIFICACIÓN DE LA POSIBLE SECUENCIA DEL CANAL PUTATIVO H_v1 DE *Acropora millepora* Y DISEÑO DE OLIGOS

Para realizar la clonación del posible canal H_v1 de alguna especie de coral se buscó de forma general las secuencias de las especies que presentan el canal iónico H_v1 en la base de datos del GenBank, después la búsqueda se delimitó a sólo a especies de animales invertebrados. Como resultado de esta búsqueda, se pudieron identificar 4 secuencias de nucleótidos que fueron de nuestro interés, ya que se encontraban mejor conservados en ambas especies y tenían un marco de lectura abierto. Los números de acceso correspondientes en GenBank son: XM_015907823.1, XM_015907824.1, XM_029346499.1 y XM_029346498.1. Las dos primeras secuencias corresponden a *Acropora digitifera* y las dos últimas a *Acropora millepora*. Estas secuencias se reportaron como parte de un análisis de transcriptoma de estas dos especies.

Con las secuencias seleccionadas, se realizaron diversos alineamientos utilizando el servidor CLUSTALW, esto con la finalidad de identificar regiones conservadas entre ellas. Asimismo, se realizó un análisis de estructura secundaria para dichas secuencias. Para esto último, se generaron modelos *in silico* de cada uno de los fragmentos seleccionados. El modelado se llevó a cabo utilizando el servidor SWISS-MODEL y se empleó como molde el PDB: 3WKV, que corresponde a la quimera del canal H_v1 de ratón con el VSD de *Ciona intestinalis* (mH_v1cc). Los modelos obtenidos fueron analizados en el programa Pymol.

Después de realizar la búsqueda y el análisis de las secuencias se lograron identificar dos fragmentos de ADN los cuales sugerimos que codifican para las regiones amino y carboxilo terminales del putativo canal H_v1 de *Acropora sp.* Utilizando estos dos fragmentos

se diseñaron oligonucleótidos que permitieran clonar de manera parcial y total el putativo canal H_v1 de este coral. Las secuencias de los oligos diseñados fueron:

Tabla 2. Oligonucleótidos diseños para clonar el canal putativo H_v1 de *Acropora sp.*

Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido
<u>AcHvNt5'</u>	ATGATTGATGCAAGAACCAGACGATCGAGCATGGATGAT
<u>AcHvNt3'</u>	TGATCCTGCTCTCAAGTCAAGAACCAACTCAGCAATGAC
<u>AcHvCt5'</u>	ATGGGATTACATTTTCAAGCACAAATGGAGGTGTTT
<u>AcHvCt3'</u>	TCAGCTTTGTTTTAATGTTGTCAATTCAGACTCCAAC TG

6.2 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE *Acropora millepora*

Para realizar la clonación del posible canal H_v1 de *Acropora sp.*, se realizó una extracción de ARN total a partir de un fragmento del coral *Acropora millepora*, el cual se pudo adquirir en un acuario local y fue identificado por el Dr. León Islas. La extracción del ARN total se realizó utilizando el método de Chomczynski y Sacchi (1987) partiendo de una muestra de 3 cm de coral. Esta muestra de coral fue incubada por 2 minutos en 5 ml de Solución D (Tiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM, Sarcosyl 5 % y 2-mercaptoetanol 0.1 M). Después de la incubación se despegaron los pólipos del esqueleto calcáreo con ayuda de una pipeta serológica, subiendo y bajando el volumen de la solución D suavemente sobre el fragmento de coral durante 2 min. Posteriormente se retiró el esqueleto calcáreo y se continuó con la extracción de ARN total de acuerdo con el protocolo citado. Se sabe que es un ARN de coral debido a que en varios grupos del mismo phylum este gen se encuentra conservado.

6.3 AMPLIFICACIÓN DEL PUTATIVO CANAL H_v1 POR RT-PCR

A partir de 1 µg ARN total de *A. millepora* se realizó la retrotranscripción utilizando oligo dT y la enzima SuperScripII (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del proveedor. Posteriormente, se realizaron 3 mezclas independientes de PCR (reacción en cadena de la polimerasa o por sus siglas en inglés *polymerase chain reaction*) para tratar de amplificar los segmentos que nosotros proponemos que corresponde a las regiones amino y carboxilo terminal de la proteína, así como el posible canal completo H_v1 de *A. millepora*. Para ello se utilizaron los oligos: 1) AcHv1Nt5' y 3'; 2) AcHv1Ct5' y 3' y 3) AcHv1Nt5' y AcHv1Ct3'. Las 3 reacciones se realizaron con la enzima Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen) utilizando el protocolo recomendado por el proveedor. Una vez terminada las reacciones, se le agregó a cada muestra 1 µl de Taq DNA polymerase (Invitrogen) y se mantuvo la reacción por 10 minutos a 72 °C, esto último para adicionar adeninas en los extremos 5' y 3' y así poder clonar fácilmente los fragmentos amplificados en el vector pGEM-T.

Una vez que se logró clonar el canal completo H_v1 de *A. millepora* en el vector pGEM-T, se diseñaron nuevos oligos AcHv1Nt5' y AcHv1Ct3' con los sitios de restricción KpnI y NotI respectivamente. Una vez que tuvo el inserto puro, se realizó la ligación correspondiente en el vector pGEM-T. El protocolo se describe a continuación: 5 µl de buffer, 3 µl de inserto, 1 µl de ligasa, 1 µl de vector pGEM-T. La ligación se incubó toda la noche a 4 °C.

Posteriormente se realizó la transformación en bacterias la cual consiste en la introducción de DNA de manera exógena a la bacteria, esto provocará que cada vez que la bacteria se replique, replicará el DNA exógeno que fue introducido (Serrano, et al. 2012). Para hacer este proceso se utilizó una cepa de bacterias llamada DH5α pertenecientes a *Escherichia coli* (*E. coli*). Las bacterias se mezclaron con 10 µl de la ligación y se incubaron por 30 minutos en hielo, inmediatamente, se les dio un choque térmico durante 45 segundos

a 42 °C, nuevamente se trasladaron a hielo por 2 minutos, después se adicionaron 800 µl de medio LB (triptona, extracto de levadura, NaCl, y NaOH), la muestra de bacterias se incubó por 1 hora a 37 °C en agitación. Las bacterias se sembraron en cajas LB-agar, incubándolas 16 horas a 37 °C.

Una vez transcurrido el tiempo, se resembraron las colonias de bacterias que posiblemente contenían el inserto. Cada colonia se colocó en tubos falcón con 5 ml de medio LB, 80 µl de antibiótico (ampicilina 80 µg/µl) y se dejaron crecer durante 16 horas a 37°C en agitación. Posteriormente se hizo una miniprep a partir de cada una de las colonias resembradas, el protocolo de miniprep utilizado fue reportado por Mmessage mMachin (n.d).

Más adelante se realizó una subclonación con el vector pcDNA3.1 porque presenta un promotor proveniente del citomegalovirus (CMV), estos promotores son secuencias de DNA que tienen un sitio de unión para que una enzima se una a este sitio e inicie la transcripción (Margulies, n.d).

Esta última construcción fue utilizada para realizar la caracterización electrofisiológica del canal AmH_v1 en células HEK293. Todas las construcciones fueron verificadas por secuenciación automática.

6.4 TRANSFECCIÓN DEL CANAL AMH_v1 EN CÉLULAS HEK293

Se realizó una cotransfección en células HEK293 con los plásmidos AmH_v1-pcDNA3.1 (100-300 ng) y pEGFP (100-400 ng). Para todos los experimentos se usó como gen reportero a la GFP. Para obtener la expresión transitoria del canal AmH_v1 y la GFP en

células HEK293, se utilizó el agente de transfección jetPEI (Polyplus) de acuerdo con las especificaciones del proveedor. El cultivo celular se mantuvo en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, por sus siglas en inglés) con 10 % de SBF y 1 % de penicilina-estreptomicina, a 37 °C y con 5 % de CO₂. Los registros electrofisiológicos del canal AmH_v1 se realizaron a las 24 y 48 horas después de la cotransfección.

6.5 CONDICIONES DE REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

Las técnicas por excelencia más usadas para el registro de canales iónicos son el *Voltage clamp* y el *Patch-clamp*, ambas técnicas permiten el registro de corrientes iónicas, pero en este trabajo solo se describirá la técnica *Patch-clamp*. Este método permite estudiar las corrientes iónicas originadas por la apertura de los canales iónicos, ya sea en célula completa o en microáreas de membrana. Para realizar el registro de dichas corrientes iónicas se utilizan micropipetas hechas de borosilicato cortadas y previamente pulidas con calor. Una vez que las micropipetas están listas, una se coloca en un microelectrodo (típicamente de AgCl), posteriormente, se procede a acercar la micropipeta de manera lenta y cuidadosa a la membrana plasmática, hasta que ésta la toque con el propósito de formar un sello de alta resistencia entre el vidrio de la micropipeta y la región de la membrana (1 GΩ) (ver Figura 21.) (Salceda y Soto, 2015). La fijación de voltaje consiste en mantener el potencial de membrana en un valor fijo, inyectando la corriente que compense rápidamente cualquier cambio causado por el flujo de iones a través de los canales presentes en la membrana. Una vez que se forma el gigasello, se pueden medir los cambios en el potencial de membrana y compensarlos rápidamente usando un amplificador. La corriente que se tiene que inyectar para mantener el voltaje constante es del signo opuesto a la corriente que está fluyendo a través de los canales del sello, pero como es de la misma magnitud, es una medida de cuánta corriente está pasando a través de la membrana que forma el gigasello. La corriente de compensación se amplifica y es lo que se registra durante un experimento de *Patch-clamp*.

La técnica de *Patch-clamp* se puede realizar en diferentes configuraciones, a continuación, se describe cada una de ellas:

Cell-attached o célula adherida, es la más fácil de realizar y permite el registro de canales iónicos expresados en la microárea de membrana que está en contacto con la pipeta. Esta configuración se logra con una presión leve en la micropipeta contra la superficie de la célula, aplicando a su vez una succión.

Whole-cell o célula completa: es utilizado para el registro de corrientes macroscópicas. Se inicia con la configuración de cell-attached, pero se emplea una succión más fuerte para que la membrana se rompa, el líquido de la micropipeta y del citoplasma quedan en contacto (Salceda y Soto, 2015).

Outside-out o afuera-afuera: esta configuración se realiza a partir de whole-cell, pero una vez que se formó el sello de alta resistencia con la membrana, la punta de la micropipeta se retira de manera que se provoca el rompimiento de la membrana. Debido a las propiedades de los fosfolípidos, los fragmentos de la membrana se unen nuevamente, exponiendo la parte intercelular de la membrana hacia adentro de la micropipeta.

Inside-out o adentro-afuera: se comienza cell-attached, una vez que se tiene el sello formado, la pipeta se retira de la célula, pero ahora la parte intracelular de la membrana ve hacia a fuera de la micropipeta (Molleman, 2003).

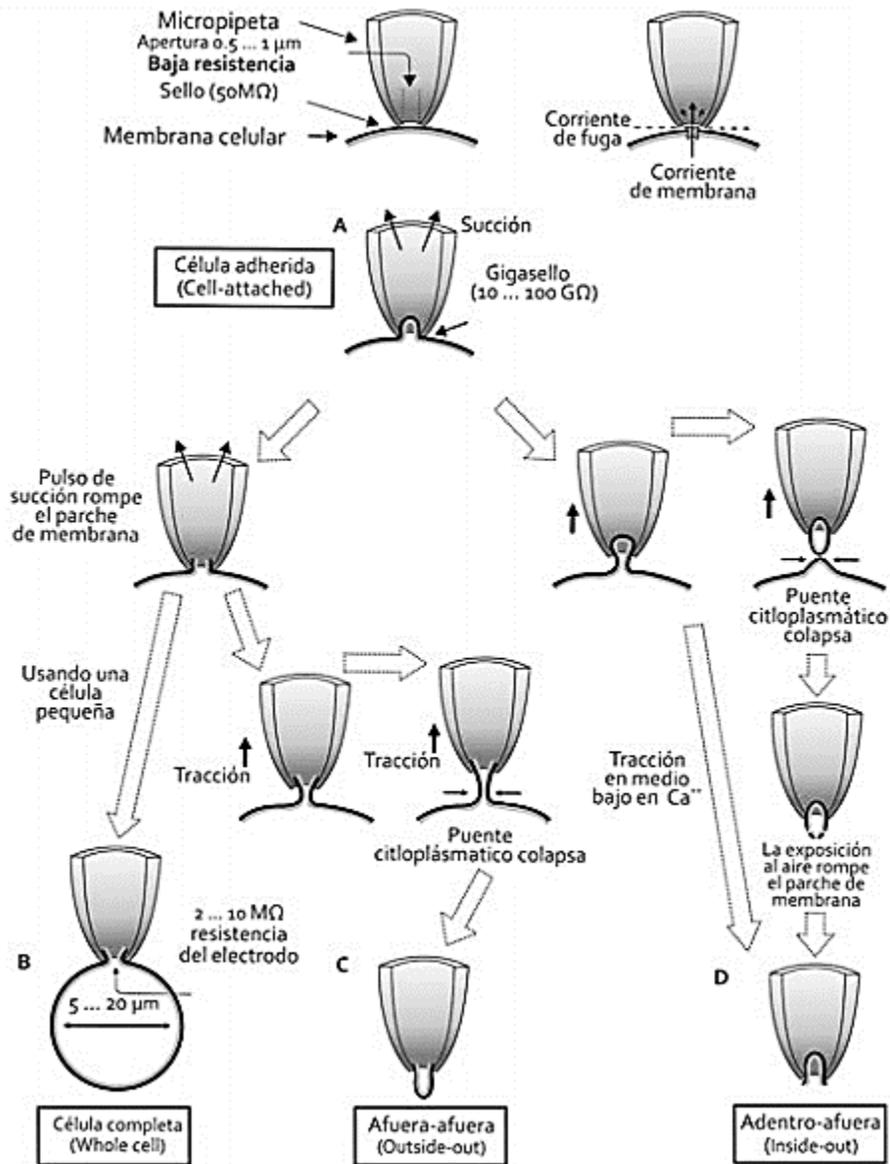


Figura 21. Configuraciones para la fijación de voltaje por medio de parches. A) La configuración del sello en célula adherida. B) La configuración del parche en célula completa. C) La configuración del sello afuera-afuera. D) La configuración del sello adentro-afuera. Tomado de Salceda y Soto, 2015.

Para realizar los registros electrofisiológicos se utilizó un microscopio óptico invertido marca Nikon modelo Eclipse Ti. Las corrientes se registraron a 20 kHz con un amplificador de la marca HEKA modelo EPC 10 y el software PatchMaster (HEKA) y fueron analizadas con el programa Igor Pro (Wavemetrics Inc). Se utilizó la técnica de *Patch-clamp* en configuraciones inside-out, whole-cell y outside-out (este último para los registros con zinc).

En todos los experimentos inside-out y whole-cell se emplearon las mismas soluciones; la solución extracelular que podría ser del baño o la pipeta dependiendo de la configuración del sello contenía: 80 mM TMA-OH, 80 mM HMESO₃, 100 mM MES para pH 5.5, 6.5 o HEPES para pH 7.0, 7.5, 8 mM HCl, 2 mM CaCl₂ y 2 mM MgCl₂. La solución intracelular que podría ser del baño o la pipeta dependiendo la configuración del sello contenía: 80 mM TMA-OH, 80 mM HMESO₃, 100 mM MES para pH 5.5, 6.5 o HEPES para pH 7.0, 7.5 y 1 mM EGTA. El pH se ajustó con TMA-OH, NMDG y HCl.

Para realizar la caracterización del canal se utilizaron pipetas de borosilicato con una resistencia de 1 a 3 MΩ en los registros whole-cell y de 4 a 7 MΩ en los registros inside-out y outside-out.

En los registros realizados en configuración inside-out y outside-out, se utilizaron vidrios tratados con poly-D lisina en los cuales se sembraron las células. Lo anterior se realizó con el propósito de que la membrana de las células quedara adherida al vidrio y permitiera levantar el sello fácilmente. Este procedimiento consistió en agregar a los vidrios 100 ug/ml de poly-D lisina. Los vidrios quedaron sumergidos en esta solución durante media hora, posteriormente, éstos se enjugaron tres veces con agua Milli-Q filtrada y se dejaron secar antes de sembrar las células.

Tabla 3. Valores de ΔpH en los que se registró el canal en inside-out

ΔpH (pH _o -pH _i)	Baño pH (pH _i)	Pipeta pH (pH _o)
2	5.5	7.5
1	6.0	7.0
0	7.0	7.0
-1	7.0	6.0
-2	7.5	5.5

Para caracterizar la activación del canal se obtuvieron diferentes familias de corrientes, para esto se diseñaron varios protocolos de voltaje con respecto al ΔpH , ya que la apertura del canal cambia dependiendo si se tiene un ΔpH negativo o positivo; para $\Delta\text{pH} = 2$ los voltajes fueron de -120 mV a 120 mV con una duración de 250 ms por pulso, en incrementos de 20 mV en 20 mV, con un voltaje de mantenimiento de -80 mV (N = 5). Se aplicó el mismo voltaje de mantenimiento e incremento de los mismos para todos los experimentos en este bloque. El protocolo con $\Delta\text{pH} = 1$ inició desde -100 mV a 140 mV durante 500 ms (N = 10). Los registros con $\Delta\text{pH} = 0$ se les aplicó pulsos de voltaje que iban desde -40 mV a 160 mV durante 500 ms (N= 4). Para los registros con $\Delta\text{pH} = 0$ sin transfección el protocolo fue de -60 mV a 160 mV durante 300 ms (N= 4). Para las corrientes con $\Delta\text{pH} = -1$ el protocolo de voltaje fue de 20 mV a 200 mV durante 500 ms (N = 5). Para el $\Delta\text{pH} = -2$, el protocolo comenzó desde 40 mV a 220 mV durante 500 ms (N = 5). Estos experimentos nos permitieron determinar la dependencia de voltaje del canal AmH_v1 .

A partir de los datos obtenidos en cada uno de los registros se realizaron diferentes tipos de análisis electrofisiológicos (curvas I-V, curvas G-V, gráfica del potencial de reversión experimental y gráfica de dosis-respuesta) para determinar las propiedades biofísicas del canal, además se hizo una serie de experimentos como grupo control, el cual consistió en registrar células HEK293 sin haber sido transfectadas con el canal AmH_v1 , con el propósito de conocer las diferencias entre corriente endógena y una corriente propiamente del canal clonado de *A. millepora*. Cada una de las familias de corrientes obtenida se graficó y se realizó su correspondiente curva I-V. Después se calculó el “leak” por medio de la ecuación de la recta. El “leak” o corriente de fuga representa la corriente que se escapa entre la membrana y la pipeta, ya que los sellos no son totalmente herméticos, por lo tanto, siempre existe corriente de fuga que no es propia del canal.

Ecuación 3:

$$\text{Leak} = a + (mV * b)$$

Donde a y b representan los valores donde no hay corriente propia del canal, por lo tanto, la corriente es igual a 0 y mV son los voltajes a los cuales fue sometido el canal. El dato obtenido se restó a cada valor de la corriente.

Para poder medir la conductancia del canal se necesitaba conocer el potencial de reversión dado un ΔpH específico, para esto se aplicó la ecuación de Nernst que se describió anteriormente (ver Ecuación 1).

Posteriormente, se calculó la conductancia (G) por medio de la ley de Ohm, la cual fue normalizada.

Ecuación 4:

$$G = \frac{I}{(V - V_{rev})}$$

Donde I representa la corriente, V es el voltaje y V_{rev} es el valor del potencial de reversión. Además, se calculó el promedio, desviación y error estándar.

A las curvas G - V se les ajustó la ecuación de Boltzmann, con la que se obtuvo la $V_{1/2}$ y el valor del movimiento de carga:

Ecuación 5:

$$\frac{G}{G_{max}} = \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{q(V - V_{0.5})}{K_B T}\right)}$$

Donde G es la conductancia, G_{max} es la conductancia máxima, q es la carga aparente asociada (en cargas elementales es e_0), $V_{0.5}$ es el voltaje en que la mitad de la carga se movió, K_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura en grados Kelvin.

Para medir la cinética de activación (τ) a las familias de corriente, desde un inicio se utilizó un procedimiento conocido como -p/4, lo que hace este procedimiento es dar una serie de pulsos de voltaje negativos extras que equivalen a la cuarta parte del voltaje máximo que se le aplicó al canal, este protocolo consiste en 4 pulsos, dichos pulsos son promediados por el programa automáticamente con el objetivo de observar el trazo de manera más clara; los 4 pulsos se dan por cada pulso de voltaje que estén indicados en el protocolo *per se*, más el pulso prueba. En $\Delta\text{pH} = 0$ sin transfectar se dieron un total de 55 pulsos (1 pulso prueba que se intercala con 4 pulsos de leak, lo anterior se repite 11 veces); en $\Delta\text{pH} = 0$ fue un total de 60 pulsos (1 pulso prueba que se intercala con 4 pulsos de leak, lo anterior se repite 12 veces). Con $\Delta\text{pH} = 2$ fueron 65 pulsos (1 pulso prueba que se intercala con 4 pulsos de leak, lo anterior descrito se repite 13 veces). En $\Delta\text{pH} = 1$ fue un total de 65 pulsos (1 pulso prueba que se intercala con 4 pulsos de leak, esto se repite 13 veces). Con $\Delta\text{pH} = -1$ fue un total de 50 pulsos (1 pulso prueba que se intercala con 4 pulsos de leak, esto se repite 10 veces). Por último, en $\Delta\text{pH} = -2$ fue un total de 50 pulsos (1 pulso prueba que se intercala con 4 pulsos de leak lo anterior se repite 10 veces).

Los voltajes que equivalen al leak son restados al transitorio capacitivo, una vez que son restados, se pudo medir la cinética de activación con exactitud y ajustarle una exponencial a cada trazo de corriente, dicha exponencial ajustada abarcó del 20 % al 90 % de la corriente dependiendo si está presentaba depleción o no. La exponencial es la siguiente:

Ecuación 6:

$$I(t) = I_{SS} \cdot \left(1 - \exp\left(\frac{-(t-\delta)}{\tau}\right) \right)$$

Donde I_{ss} es la amplitud de la corriente en estado estable, δ es el retraso de la exponencial con respecto al inicio del pulso de voltaje y t es la constante de tiempo. Por último, se calculó el promedio, desviación y error estándar.

Debido a que se tuvieron algunos problemas al inicio para registrar el canal AmHv1 en modo inside-out, se utilizó la configuración whole-cell para poder tener corrientes lo suficientemente grandes para calcular el potencial de reversión. Para esto se establecieron cuatro Δ pHs.

Subsiguientemente, se calculó el potencial de reversión por medio de la ecuación de Nernst para cada Δ pH.

Tabla 4. Valores de los Δ pH en los que se registró el canal en whole-cell.

Δ pH (pH _o -pH _i)	Baño pH (pH _o)	Pipeta pH (pH _i)
2	7.5	5.5
1	7.0	6.0
0	7.0	7.0
-1	6.0	7.0

Con el propósito de conocer el valor del potencial de reversión (ver Tabla 5) se hicieron cálculos con la ecuación de Nernst (ver Ecuación 2). Posteriormente, para obtener el potencial de reversión experimental se hicieron registros en la configuración whole-cell, donde se realizaron experimentos de colas de corriente, donde se aplicó también el protocolo -p/4, después cada familia de colas de corriente se graficó.

Los protocolos consistieron en aplicar una serie de voltajes con base al potencial de reversión que se estuviera empleando, con el objetivo de que la corriente que entra y sale del canal fuera la misma. El protocolo para Δ pH = 2 consistió en pulso de voltaje de 200 mV por 200 ms (este pulso se dio con el objetivo de activar el canal, esto se hizo con todos los registros) posteriormente, el voltaje descendió a -140 mV hasta llegar a -100 mV, con incrementos de 20 en 20 mV y una duración de 200 ms (N = 7). Considerando el protocolo

con los leaks que se aplicaron, fueron un total de 20 pulsos (1 pulso que activa el canal más 4 pulsos de leak esto sólo se hizo una vez, después se dio 1 pulso prueba que se intercala con 4 pulsos de leak y lo anterior descrito se repite 3 veces) con un voltaje de mantenimiento de -80 mV para todos los registros. El protocolo para $\Delta\text{pH} = 1$ fue un pulso de voltaje de 120 mV por 120 ms, posteriormente, el voltaje descendió a -80 mV hasta llegar a 10 mV con incrementos de 10 en 10 mV, con una duración de 450 ms ($N = 7$), sumando los pulsos de leaks fueron un total de 45 pulsos (1 pulso que activa el canal más 4 pulsos de leak esto sólo se hizo una vez, posteriormente se aplicó 1 pulso prueba que se intercala con 4 pulsos de leak, lo anterior se repite 8 veces). El protocolo para $\Delta\text{pH} = 0$ consistió en un pulso de 100 mV por 50 ms, inmediatamente el voltaje descendió a -70 mV hasta llegar a 10 mV con incrementos de 20 en 20 mV con una duración de 300 ms ($N = 6$), sumando los pulsos de leak se dieron un total de 25 pulsos (1 pulso que activa el canal más 4 pulsos de leak, esto sólo se hizo una vez, más adelante se dio 1 pulso prueba que se intercala con 4 pulsos de leak, esto se repite 5 veces). Por último, el protocolo de $\Delta\text{pH} = -1$ consistió en un primer pulso de 180 mV por 150 ms, posteriormente, el voltaje descendió a 30 mV hasta llegar a 100 mV con incrementos de 10 en 10 mV y una duración de 500 ms, ($N = 2$) sumando los pulsos de leak fueron un total de 45 pulsos (1 pulso que activa el canal más 4 pulsos de leak, esto sólo se hizo una vez, después se aplicó 1 pulso prueba que se intercala con 4 pulsos de leak, lo anterior descrito se repite 8 veces).

Debido a que se presentaron algunas complicaciones con el canal debido a que no soporta altos voltajes, se aplicó un segundo protocolo que consistió en un pulso de 120 mV durante 100 ms, posteriormente el voltaje descendió a 40 mV hasta llegar a 60 mV con incrementos de 10 en 10 mV y una duración de 300 ms, ($N = 6$) sumando los pulsos de leak fueron un total de 17 pulsos (1 pulso que activa el canal más 4 pulsos de leak esto sólo se hizo una vez, más adelante se dio 1 pulso prueba que se intercala con 4 pulsos de leak, lo anterior se repite 3 veces).

Después, se obtuvo el valor del potencial de reversión (ver Tabla 5) por medio de la ecuación de la recta (ver Ecuación 3). Por último, se calculó el promedio, desviación y error estándar y se realizó la gráfica del potencial de membrana contra ΔpH s.

6.5.1 CONDICIONES DE REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS CON ZINC

En todos los experimentos outside-out se usaron las mismas soluciones, la solución de baño contenía: 100 mM TMA-OH, 100 mM HMESO₃, 100 mM HEPES, 4 mM HCl, 2 mM CaCl₂ y 2 mM MgCl₂. Para las concentraciones con ZnCl₂ se preparó un stock a 10 o 5 mM, a partir de éste se hicieron diluciones a 1 mM, 100 μM , 10 μM , 1 μM y el stock de 10 μM se utilizó directamente para el registro. La solución de la pipeta contenía: 80 mM TMA-OH, 80 mM HMESO₃, 100 mM MES, 10 mM EGTA, 10 mM MgCl₂. El pH se ajustó con TMA-OH y HCl.

A continuación, se presentan los valores de pH con los que se registraron los experimentos con Zn²⁺. Los registros con zinc se hicieron con $\Delta\text{pH} = 1$, ya que se observó que con este ΔpH se obtenían sellos más estables.

Tabla 5. Valor de ΔpH en el que se registró el canal en outside-out con Zn²⁺.

ΔpH ($\text{pH}_o - \text{pH}_i$)	Baño pH (pH_o)	Pipeta pH (pH_i)
1	7	6

Para obtener los registros de zinc con la concentración de 10 μM y 10 mM, el protocolo consistió en pulsos de -40 mV a 140 mV con una duración de 500 ms (N= 4 y N= 5 respectivamente). El protocolo de registro para probar otras concentraciones de zinc se tuvo que modificar un poco ya que los sellos no eran muy estables en las condiciones anteriores.

En los registros con concentraciones 100 μM de zinc, los pulsos comenzaron desde -80 mV a 100 mV con una duración de 300 ms ($N= 4$). En todos los experimentos el voltaje de mantenimiento se fijó a -80 mV , los incrementos de voltaje eran de 20 mV en 20 mV y un tiempo de 15 s para dar el siguiente pulso. Los protocolos se aplicaron tres veces en un mismo sello, la primera serie de pulsos se realizaron en ausencia de zinc (éste era el control), el segundo protocolo era con zinc y el último protocolo era un lavado que se hizo con la misma solución de baño durante 2 min y 30 s .

Nuevamente se graficaron las familias de corrientes y a partir de ellas se obtuvieron curvas I-V a la cuales se les restó el “leak”

Posteriormente, para saber el porcentaje de inhibición del zinc, se normalizó la corriente con zinc respecto a la corriente control, donde se aplicó la siguiente ecuación.

Ecuación 7:

$$F_B = I_{\text{conZn}^{2+}} / I_{\text{max}}$$

Donde F_B es la fracción de la corriente bloqueada, $I_{\text{conZn}^{2+}}$ es la corriente en presencia de zinc e I_{max} es la corriente control o corriente máxima. Después, solo se consideró el valor de la corriente que se expuso a un voltaje de 100 mV , esto con la intención de evitar la depleción y asegurarnos que el 80% de los canales estuvieran abiertos. Posteriormente, las curvas I-V se normalizaron respecto a la corriente sin zinc. Más adelante, se calculó el promedio, la desviación y el error estándar.

Debido a que no se lograron obtener experimentos completos de todas las concentraciones de zinc con el protocolo antes descrito, se decidió emplear una segunda

estrategia experimental, que es la siguiente: para los registros 1 μM y 1 mM se hizo un protocolo de pulsos continuo, el cual consistía en un potencial de mantenimiento de -60 mV , posteriormente, sólo se aplicaron pulsos a 100 mV durante 200 ms , cada pulso se dio en un intervalo de 5 s (1 μM $N= 5$ y 1 mM $N= 4$). En los primeros 5 a 7 pulsos el sello no era sometido a la solución con zinc, más adelante, entre los pulsos 10 y 13 el sello era expuesto a la solución con zinc y finalmente, en los pulsos 16 y 18 el sello se sometió a la solución de lavado.

El análisis de datos consistió en normalizar todos los pulsos pertenecientes a un mismo sello al pulso con mayor valor de corriente sin zinc, posteriormente estos valores se graficaron contra el tiempo. Lo descrito anteriormente se realizó con cada registro. A continuación, se calcularon los promedios, la desviación y el error estándar. A estos datos se les ajustó la función de Hill.

Ecuación 8:

$$F_B = \frac{1}{1 + \left(\frac{K_D}{[Zn^{2+}]_o}\right)^{n_H}}$$

Donde K_D es la constante de disociación, $[Zn^{2+}]$ es la concentración extracelular de zinc y n_H es el coeficiente de Hill.

7. RESULTADOS

7.1 IDENTIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DEL CANAL H_v1 DE *Acropora millepora*

A partir de las secuencias encontradas en el GenBank, las cuales parecían corresponder al canal H_v1 de los corales *Acropora digitifera* y *millepora* (XM_015907823.1, XM_015907824.1, XM_029346499.1 y XM_029346498.1), se realizaron alineamientos a nivel de nucleótidos, así como su correspondiente secuencia en aminoácidos. Lo anterior nos permitió identificar regiones conservadas entre ellas y su posible marco de lectura abierto para cada par de secuencias. A continuación, se muestran los alineamientos correspondientes, así como las secuencias que fueron seleccionadas para diseñar los dos pares de oligonucleótidos (se muestran resaltadas en verde).

Alineamiento de las secuencias XM_015907823.1 (*A. digitifera*) y XM_029346499.1 (*A. millepora*).

Fragmento A

```
Digitifera-XM_015907823.1      CTTATATGTGAAGAGAAGTGTAAGATCAACATTTGCTATTCAGGTATTCG
Millepora-XM_029346499.1      CTAGTACCAGACCTGTCCGCTTTCAAAAGTGACGCCTGGTTAATTTGCAT
**:.**  :**. :*:.  *:. *:.*  .:  **. * * . *:  .

Digitifera-XM_015907823.1      ATTACTGTGATCACTGTCTAAGATGTTGTTCCACCAGTAAAAATAGTTTT
Millepora-XM_029346499.1      ATTTATGAAGACCCTTTTAGTGAAGAGAAGTGCAAGATCAACAT-----
***:.**:.:*.** * **.  .:.  .:  .*.**:.**:.:

Digitifera-XM_015907823.1      GTCCTGAATTATAGTCATCTTGAAGTCCAAACCATTGGTTCATTTCCGAG
Millepora-XM_029346499.1      ---TTGCTATTCAGTCATCTTGAAGTCCAAACTATTGGTTCATTTCCGAG
**.:*:  *****

Digitifera-XM_015907823.1      TTCCGGGTCTGTCAGAGGATCTCCGTTTCTAGTGAGTTAAGCACCAGCA
Millepora-XM_029346499.1      TTCCGGGTCTGTCAGAGGATCTCCGTTTCTAGTGAG--TTACCACCAGCA
*****  *:* *****

Digitifera-XM_015907823.1      TGGGATTTTCGTAAATGATTGATGCAAGAACCAGACGATCGAGCATGGATG
Millepora-XM_029346499.1      TGGGATTTTCGCAAATGATTGATGCAAGAACCAGACGATCGAGCATGGATG
*****  *****

Digitifera-XM_015907823.1      ATCAACTTCCTGCAGATGAACTCAAGGAGATGGGACAGCCAGGCACAACA
Millepora-XM_029346499.1      ATCAACTTCCTGCAGATGAACTCAAGGAGATGGGACAGCCAGGCACAACA
*****

Digitifera-XM_015907823.1      GCTGCAGTGATGGCAAGCACAGTGTGTTTGACGGAAGATGACACGGAATG
Millepora-XM_029346499.1      GCTGCAGTGATGGCAAGCACAGTGTGTTTGACGGAAGATGACACGGAATG
*****
```

```

Digitifera-XM_015907823.1      CGCAGCAAATAAGAACCACCGGGAAAACTGAATGAACTACTTCATGGAG
Millepora-XM_029346499.1      CCCAGCAAATAAGAACCACCGGGAAAACTGAATGAACTACTTCATGGAG
* ****

Digitifera-XM_015907823.1      ATAAGATTCAGTATGCCATTGTAGTTTGTAGTATCATTGATATCATCATT
Millepora-XM_029346499.1      ATAAGATTCAGTATGCCATTGTAGTTTGTAGTATCATTGATATCATCATT
* ****

Digitifera-XM_015907823.1      GTCATTGCTGAGTTGGTTCTTGACTTGAGAGCAGGATCAG-----
Millepora-XM_029346499.1      GTCATTGCTGAGTTGGTTCTTGACTTGAGAGCAGGATCAGAACATCATGA
* ****

Digitifera-XM_015907823.1      -----
Millepora-XM_029346499.1      CAATTCTGCATCTCATGTCCTGCACTATATCAGTATTGCCATCCTATCAG

Digitifera-XM_015907823.1      -----
Millepora-XM_029346499.1      TCTTTATGATTGAGTTGCTTTTGAAGATCTATGCCATGGGATTACATTT

Digitifera-XM_015907823.1      -----
Millepora-XM_029346499.1      TTCAAGCACAAAATGGAGGTGTTTGATGGCTTTGTTATAATTGTGTCATT

Digitifera-XM_015907823.1      -----
Millepora-XM_029346499.1      TGCCTTGATATTGCCTTCAGTAATGAGCAGGGAGGTGTTGATGGCGTGA

Digitifera-XM_015907823.1      -----GTGAGGATTTGAATCACTTAATAAT
Millepora-XM_029346499.1      GTCTTATGTTTTACTTCGACTTTGGAGAGTAACAAGAATTGTCAACGGA
*:*:* * : :.*: : * ** ..:

Digitifera-XM_015907823.1      CCTACTTGGCACCTTAAAAAGCTGAACAAGAGGAAATGCCAGGCACTAAT
Millepora-XM_029346499.1      ATTATTTTGTCCGTGCAAATGCGGGCTGAAAAGAAAGTTCAAGCGGTGAT
. ** * * . * * .***:** *.. *.**.*** **.*. *.**

Digitifera-XM_015907823.1      AATG-----
Millepora-XM_029346499.1      GAAGGAAAATGCTGAGCTAAAAGCAGAAGTTGAGCAATTGAAGAGCAAGT
.*:*

Digitifera-XM_015907823.1      -----
Millepora-XM_029346499.1      GTGCGCAGTTGGAGTCTGAATTGACAACATTAAGCAAAGCTGAGAAGAG

Digitifera-XM_015907823.1      -----
Millepora-XM_029346499.1      AAAAGAGCGGAAGTAAGGTTATCGAGCGAAAGTTCATAGTGATACTGCC

Digitifera-XM_015907823.1      -----
Millepora-XM_029346499.1      CTAAATATGATCAGTGATTTTAAACAGTTTGTAGATTGAAACAAGTTC

Digitifera-XM_015907823.1      -----ATGGATTTCTAGTTTCTAAAG-----
Millepora-XM_029346499.1      GTAATAGTGAAATATATTTTATTTTACAAAGTACCTAGTTTACTGAT
** . **** ** ** :.**.

Digitifera-XM_015907823.1      -----AACTGTGGTGTGCGTCCG
Millepora-XM_029346499.1      GAGTGATAAAAAAATATCAACCAAAGTCTATAACTTAAGTGTGCAAAGA
:**** :.*****:.*.

```

```

Digitifera-XM_015907823.1      TGGGG-----
Millepora-XM_029346499.1      TAAAAAATTGACCGTTTGTTCCTTAGTGGAAGAAACGTTGAAGTCAT
*....

Digitifera-XM_015907823.1      -----
Millepora-XM_029346499.1      TTCGAAAATATAGGAGATGTATCCTTTTTTTAATTAGTGCTCAGACAAG

Digitifera-XM_015907823.1      -----
Millepora-XM_029346499.1      CAATTGTGTAAAATTTGTAAAGCAATTCATAGAGAATAATTTTTGTATT

Digitifera-XM_015907823.1      -----
Millepora-XM_029346499.1      TTAAGACTTTTATGATTGCCTTAAAGTTAAAGAGAATTATCACTCAAAGA

Digitifera-XM_015907823.1      -----
Millepora-XM_029346499.1      ACGCAAGATTAAATATCAGTGATTTCTTTGATTATCAGAGAGTCCTTTT

Digitifera-XM_015907823.1      -----
Millepora-XM_029346499.1      TATAATGTAATCATCTTGTATTACCATATAGGATAAGTTGTACTTTCT

Digitifera-XM_015907823.1      -----
Millepora-XM_029346499.1      ACCTGTGTGGTGTATTAAATGTGGAAAAGAAATAAAAATGAAACCTTG

```

Alineamiento de las secuencias XM_015907824.1 (*A. digitifera*) y XM_029346498.1 (*A. millepora*).
Fragmento B

```

Digitifera-XM_015907824.1      -----TTATCTAGTTG
Millepora-XM_029346498.1      ACCCTTTTGTAGTGAAGAGAAGTGAAGATCAACATTTGCTATTTCAGGTAT
*::**:.**

Digitifera-XM_015907824.1      TTGAGGTGTGT-----
Millepora-XM_029346498.1      TCGATTAATGTGATCACAGTCTAAGATGTTTGTATCACCAGTAAAAATAGT
* ** :.***

Digitifera-XM_015907824.1      -----
Millepora-XM_029346498.1      TTTGTCTGAATTATAGTCATCTTGAAGTCCAAACTATTGGTTCATTTC

Digitifera-XM_015907824.1      GAATTGCATGTCTG-----GCTACCCATGGGTGACAATTAAC
Millepora-XM_029346498.1      GAGTTCGGGTCTGTGTCAGAGGATCTCCGTTTCTAGTGAGTTACCACCAGC
**.* * .***** * *:* .*.**.* *.*

Digitifera-XM_015907824.1      AAG----ATCACATGAGATAGCTGTTAGTTATAAAG-----CAGTTT
Millepora-XM_029346498.1      ATGGGATTTTCGCAAAATGATTGATGCAAGAACCAGACGATCGAGCATGGAT
*:* :**.*:.*:**.* *:*:. *.* :.*:*

Digitifera-XM_015907824.1      AATTTTCAGACAGAAAATGTTACCATG-----
Millepora-XM_029346498.1      GATCAACTTCTGCAGATGAACTCAAGGAGATGGGACAGCCAGGCACAAC
.* *:* :*.**.*:**:..**.*

```

```

Digitifera-XM_015907824.1
Millepora-XM_029346498.1
-----
AGCTGCAGTGATGGCAAGCACAGTGTGTTTGACGGGAAGATGACACGGAAT

Digitifera-XM_015907824.1
Millepora-XM_029346498.1
----TGCTTTTATAATCTCACTG---TTGCTGGGTTTTTGTTCATTATTAT
GCCAGCAAATAAGAACCACCGGAAAACTGAATGAACACTTTCATGGA
      :*:::*:*.:* ..* *      :*.***.* :: :*: * * .:

Digitifera-XM_015907824.1
Millepora-XM_029346498.1
TATCTGTATGTGTTGTCGG-----ACTCTTTATTATCAACAA
GATAAGATTCAGTATGCCATTGTAGTTTTAGTGATCATTGATATCATCAT
**.*:.*: * :*: * * .          ..*:**.:****:*:

Digitifera-XM_015907824.1
Millepora-XM_029346498.1
ATTTTTCGTT-----
TGTCATTGCTGAGTTGTTCTTGACTTGAGAGCAGGATCAGAACATCATG
: * : * * *

Digitifera-XM_015907824.1
Millepora-XM_029346498.1
----TTTTGTTTTTTTTTTCTGTTTCCAGAAATATTGGCACTGATATGCTTG
ACAATTCGCATCTCATGTCCTG--CACTATATCAGTATTGCCATCTAT
** ** :* * :* ***** * :**** .* * ** . ** *:

Digitifera-XM_015907824.1
Millepora-XM_029346498.1
CATCTCTTTTCTGCTAGTTGCTTTTGAAGATCTATGCCATGGGATTCACA
CAGTCTTTATGATTGAGTTGCTTTTGAAGATCTATGCCATGGGATTCACA
**      *:* :      *****

Digitifera-XM_015907824.1
Millepora-XM_029346498.1
TTTTTCAAGCACAAAATGGAGGTGTTTATGGCCTTTGTTATAATTGTGTC
TTTTTCAAGCACAAAATGGAGGTGTTTATGGCCTTTGTTATAATTGTGTC
*****

Digitifera-XM_015907824.1
Millepora-XM_029346498.1
ATTTGCCTTGATATTGCCTTCAGTAATGAGCAGGGAGGTGTTGATGGCG
ATTTGCCTTGATATTGCCTTCAGTAATGAGCAGGGAGGTGTTGATGGCG
*****

Digitifera-XM_015907824.1
Millepora-XM_029346498.1
TGAGTCTCATTGTTTTACTTCGACTTTGGCGAGTAACAAGAATTGTAAAC
TGAGTCTTATTGTTTTACTTCGACTTTGGAGAGTAACAAGAATTGTCAAC
*****

Digitifera-XM_015907824.1
Millepora-XM_029346498.1
GGAATTATTTTGTCCGTGCAAATGCGGGCTGAAAGGAAAGTTCAAGCGGT
GGAATTATTTTGTCCGTGCAAATGCGGGCTGAAAGGAAAGTTCAAGCGGT
*****

Digitifera-XM_015907824.1
Millepora-XM_029346498.1
GATGAAGGAAAATGCTGAGCTAAAAAAGAAGTTGAGCAATTGAAGAGCA
GATGAAGGAAAATGCTGAGCTAAAAGCAGAAGTTGAGCAATTGAAGAGCA
*****

Digitifera-XM_015907824.1
Millepora-XM_029346498.1
AGTGTGCGCAGTTGGAGTCTGAATTGACAACATTAAACAAAGCTGAGAA
AGTGTGCGCAGTTGGAGTCTGAATTGACAACATTAAAGCAAAGCTGAGAA
*****

Digitifera-XM_015907824.1
Millepora-XM_029346498.1
GAGAAAAGAGCGGAAGTAAGGTTATCGAGGCGAAAGTTCATAGGTGATACT
GAGAAAAGAGCGGAAGTAAGGTTATCGAGGCGAAAGTTCATAGGTGATACT
*****

Digitifera-XM_015907824.1
Millepora-XM_029346498.1
GCCCTAAATATGATCAGTGATTTTAAACAGTTTTTGTAGATTGAAACAAG
GCCCTAAATATGATCAGTGATTTTAAACAGTTTTTGTAGATTGAAACAAG
*****

Digitifera-XM_015907824.1
Millepora-XM_029346498.1
TTAGTAATAGTGGAAGTATATTTTTATTTTTACAAAGTACCTAGTTTACT
TTCGTAATAGTGGAATATATTTTTATTTTTACAAAGTACCTAGTTTACT
** .*****

```

Digitifera-XM_015907824.1	GATGAGTGATATAAAAAATATCAGCCAAAGTATATAACTTAAGTGCTGCAA
Millepora-XM_029346498.1	GATGAGTGATAAAAAAATATCAACCAAAGTCTATAACTTAAGTGCTGCAA *****.*****.*****.*****
Digitifera-XM_015907824.1	AGATAAAAAATTGACCGTTTGTTCCTTAGTGAAAGAAACGTTGAAGT
Millepora-XM_029346498.1	AGATAAAAAATTGACCGTTTGTTCCTTAGTGAAAGAAACGTTGAAGT *****
Digitifera-XM_015907824.1	CATTTGAAAATATAGGAGATGTATCCTTTTTTTTAAATTAGTGCTCAGAC
Millepora-XM_029346498.1	CATTTGAAAATATAGGAGATGTATCCTTTTTTTTAAATTAGTGCTCAGAC *****
Digitifera-XM_015907824.1	AAGCAATTGTGTAATAATTTGTAAAGCAATTCATAGAGAATAATTTTGT
Millepora-XM_029346498.1	AAGCAATTGTGTAATAATTTGTAAAGCAATTCATAGAGAATAATTTTGT *****
Digitifera-XM_015907824.1	ATTTTAAGACTTTTATGATTGCCTTAAAGTTAAAGAGAATTATCACTCAA
Millepora-XM_029346498.1	ATTTTAAGACTTTTATGATTGCCTTAAAGTTAAAGAGAATTATCACTCAA *****
Digitifera-XM_015907824.1	AGAACGCAAGATTAAATATCAGTGATTCTTTGA-----
Millepora-XM_029346498.1	AGAACGCAAGATTAAATATCAGTGATTCTTTGATTATCAGAGAGTCCTT *****
Digitifera-XM_015907824.1	-----
Millepora-XM_029346498.1	TTTTATAATGTAATCATCTTGTTATTACCATATAGGATAAGTTGTACTT
Digitifera-XM_015907824.1	-----
Millepora-XM_029346498.1	TCTACCTGTGTGGTGTATTATAAATGTGGAAAGAAATAAAAATGAAACC
Digitifera-XM_015907824.1	---
Millepora-XM_029346498.1	TTG

A continuación, se muestran las secuencias que corresponden solo al marco de lectura abierto de los fragmentos A y B.

Traducción del fragmento A flanqueado por el primer par de oligos

MIDARTRRSSMDDQLPADELKEMGQPGTTAAVMAS TVCLTEDDTECPANKNHRE
 KLNELLHGDKIQYAIVVLVIIDIIIVIAELVLDLRAGS

Traducción del fragmento B flanqueado por el segundo par de oligos

MGFTFFKHKMEVFDGFVIIVSFALDIAFSNEQGGVDGVSLIVLLRLWRVTRIVNGIIL
SVQMRAEKKVQAVMKENAELKAELEQLKSKCAQLESELTTLKQS-

Para realizar un análisis de la posible estructura de las secuencias flanqueadas por los oligos, se realizó un modelado por homología de cada uno de los fragmentos, utilizando el servidor SWISS-MODEL. Para obtener el modelo de ambos fragmentos, se utilizó como molde el PDB: 3WKV, correspondiente a la quimera del canal Hv1 de *Ciona intestinalis* con el VSD de *raton* (ccHv1m). A continuación, se muestran los modelos obtenidos para cada fragmento con sólo tres pases transmembranales y su comparación con el PDB molde.

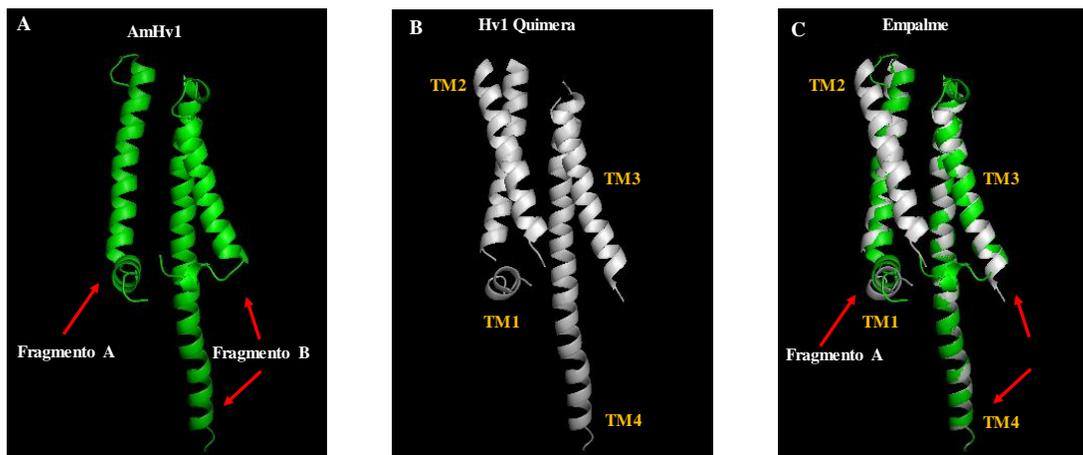


Figura 22. Modelos de los fragmentos identificados como Hv1 de *Acropora*.

A) Modelos de los Fragmentos A y B de *Acropora* obtenidos en SWISS-MODEL; B) Hv1 Quimera (PDB: 3WKV); y
C) Empalme de modelos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de los modelos podemos sugerir que, el fragmento A corresponde al grupo amino terminal y al primer segmento transmembranal del canal Hv1 de *Acropora millepora*, mientras que el fragmento B corresponde a los segmentos transmembranales 3 y 4, y al grupo carboxilo terminal de dicho canal. Considerando estos resultados, sugerimos que con el oligo 5' del fragmento A y el

oligo 3' del Fragmento B podríamos amplificar la secuencia completa del canal Hv1 de *A. millepora*, a continuación, se muestran los resultados correspondientes.

7.1.1 AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DEL CANAL Hv1 DE *Acropora millepora*

Con la finalidad de clonar el posible canal Hv1 de *A. millepora*, se realizó una extracción de ARN total a partir de un fragmento de coral, el cual había sido propagado en un acuario. La extracción del ARN total se realizó utilizando el método de Chomczynski y Sacchi (1987) partiendo de una muestra de 3 cm de coral. En la figura 23 se muestra un análisis por electroforesis de agarosa (al 1.4 % en MOPS 1X) del ARN total obtenido del fragmento de coral. Sumado a lo anterior, se realizó la cuantificación de la muestra, tomando en cuenta el valor de absorbancia a 260 nm obtenido con la ayuda de un espectrofotómetro. La concentración de la muestra de ARN total fue de 0.504 ug/ul. Al dividir los valores de absorbancia a 260 nm / 280 nm, se pudo determinar el nivel de pureza de la muestra, obteniendo para dicha muestra un valor de pureza de 1.8.

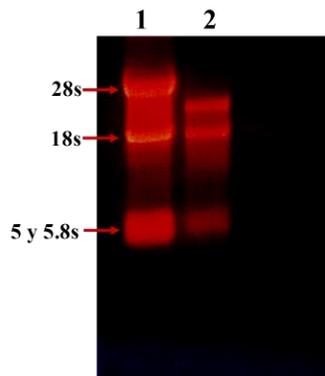


Figura 23. Extracción de ARN total de *A. millepora*. Carril 1. ARN total de Células HEK293, Carril 2: ARN total de *Acropora millepora*. En ambas muestras se muestran los ARN ribosomales, 28s, 18s, 5 y 5.8s en HEK293 y sus correspondientes bandas en la muestra de *A. millepora*.

Una vez que se determinó la integridad, concentración y pureza de la muestra de ARN total, se realizó una RT-PCR utilizando 3 pares de oligos independientes. AcHv1Nt5' y 3' y AcHv1Ct5' y 3' para amplificar los fragmentos A y B ya descritos, y también se probó la

combinación AcHv1Nt5' y AcHv1Ct 3', esto último con la finalidad de tratar de clonar el canal completo H_v1 de *Acropora millepora*. A continuación, se muestran las amplificaciones obtenidas en dichas reacciones de PCR.

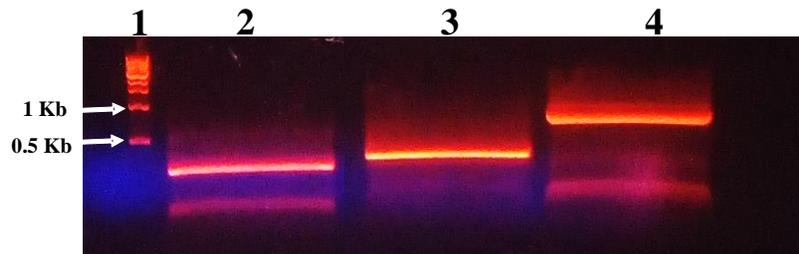


Figura 24. Amplificaciones por RT-PCR de AmH_v1 parcial y completo. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb, Carril 2: Amplificación con los oligos AcH_v1 Nter 5' y 3'; Carril 3: AcH_v1 Cter 5' y 3'; Carril 4) Amplificación con los oligos AcH_v1 Nter 5' y AcH_v1 Cter 3', esta última combinación nos permitió obtener en canal AmH_v1 completo.

Los 3 fragmentos amplificados fueron clonados de manera independiente en el vector pGEMT para generar más copias y realizar la secuenciación correspondiente. Después de analizar la secuencia de los 3 fragmentos amplificados encontramos que dos de ellos correspondían justamente a los fragmentos A y B previamente descritos como secuencias conservadas entre las especies *A. millepora* y *digitifera*, sólo con pocas diferencias a nivel de pares de bases y aminoácidos. El producto de amplificación obtenido al utilizar los oligos AcH_v1 Nter 5' y AcH_v1 Cter 3', corresponde a lo que nosotros proponemos que es el canal H_v1 de *Acropora millepora*. Este último par de oligos nos permitió determinar correctamente el marco de lectura abierto del canal H_v1 de *A. millepora*. A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos del canal H_v1 clonado en este proyecto.

Secuencia en aminoácidos del canal H_v1 de *Acropora millepora*

```
MIDARTRRSSMDDQLPADELKEMGQPGTTAAVMASVCLTEDDTECPANKNHREKLNELLHGDKI
QYAIIVLVIIDIIIVIAELVLDLRAGSEHHDNSASHVLHYISIAILSVFMIELLLKIYAMGFTFFKHKMEV
FDGFVIIVSFALDIAFSNEQGGVDGVSILVLLRLWRVTRIVNGIILSVQMRAEKKVQAVMKENAELQK
ELEQLKSKCAQLESELTTLKQS-
```

A partir de la secuencia del canal H_v1 de *A. millepora*, se realizó un modelado por homología en el servidor SWISS-MODEL, utilizando el PDB del canal H_v1 quimérico (3WKV). En la figura 25 se muestra la comparación del modelo computacional obtenido para el AmH_v1, presentando los cuatros pases transmembranales con su contraparte H_v1 quimérico.

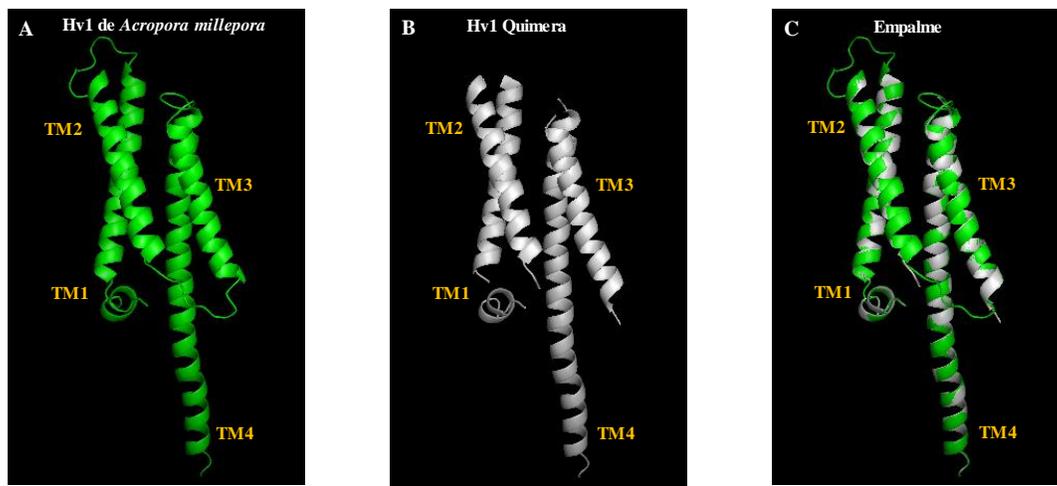


Figura 25. Modelo estructural del canal H_v1 de *Acropora millepora*.

A) Modelo computacional del canal AmH_v1 obtenido en SWISS-MODEL; B) H_v1 quimérico (PDB: 3WKV); y C) Empalme.

Una vez que se clonó y caracterizó la secuencia del canal AmH_v1, se realizó una subclonación de esta misma secuencia ahora en el plásmido pcDNA3.1, el cual es un vector de expresión en células de mamífero. Esta construcción fue utilizada para la expresión transitoria del canal de estudio en células HEK293. Dicho sistema de expresión heterólogo nos permitió realizar la caracterización electrofisiológica del nuevo canal.

7.2 CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DEL CANAL H_v1 DE *Acropora millepora* (AmH_v1) EXPRESADO EN CÉLULAS HEK293

Antes de iniciar con la caracterización electrofisiológica del canal H_v1 , se registraron células HEK293 sin transfectar, tomando a estas como un grupo control. En la Figura 26 se muestra una familia de corrientes representativa obtenida en células HEK293 sin transfectar. Como se puede observar, se encontró que este grupo control presenta corrientes en respuesta al protocolo de voltaje, alcanzando un valor máximo cercano a 90 pA. La amplitud de la corriente va en aumento conforme aumenta el voltaje, lo que sugiere la expresión endógena de canales iónicos dependientes de voltaje en dichas células.

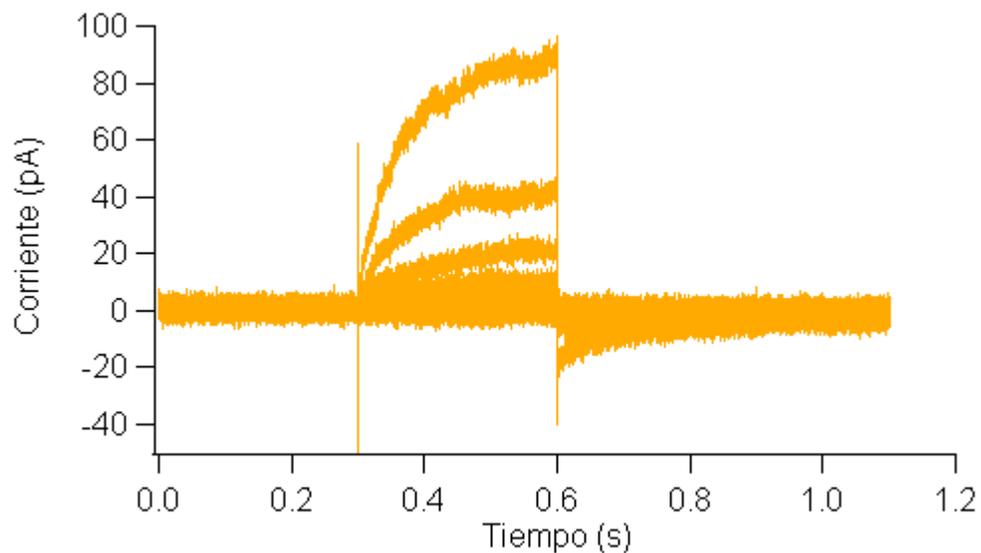


Figura 26. Familia de corrientes obtenida de células HEK293 sin transfectar. Los registros se hicieron en configuración Inside-out con $\Delta pH = 0$. El protocolo de $\Delta pH = 0$ fue de -60 mV a 160 mV durante 300 ms (N= 4).

El mismo protocolo de voltaje se aplicó también a células HEK293 transfectadas con el canal AmH_v1 . En la siguiente figura se presenta una familia de corrientes representativa para este grupo experimental. De acuerdo con lo que se observa en la imagen, las células transfectadas con el canal AmH_v1 también presenta corrientes en respuesta al protocolo de

voltaje, mostrando un valor máximo de corriente alrededor de 70 pA. Lo importante en este punto es que las características de las corrientes observadas en las células transfectadas son claramente diferentes a las mostradas para el grupo control.

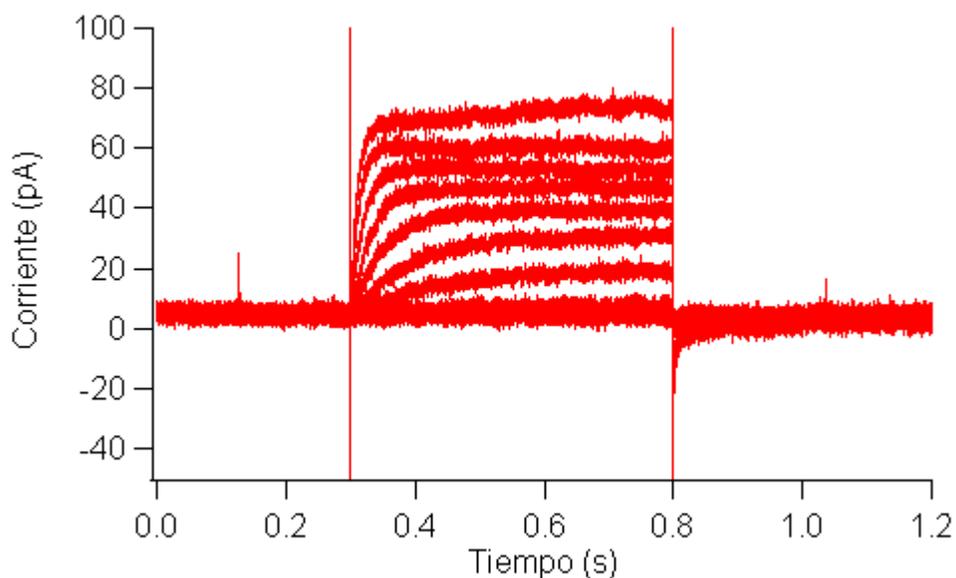


Figura 27. Familia de corrientes obtenida en células HEK293 transfectadas con el canal AmHv1. Los registros se hicieron en configuración inside-out con $\Delta\text{pH} = 0$. El protocolo de $\Delta\text{pH} = 0$ fue de -40 mV a 160 mV durante 500 ms ($N= 4$).

Como se puede observar en ambos grupos de células se ve una corriente en respuesta al voltaje, sin embargo, existen claras diferencias entre el grupo control y el grupo experimental. En primer lugar, en las células no transfectadas se observa que el inicio de la corriente es más lento y no responde rápidamente al voltaje, mientras que en células transfectadas, se observan corrientes rápidas. Por otra parte, al realizar curvas I-V a partir de las familias de corrientes registradas para ambos grupos de células, se pudo determinar que la dependencia al voltaje también es diferente entre el grupo control y el experimental. A continuación, se presentan las curvas I-V correspondientes.

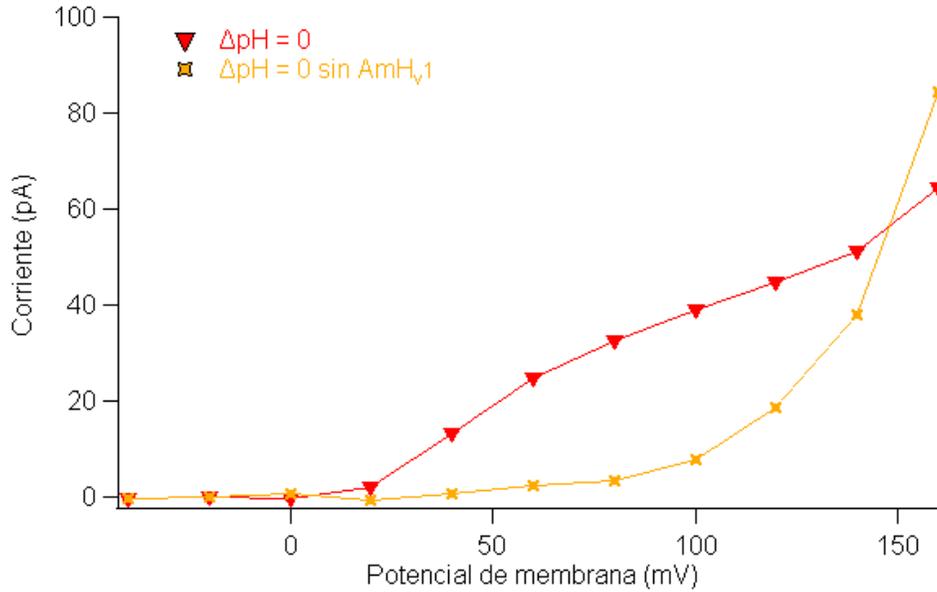


Figura 28. Curvas I-V. Corrientes de canal AmH_v1 expresado en células HEK293 (N=5) (triángulos rojos) y corrientes endógenas de las células HEK293 (N=4) (cruces amarillas).

En la Figura 28 se ilustran dos curvas I-V una de ellas corresponde a células transfectadas con el canal AmH_v1 y la otra curva se obtuvo a partir de los datos de las células control. La I-V que pertenece a células que expresan el canal H_v1 de *Acropora millepora*, se puede observar que el canal presenta una apertura a 20 mV y el valor de la corriente máxima promedio es alrededor de 65 pA a 160 mV. Por otra parte, los canales endógenos se abren a un potencial mayor, alrededor de 60 mV, 40 mV más positivos que los canales AmH_v1, y un valor de corriente máxima promedio de 85 pA a 160 mV. Asimismo, la cinética de las curvas es distinta, en AmH_v1 se forma una sigmoide y en los canales endógenos una asíntota oblicua, lo que indica que requieren de mayor estimulación de voltaje para que se abran.

Estos primeros experimentos nos permitieron determinar que, a pesar de que las células control expresan de manera endógena canales activados por voltaje, estos tienen propiedades biofísicas diferentes al canal AmH_v1, por lo tanto, podremos distinguir completamente en los registros aquellas corrientes que corresponden al nuevo canal AmH_v1 del resto de canales endógenos dependientes de voltaje presentes en las células HEK293.

7.2.1 DEPENDENCIA DE VOLTAJE Y MODULACIÓN POR ΔpH DEL CANAL AmH_v1

Para iniciar propiamente la caracterización electrofisiológica del canal AmH_v1 , se obtuvieron familias de corrientes en células HEK293 transfectadas con el nuevo canal en configuración inside-out, aplicando los protocolos descritos en la sección de métodos. Así mismo, como ya se mencionó en la introducción el canal H_v1 es modulado por cambios en el ΔpH , por lo anterior se realizaron registros en donde se aplicaba el protocolo de voltaje antes mencionado en diferentes ΔpH s. La Figura 29 muestra el efecto del ΔpH sobre las corrientes del canal AmH_v1 . En el panel A podemos encontrar las familias de corrientes correspondiente a un ΔpH de 2, las cuales tienen un valor alrededor de 400 pA, sin embargo, existe una notable depleción de la corriente, esto debido a la pérdida de protones en el medio intracelular (Hille, 2001). En el panel B se muestran las familias de corrientes con $\Delta\text{pH} = 1$, con un valor de corriente de 300 pA; el panel C exhibe las familias con $\Delta\text{pH} = -1$, el valor de la corriente es de 190 pA, por último, en la sección D se presenta las familias de corriente a un $\Delta\text{pH} = -2$ con un valor de corriente cercano a 650 pA.

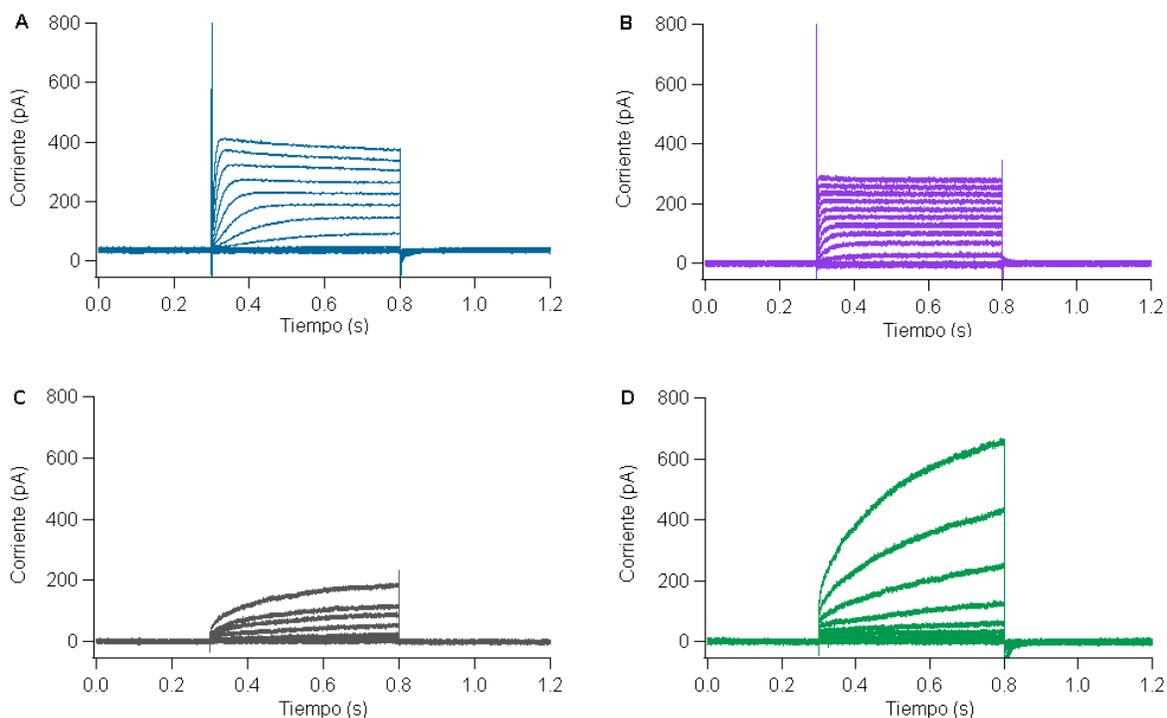


Figura 29. Familias de corriente perteneciente a AmH_v1. Registros en configuración Inside-out. (A) Familias de corrientes con $\Delta\text{pH} = 2$, (N = 5) (trazos azules). El protocolo consistió en voltaje de -120 mV a 120 mV con una duración de 550 ms por pulso, en incrementos de 20 mV en 20 mV, con un voltaje de mantenimiento de 80 mV. (B) Familias de corrientes con $\Delta\text{pH} = 1$ el protocolo inició desde -100 mV a 140 mV durante 500 ms (N = 10) (trazos lilas). (C) Familias de corrientes con $\Delta\text{pH} = -1$ inicio con un protocolo de voltaje de 20 mV a 200 mV durante 500 ms (N = 5) (trazos grises). (D) Familias de corrientes con $\Delta\text{pH} = -2$, el protocolo comenzó desde 40 mV a 220 mV durante 500 ms (N = 5) (trazos verdes).

A partir de todos los resultados obtenidos en estas familias de corrientes se realizaron curvas I-V pertenecientes AmH_v1, pero expuestas a diferentes ΔpH s (ver Figura 30). En $\Delta\text{pH} = 2$ la corriente se activa en -20 mV, con un valor de corriente máxima cercana a 250 pA, en $\Delta\text{pH} = 1$ el canal se abre a 0 mV con una corriente máxima de 290 pA. Ambas curvas comienzan a formar una asíntota. Mientras que en $\Delta\text{pH} = -1$ y -2, la apertura del canal ocurre a potenciales mucho más positivos, en 100 mV y 120 mV respectivamente, y corrientes máximas que van desde los 190 pA a los 600 pA. La activación del canal se recorre 100 mV cuando se trabaja con ΔpH s negativos, además dichas curvas sólo forman el inicio de la asíntota en comparación con las curvas con ΔpH positivos, donde se observa una asíntota más completa.

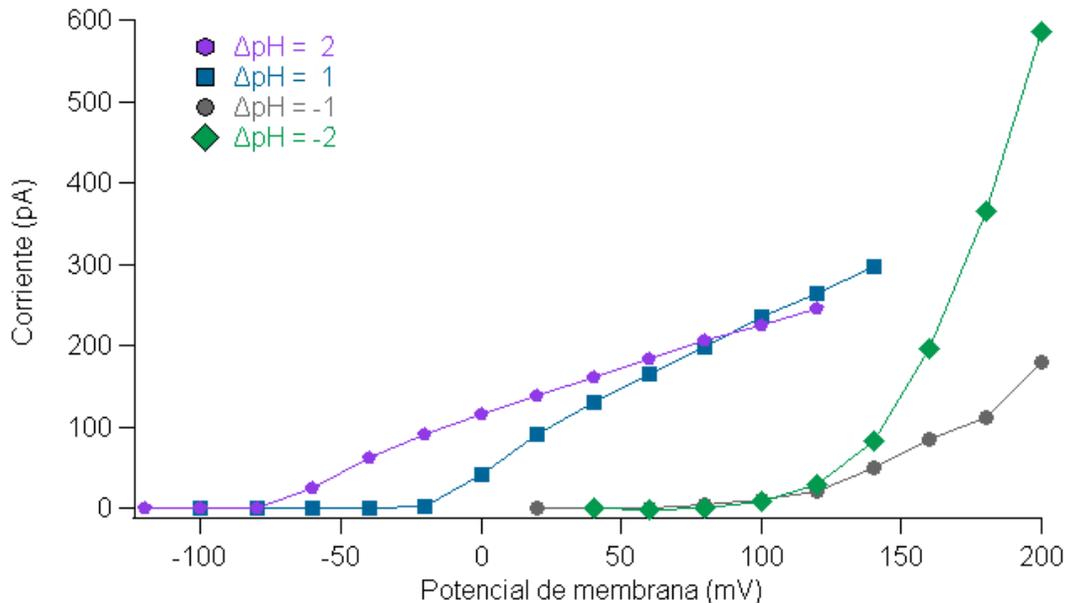


Figura 30. Curvas I-V expuestas a diferentes ΔpH s del canal AmH_v1. Parches en configuración Inside-out (pentágonos lilas = $\Delta\text{pH} = 2$; cuadrados azules = $\Delta\text{pH} = 1$; círculos grises = $\Delta\text{pH} = -1$ y rombos verdes = $\Delta\text{pH} = -2$).

Esta serie de experimentos nos permitió determinar que la apertura del canal AmH_v1 es dependiente del voltaje, al mismo tiempo el valor del ΔpH repercute en su activación, ya que ésta ocurre a distintos valores de voltaje. En los siguientes experimentos se retomará el tema de ΔpH y selectividad de protones.

7.2.2 CURVAS DE CONDUCTANCIAS (G-V) DEL CANAL AmH_v1 CON DIFERENTES ΔpHS

A partir de las familias de corrientes obtenidas a diferentes ΔpHS, se realizó también el análisis de la conductancia del canal AmH_v1. Como se mencionó anteriormente en la parte de métodos (ver sección 6.4), a las curvas G-V se les ajustó la función de Boltzmann la cual nos brinda dos valores importantes; el primero es e_0 que es la proporción de canales que presentan movimiento de carga a un voltaje específico, el segundo es el voltaje medio de activación o $V_{0.5}$, que es el voltaje en el cual la mitad de la carga se movió.

En la Figura 31 se presentan las conductancias (G) normalizadas en los cinco ΔpHS que fue sometido el canal de AmH_v1. En las curvas con pH 2, 1 y 0 se puede notar una gran voltaje dependencia del canal de protones, puesto que en pocos pulsos el canal llega casi al límite de su conductividad. Los valores que arrojó la función de Boltzmann se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 5. Valores promedio con error estándar de la función de Boltzmann para cada ΔpH.

ΔpH	e_0	$V_{0.5}$ (mV)
2	1.8 ± 0.2	-8.4 ± 2.5
1	1.4 ± 0.3	-1.8 ± 4.0
0	3.0 ± 0.6	26 ± 2
-1	1.0 ± 0.1	147 ± 5
-2	1.5 ± 0.5	150 ± 7

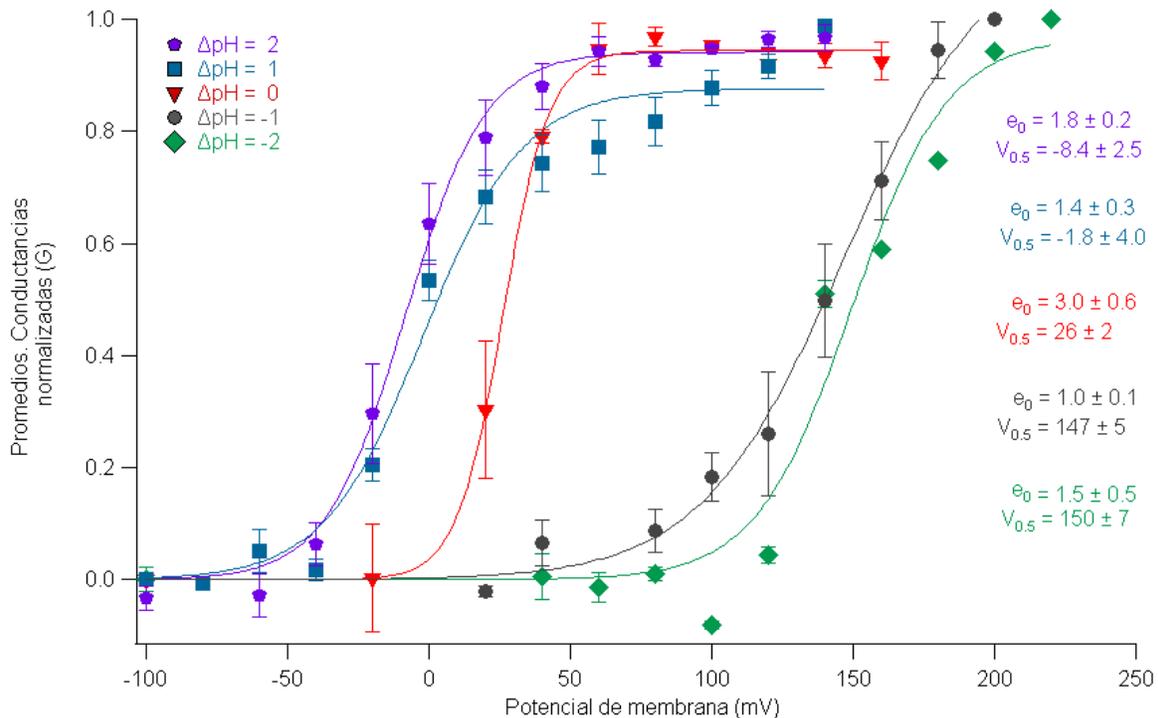


Figura 31. Promedios de las conductancias (G) normalizadas del canal de AmH_v1 a distintos ΔpHs. Registros en configuración Inside-out. (pentágonos lilas = ΔpH = 2, N = 5; cuadrados azules ΔpH = 1, N = 10; triángulos rojos ΔpH = 0, N = 4; círculos grises = ΔpH = -1, N = 5; rombos verdes = ΔpH = -2, N = 5). Las barras indican el error estándar.

Las curvas con ΔpHs de 2 y -1, el valor de sus V medias cambia alrededor de 150 mV, mientras que en ΔpH = 0 su V media está por arriba de los valores de las V medias de ΔpH 2 y 1, el cual corresponde a 26.2 ± 2 mV. En el ΔpH 2, 1 y 0 se observa que la curva llega a un nivel de saturación, pero en los ΔpH de -2 y -1 las curvas apenas llegan a la asíntota. Las V medias con ΔpHs negativos no tuvieron valores significativamente diferentes. Sin embargo, en comparación con las V medias de ΔpH 2, 1 y 0 su valor está alrededor de 125 mV a 160 mV de diferencia.

El valor de las cargas elementales es mayor en ΔpH 0, ya que conduce 3 veces más carga que en los otros ΔpHs. En esta grafica podemos confirmar que el canal es sumamente

dependiente al voltaje porque en pocos pulsos el canal presenta una pendiente pronunciada y está llegando a un nivel de conductividad máxima.

7.2.3 CINÉTICA DE ACTIVACIÓN (T) DEL CANAL AmHv1 CON DISTINTOS ΔpHS

Como parte de la caracterización del canal AmHv1, se compararon los valores de las τ de activación con diferentes ΔpH s. En las cinco curvas, a medida que incrementa el voltaje la cinética de activación es más rápida, sin embargo, cuando los potenciales se acercan a valores negativos, la cinética se hace más lenta. Esto es claramente notorio a ΔpH s positivos, en ΔpH 2, su velocidad de activación es rápida, con un valor de 0.17 s llegando a un valor mínimo de 0.002 s y en ΔpH 1 va de 0.19 s a 0.007 s, mientras que en ΔpH 0 la cinética de activación comienza en 0.25 s a un valor mínimo 0.01 s. A ΔpH s negativos la cinética cambia y se hace más lenta, en ΔpH -1 va 0.42 s a 0.15 s y en ΔpH -2 va de 0.32 s a 0.12 s, el valor final de la cinética de activación aumentó de 400 y 300 veces más en estos dos últimos ΔpH s en comparación con el valor final a ΔpH 2.

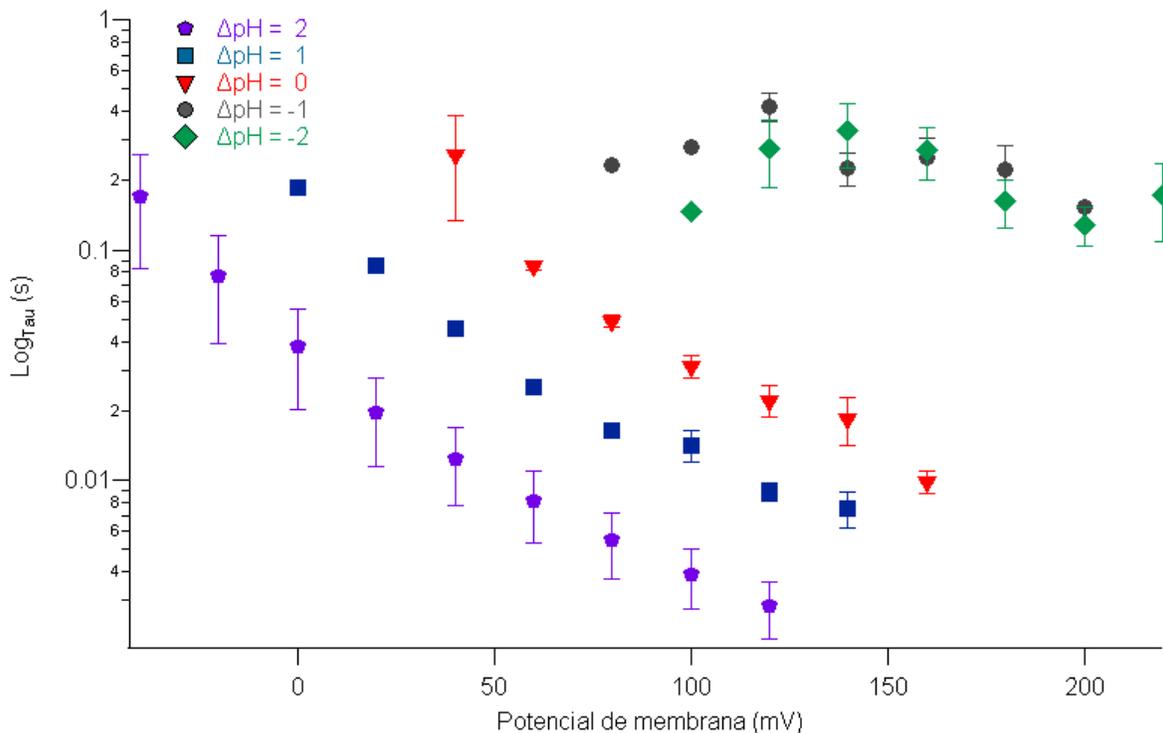


Figura 32. Promedios de las cinéticas de activación (τ) del canal de AmH_v1 a distintos Δ pHs. Registros en configuración Inside-out. (pentágonos lilas= Δ pH 2; cuadrados azules Δ pH 1; triángulos rojos = pH 0; círculos grises = Δ pH -1; rombos verdes = Δ pH -2). Las barras indican el error estándar.

7.2.4 COLAS DE CORRIENTE Y POTENCIAL DE REVERSIÓN (E_{REV}) DEL CANAL AmH_v1

Con la finalidad de caracterizar la selectividad del canal AmH_v1 se realizaron experimentos de colas de corriente como se describió en la sección de métodos, a todas las gráficas se les hizo un acercamiento para poder ver mejor la corriente de colas. La siguiente figura muestra el efecto del Δ pH sobre las corrientes del canal AmH_v1. En el panel A podemos encontrar las colas de corrientes correspondiente a un Δ pH de 2, las cuales presentan ruido, sin embargo, se puede apreciar que las corrientes son cercanas a la línea de 0 (línea punteada de color negro); primero se observa una corriente entrante a un voltaje de -140 mV y la corriente se aproxima a 0, inmediatamente en el voltaje de -120 mV la corriente es saliente, esto quiere decir que se alcanzó el potencial de equilibrio al voltaje cercano a -118 mV que es el E_{rev} , donde el flujo neto de protones está en equilibrio o equivale a 0 al voltaje de -118 mV. En el panel B se muestran las colas de corriente con Δ pH 1, aquí se puede notar con mayor claridad como las corrientes conforme aumenta el voltaje se aproximan a la línea de 0, primero se observan corrientes entrantes a voltajes de -80 a -60 mV y la corriente se aproxima a 0, inmediatamente después del voltaje de -60 mV la corriente es saliente al voltaje de -50 mV, esto quiere decir que se alcanzó el potencial de equilibrio al voltaje cercano a -59 mV que es el E_{rev} , donde el flujo neto de protones está en equilibrio o equivale a 0 al voltaje de -59 mV. En el panel C exhibe las familias con Δ pH 0, nuevamente conforme aumenta el voltaje las corrientes se aproximan a la línea de 0, primero se observan corrientes entrantes a voltajes de -70 a -10 mV, después del voltaje de -10 mV la corriente es saliente al voltaje de 10 mV, esto quiere decir que se alcanzó el potencial de equilibrio al voltaje cercano a 0 mV que es el E_{rev} , donde el flujo neto de protones está en equilibrio o equivale a 0 al voltaje de 0 mV.

Finalmente, en la sección D se presenta las familias de corriente a un $\Delta\text{pH} -1$, nuevamente conforme aumenta el voltaje las corrientes se aproximan a la línea de 0, primero se observan corrientes entrantes a voltajes de 30 a 50 mV, después del voltaje de 50 mV la corriente es saliente al voltaje de 60 mV, esto quiere decir que se alcanzó el potencial de equilibrio al voltaje cercano a 59 mV que es el E_{rev} , donde el flujo neto de protones está en equilibrio o equivale a 0 al voltaje de 59 mV.

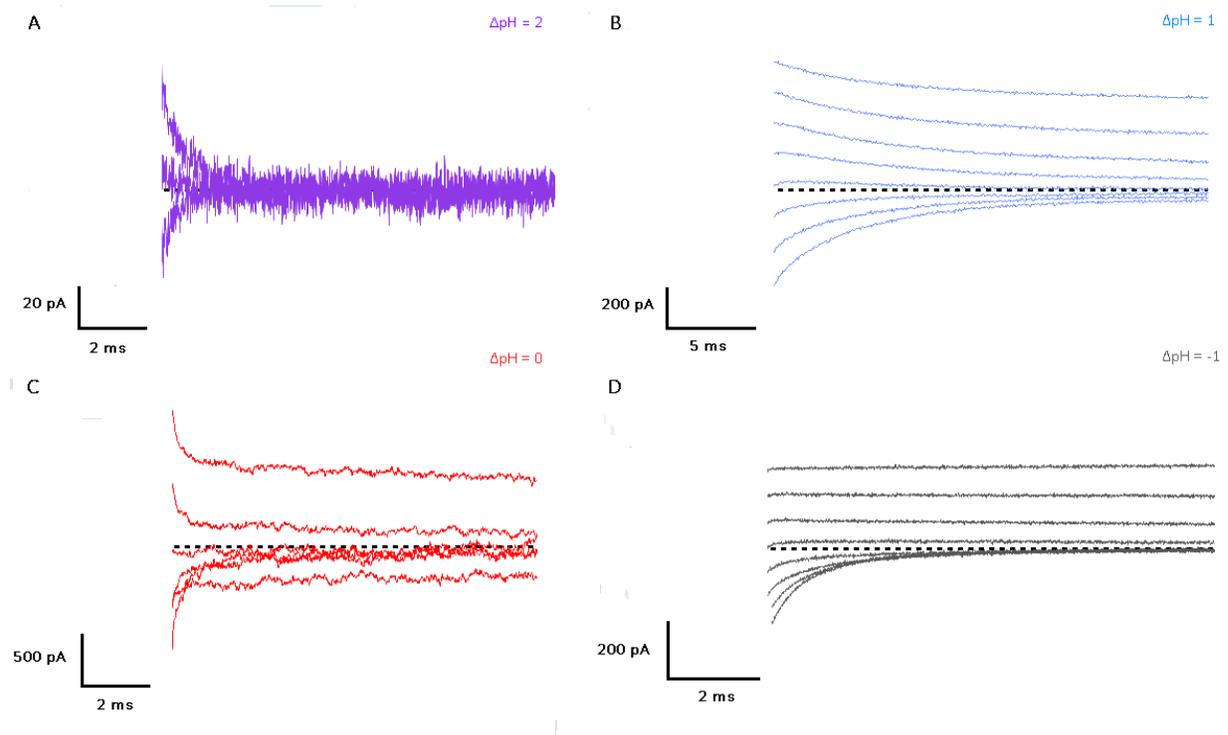


Figura 33. Graficas de colas de corriente en configuración Whole-cell del canal AmH_v1. Para el registro con $\Delta\text{pH} = 2$ consistió en pulso de voltaje de 200 mV por 200 ms, posteriormente, el voltaje descendió a -140 mV hasta llegar a -100 mV, con incrementos de 20 en 20 mV y una duración de 200 ms ($N = 7$). El protocolo para $\Delta\text{pH} = 1$ fue un pulso de voltaje de 120 mV por 120 ms, posteriormente, el voltaje descendió a -80 mV hasta llegar a 10 mV con incrementos de 10 en 10 mV, con una duración de 450 ms ($N = 7$). El protocolo para $\Delta\text{pH} = 0$ consistió en un pulso de 100 mV por 50 ms, inmediatamente el voltaje descendió a -70 mV hasta llegar a 10 mV con incrementos de 20 en 20 mV y una duración de 300 ms ($N = 6$). Por último, el protocolo de $\Delta\text{pH} = -1$ consistió en un primer pulso de 180 mV por 150 ms, posteriormente, el voltaje descendió a 30 mV hasta llegar a 100 mV con incrementos de 10 en 10 mV una duración de 500 ms, ($N = 8$). La línea punteada negra que atraviesa las colas de corriente equivale a la línea de 0.

En la siguiente tabla se presentan los valores del potencial de reversión teórico contra el promedio del potencial de reversión experimental. Estos valores son muy cercanos de acuerdo con los valores esperados por la ecuación de Nernst en los diferentes ΔpH s.

Tabla 6. Valores de los ΔpH s, el potencial de reversión teórico y el promedio del potencial de reversión experimental con error estándar.

ΔpH	E_{rev} (teórico promedio)	E_{rev} (experimental)
-1	59 mV	59 ± 2 mV
0	0 mV	1 ± 3 mV
1	-59 mV	-56 ± 1 mV
2	-118 mV	-120 ± 2 mV

En la siguiente grafica se muestra el promedio de los experimentos a los cuales se les calculó el potencial de reversión con la ecuación de Nernst graficados contra su ΔpH correspondiente. Como puede observarse en esta figura, la mayoría de los puntos experimentales caen en la línea punteada que corresponde el potencial de reversión calculado para protones en los ΔpH utilizados.

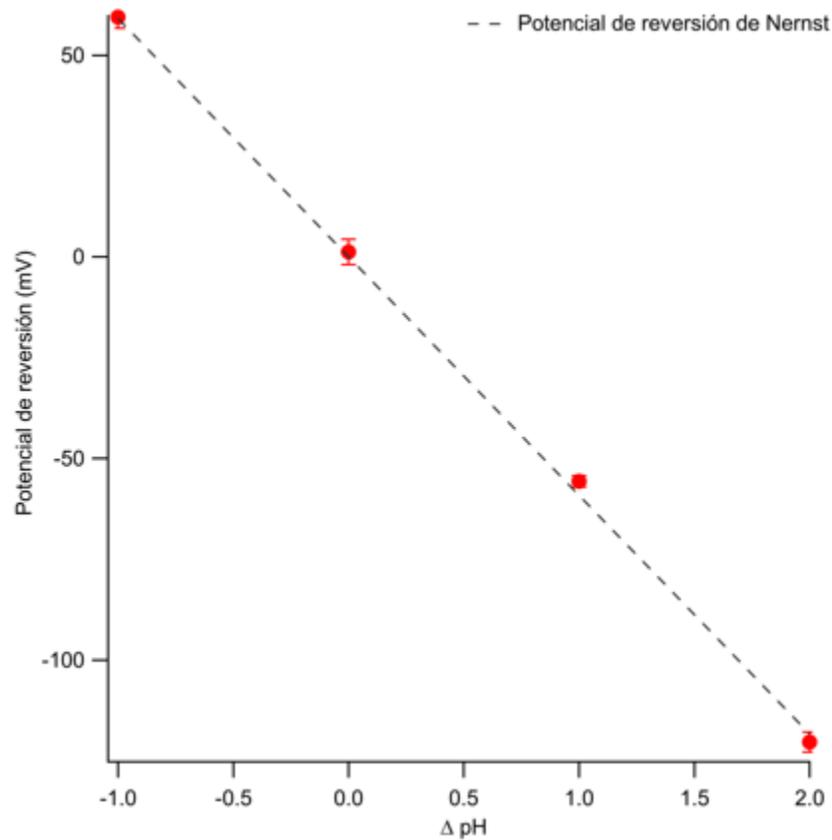


Figura 34. Grafica con los valores del potencial de reversión promedio del canal AmH_v1 y su ΔpH correspondiente. La línea punteada es el potencial de reversión calculado con la ecuación de Nernst. Los círculos rojos son los valores del E_{rev} experimental y las barras indican el error estándar. Los ΔpH s son: $\Delta pH = -1$ (N = 7), $E_{rev} = 59 \pm 2$ mV; $\Delta pH = 0$ (N = 6), $E_{rev} = 1 \pm 3$ mV; $\Delta pH = 1$ (N = 8) $E_{rev} = -56 \pm 1$ mV; $\Delta pH = 2$ (N = 7), $E_{rev} = -120 \pm 2$ mV.

7.2.5 EFECTO DEL ZINC SOBRE LAS FAMILIAS DE CORRIENTE Y CURVAS I-V DEL CANAL AmH_v1

Como parte de la caracterización del canal AmH_v1, nos interesó estudiar el efecto de zinc sobre la actividad del canal. Como se describió en la introducción, el zinc ha mostrado ser un importante inhibidor de la actividad de otros canales H_v1. En la siguiente figura en el panel A se muestra una familia de corrientes del canal AmH_v1 en ausencia de zinc, con un

valor de corriente máxima alrededor de 98 pA, posteriormente, en el panel B se presenta la familia de corrientes obtenida en el mismo sello, pero ahora en presencia de zinc a 10 μM , puede notarse que la corriente disminuye y tiene un valor máximo de 75 pA. La sección C se observa la familia de corrientes del mismo sello, pero después de un lavado con la solución extracelular, esto último con la finalidad de eliminar todo el zinc. Como se puede notar, la amplitud de las corrientes se recupera después del lavado, llegando a un valor máximo de 102 pA, aproximadamente el mismo valor inicial. En el panel D se presentan las dos curvas I-V normalizadas con respecto a la curva I-V sin zinc, puede verse que en la curva I-V con zinc existe una disminución alrededor del 40 %. A pesar de dicha disminución el zinc no afecta la apertura del canal, ya que la activación de ambas curvas comienza en 20 mV.

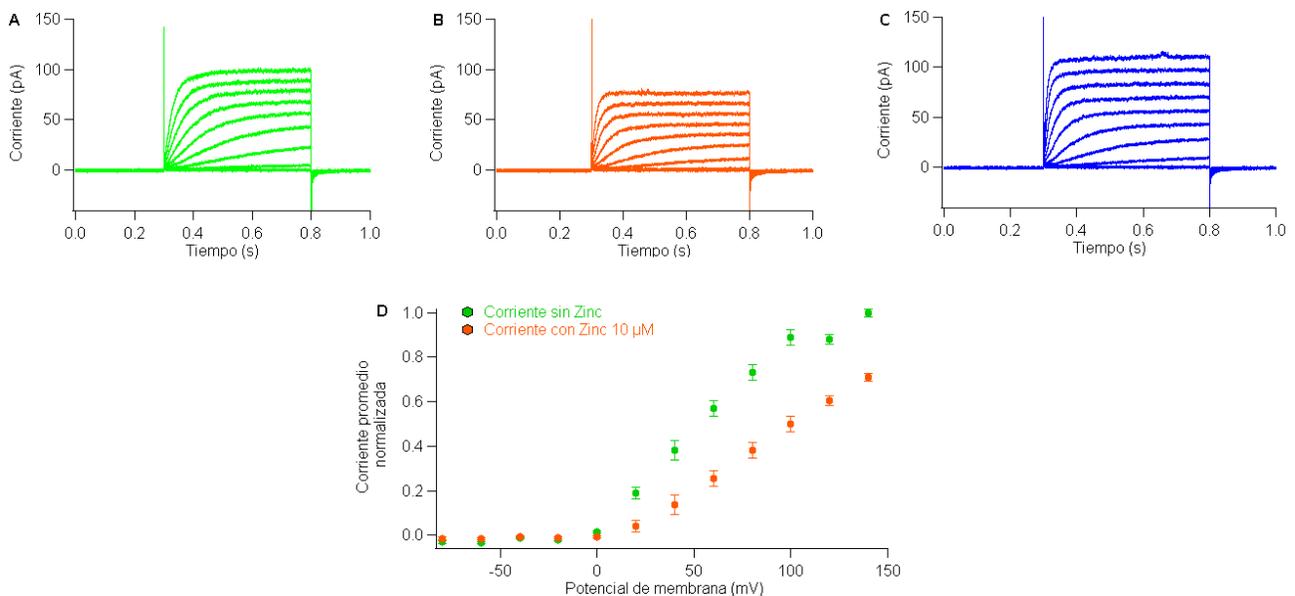


Figura 35. Familias de corrientes y curvas I-V con $\Delta\text{pH} = 1$ de AmHv1. Registros en configuración Outside-out. (A) Familias de corrientes de AmHv1 (trazos verdes). (B) Familias de corrientes con zinc 10 μM (trazos naranjas). (C) Familias de corrientes con el lavado (trazos azules). (D) Curva I-V normalizada sin zinc (círculos verdes) y corriente normalizada con zinc (círculos naranjas). Para obtener los registros de zinc con la concentración de 10 μM , el protocolo consistió en pulsos de -40 mV a 140 mV con una duración de 500 ms ($N = 4$). Las barras indican el error estándar.

Con la finalidad de obtener una curva dosis respuesta a zinc, se aplicó el protocolo anterior, pero con diferentes concentraciones de zinc. Para algunas concentraciones de zinc no se lograron sellos muy estables, para esos casos se empleó otra estrategia de registro previamente descrita en la sección de métodos. En la Figura 36 panel A se muestra una familia de corrientes expuesta a una solución de baño, donde la corriente máxima equivale a 100 pA, (estos trazos casi no son notables debido a que están empalmados con los trazos del lavado) posteriormente, se agregó una solución con zinc a una concentración de 1 mM, la cual inhibe el canal casi en su totalidad con un valor de corriente cerca de 10 pA, por último, las corrientes son sometidas a una lavado con la solución de baño, donde nuevamente la corriente se incrementa 100 pA, llegando al valor del estado inicial. En la sección B se plasma la corriente normalizada, los 7 primeros puntos corresponden a la corriente sin zinc, los siguientes 8 puntos pertenecen a la corriente con zinc 1 mM y los últimos 6 son el lavado con la solución de baño.

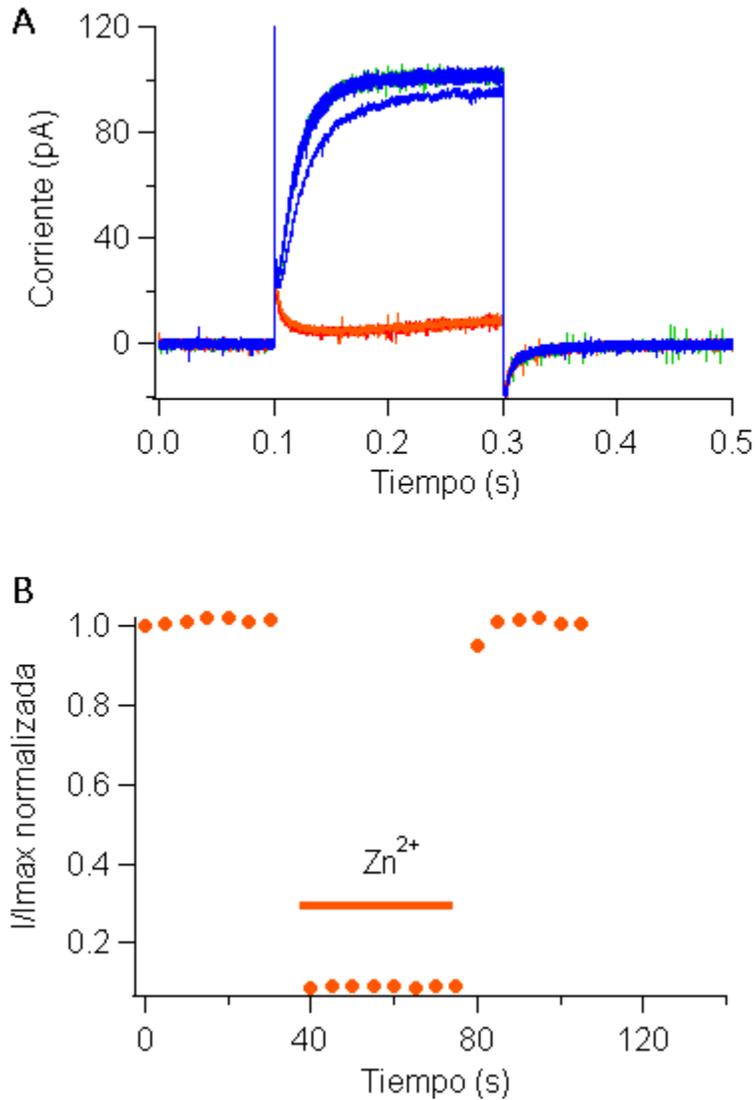


Figura 36. Familias de corrientes y corriente normalizada. Registro en configuración Outside-out. (A) Familias de corrientes. Los trazos verdes representan corriente sin zinc que están en la parte de atrás de los trazos naranjas, los trazos naranjas es la corriente con zinc (1 mM) y los trazos azules son el lavado. (B) Corriente normalizada respecto a la corriente en ausencia de zinc. La línea inferior naranja indica los pulsos en donde el sello estuvo expuesto a la solución de zinc. El protocolo consistió en una serie de pulsos a 100 mV durante 200 ms con un potencial de mantenimiento de -60 mV, cada pulso se dio en un intervalo de 5 s (N = 4).

Con este experimento es notable la inhibición inmediata que se tiene cuando el sello es sometido a zinc 1 mM y como la corriente vuelve a establecerse por completo una vez lavado el zinc.

A partir de los resultados obtenidos en los registros en presencia de zinc, se logró calcular el porcentaje de inhibición para cada una de las concentraciones de zinc analizadas y con ello construir una curva dosis-inhibición para zinc. La Figura 37 muestra el porcentaje de inhibición del zinc versus la concentración de zinc. Esta grafica muestra las 5 concentraciones empleadas (1 μM , 10 μM , 100 μM , 1 mM y 10 mM). Entre más aumenta la concentración de este ion, existe una mayor inhibición en el canal de protones, ya que, con la concentración de 10 mM , el porcentaje de inhibición es del 96 %, en la concentración de 1 mM el porcentaje de inhibición equivale a 89 %, con la concentración de 100 μM disminuye a un 65 % de inhibición, con la concentración de 10 μM el valor de inhibición se reduce a un 39 % y en la concentración de 1 μM el porcentaje de inhibición llega al 44 %.

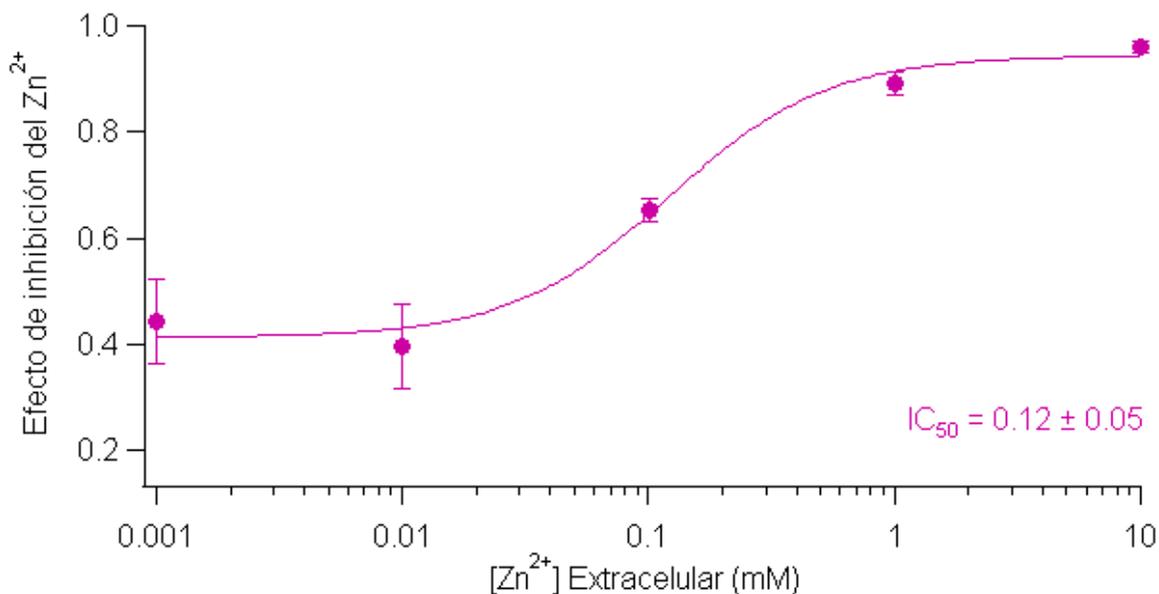


Figura 37. Efecto de la inhibición de zinc a diferentes concentraciones (1 μM , N = 5; 10 μM , N = 4; 100 μM , N = 4; 1 mM , N = 4; 10 mM , N = 5). $\text{IC}_{50} = 0.12 \pm 0.05$. Las barras representan el error estándar.

A partir de dichas concentraciones se ajustó la ecuación de Hill la cual arrojó el valor de la IC_{50} que corresponde a 0.12 ± 0.05 mM o 120 μM .

8. DISCUSIÓN

8.1 COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DEL CANAL AmH_v1 CON OTROS CANALES H_v1

En el presente trabajo logramos identificar y clonar la secuencia del canal H_v1 del coral *A. millepora*. Al comparar la secuencia de AmH_v1 clonada con la secuencia de canales H_v1 reportadas para otras especies de cnidarios encontramos lo siguiente:

Como se muestra en el siguiente alineamiento, existen muchas regiones conservadas entre las diferentes especies, principalmente en la región del S4. Los aminoácidos que están marcados en amarillo indican que al menos dos aminoácidos son diferentes en esa secuencia. Los aminoácidos que están marcados en color lila y con dos puntos representan la parte de la secuencia en donde dos aminoácidos difieren del alineamiento. Las secuencias que están marcadas en color cian y con un asterisco, representa la parte en donde no hubo ninguna variación en la secuencia y todos los aminoácidos son iguales. Por último, las argininas que están marcadas en rojo forman el dominio sensor de voltaje.

Alineamiento de las secuencias perteneciente al canal H_v1. (número de acceso) (*S. pistillata*), número de acceso (*P. damicornis*), número de acceso (*O. faveolata*), XM_029346499.1 (*A. millepora*), número de acceso (*A. tenebrosa*), número de acceso (*N. vectensis*)

```
S. pistillata      MLVGVTS MYEQDDQPLVDDDTSPDPNIDLTKMEQASNSIAVTENTVNL TENE DERPCND
P. damicornis    -----MYEPDDQRLVD TLS--DLNINLNKMDQASNNIAVTE SAVNL TENE DERPCND
O. faveolata     -----MEQATDSSAVTE STVNL TEDD SEGSNNG
A. millepora    -----MIDARTRRSSMDDQLPADELKEMGQPGTTAAVMAS TVCL TEDD TECPANK
A. tenebrosa    -----MDPDDQQLVGR LSFDELST-----DTAEME VGGAGDSNLE VVPSTPWWKDN
N. vectensis    -----MESDNQQLV GQLVFD TQSLGERAMDKEIEVEVGDGGGDAQVVSSTPCWHIL
```

. . .

```
S. pistillata    -HREQLCEILHSRKAQYVITLVVVDMIIVIAELLI DLKAVEVHHESHAPHILHYISIAI
P. damicornis   -HREQLCEILHSRRAQYVITLVVVDMIIVIAELLI DLKAVEVHHESHAPHILHYISIAI
O. faveolata    -HREQLCELLSHKAQYAI IALVVIDMIIVIAELLLDLRAIEVHHDNPAPHVLHYISIAI
```


diferencias funcionales en esta familia de proteínas puede estar determinada justamente por esta región.

Otras diferencias que pudimos encontrar entre el canal H_v1 de *A. millepora* y *H. sapiens* es que, en la secuencia H_v1 de *H. sapiens* se observa que tienen dos histidinas que interactúan con el zinc (Zn²⁺) y están en las posiciones His140 e His193. Como se muestra en los experimentos el ion divalente Zn²⁺ inhibe las corrientes del canal *A. millepora*, así mismo como se mencionó en la introducción, este ion se une a dos histidinas presentes en el canal de humano, sin embargo, en el caso de la secuencia del canal AmH_v1 no se puede saber con certeza cuales son las His que interactúan con el canal, para esto se podría realizar un estudio de mutagénesis. El canal de humano en la parte del asa que une el S3 con S4 se encuentra la His193 que permite la unión con zinc y en el canal de mH_v1 corresponde a His189, sin embargo, la secuencia del pez cebra (DrH_v1) no la presenta, por lo tanto, se piensa que esta His proporciona una gran sensibilidad al zinc, en cambio en el canal DrH_v1 hay una Asp que al parecer lo hace menos sensible al zinc (Ratanayotha *et al.*, 2017).

Finalmente podemos comentar que, si bien a nivel de aminoácidos las secuencias de los canales H_v1 reportadas para las diferentes especies son muy conservadas, a nivel de nucleótidos si presentan una gran diferencia entre ellas, de ahí la dificultad a la que nos enfrentamos al momento de diseñar los oligos para la clonación del canal de *A. millepora*.

8.2 MODELADO MOLECULAR DEL CANAL AmH_v1

Como ya se comentó en el apartado anterior, la secuencia a nivel de aminoácidos del nuevo canal AmH_v1 está muy conservada con respecto a otros canales H_v1 previamente reportados. Ahora bien, al obtener el modelo *in silico* de este nuevo canal se distinguen varias similitudes con la estructura del canal H_v1 quimérico previamente mencionado (ver Figura 25). De acuerdo con el modelo *in silico* del canal AmH_v1, éste presenta los cuatro segmentos transmembranales descritos para esta familia de proteínas y los grupos amino y carboxilos ubicados en la región intracelular. Estos datos apoyan aún más la idea de que la secuencia clonada efectivamente corresponde a un miembro de la familia de canales H_v1.

En un estudio hecho por Chamberlin *et al.* (2015) trabajaron con dos modelados moleculares de H_v1, uno correspondiente a ratón (mH_v1) y otro de *Ciona intestinalis* (CiH_v1), se observa que los segmentos S1, S3 y S4 se alinean uno sobre el otro de forma correcta, pero los segmentos S2 de ambas proteínas quedan poco empalmados, ellos mencionan que esto se debe a que utilizaron una proteína quimérica para la cristalización, el asa que une a S2 con S3 y una parte de estas mismas hélices se sustituyeron por el segmento VSP (fosfatasa sensible a voltaje). A pesar de que existen algunas diferencias a nivel de secuencia y probablemente a nivel de estructura entre el canal AmH_v1 y el H_v1 de otras especies, existen similitudes claramente notables como el hecho de que el canal de *A. millepora* es una proteína pequeña cuya estructura presenta cuatro segmentos transmembranales, así mismo, el S4 en las tres especies (mH_v1, CiH_v1, AmH_v1) es más largo que las demás hélices transmembranales; aunque el tamaño de los segmentos pueden presentar diferencias en el número de aminoácidos que los conforman dependiendo de la especie que se esté estudiando, dicha longitud no es significativamente distinta entre una especie y otra. Finalmente podemos mencionar que, las regiones amino y carboxilo terminales, así como las asas que unen los dominios transmembranales, son las que parecen presentar más diferencias entre las especies.

8.3 FAMILIAS DE CORRIENTE Y CURVAS I-V DEL CANAL AmH_v1 CON DIFERENTES ΔpHs

En este trabajo se presentaron varias familias de corrientes (ver Figuras 27 y 29) que corresponden a corrientes salientes de protones dependientes de voltaje y moduladas por ΔpH. La dependencia al voltaje y las características de las curvas I-V observada para el canal AmH_v1 corresponde con los descrito para otros canales H_v1. En el estudio de Szteyn *et al.* (2012), observaron que las corrientes de protones del canal *Mus musculus* mH_v1, presentan una alta selectividad a H⁺, responden al voltaje y una rectificación saliente muy notoria. Además, en este estudio también calcularon el potencial de reversión teórico para un ΔpH = 1 el cual fue de -58 mV contra el potencial de reversión experimental que fue de -38 mV, esta diferencia de potencial puede ocurrir debido a que demasiados protones se quedan en el lado exterior de la membrana plasmática, entonces, el medio se acidifica y el gradiente cambia, por lo tanto, el potencial de reversión es diferente al esperado, sin embargo, las corrientes tenían una gran selectividad de protones. Sin embargo, esto no sucede en las curvas I-V de AmH_v1. Más adelante se discutirá el potencial de reversión calculado con el experimental. Pudiera ser que estos valores del potencial de reversión son más cercanos debido a que el canal de *A. millepora* tiene una cinética más rápida, por lo tanto, la entrada y salida de protones puede ser compensada rápidamente.

Ahora bien, se hizo un estudio con espermatozoides humanos que presentan H_v1 de manera endógena expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*, ambos registros se realizaron en configuración inside-out, con ΔpH = 0, sin embargo, los valores fueron cambiando, comenzaron con pH 6 en la parte intracelular como en la extracelular, después 7 y por último 8. En las familias de corrientes se observa que el canal se activa a potenciales que van desde 0 con un pH más básico hasta potenciales de 30 mV con pH más ácido (Berger *et al.*, 2017). Esto coincide con los datos mostrados en la Figura 30. La activación del canal AmH_v1 se ve alterada por el cambio del ΔpH, por lo que se observa en las corrientes si se trabaja con ΔpHs negativos, en este caso se tienen pHs ácidos en el medio extracelular, la activación del canal

será a voltajes positivos, pero si se registra con ΔpH s positivos y el pH extracelular del medio es básico el canal se activa a voltajes negativos. Este tipo de comportamiento se ha visto en el canal H_v1 de humano, así como en otros canales H_v1 (Cherny *et al.*, 1995; Islas, 2018). Aunque en nuestros resultados no se usaron los mismos valores isométricos en las soluciones, se observa que, si se trabaja con soluciones más básicas en el lado extracelular, existe una tendencia a que el canal se abra a potenciales negativos.

En otro estudio donde analizaron corrientes de protones registradas en células de microglía de ratón en configuración whole-cell, el pH de las soluciones fue de: pH_i 5.5 y un pH_o 7.3, esto indica que tuvieron un $\Delta\text{pH} = 1.8$. En la gráfica de dicho estudio se puede apreciar que el canal se activa a -20 mV con un valor de corriente mayor a 800 pA. Estos resultados son comparables con los resultados presentados en la Figura 30, donde la apertura del canal con $\Delta\text{pH} = 2$ ocurre en -20 mV (Song y Yeh., 2012).

De acuerdo con lo descrito hasta este momento, el nuevo canal AmH_v1 es un canal activado por voltaje y modulado por el ΔpH , propiedades que comparte con los canales H_v1 reportados para otras especies.

8.3.1 CURVAS DE CONDUCTANCIAS (G-V) DEL CANAL AmH_v1 CON DIFERENTES ΔpH s

Para calcular la conductancia, Hodgkin y Huxley, en el año de 1952 (citado en DeCoursey, 2018), retomaron la Ley de Ohm, ellos proponen que varias cargas debiesen de estar trasladándose a través de la membrana, es decir: “Suponiendo que la corriente a través de un solo tipo de canal ha sido aislada, la conductancia es aproximadamente proporcional a la fracción de canales que se abren en cada voltaje” (DeCoursey, 2018).

Las curvas G-V tienen una relación con la probabilidad de apertura del canal respecto al voltaje. Además, Hodgkin y Huxley calcularon cuántas cargas deben de estar cruzando la

membrana por cada canal que está siendo aislado, y el resultado arrojó que son 6 cargas elementales (e_0) pero en otros estudios con una mejor estimación mencionaron que son de 12 a 14 e_0 en los canales de Ca^{2+} , Na^+ y K^+ (DeCoursey, 2018).

Como se muestra en la figura 31, las 5 curvas con los diferentes ΔpH s tienen voltaje dependencia, esto quiere decir que responden rápidamente al voltaje, cada curva presenta un promedio de la $V_{0.5}$. En $\Delta\text{pH} = 2$, la $V_{0.5} = -8.4 \text{ mV} \pm 2.5$, pero si el ΔpH es 1 la $V_{0.5} = -1.8 \pm 4.0$, este comportamiento no coincide con un modelo que menciona un cambio de 40 mV en la voltaje dependencia por cada unidad de cambio en el ΔpH (DeCoursey, 2018). Respecto a los valores de las cargas elementales, estos no coinciden con lo descrito por Hodgkin y Huxley, el valor que más se aproxima con lo reportado es $e_0 = 3 \pm 0.6$ con ΔpH de 0, donde el valor del pH externo e interno es de 7. Esta diferencia de valores de las cargas elementales puede deberse al tipo del canal con el que se esté trabajando. Las cargas elementales (e_0) equivalen a la carga eléctrica transportada por un electrón o protón (Feltin y Piquemal, 2009). En los experimentos que realizaron Hodgkin y Huxley en el axón gigante del calamar, describieron corrientes de potasio y de sodio (Vandenberg y Waxman); en los canales de potasio se presentan alrededor de ocho aminoácidos que intervienen en la sensibilidad del voltaje, entre ellos están las argininas y las lisinas que tienen carga positiva (Kuang *et al.*, 2015), por lo tanto, entre más aminoácidos positivos intervengan en el movimiento de carga mayor será el valor de la carga eléctrica transportada por las cargas elementales.

Es importante mencionar que, en varias especies que expresan el canal H_v1 no siguen la regla de 40 mV por unidad de cambio de ΔpH , algunas de estas especies son: *H. pomatia*, *L. stagnalis* con un valor de 63 mV en pH externo 7.5 y 46 mV en pH externo 7.4. En cocolitóforos existe un valor alrededor de 50 mV por unidad y en el canal de *Nicoletia phytophila* (NpH_v1) existe un valor de 54 mV. Los canales de otros caracoles como el de *Helisoma trivolvis* (HtH_v1) se obtuvo un valor de 15.3 mV por unidad de cambio de ΔpH . (Cherny *et al.*, 2015; Doroshenko *et al.*, 1986 en Thomas *et al.*, 2018). El canal AmH_v1 igualmente no sigue esta tendencia, esta proteína no tiene un voltaje establecido que cambie

por unidad de ΔpH , porque a valores con ΔpH s positivos cambia alrededor de 7 mV; con valores de ΔpH s negativos sólo cambia 3 mV, excepto en ΔpH 0 donde el voltaje respecto a los demás se modifica 34 mV en comparación con ΔpH s positivos y alrededor de 125 mV respecto a ΔpH s negativos.

En otros canales de protones como el de humano hH_v1 , *Karlodinium veneficum* (kh_v1) y *Emiliana Huxley* (EhH_v1), la saturación sucede cuando el pH interno o externo es 8 y este mismo fenómeno pasó en el HtH_v1 , la pendiente disminuye cuando el pH externo está por arriba de 7 (Byerly *et al.*, 1984; Cherny *et al.*, 2015; en Thomas *et al.*, 2018). La saturación en el canal AmH_v1 (ver Figura 31) se da cuando el pH externo es de 7 o 7.5 con $\Delta\text{pH} = 2, 1$ y 0, sin embargo, en los $\Delta\text{pH} = -2$ y -1 no se observa una saturación y parece que la curva sigue subiendo, en especial en $\Delta\text{pH} = -1$ donde el pH externo tiene un valor de 7, también esta falta de saturación se puede deber a que el canal se abre a voltajes mucho más positivos, pero en los protocolos con ΔpH s negativos el canal es sometido a menor cantidad de pulsos porque el sello no es estable a voltajes muy positivos

Los canales H_v1 presentan voltaje dependencia y como se observa en las gráficas G-V, el canal AmH_v1 no es la excepción, existen varias explicaciones para que se dé una voltaje dependencia, una de ellas es descrita por Kullerperuma *et al.* (2013). En este trabajo se menciona que los canales iónicos activados por voltaje, por ejemplo, Na^+ o K^+ , existe una serie de Arg que están posicionadas en el S4 del canal, éstas se desplazan de una región muy estrecha que está localizada en el canal y que tiene forma de reloj de arena, cuando ocurre la apertura del canal, el segmento S4 (donde se encuentran las Arg) se mueve del centro hacia el exterior de la célula, por lo tanto, probablemente esto pasa también en el canal AmH_v1 dado que expresa también en el S4 tres argininas que sugerimos están participando en la respuesta al voltaje. Otra explicación llamada “pozo de protones” descrita por Michell, se refiere a la unión o desunión de los protones a los grupos titulables; y otra respuesta para la voltaje dependencia es que en el campo eléctrico de la membrana se pueden mover las cargas cuando ocurre un cambio conformacional (DeCoursey, 2018).

Por otra parte, en un estudio realizado por Mony y colaboradores en el año 2015, encontraron que la detección del pH no es sólo por la protonación o desprotonación de grupos titulables. Ellos removieron 68 aminoácidos que representan el N-amino de H_v1 (H_v1Sper), y observaron una disminución en la detección del pH, además mencionan que el N-amino puede participar de forma independiente con el VSD, por lo tanto, el S1 también tiene movimientos conformacionales cuando el canal se encuentra en el estado abierto.

En otro trabajo publicado por Berger *et al.* (2017) apoya también esta idea, parte del S1 está implicado en la activación, debido a que se da una fosforilación en el aminoácido T29 por la proteína quinasa C. Esta fosforilación es capaz de cambiar el valor de la V_{0.5} a potenciales negativos repercutiendo en la conductancia y en la cinética de activación, en otros canales iónicos activados por voltaje, cuando su VSD se une a una fosfatasa enzimática, el N-amino terminal tiene diferentes cambios conformacionales, esto ha sido estudiado a través de la transferencia de energía de resonancia Förster, también conocido como FRET (Förster resonance energy transfer). Por lo tanto, la activación y detección de pH no sólo depende del movimiento del S4, sino también de otros segmentos del canal.

En resumen, tanto la activación del canal y el sensor del pH no sólo se le puede atribuir al S4, sino que hay varios segmentos que están interviniendo, incluso varios aminoácidos que estén localizados en el S2 o S3 podrían estar participando.

8.3.2 CINÉTICA DE ACTIVACIÓN (τ) DEL CANAL AmH_v1 CON DISTINTOS Δ pHs

La cinética de activación de AmH_v1 (ver Figura 32) es rápida y este comportamiento concuerda con varios canales de Na⁺ y K⁺ activados por voltaje ya que tienen una cinética de activación rápida, por ejemplo, los canales de Na⁺ se abren en un milisegundo para que se dé un potencial de acción en las células musculares, los canales de K⁺ en las mismas células su

cinética es un poco más lenta y repolarizan la membrana. En varios mamíferos la cinética del canal H_v1 es sumamente lenta comparada con los demás canales que se activan por voltaje (DeCoursey, 2018), por ejemplo, en el estudio de Sztyn (2012) los canales que pertenecen a las células dendríticas de ratón tienen una cinética de activación lenta, sin embargo, los canales H_v1 que fueron identificados en el caracol, la cinética de la proteína es igual de rápida que otros canales, haciendo una comparación H_v1 en mamíferos es 103 veces más lento, pero existe evidencia que el canal cuando es un monómero es de 5 a 7 veces más rápido (DeCoursey, 2018).

Como se describió en la sección de resultados, la cinética de activación de AmH_v1 presenta un valor mínimo de 0.17 s a 0.002 s con ΔpH 2 y en ΔpH -2 se presenta un valor de 0.32 s a 0.12 s, comparando esto datos con el estudio de Cherny *et al* (2015) en donde midieron la cinética de activación en el canal de humano en células HEK293 y COS-7, en la Figura 5 de su trabajo, el resultado de la cinética de activación es alrededor de 5 s con un valor mínimo alrededor de 1.2 s. El canal hH_v1 tiene un orden de magnitud superior al canal AmH_v1, por consiguiente, éste último tiene una cinética notablemente más rápida.

El canal AmH_v1 responde de manera rápida al voltaje al igual que el canal HtH_v1, donde se observó que la cinética de activación se vuelve rápida cuando el pH externo es más bajo, asimismo en el canal de insecto NpH_v1 su cinética de activación tiene un comportamiento muy parecido al del caracol, pero en el canal de humano fue diferente, su cinética de activación fue más rápida si se somete a pH interno más bajo, pero si el pH interno sube ocurre una desactivación. Debido a que existen varias diferencias en la cinética de activación, hasta el momento no se ha podido proponer un modelo ideal que describa la dependencia del voltaje, ni la respuesta al pH (Chaves *et al.*, 2016; Villalba, 2014; en Thomas *et al.*, 2018).

8.4 POTENCIAL DE REVERSIÓN (E_{REV}) Y SELECTIVIDAD DE PROTONES DEL CANAL AmH_v1

En las colas de corriente (ver Figura 33) se observa cómo cambia la corriente de entrante a saliente, respecto al ΔpH , como se describió en la sección de resultados, en el panel D con ΔpH de -1, se observa que el E_{rev} es cercano a 59 mV, porque inmediatamente después de que se sobrepasa el voltaje a 60 mV la corriente es saliente y en el voltaje anterior que es de 50 mV la corriente es entrante, así mismo, esto sucede en el panel C con $\Delta pH = 0$, donde la corriente a -10 mV es entrante y cuando cambia el voltaje a 10 mV la corriente es saliente. Lo anterior coincide con el trabajo de Rodríguez y colaboradores (2017), midieron las corrientes de colas del dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum* (LpH_v1), donde realizaron parches inside-out donde muestran dos familias de colas de corriente registradas en configuración inside-out, En la primera familia que tiene un $\Delta pH = -1$, se presentan los valores de pH extracelular de 7 y pH intracelular de 8, el protocolo que emplearon consistió en pulsos de 20 a 60 mV en incrementos de 10 en 10 mV, donde el potencial de reversión es 59.2 mV, en las colas se puede observar que en el pulso de 50 mV la corriente está llegando a un equilibrio, es decir, que la corriente entrante y saliente es prácticamente cero. Por lo anterior, 50 mV es justamente E_{rev} experimental, el cual se aproxima al E_{rev} calculado con la ecuación de Nernst. En la segunda familia se presenta un $\Delta pH = 0$, con valores de 7 tanto pH intracelular como extracelular, el protocolo que aplicaron iba de -20 a 10 mV con incrementos de 10 en 10 mV, aquí el potencial de reversión es de 0 mV, en las colas nuevamente se puede observar que no hay corriente entrante ni saliente a ese potencial, por lo cual el potencial de reversión en esta familia de colas es de 0 mV, esto coincide una vez más con el E_{rev} de Nernst. Lo cual indica que trabajaron con el pH adecuado.

En el trabajo de Ratanayotha *et al*, se registró el canal de DrH_v1 en configuración whole-cell, aunque aquí no se muestran las corrientes de colas como tal, realizaron una gráfica con los valores normalizados de las colas de corrientes versus el potencial de membrana. El protocolo consistió en pulsos de voltaje a 60 mV por 200 ms para despolarizarla membrana, posteriormente los pulsos aplicados a la membrana se dieron con

el fin de repolarizarla de -80 mV a 100 mV con una duración de 200 ms. Trabajaron con los siguientes valores en pH externo: 7.5, 7.0, 6.5, 6.0; con pH interno de 7, por lo tanto, en $\Delta\text{pH} = 0.5$, se observa que la corriente de colas normalizada cruza el eje del potencial de membrana cercano al valor de -29.58 mV; en $\Delta\text{pH} = 0$, se aprecia que la corriente de colas normalizadas intercepta el eje del potencial de membrana cerca del valor de 0 mV; en el $\Delta\text{pH} = -0.5$ donde la corriente de colas atraviesa el eje del potencial de membrana cerca del valor de 29.58 mV; finalmente en $\Delta\text{pH} = -1$, la corriente de colas intercepta el eje del potencial de membrana en 59.16 mV. Estos resultados nos indican que se estaba manejando el pH adecuado, ya que aquí la corriente está en equilibrio y no hay corriente entrante o saliente.

De acuerdo con el potencial de reversión calculado y el potencial de reversión experimental que se muestran en la Tabla 5, se puede confirmar que el nuevo canal AmH_v1, efectivamente es un canal selectivo a protones, ya que estos valores son muy cercanos entre sí, esto también está plasmado en la Figura 34, ya que los puntos experimentales coinciden con la línea punteada que representa el E_{rev} calculado. Los datos de E_{rev} experimental coinciden con otros reportes para el canal de protones. Por ejemplo, en el mismo artículo de Rodriguez *et al.* (2017), el potencial de reversión fue de 55 mV con $\Delta\text{pH} = -1$ y -2 mV con $\Delta\text{pH} = 0$, ambos valores son muy cercanos a los cálculos predichos por la ecuación de Nernst (antes mencionados), los cuales se ajustan para protones.

En otro estudio donde se midió el potencial de reversión del canal de protones del erizo *Strongylocentrotus purpuratus* (SpH_v1), donde realizaron parches whole-cell con ΔpH de 1, 0.5, 0, -0.5 y -1, donde los valores del potencial de reversión se encontraban entre los siguientes rangos -50 mV a -38 mV, -33 mV a -20 mV, -2 mV a -10 mV, 21 mV a 32 mV, 55 mV a 48 mV, respectivamente para cada ΔpH (Sakata. *et al.*, 2016). Estos datos también confirman que el canal SpH_v1 es selectivo a protones porque los valores del potencial de reversión rondan el valor calculado con la ecuación de Nernst.

Por último, en el canal DrH_v1 igualmente se obtuvieron los valores para el E_{rev}, prácticamente se probaron los mismos ΔpHs de -1, -0.5, 0, 0.5 y los rangos de los potenciales de reversión eran los siguientes: 53 mV a 63 mV, 30 mV a 40 mV, -5 a 18 mV y -19 mV a -30 mV correspondientes a cada ΔpH. Los valores expuestos nuevamente son cercanos a los calculados con la ecuación de Nernst, esto indica que H_v1 es un canal de H⁺ (Ratanayotha, *et al.*, 2017) ya que no se presentan grandes variaciones entre los valores de los potenciales de reversión, el canal mantiene su selectividad, aunque se trate de diferentes especies. Por lo tanto, se refuerza la idea de que el canal de *A. millepora* (AmH_v1) es un canal selectivo a protones.

8.5 EFECTO DEL ZINC SOBRE LAS FAMILIAS DE CORRIENTE Y CURVAS I-V DEL CANAL AmH_v1

Como se describió en la introducción, el canal H_v1 puede ser bloqueado por Zn²⁺. Existen varias evidencias de esta inhibición, por ejemplo, en el estudio de Ratanayota, *et al.* (2017), realizan experimentos con el canal de DrH_v1 (*Danio rerio*) y prueban tres concentraciones 10 μM, 100 μM y 1 mM, cada una de ellas inhibe de manera diferente, la primera inhibe ~25 % de la corriente, la segunda ~50 % y la tercera el 100 %. Estos resultados concuerdan con los datos mostrados en las figuras 35 y 36. Cuando el sello fue expuesto a una concentración de 10 μM, un 40 % de la corriente se inhibió y con 1 mM, la corriente es suprimida de manera total. Algunos investigadores han propuesto que, la IC₅₀ es cercana a 100 μM. El canal de protones de *A. millepora* tiene una IC₅₀ = 0.12 mM o su equivalente a 120 μM y una inhibición casi en su totalidad cuando la proteína se expone a una concentración de 1 mM de Zn²⁺.

En la curva dosis respuesta de la inhibición por zinc en el canal de protones de *A. millepora* (ver Figura 37), se observa que conforme aumenta el valor de la concentración de zinc la inhibición es aún mayor.

Sin embargo, en el canal de humano la IC_{50} es igual a $3.8 \mu\text{M}$ (De la Rosa *et al.*, 2018), esto difiere del canal de *Acropora*, por lo tanto, se requiere una concentración mucho mayor, alrededor de 32 veces más para que un 50 % de los canales estén inhibidos. En un estudio mencionan que el canal puede ser bloqueado desde una concentración de $1.9 \mu\text{M}$ (Ramsey *et al.*, 2006 citado en Iovannisci *et al.*, 2010), y en el artículo escrito por Iovannisci *et al.* (2010) lograron ver un bloqueo de las corrientes de protones usando $10 \mu\text{M}$ de ZnCl_2 en registros de whole-cell.

En el estudio de *Helisoma trivolvis* publicado por Thomas *et al.* (2009) donde observó que HtH_v1 fue inhibido de manera sutil por Zn^{2+} , en comparación con mamíferos y no sólo este canal es menos sensible al Zn^{2+} , se ha visto que otros canales de invertebrados como: SpH_v1 , NpH_v1 CiH_v1 la inhibición por Zn^{2+} es menor.

Así mismo, el canal de DrH_v1 es menos sensible al zinc comparado con otros mamíferos como el ratón mH_v1 , donde en un estudio probaron una sola concentración de Zn^{2+} a $50 \mu\text{M}$ y el canal fue inhibido casi en su totalidad (Szteyn *et al.*, 2012). Por lo tanto, se sugiere que la alta sensibilidad al zinc sólo está en una subpoblación de vertebrados donde están los mamíferos, ya que el zinc se requiere para el correcto funcionamiento de los espermatozoides humanos y los macrófagos en mamíferos, por lo cual esto sucede para compensar los bajos niveles de Zn^{2+} en la sangre (Ratanoyota *et al.*, 2017).

Finalmente, es importante mencionar que todos los resultados del presente trabajo formaron parte de un artículo de investigación, el cual ya ha sido publicado recientemente y del cual soy coautora (Rangel-Yescas *et al.*, 2021).

9. CONCLUSIONES

El coral *Acropora millepora* expresa canales H_v1 , el cual muestra una secuencia a nivel de aminoácidos muy conservada con respecto a otros canales H_v1 previamente reportados.

De acuerdo con el modelo *in silico* obtenido para dicha secuencia, el canal Am H_v1 está conformado por cuatro pasos transmembranales y un grupo amino y carboxilo terminales intracelulares.

El canal de protones de *Acropora millepora* presenta dependencia al voltaje, es selectivo a protones, modulado por el ΔpH , muestra una cinética de activación rápida y es inhibido por zinc.

10. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados y discusión de este trabajo, sería interesante conocer exactamente en qué tipo de células del coral se localiza Am H_v1 , a través del procedimiento de inmunohistoquímica y conocer cuál es su importancia en el proceso de calcificación.

Además, sería importante realizar mutagénesis sobre las histidinas que presenta la secuencia del canal H_v1 de *Acropora millepora*, para averiguar si es fundamental que el canal sea bloqueado por el zinc debido a la unión con dichos aminoácidos. Así mismo, la mutagénesis se podría llevar a cabo en el S3, S4 y en las tres argininas que se localizan en el VDS para conocer más a detalle cómo se da la detección de voltaje, si realmente son

imprescindibles estos aminoácidos y a su vez conocer que otros aminoácidos están interviniendo en el paso de protones.

Finalmente, sería de gran relevancia saber cómo afecta la acidificación del agua de mar en la calcificación del coral y como puede repercutir dicho fenómeno en la función de los canales H_v1.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. (2002). *Ion Channels and the Electrical Properties of Membranes* en *Molecular Biology of the Cell*. United States. Garland Science, pp: 668, 671.

Allemand, D., Tambutté, E., Zoccola, D., y Tambutté, S., (2011). *Coral Calcification, Cells to Reefs* en *Coral Reefs: An Ecosystem in Transition, Coral Biology: Part III Symbiosis, Photosynthesis and Calcification*. United States of America, Springer. pp: 120-122, 126-127.

Australian Institute of Marine Science (AIMS). (2013). *Corals of the World, ficha de A. millepora*. URL: <http://coral.aims.gov.au/factsheet.jsp?speciesCode=0047>.

Berger, TK., Fußhöller, DM., Goodwin, N., Bönigk, W., Müller, A., Dokani Khesroshahi, N., Brenker, C., Wachten, D., Krause, E., Kaupp, UB, y Strünker T. (2017). Post-translational cleavage of H_v1 in human sperm tunes pH- and voltage-dependent gating. *J Physiol*, 595(5),1533-1546. DOI: [10.1113/JP273189](https://doi.org/10.1113/JP273189)

Byerly, L., Meech, R, y Moody, W Jr. (1984). Rapidly activating hydrogen ion currents in perfused neurones of the snail, *Lymnaea stagnalis*. *J. Physiol*, 351, 199–216. DOI: [10.1113/jphysiol.1984.sp015241](https://doi.org/10.1113/jphysiol.1984.sp015241).

Boonamnaj, P., y Sompornpisut, P., (2018). Insight into the Role of the Hv1 C-terminal Domain in Dimer Stabilization. *The Journal of Physical Chemistry*, 122(3), 1037-1048. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b08669>

Brownlee, C., Wheeler, G., y Taylor, A R. (2015). Coccolitophore biomineralization: New questions, new answers. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 46, 11-16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.027>

Capasso, M., (2014). Regulation of immune responses by proton channels. *The journal of cells, molecules, systems and technologies*, 143(2),131-137. DOI: [10.1111/imm.12326](https://doi.org/10.1111/imm.12326)

Castillo, K., Pupo, A., Baez-Nieto, D., Contreras, GF., Morera, FJ., Neely, A., Latorre, R., y Gonzalez C. (2015). Voltage-gated proton (Hv1) channels, a singular voltage sensing domain. *Federation of European Biochemical Societies*, 589(22), 3471-3478. DOI: [10.1016/j.febslet.2015.08.003](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.003).

Chae, MR., Kang, SJ., Lee, KP., Choi, BR., Kim, HK., Park, JK., Kim, CY., y Lee, SW. (2017). Onion (*Allium cepa* L.) peel extract (OPE) regulates human sperm motility via protein kinase C-mediated activation of the human voltage-gated proton channel. *American Society of Andrology*, 5(5), 979-989. DOI: [10.1111/andr.12406](https://doi.org/10.1111/andr.12406)

Chaves, G., Derst, C., Franzen, A., Mashimo, Y., Machida, R., y Musset, B. (2016). Identification of an HV 1 voltage-gated proton channel in insects. *FEBS J*, 283(8), 1453-1464. DOI: [10.1111/febs.13680](https://doi.org/10.1111/febs.13680)

Cherny, VV., Morgan, D., Musset, B., Chaves, G., Smith, SM., y DeCoursey, T E. (2015). Tryptophan 207 is crucial to the unique properties of the human voltage-gated proton channel, hHv1. *The Journal of General Physiology*, 146(5), 343-356. DOI: <https://doi.org/10.1085/jgp.201511456>

Chamberlin, A., Qiu, F., Wang, Y., Noskov, SY., y Larsson, HP. (2015). Mapping the gating and permeation pathways in the voltage-gated proton channel hv1. *J. Mol. Biol*, 427(1), 131–45. DOI: [10.1016/j.jmb.2014.11.018](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.11.018)

Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987). *Anal. Biochem*, 162(1), 156-159. DOI: [10.1006/abio.1987.9999](https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999)

Clark, RA., (2016). Proton pathway paradox: Hv1 H⁺ channel sustains neutrophil Nox2 activity yet suppresses HOCl formation. *Journal of Leukocyte Biology*, 99(1), 1-4. DOI: [10.1189/jlb.4CE0515-188RR](https://doi.org/10.1189/jlb.4CE0515-188RR)

Cooper, G., (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Structure of the Plasma Membrane: Sinauer Associates. United States of America. pp: 71 y 75. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9839/>.

DeCoursey, T., (2018). Voltage and pH sensing by the voltage-gated proton channel, Hv1. *J. R. Soc. Interface*, 15(141), 1-15. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0108>

DeCoursey, T., (2013). Voltage-gated proton channels: molecular biology, physiology, and pathophysiology of the H_v family. *Physiol Rev*, 93(2), 599-652. DOI: [10.1152/physrev.00011.2012](https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2012)

DeCoursey, T., (2012). Voltage-gated Proton Channels. *Compr Physiol*, 2(2), 1355-1385. DOI: [10.1002/cphy.c100071](https://doi.org/10.1002/cphy.c100071)

DeCoursey, TE., Morgan, D., Musset, B., y Cherny, VV. (2016). Insights into the structure and function of Hv1 from a meta-analysis of mutation studies. *J. Gen. Physiol*, 148(2), 97-118. DOI: [10.1085/jgp.201611619](https://doi.org/10.1085/jgp.201611619)

De La Rosa, V., Bennett, AL., y Ramsey, IS. (2018). Coupling between an electrostatic network and the Zn²⁺ binding site modulates Hv1 activation. *J. Gen. Physiol*, 150(6), 863-881. DOI: <https://doi.org/10.1085/jgp.201711822>

Doroshenko, P., P G Kostyuk, PG., y Martynyul, AE. (1986). Transmembrane outward hydrogen current in intracellularly perfused neurones of the snail *Helix pomatia*. *Gen. Physiol. Biophys*, 5(4), 337-350.

Fais, S., De Milito, A., You, H., y Qin., W. (2007). Targeting vacuolar H⁺-ATPases as a new strategy against cancer. *Cancer Res*, 67(22), 10627–10630. DOI: [10.1158/0008-5472](https://doi.org/10.1158/0008-5472)

Fais, S. (2010). Proton pump inhibitor-induced tumor cell death by inhibition of a detoxification mechanism. *J. Intern. Med*, 267(5), 515–525. DOI: [10.1111/j.1365-2796.2010.02225.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2010.02225.x).

Feltn, N. y Piquemal, F. (2009). Determination of the Elementary charge and the quantum metrological triangle experiment. *The European Physical Journal Special Topics*, 172, 267-296. DOI: <https://doi.org/10.1140/epjst/e2009-01054-2>

Florman, HM., Jungnickel, MK., y Sutton KA. (2010). Shedding Light on Sperm pHertility. *Cell*, 140(3), 310-312. DOI: [10.1016/j.cell.2010.01.035](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.035)

Furuhashi, T., Schwarzingler, C., Miksik, I., Smrz, M., y Beran, A. (2009). Molluscan shell evolution with review of shell calcification hypothesis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 154, 351-371. DOI: [10.1016/j.cbpb.2009.07.011](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.07.011)

Gianti, E., Delemotte, L., Klein, ML., y Carnevale, V. (2016). On the role of water density fluctuations in the inhibition of a proton channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(52), E8359–E8368. DOI: [10.1073/pnas.1609964114](https://doi.org/10.1073/pnas.1609964114)

Gordon, J., Desaix, P., Johnson, E., Oksana, K., Kruse, D., Poe, B., Wise, JA., Womble, M., y Young, KA. (2017). Unit. 12 *The Action Potential* en Anatomy and Physiology. United States of America. Openstax, pp: 523, 527-528.

Gordon, M., (2003). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press. URL: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/phospholipids>.

Hille, B., (2001). *Ionic channels of excitable membranes*: Sinauer Associates. United States of America. pp 1-3.

Hong, L., Kim, IH., y Tombola, F. (2014). Molecular determinants of Hv1 proton channel inhibition by guanidine derivatives. *PNAS*, *111*(27), 9971-9976. DOI: [10.1073/pnas.1324012111](https://doi.org/10.1073/pnas.1324012111)

Horta, G., y Carricart J., (1993). *Corales pétreos recientes (Milleporina, Stylasterina y Scleractinia)* de México en Biodiversidad Marina y Costera de México. México CONABIO/CIQRO. pp: 66.

Iovannisci, D., Illek, B., y Fischer, H. (2010). Function of the HVCN1 proton channel in airway epithelia and a naturally occurring mutation, M91T. *The Journal of General Physiology*, *136*(1), 35-46. DOI: [10.1085/jgp.200910379](https://doi.org/10.1085/jgp.200910379)

Jardin, C., Chaves, G., y Musset, B. (2020). Assessing structural determinants of Zn²⁺ binding to human Hv1 via multiple MD simulations. *Biophysical Journal*, *118*(5), 1221-1233. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.12.035>

Islas, L. (2018). The acid test for pH-dependent gating in cloned H_v1 channels. *The Journal of General Physiology*, *150*(6), 781-782. DOI: <https://doi.org/10.1085/jgp.201812076>

Khatter, H., Myasnikov, AG., Natchiar, SK., y Klaholz, BP. (2015). Structure of the human 80S ribosome. *Nature*, *20*(7549), 640-645. DOI: [10.1038/nature14427](https://doi.org/10.1038/nature14427)

Kuang, Q., Purhonen, P., y Hebert, H. (2015). Structure of potassium channels. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(19), 3677-3693. DOI: [10.1007/s00018-015-1948-5](https://doi.org/10.1007/s00018-015-1948-5)

Kulleperuma, K., Smith, SM., Morgan, D., Musset, B., Holyoake, J., Chakrabarti, N., Cherny, VV., DeCoursey, TE., y Pomès R. (2013). Construction and validation of a homology model of the human voltage-gated proton channel hH_v1. *The Journal of General Physiology*, *141*(4), 445-465. DOI: [10.1085/jgp.201210856](https://doi.org/10.1085/jgp.201210856)

Leuchtag, R., (2008). *Voltage-Sensitive Ion Channels. Biophysics of Molecular Excitability*, Springer. United States of American pp:5-7.

Li, SJ., Zhao, Q., Zhou, Q., y Zhai, Y. (2009). Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic study of the carboxyl-terminal domain of the human voltaje-

gated proton channel Hv1. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 65(3), 279-81. DOI: [10.1107/S1744309109003777](https://doi.org/10.1107/S1744309109003777)

Lishko, P. V., Kirichok, Y., Ren, D., Navarro, B., Chung, J. J., y Clapham, D. E. (2012). The Control of Male Fertility by Spermatozoan Ion Channels. *Annual Review of Physiology*, 74, 453-475. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020911-153258>

Mackinder, L., Wheeler, G., Schroeder, D., Riebesell, U., y Brownlee, C. (2015). Molecular Mechanisms Underlying Calcification in Coccolithophores. *Geomicrobiology Journal*, 27(6-7), 585-595. DOI: [10.1080/01490451003703014](https://doi.org/10.1080/01490451003703014)

Margulies, E. (n.d). *Promoter*. National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Promoter>.

McNeil, B., Matear, R.J., y Barnes DJ. (2004). Coral reef calcification and climate change: The effect of ocean warming. *Geophysical Research Letters*. 31(22), 1-2. DOI: <https://doi.org/10.1029/2004GL021541>

Mmessage mMachine (n.d). *High Yield Capped RNA Transcription Kit.Manual version 0504*.

Fleig, A., Penner, R., y Ruckle, J. (2014-2021). Ion Channel Therapeutics. <https://www.cytherapharm.com/leadership.html>. Consulta: 5 de septiembre de 2020.

Molleman, A., (2003). *Basic Theoretical Principles* en Patch clamping An introductory Guide to Patch Clamping Electrophysiology, John Wiley & Sons, LTD pp: 17- 29-33, 35-37.

Mony, L., Berger, TK., y Isacoff, EY., (2015). A specialized molecular motion opens the Hv1 voltage-gated proton channel. *Nat Struct Mol Biol*, 22(4), 283-290. DOI: [10.1038/nsmb.2978](https://doi.org/10.1038/nsmb.2978)

Morera, FJ., Saravia, J., Pontigo, JP., Vargas-Chacoff, L., Contreras, GF., Pupo, A., Lorenzo, Y., Castillo, K., Tilegenova, C., Cuello, LG., y Gonzalez, C. (2015). Voltage-dependent BK and Hv1 channels expressed in non-excitable tissues: New therapeutics opportunities as

targets in human diseases. *Pharmacological Research*, 101, 56-64. DOI: [10.1016/j.phrs.2015.08.011](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.08.011)

Moya, A., Huisman, L., Ball, EE., Hayward, DC., Grasso, LC., Chua, CM., Woo, HN., Gattuso, JP., Forêt, S., y Miller, DJ. (2012). Whole Transcriptome Analysis of the Coral *Acropora millepora* Reveals Complex Responses to CO₂-driven Acidification during the Initiation of Calcification. *Molecular Ecology*, 21(10), 2440-2454. DOI: [10.1111/j.1365-294X.2012.05554.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05554.x).

Musset, B., Capasso, M., Cherny, VV., Morgan, D., Bhamrah, M., Dyer, MJ., y DeCoursey, TE. (2009). Identification of Thr²⁹ as a Critical Phosphorylation Site That Activates the Human Proton Channel Hvcn1 in Leukocytes. *The journal of biological chemistry*, 285(8), 5117-512. DOI: [10.1074/jbc.C109.082727](https://doi.org/10.1074/jbc.C109.082727)

Musset, B., Smith, S M E., Rajan, S., Morgan, D., Cherny, V V y DeCoursey T E. (2012). Aspartate¹¹² is the Selectivity Filter of the Human Voltage Gated Proton Channel. *Nature*, 480, (7376), 273-277. DOI: [10.1038/nature10557](https://doi.org/10.1038/nature10557)

Okamura, Y., Fujiwara, Y., y Sakata, S. (2015). Gating Mechanisms of Voltage-Gated Proton Channels. *Annual Review of Biochemisery*, 84, 685-709. DOI: [10.1146/annurev-biochem-060614-034307](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034307)

Ramsey, S., Ramsey, IS., Moran, MM., Chong, AJ., y Clapham, DE. (2006). A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain. *Nature*, 440, 1213–1216. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature04700>

Rangel-Yescas, G., Cervantes, C., Cervantes-Rocha MA., Suárez-Delgado, E., Banaszak, AT., Maldonado, E., Ramsey, IS., Rosenbaum, T., Islas, LD. (2021). Discovery and characterization of Hv1-type proton channels in reef-building corals. *ELife*, 10, e69248. DOI: [10.7554/eLife.69248](https://doi.org/10.7554/eLife.69248)

Ratanayotha, A., Kawai, T., Higashijima, SI., Okamura, Y. (2017). Molecular and functional characterization of the voltage-gated proton channel in zebrafish neutrophils. *Physiol Rep*, 15, e13345. DOI: [10.14814/phy2.13345](https://doi.org/10.14814/phy2.13345)

Ren, D. (2010). Sperm and the Proton Channel. *The New England Journal of Medicine*, 362(20), 1934-1935. DOI: [10.1056/NEJMcibr1001843](https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1001843)

Rodriguez, JD., Haq, S., Bachvaroff, T., Nowak, KF., Nowak, SJ., Morgan, D., Cherny, VV., Sapp, MM., Bernstein, S., Bolt, A., DeCoursey, TE., Place, AR., y Smith, SM. (2017). Identification of a vacuolar proton channel that triggers the bioluminescent flash in dinoflagellates. *PLOS ONE*, 12(2). 1-24. DOI: [10.1371/journal.pone.0171594](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171594)

Sakata, S., Miyawaki, N., McCormack, TJ., Arima, H., Kawanabe, A., Özkucur, N., Kurokawa, T., Jinno, Y., Fujiwara, Y., y Okamura, Y. (2016). Comparison between mouse and sea urchin orthologs of voltage-gated proton channel suggests role of S3 segment in activation gating. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858(12), 2972-2983. DOI: [10.1016/j.bbamem.2016.09.008](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.09.008)

Salceda, E., y Soto, E., (2015). *Métodos electrofisiológicos para el estudio de los efectos y mecanismos de acción de toxinas que actúan sobre canales iónicos en Estrategias y Avances en el estudio de Toxinas de Interés para la biomedicina*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. pp: 107-110.

Sánchez Moreno., Ana. (2018). Caracterización de la inactivación por temperatura del canal iónico TRPV1. [Tesis de licenciatura no publicada]. Universidad Nacional Autónoma de México.

Seredenina, T., Demarex, N., y Krause, KH. (2015). Voltage-Gated Proton Channels as Novel Drug Targets: From NADPH Oxidase Regulation to Sperm Biology. *Antioxidants & Redox signaling*, 23(5), 490-513. DOI: [10.1089/ars.2013.5806](https://doi.org/10.1089/ars.2013.5806)

Serrano-Rivero, Y., Hernández-García, A., y Fando-Calzada, R. (2012). Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en *Escherichia coli*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 44(2), 1-6.

Sevilgen, D., Venn, AA., Hu, MY., Tambutté, H., De Beer, D., Planas-Bielsa, V., y Tambutté, S. (2019). *Full in vivo characterization of carbonate chemistry at the site of calcification in corals*. *Science advances*, 5(1), 1-9. DOI: [10.1126/sciadv.aau7447](https://doi.org/10.1126/sciadv.aau7447)

Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., y Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18(6), 361-374. DOI: [10.1038/nrm.2017.16](https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16)

Smit, S., Widmann, J., y Knight, R. (2007). Evolutionary rate vary among rRNA structural elements. *Nucleic Acids Research*, 35(10), 3339–3354. DOI: [10.1093/nar/gkm101](https://doi.org/10.1093/nar/gkm101)

Smith, S., y DeCourey, T., (2014). Consequences of dimerization of the voltage gated proton channel. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 117, 335-360. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386931-9.00012-X>

Song, JH., y Yeh, JZ., (2012). Dextromethorphan inhibition of voltage-gated proton currents in BV2 microglial cells. *Neuroscience Letters*, 516(1), 94-98. DOI: [10.1016/j.neulet.2012.03.065](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.03.065)

Szteyn, K., Yang, W., Schmid, E., Lang, F., y Shumilina, E. (2012). Lipopolysaccharide-sensitive H⁺ current in dendritic cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 303(2), C204-C212. DOI: [10.1152/ajpcell.00059.2012](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00059.2012)

Taleinsnik, S., (2006). *Receptores celulares y la transducción de señales. Temas de biología celular*. Capítulo 10: canales iónicos. Argentina: Encuentro grupo editor. pp: 159-161.

Tao, X., Lee, A., Limapichat, W., Dougherty, DA., y MacKinnon, R. (2010). A gating change transfer center in voltaje sensors. *Science*, 328(59749), 67-73. DOI: [10.1126/science.1185954](https://doi.org/10.1126/science.1185954)

The University of Arizona. (2004). *The Chemistry of Amino Acids*. En línea: http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problema_sets/aa/aa.html.

Thomas, S., Lee, A., Limapichat, W., Dougherty, DA., y MacKinnon, R. (2018). Exotic properties of a voltage-gated proton channel from the snail *Helisoma trivolvis*. *The Journal General Physiology*, 328(5974), 67-73. DOI: [10.1126/science.1185954](https://doi.org/10.1126/science.1185954)

Tombola, F., Ulbrich, MH., y Isacoff, EY. (2008). The voltage-gated proton channel Hv1 has two pores, each controlled by one voltage sensor. *Neuron*, 58(4), 546–556. DOI: [10.1016/j.neuron.2008.03.026](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.03.026)

Tombola, F., Ulbrich, M. H., y Isacoff, E. Y. (2009). Architecture and gating of Hv1 proton channels. *The Journal of Physiology*, 587(22), 5325-5329. DOI: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.180265>

Tsuji, Y. y Yoshida, M. (2017). Biology of Haptophytes: Complicated Cellular Processes Driving the Global Carbon Cycle. *Advances in Botanical Research*, 84, 219-261.

Vandenberg, J., y Waxman, S. (2012). Hodgkin and Huxley and the basis for electrical signalling: a remarkable legacy still going strong. *The Journal of Physiology*, 590(11), 2569-2570. DOI: [10.1113/jphysiol.2012.233411](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.233411)

Villalba-Galea, CA. (2014). Hv1 proton channel opening is preceded by a voltage-independent transition. *Biophys. J*, 107(7), 1564–1572. DOI: [10.1016/j.bpj.2014.08.017](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.08.017)

Voet. D., Voet J., (2005). *Amino acids*. Biochemistry Biochemistry. <https://web.archive.org/web/20080118064634/http://opbs.okstate.edu/5753/Amino%20Acids.html>.

Wallace, C., (2011). *Acropora* en *Encyclopedia of Modern Coral Reefs Structure, Form and Process*. Springer. pp: 3.

Wang, Y., Li, SJ., Wu, X., Che, Y., y Li, Q. (2012). Clinicopathological and Biological Significance of Human Voltage-gated Proton Channel Hv1 Protein Overexpression in Breast Cancer. *The Journal of biological chemistry*, 287(17), 13877-13888. DOI: [10.1074/jbc.M112.345280](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.345280)

World Register of Marine Species (WORMS). (2018). *Acropora millepora* (Ehrenberg, 1834). En línea: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=207023>.

Wysotzki, P., y Gimsa, J. (2019). Surface Coatings Modulate the Differences in the Adhesion Forces of Eukaryotic and Prokaryotic Cells as Detected by Single Cell Force Microscopy. *International journal of biomaterials*, 2019, 1-12. DOI: [10.1155/2019/7024259](https://doi.org/10.1155/2019/7024259)

Yusupov, MM., Yusupova, GZ., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, TN., Cate, JH., y Noller, HF. (2001). Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution. *Science*, 292(5518), 883-896. DOI: [10.1126/science.1060089](https://doi.org/10.1126/science.1060089)