



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**"IDENTIFICACIÓN DE LOS CANALES DE POTASIO
SENSIBLES AL VOLTAJE
EN EL RIÑÓN DE RATA."**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

NOÉ SIDARTHA BAHENA MARTÍNEZ.

MÉXICO, D.F.



AGOSTO DEL 2004

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente Prof. José de Jesús García Valdés.
Vocal Prof. Francisco Ruiz Terán.
Secretario Prof. Leonila Irma Laura Escobar Pérez.
1er Suplente Prof. Oscar Armando Pérez Méndez
2º Suplente Prof. José Ignacio Páramo Ramírez.

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM.

ASESOR



Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez.

SUSTENTANTE



Noé Sidartha Bahena Martínez.

Este trabajo se desarrollo bajo la dirección de:

Dra. Laura Escobar Pérez.
Departamento de Fisiología.
Facultad de Medicina.
U.N.A.M.

El financiamiento para la realización de este trabajo fue proporcionado por:

DGAPA IN233802-2

CONACyT 41365-M

AGRADECIMIENTOS

A mi Madre, mi Padre y mis Hermanos por haberme apoyado siempre en todos los aspectos que pudieron, gracias a ustedes he podido concluir esta carrera. "Los quiero mucho"

Alejandra y Tania por confiar en mi y brindarme su apoyo incondicional en todo momento. Junto a ustedes he vivido gran parte de los momentos mas felices durante mi carrera, sepan que las guardare siempre en mi corazón.

A la Dra. Laura Escobar por darme la oportunidad de estar en su equipo, por compartir en todo momento sus grandes ideas y por que gracias a usted pude realizar este trabajo.

A Carolina Salvador por su apoyo técnico en todo momento.

A Carito, Ivoncita, Rolando, Natllely, Philipo, Liliana, Perla y Ana por hacer que el ambiente en el laboratorio sea muy ameno. Ustedes son los mejores compañeros de laboratorio que he tenido.

Al jurado asignado Dr. José de Jesús García V., Dr. Francisco Ruiz T., Dr. Oscar Armando Pérez M. y Dr. José Ignacio Páramo R. por revisar este trabajo y ayudarme a mejorarlo.

Y a todos aquellos Familiares, Amigos y Profesores que han dejado huella en mi formación de alguna manera los tendré siempre presentes.

ÍNDICE.

| | |
|--|----|
| 1. Resumen..... | 2 |
| 2. Introducción..... | 3 |
| 2.1 Estructura del riñón..... | 4 |
| 2.2 Función renal..... | 5 |
| 2.3 Proteínas de transporte..... | 6 |
| 2.4 Canales iónicos..... | 8 |
| 2.5 Canales de potasio..... | 10 |
| 2.6 Canales de potasio sensibles al voltaje (Kv)..... | 12 |
| 2.7 Distribución de los Kv's..... | 13 |
| 3. Antecedentes..... | 15 |
| 4. Objetivos..... | 16 |
| 5. Metodología..... | 17 |
| 6. Resultados y discusión..... | 18 |
| 6.1 Obtención de ARN con guanidina y cloruro de cesio..... | 18 |
| 6.2 Controles..... | 18 |
| 6.3 Subfamilia Kv1..... | 20 |
| 6.4 Subfamilias Kv2, Kv3, Kv4 y Kv7..... | 23 |
| 7. Conclusiones..... | 26 |
| 8. Perspectivas..... | 26 |
| 9. Bibliografía..... | 27 |
| 10. Apéndice..... | 31 |

1) Resumen.

Los canales de potasio sensibles al voltaje han sido extensamente estudiados en las células excitables, donde se sabe que participan en la fase de repolarización después de un potencial de acción.

El riñón es el órgano encargado de mantener la composición y el equilibrio electrolítico de los fluidos del cuerpo por lo que las células de este órgano presentan una actividad de reabsorción y secreción de iones muy alta. Recientemente en nuestro laboratorio se identificaron tres canales de K^+ sensibles al voltaje en los túbulos colectores de la médula interna del riñón de rata: El Kv1.1, Kv1.3 y Kv1.6. El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo un estudio sistemático por RT-PCR de los canales de potasio sensibles al voltaje que están presentes en todo el riñón de la rata. Se identificó el ADNc de los canales Kv1.2, Kv1.4 y Kv4.3; y se confirmó la presencia del Kv1.7, Kv2.1 y Kv7.1. Estos canales podrían estar involucrados en el reciclaje de K^+ , el cual es necesario para que se lleve a cabo la reabsorción del Na^+ y del Cl^- en las células de este órgano.

2) Introducción.

Los riñones están localizados en la parte media de la espalda, inmediatamente debajo de la caja torácica (la estructura formada por las costillas); tienen forma de frijol y cada uno tiene el tamaño aproximado de una mano cerrada. Los riñones son una compleja maquinaria de purificación. A diario purifican aproximadamente 200 litros de sangre para filtrar unos 2 litros de desechos y exceso de agua, los cuales se convierten en orina que fluye a la vejiga a través de tubos llamados uréteres.

El riñón junto con los uréteres, la vejiga urinaria y la uretra, constituyen el sistema urinario. En el riñón se llevan a cabo gran parte de los procesos que contribuyen a la homeostasis de los líquidos y electrolitos, además de ser uno de los órganos responsables de mantener la composición de los fluidos corporales en los animales superiores. Estas funciones se realizan fundamentalmente mediante tres procesos: filtración glomerular, reabsorción y secreción tubular.

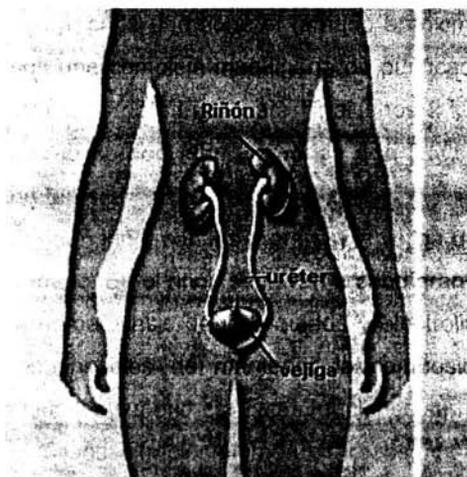


Fig.1. Componentes principales del sistema urinario humano. Los riñones se encargan de producir la orina a partir del plasma. La orina se transporta hacia la vejiga a través de los uréteres en donde se almacena temporalmente antes de ser expulsada hacia el exterior a través de la uretra.

2.1) Morfología del Riñón.

La cara interna de cada riñón tiene una región en forma de muesca llamada hilio, a través de la cual pasan la arteria y la vena renal, los vasos linfáticos, los nervios y el uréter, que lleva la orina desde el riñón a la vejiga. Si se practica un corte transversal del riñón, las dos regiones principales que pueden verse son la corteza externa y la región interna llamada médula. La médula está dividida en numerosas masas de tejido de forma cónica llamadas pirámides renales. La base de cada pirámide nace en el límite entre la corteza y la médula y termina en la papila que penetra en el espacio de la pelvis renal, una prolongación de la parte superior del uréter que tiene forma de embudo. El borde externo de la pelvis se divide en pequeñas bolsitas de extremos abiertos llamadas cálices mayores, los cuales se extienden por abajo y se dividen en los cálices menores; existen dos o tres cálices mayores y ocho a dieciocho cálices menores. Cada cálice menor recolecta orina de los túbulos colectores de las pirámides. Desde los cálices mayores, la orina drena hacia la pelvis y después hacia el uréter.

La corteza y las pirámides renales constituyen el parénquima (porción funcional) del riñón. Desde el punto de vista estructural, el parénquima de cada riñón está formado de aproximadamente 1.3 millones de nefronas, la unidad anatómica mínima funcional del riñón, ordenadas de manera paralela y acompañadas de una red intrincada de vasos sanguíneos.

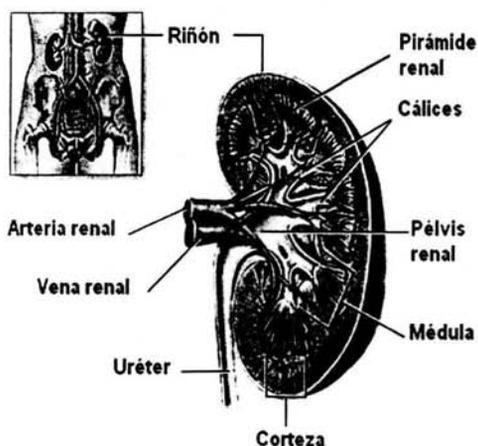


Fig.2. Anatomía del riñón.
(modificada de www.abc.net.au/science)

Cada nefrona es una estructura tubular contorneada cuya pared está formada por células epiteliales especializadas. La morfología y función de estas células cambia en la medida en la que se constituyen los diferentes segmentos de la nefrona. Cada nefrona se constituye de 5 segmentos funcionales muy bien definidos: el glomérulo, el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo distal y el túbulo colector.

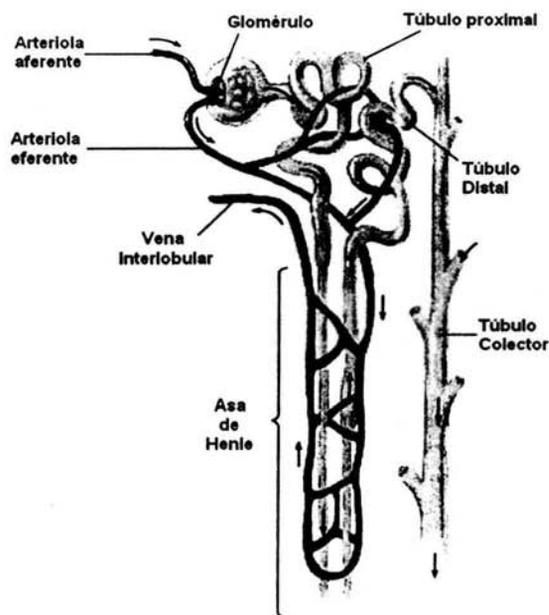


Fig.3. Principales componentes de la nefrona, rodeada por vasos sanguíneos. (modificada de www.anselm.edu/homepage.com)

2.2) Función renal.

El trabajo principal del sistema urinario se realiza en los riñones cuyas funciones más importantes son: filtrar el plasma y eliminar sustancias del filtrado según las necesidades del organismo. De esta manera se forma la orina, la cual debe ser expulsada constantemente del organismo. Además los riñones se consideran órganos endocrinos, ya que se encargan de producir hormonas y autacoides como la eritropoyetina y las prostaglandinas.

Las funciones principales que se llevan a cabo en los riñones son:

Excreción de los productos metabólicos de desecho y de las sustancias químicas extrañas.

Regulación del equilibrio hídrico y electrolítico.

Regulación de la osmolaridad de los líquidos corporales y de las concentraciones de electrolitos.

Regulación del equilibrio ácido-base.

Regulación de la presión arterial.

Secreción, metabolismo y excreción de hormonas.

Gluconeogénesis.

El transporte transepitelial de los iones tales como el Na^+ , K^+ , Cl^- , CO_3^- , Ca^{2+} , H^+ y los aminoácidos, es una de las funciones elementales de los riñones, el intestino y los pulmones. Este transporte es necesario para mantener la osmolaridad del plasma sanguíneo, para transportar sustancias nutritivas como los carbohidratos y aminoácidos desde la luz intestinal hacia la sangre, para la secreción de moco en las vías respiratorias, etc. Sean cuales fueren los solutos que transportan los diversos epitelios, dicho transporte depende, en gran parte, de las proteínas de membrana que expresan las células epiteliales.

2.3) PROTEÍNAS DE TRANSPORTE

Pocas son las moléculas que entran o salen de la célula, o difunden por la membrana de los organelos sin la ayuda de proteínas. Incluso el paso de algunas moléculas, como el agua o la urea, que pueden difundirse a través de bicapas fosfolipídicas, a menudo es acelerado por proteínas de transporte. Existen tres clases principales de proteínas de transporte membranales con un alto grado de especificidad por la sustancia que transportan.

Las bombas impulsadas por ATP. Son ATPasas que usan la energía de la hidrólisis del ATP para mover iones a través de la membrana, en contra de un potencial eléctrico o de un gradiente químico de concentración.

Transportadores. Son proteínas que se encargan de mover una gran cantidad de iones o moléculas a través de las membranas celulares. Los transportadores fijan una sola molécula de sustrato (o muy pocas) a la vez. Después de que se fija esta molécula, el transportador sufre un cambio de conformación de manera que solo las moléculas de sustrato unidas son transportadas a través de la membrana.

Canales. Son proteínas que forman un poro en la membrana plasmática a través del cual se mueven a gran velocidad iones específicos o moléculas de agua en un proceso energéticamente favorable.

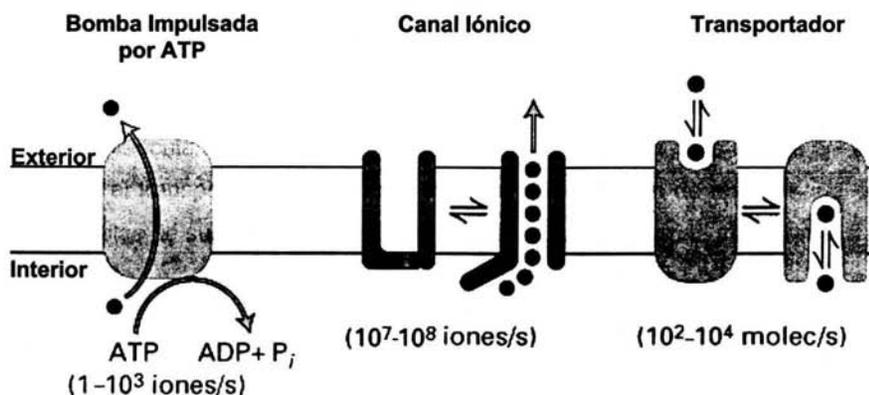


Fig.4. Proteínas de transporte.

2.4) Canales iónicos.

Los canales iónicos son componentes clave en la actividad de las células vivas, ya que permiten el paso selectivo de iones a través de ellos desde un lado de la membrana hasta el otro y también ejercen control sobre el movimiento de estos iones ya que se pueden cerrar o abrir. Los canales pueden ser monómeros o heteromultímeros. Contienen un poro en el centro que se puede abrir mediante un cambio conformacional y de esta manera dejan fluir iones a través de la membrana. Los iones pueden llegar a fluir a velocidades superiores a 100 millones por segundo. Este movimiento de los iones genera una corriente eléctrica que puede ser medida.

Los canales iónicos consisten en una o más subunidades polipeptídicas con segmentos transmembranales. Los canales tienen varios componentes funcionales. La llamada compuerta de activación que determina si el canal está abierto o cerrado, y cada uno de estos estados refleja una conformación diferente de las proteínas de membrana. Segundo, los canales pueden responder a uno o varios estímulos (1) cambios en el potencial de membrana, (2) sistemas de segundos mensajeros que actúan en el lado citoplasmático o (3) ligandos, tales como neurotransmisores, que se unen a la cara extracelular de la proteína de membrana. Estas señales regulan transiciones entre los estados abierto y cerrado. Un tercer componente funcional de los canales iónicos es el filtro de selectividad el cual determina el ion en particular (ej. Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) o las clases de iones (ej. aniones o cationes) que tienen acceso al poro del canal. El cuarto componente funcional es el mismo poro del canal. Cada vez que el canal asume la conformación abierta, éste provee de una vía continua entre los dos lados de la membrana, de modo que los iones pueden fluir a través de él por difusión pasiva (sin gasto de ATP) antes de que el canal se vuelva a cerrar. Durante cada apertura del canal, muchos iones fluyen a través de su poro, usualmente un número suficiente como para ser detectado como una pequeña corriente mediante técnicas muy sensibles como el "Patch-clamp".

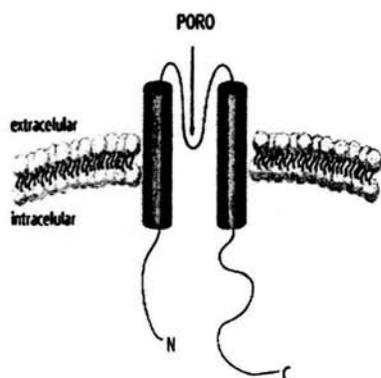
Canales de sodio. Debido a que la diferencia de potencial electroquímico para el sodio generalmente es negativa, el gradiente favorece el movimiento neto del Na^+ hacia adentro de virtualmente todas las células del cuerpo. De esta manera un canal de Na^+ abierto actuará como un conducto para la entrada pasiva del Na^+ . Una característica fisiológica de los canales que median la entrada de Na^+ es la transmisión de información. Los canales de Na^+ sensibles al voltaje son responsables de la generación del potencial de acción (ej. impulso nervioso) en muchas células excitables. Otra característica fisiológica de los canales de Na^+ puede ser encontrada en algunas células epiteliales tales como aquellas de ciertos segmentos del túbulo renal e intestino, en este caso los canales de Na^+ se encuentran restringidos a la superficie apical de la célula, donde permiten el paso de Na^+ hacia dentro de la célula epitelial desde el lumen del túbulo renal o el lumen intestinal. El flujo pasivo es un paso clave en el movimiento de Na^+ a través del epitelio entero, desde el lumen hacia la sangre.

Canales de calcio. La diferencia de potencial electroquímico para el Ca^{2+} también es siempre negativa, así que el Ca^{2+} tiende a moverse hacia adentro de la célula. Cuando los canales de calcio están abiertos, el Ca^{2+} rápidamente entra a la célula a favor de su gradiente electroquímico. El movimiento entrante de Ca^{2+} juega un papel vital en la señalización transmembranal tanto en las células excitables como en las no excitables, así como en la generación del potencial de acción en algunas de las células excitables.

Canales de potasio. El K^+ tiende a difundirse hacia afuera de la célula. En virtualmente todas las células, los canales de potasio establecen el potencial de membrana en el reposo y participan en la fase de la repolarización del potencial de membrana después de un potencial de acción en las células excitables, y la secreción y reciclaje de potasio en las células no excitables.

2.5) Canales de potasio.

Los canales de potasio han sido observados en virtualmente todos los tipos de células pertenecientes a una extensa clasificación filogenética de especies incluyendo los procariontes. La gran diversidad de canales de K^+ se pueden agrupar dentro de muchas clases conservadas de familias de genes (Gutman A. Et al. 2003). Actualmente se conocen varias familias de canales de K^+ , la mayoría de ellas está compuesta por múltiples miembros. Una característica universal de todas las familias es una secuencia conservada que forma parte del poro y es la que le da al canal su selectividad al K^+ .

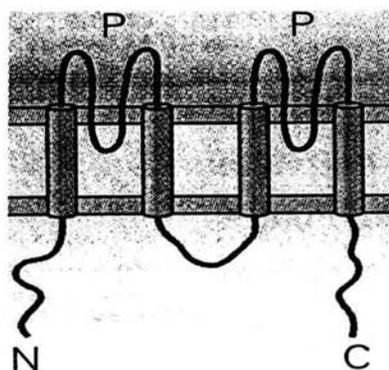


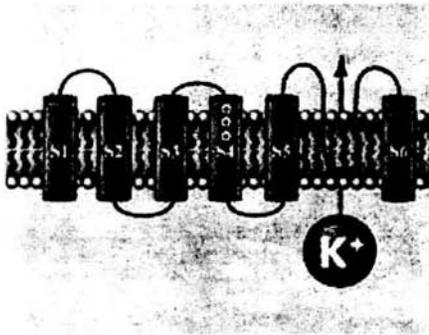
Canales 2TM

Los canales formados por proteínas de dos dominios transmembranales incluyen los rectificadores entrantes, los canales K_{ATP} , y los canales acoplados a proteínas G. El extremo amino y carboxilo terminal de las proteínas están localizados en el citoplasma y la región del poro se encuentra entre los dos dominios transmembranales. El canal funcional es un tetrámero formado por estas subunidades. (modificada de www.ipmc.cnrs.fr/)

Canales 4TM

A esta clase de canales pertenece la familia K_{2p} ; contienen 2 subunidades de 2 dominios transmembranales ligadas una tras otra y el canal funcional está formado por un dímero de las subunidades de 4 dominios transmembranales y dos segmentos de poro. (Fig. modificada del Boron W. 2003)



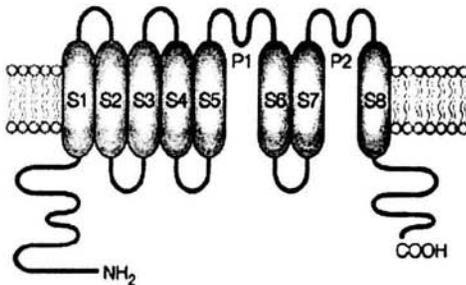
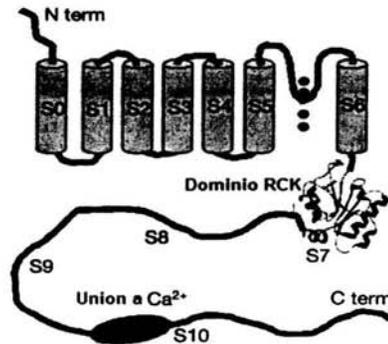


Canales 6TM

Incluyen a los canales Kv y los canales de K^+ activados por calcio de conductancia baja e intermedia (K_{Ca}). El extremo amino y carboxilo terminal de estas proteínas está localizado intracelularmente y la región del poro está localizada entre el quinto y sexto dominio transmembranal. El canal funcional está formado por la asociación tetramérica de esas subunidades de seis dominios transmembranales.

Canales 7TM

A este tipo pertenece un canal de alta conductancia, Slo, el canal funcional es un tetrámero, pero a diferencia de otros canales, Slo tiene su extremo amino terminal localizado extracelularmente.



Canales 8TM

Una clase de proteínas que tiene un segmento de seis dominios transmembranales unido a uno de dos dominios transmembranales. El canal funcional está formado por la asociación de dos subunidades de ocho segmentos transmembranales con dos regiones de poro. (Choe S. 2002).

2.6) Canales de potasio sensibles al voltaje.

La familia de los canales de potasio sensibles al voltaje (Kv) constituyen la familia más grande de canales de potasio. Todos los miembros que integran esta familia poseen una serie de características comunes entre ellos. Los canales Kv se componen por cuatro subunidades α (son tetrámeros), las cuales cuentan con un extremo amino y un extremo carboxilo terminales localizados en el citoplasma. Cada subunidad α se compone a su vez de seis dominios transmembranales (S1-S6), un sensor de voltaje (S4) y una región de poro transmembranal selectivo para el ion K^+ (localizado entre los segmentos S5 Y S6).

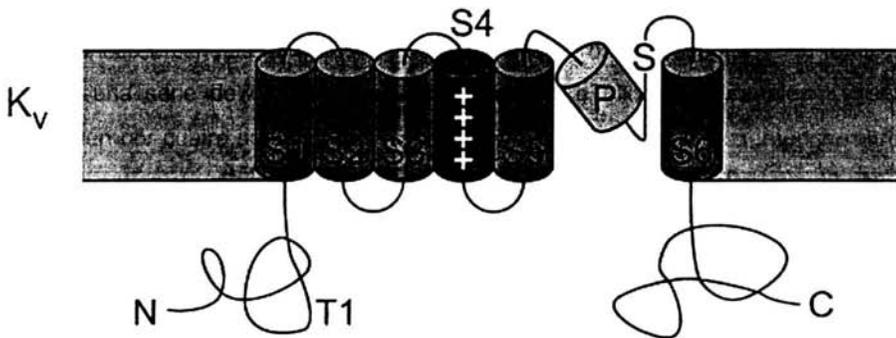


Fig.5. Topología de la subunidad α de un canal de K^+ sensible al voltaje (Kv). La región del poro se localiza entre los segmentos transmembranales S5 y S6. El segmento S4 actúa como sensor de voltaje (conjunto de aminoácidos cargados positivamente).

2.7) Distribución de algunos Kv's en mamíferos.

Tabla.1 (Modificada de Shieh et al. 2000)

| Subfamilia | Integrantes | Tejidos en los que se expresa. |
|------------|---------------|---|
| Kv1 | Kv 1.1 | Neuronas, corazón, retina, islotes pancreáticos, riñón ⁶ . |
| | Kv 1.2 | Cerebro, corazón, islotes pancreáticos. |
| | Kv 1.3 | Linfocitos, cerebro, pulmón, vaso, riñón ⁶ . |
| | Kv 1.4 | Cerebro, corazón, islotes pancreáticos. |
| | Kv 1.5 | Cerebro, corazón, riñón, pulmón, músculo esquelético. |
| | Kv 1.6 | Cerebro, riñón ⁶ . |
| | Kv 1.7 | Corazón, islotes pancreáticos. Riñón ¹⁹ . |
| | Kv 1.10 | Cerebro, aorta, riñón ²² . |
| Kv2 | Kv 2.1, Kv2.2 | Cerebro, corazón, riñón, músculo esquelético, retina. |
| Kv3 | Kv 3.1 | Cerebro, músculo, linfocito. |
| | Kv 3.2 | Cerebro. |
| | Kv 3.3 | Cerebro, hígado. |
| | Kv 3.4 | Cerebro, músculo esquelético. |
| Kv4 | Kv 4.1 | Cerebro, corazón, hígado, riñón, pulmón, placenta, páncreas. |
| | Kv 4.2 | Cerebro |
| | Kv 4.3 | Corazón, cerebro. |
| Kv7 | Kv 7.1 | Corazón, riñón, pulmón, colon, placenta. |
| | Kv 7.2 | Cerebro, neuronas. |
| | Kv 7.3 | Cerebro, neuronas. |
| | Kv 7.4 | Oído interno, sistema auditivo central, células del pelo. |
| | Kv 7.5 | Cerebro, músculo esquelético. |

Es importante notar que este tipo de canales ha sido ampliamente estudiado en las células excitables tales como las del sistema nervioso y muscular, donde se sabe que participan en la repolarización del potencial de membrana. En estas células la apertura o activación de los canales de potasio sensibles al voltaje es inducida por la despolarización de la membrana celular, la cual promueve un cambio en la conformación del sensor de voltaje, permitiendo con ello la apertura del canal y, en consecuencia, el flujo de iones a través de la membrana celular.

En las células no excitables como son las de los epitelios (riñón, intestino, colon, pulmones, etc) también se han encontrado este tipo de canales; sin embargo, la función que cumplen en estos tejidos esta relacionada con la secreción y el reciclaje de potasio. Algunos ejemplos de los epitelios donde se han encontrado canales de potasio sensibles al voltaje son los de la córnea (mantienen el balance de sal y agua para una función normal de estas células. Wang L. et al 2004), la próstata (parecen estar relacionados con la mitogénesis y el cáncer. Ouadid-Ahidouch H. et al 1999), los alvéolos (juegan un papel importante en la regulación del volumen y la composición iónica del fluido alveolar. Lee S. et al 2003), el intestino (están involucrados en la restitución rápida de la mucosa cuando hay lesiones Rao J. et al 2002), el colon (están involucrados principalmente en el reciclaje de potasio, la absorción de sodio y la secreción de cloro Turnheim K. et al 2002) y el riñón (parecen estar relacionados con la regulación del volumen celular y la reabsorción de sodio Escobar L. et al 2004).

3) ANTECEDENTES.

En nuestro laboratorio se registró una corriente de potasio en un cultivo primario de los túbulos colectores de la médula interna del riñón de la rata. Recientemente se identificaron algunos de los canales de K^+ que están presentes en estas células por técnicas de RT-PCR, inmunocitoquímica e inmunofluorescencia: los canales Kv1.1, Kv1.3 y Kv1.6 (Escobar L. et al 2004).

El objetivo de esta tesis es el estudio sistemático de la presencia de otros genes de la subfamilia Kv1 y del resto de las subfamilias: Kv2, Kv3, Kv4 y Kv7 en el riñón de la rata por la técnica de RT-PCR.

4) OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL:

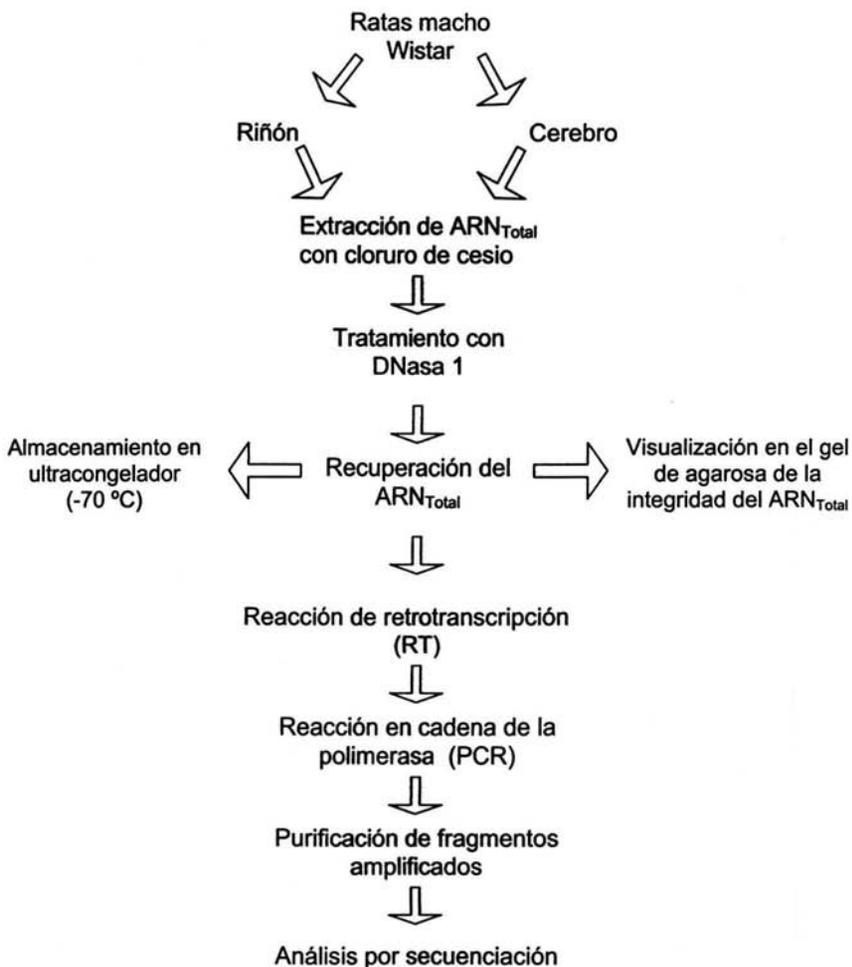
Identificar los genes de las subfamilias Kv1, Kv2, Kv3, Kv4 y Kv7 en el riñón de rata.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Diseñar oligonucleótidos específicos para cada canal Kv1 y oligonucleótidos degenerados para la amplificación de fragmentos de ADNc de los miembros de las subfamilias Kv2, Kv3, Kv4 y Kv7.
- Establecer las condiciones de la RT-PCR para la amplificación de los fragmentos de ADNc de cada canal de la subfamilia Kv1 y del resto de las subfamilias.

5) METODOLOGÍA GENERAL.

A continuación se muestra de manera general la metodología y los materiales involucrados en el desarrollo experimental del presente trabajo. Para obtener información detallada acerca de los métodos y reactivos utilizados favor de ver el apéndice.



6) RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1) Obtención de ARN_{total} con guanidina y cloruro de cesio.

Se utilizaron el riñón y el cerebro de la rata para obtener el ARN_{total} de estos órganos (el método se describe en el apéndice 1). El ARN obtenido fue tratado con Dnasa 1 libre de RNasas para evitar contaminación con ADN genómico (el ADN de la célula) durante la reacción. La integridad del ARN extraído se comprobó con una electroforesis de la muestra (Fig. 6, método apéndice 2).

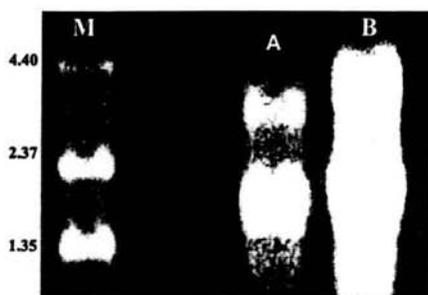


Figura 6. ARN_{total} extraído con guanidina y cloruro de cesio en un gel desnaturalizante de agarosa al 1%. M) marcador ARN "Ladder" 0.24-9.5Kb GIBCO BRL® A) ARN extraído de riñón de rata B) ARN extraído de cerebro de rata. En ambos casos se observan las dos bandas correspondientes a ARN ribosomal 28s y 18s.

Las dos bandas que se observan en el gel corresponden a las de las subunidades 28S y 18S ribosomal, respectivamente, de las células eucariontes, y son una medida de la integridad del ARN_{total} después de la extracción. Se observó una ligera degradación del ARN pero está en buenas condiciones para ser utilizado.

Con este ARN_{total} se realizó una reacción de retrotranscripción para obtener ADNc el cual se usó como templado en la reacción de PCR (apéndice 3).

6.2) Controles.

Se realizó una reacción de PCR con el ARN como templado (sin realizar la retrotranscripción). En este control no se obtuvo ninguna amplificación, lo que indica que el ARN estaba libre de ADN genómico.

Todos los controles positivos fueron realizados con ADNc de cerebro de rata.

Control positivo para los miembros de la subfamilia Kv1.

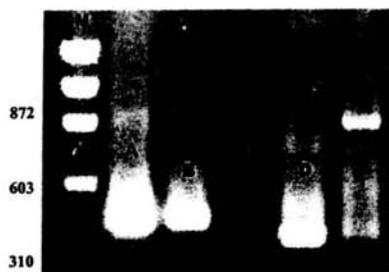


Fig.7. Fragmentos correspondientes al extremo carboxilo de canales de potasio de la subfamilia Kv1 con ADNc de cerebro de rata. M) Marcador de peso molecular Φ 174 RF DNA/ Hae III fragments A) Kv1.2 B) Kv1.4 C) Kv1.5 D) Kv1.6 E)Kv1.10 véase apéndice tabla 2. Para el canal Kv1.7 no se amplificó ninguna banda al igual que para el Kv1.5 (dato no mostrado).

Solamente con los oligonucleótidos diseñados para los canales Kv1.5 y Kv1.7 no se obtuvieron las amplificaciones esperadas de 480 y 576 pb respectivamente a pesar de que se varió la temperatura de alineamiento en una rango desde 49°C hasta 63°C y la concentración de $MgCl_2$ desde 1 mM hasta 4 mM, por lo que se deduce que son los oligonucleótidos los que no están reaccionando.

También se observa claramente que hay una mayor intensidad en la banda amplificada con respecto al riñón de los canales Kv1.2, Kv1.4 y Kv1.6 esto se debe probablemente a que en el cerebro se obtuvo una mayor cantidad de ADNc de estos canales (Figs. 7 y 9).

Control positivo para las subfamilias Kv2, Kv3, Kv4 y Kv7.

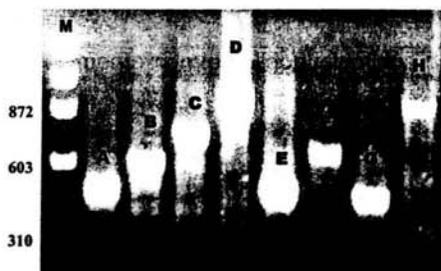


Fig.8- Fragmentos correspondientes a las subfamilias Kv2, Kv3, Kv4 y Kv7. M) Marcador de peso molecular Φ 174 RF DNA/ Hae III fragments. A) y B) Bandas correspondientes al Kv2, C) y D) Bandas correspondientes al Kv3, E) y F) Bandas correspondientes al Kv4, G) y H) Bandas correspondientes al Kv7. Nota: cada banda con su respectivo par de oligonucleótidos (ver apéndice tabla 3).

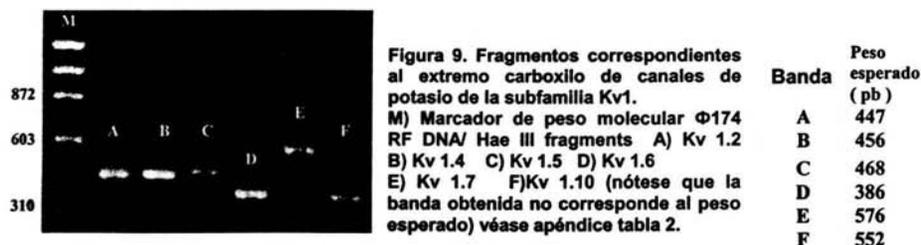
Con el ADNc del cerebro se obtuvieron todas las bandas esperadas a excepción de las correspondientes a los Kv's 1.5 y 1.7. Esto es una prueba de la eficacia de los primers diseñados.

6.3) Identificación de la subfamilia de canales de potasio sensibles al voltaje Kv1 en el riñón de la rata.

Se realizó un PCR a partir del ADNc obtenido del riñón de rata y se amplificaron secuencias específicas de los canales Kv_{1.2}, Kv_{1.4}, y Kv_{1.7}. También se probaron oligonucleótidos para los canales Kv_{1.5}, y Kv_{1.10}. Para llevar a cabo la amplificación de estos fragmentos se utilizaron un par de oligonucleótidos en cada caso, dirigidos hacia la región del poro y al extremo carboxilo terminal para asegurar su especificidad ya que ésta es la región que más difiere entre los distintos canales Kv1 (apéndice 4.1).

Para encontrar las condiciones óptimas de amplificación de cada fragmento se variaron la temperatura de alineamiento y la concentración de MgCl₂, llegándose a una temperatura de alineamiento de 50 °C y una concentración de MgCl₂ de 1.5 mM. Para más detalles de las condiciones de reacción ver apéndice 5.

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con los productos de PCR obtenidos (apéndice 6).



Purificación y secuenciación de los fragmentos de PRC.

Los fragmentos amplificados por PCR fueron purificados a partir del gel con el Kit "Concert Gel Extraction Systems" (GIBCO BRL®; apéndice 7). La secuencia se obtuvo con el método automatizado AB1 Prism 310, Perkin Elmer.

Se obtuvieron amplificaciones de los fragmentos de ADNc con los pesos esperados para cada uno de los miembros de la subfamilia Kv1 (apéndice tabla 2), a excepción del Kv1.10 (Fig. 9), cuyo peso se esperaba de 552 pb. El análisis de la secuencia que se realizó para cada uno de los fragmentos obtenidos reveló la presencia de los canales Kv1.2, Kv1.4 y Kv1.7.

Hasta la fecha seis miembros de la subfamilia Kv1 han sido localizados en el riñón, entre ellos están: Kv1.1, Kv1.3, Kv1.6 en los túbulos colectores de la medula interna (Escobar et al.), Kv1.5 y Kv1.7 en el riñón completo (Shieh et al y Kashuba et al. Respectivamente) y el Kv1.10 en el conducto colector cortical (Lang et al.). En este trabajo se identifican por primera vez la presencia de los dos miembros restantes de esta subfamilia el Kv1.2, Y el Kv1.4 y se confirmó la del Kv1.7.

Secuencias obtenidas (ver apéndice de Secuencias):

Kv1.2

```
CCCGGATGCCTTCTGGTGGGCAGTCGTCTCCATGACAACCTGTAGGCTATGGAGACATGGTT  
CCAACTACCATGGGGGAAAGATAGTGGGTTCTCTGTGTGCAATTGCAGGTGTGTTAACCA  
TTGCCTTACCAGTCCCTGTCATAGTGTCTAATTTCAACTACTTCTACCACGGGAGACAGA  
GGGAGAGGAGCAGGCCAGTACTTGCAAGTGACAAGTTGTCCAAAGATCCCGTCTCTCCC  
TGACCTAAAGAAAAGTAGAAGTGCCTCTACCATAAGTAAGTCTGATTACATGGAGATACA  
GGAGGGAGTAAACAACAGTAATGAGGACTTTAGAGAGGAGAACTAAAAACAGCCAAC  
GTACCTTGGCTAACACAACTATGTGAATATTACAAAATGTAACTGATGTCTGCTC
```

Kv_{1.4}

GATGCGTTTTGGTGGGCTGTGGTAACCATGACAACCTGTGGGCTACGGGGACATGAAGCCC
ATCACAGTGGGAGGAAAGATTGTGGGGTCCCTGTGTGCCATTGCGGGTGTCTTAACCATTG
CTTTGCCCGTGCCGGTGATTGTGTCTAACTTTAACTATTCTACCACAGAGAGACTGAAAA
CGAAGAACAGACCCAGCTGACCCAAAACGCAGTCAGTTGCCCATACCTACCTTCTAATTTG
CTCAAGAAATTTGCGGAGCTCTACTTCTTCTCCCTGGGGGACAAAGTCAGAGTATCTAGAGA
TGGAAGAAGGGGTCAAGGAGTCTTTATGTGGAAAGGAAGAGAAGTGTGTCAGGGAAAGGGG
GATGACAGCGAGACAGATAAAAAACAACCTGTTCTAATGCAAAGGCTGTGGAGACTGATGTG
TGAGGNACCCGATG

Kv_{1.7}

AAATCTNACNCACACCTGGGGGGGNTTTTNTGGTGCNACTTNTCCCATTTTTCCAGGCTA
TNCAGGNCACTTAAGGGGCGCTGNANATATTGGGGCANAACTGNGGGANTTGCCATG
CGAAAGCTANGTCTCCTNATNTTCTTCTTCTTCTGNTTGTGGNCCTCTTTCCAGCGC
AGTCTANTTNGGGTGAAGGGGCCNTTTTTTCACCCATTTAACCANNTTCTAGAGGNCTT
TNGGGGGANAANGGCCACCATGACCACGGNNGGNTACGGGGACATGGCACNNGNAACCN
AGGGNNGCAATATTNNGGGCTNTTTGGGGCCATTGCAAGCTTTNTNACCATNTNTNTGCC
GGTGCCTGTNATCGTTTTCCANNTTACCNCCTTTAACNACCGGGANANANAGGGNGAAG
AGGCAGGATGTACANCCATGTGGA

Por otro lado los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos para el Kv_{1.5} y el Kv_{1.10} fueron purificados y secuenciados. La comparación de estas secuencias con el banco de genes fue con el programa NCBI-BLAST. Las secuencias obtenidas para éstos fragmentos no mostraron identidad con canales de potasio reportados en el banco de genes por lo que no se muestran en este trabajo.

El hecho de que no se hayan amplificado los fragmentos esperados para el Kv_{1.5} y se puede atribuir a que los oligonucleótidos no están reaccionando. Para el caso del Kv_{1.10} se puede atribuir a una baja concentración de ADNc de estos canales obtenida durante la retrotranscripción ya que como lo vemos en la figura 8, los oligonucleótidos diseñados para este canal si funcionaron en el cerebro.

6.4) Identificación de las subfamilias de los canales de potasio dependientes de voltaje Kv2, Kv3, Kv4 y Kv7 en el riñón de la rata.

Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos degenerados específicos para cada una de las subfamilias Kv2, Kv3, Kv4 y Kv7 (apéndice 4.2). Estos oligonucleótidos comprenden la región amino terminal, ya que esta región está altamente conservada entre los miembros de cada subfamilia.

Se obtuvieron los tamaños de las bandas esperadas para cada una de las subfamilias. La temperatura de alineamiento utilizada fue de 49 °C y la [MgCl₂] fue de 1.5 mM. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (apéndice 5) con los productos de PCR obtenidos.

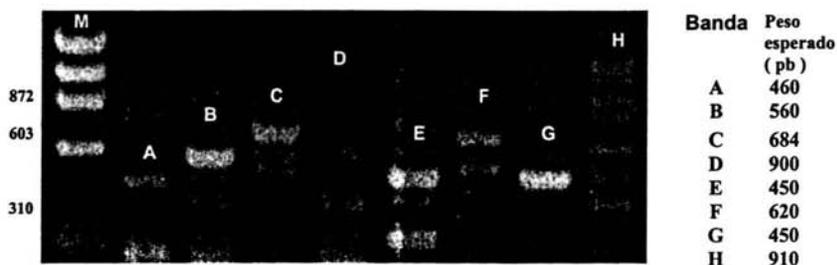


Fig.10- Fragmentos correspondientes a las subfamilias Kv2, Kv3, Kv4 y Kv7. M) Marcador de peso molecular Φ 174 RF DNA/ Hae III fragments. A) y B) Bandas correspondientes al Kv2, C) y D) Bandas correspondientes al Kv3, E) y F) Bandas correspondientes al Kv4, G) y H) Bandas correspondientes al Kv7 cada una con su respectivo par de oligonucleótidos (ver apéndice tabla 3).

Como puede observarse en la figura 10 se obtuvieron varios fragmentos de ADNc. Para estas subfamilias se esperaba obtener en algunos casos más de una banda, ya que los primers utilizados son específicos para la subfamilia pero inespecíficos para los miembros de cada subfamilia.

En todos los casos se obtuvieron los fragmentos de ADNc esperados para cada canal, a excepción del fragmento de 900 pb esperado para el Kv3 (fig. 10-D).

Los fragmentos obtenidos se purificaron a partir del gel de agarosa utilizando el Kit Concert Gel Extraction Systems (Gibco BRL® apéndice 7). La secuencia se obtuvo por el método automatizado AB1 Prism 310, Perkin Elmer.

El análisis de las secuencias mostró la presencia de los canales Kv2.1, Kv4.3 y Kv7.1. de los cuales los canales el Kv2.1(Shieh et al.) y Kv7.1(Vallon V. Et al.) ya habían sido identificados en el riñón, no así el Kv 4.3 cuya presencia en el riñón es propuesta por primera vez en este trabajo.

Secuencias obtenidas (ver apéndice de Secuencias):

Kv_{2.1}

```
GTANGNAATCATGNTTCATCGTCCTGTCCACCATCTINTTCTGTCACTCAACACGCTGCCTG
AGCTGCAGAGCCTAGACGAGTTCGGCCAGAGCACGGATAACCCGCAGCTGGCGCACGTGG
AGGCGGTGTGCATCGCATGGTTCACCATGGAGTACTTGCTGAGGTTCTGTCTCCCCAA
GAAATGGAAGTTCTTCAAGGGCCCCCTCAACGCCATTGACCTACTGGCCATCTGCCCCTAC
TAGGTCACCATCTTCTCACAGAATCCAACAAGAGCGTGTGCAGTTCAGAACGTGGCC
CGGTGGTCCAGATCTTTCGCATCATGGCATCCTTCGGATCCTGAAGCTGGCCCGTCACTC
CACTGGCCTGCAGTCTTGGGCTTCAACCCTGCGCAGAAGCTACAACGAGCTGGGCTGTCTC
ATCCTCTTCTCGGATGGGCATCATGATCTTCTCCAGCCTGGTCTTCTTTCGCGGAGAAGG
ATGAGGACGACACCAAGTTCAAAGCATCCCCGCCTTCTTGGGGGGG
```

Kv_{4.3}

```
ACGGGTGCCTGGGACCTAGGAACTGCCGTGATGGAGAGCGCTACTCCGTGGCTTCTTCTG
CCTGGACACTGCGTGTGTCATGATCTTACGGTGGAGTACCTCCTCCGACTCTTCGCGGCA
CCCAGCAGGTACCGTTCATCCGCAGTGTGATGAGCATCATCGACGTGGTGGCCATCATGC
CCTATTACATTTGGGCTGGTCAATGACCAACAACGAGGACGTGTCCGGGGCATTGTGCACT
CCGGGTCTTCCGCGTCTTCAAGATCTTCAAGTTCTCCCGACATTCACAGGGCCTACGGATCC
TAGGCTACACCCTGAAGAGCTGTGCCTCAGAAGTGGCTTCTTCTTCTTCTCCCTACCATG
GCCATCATCATCTTGGCACTGTGATGTTTATGCTGAGAAGGGCTCCTCCGCCAGCAAGT
CACAAGCATCCCTGCGTCTTCTGGTACACCATAGTCACCATGACAACACTGGGGTATGG
AGACATGGTGCCTAAGACAATTGCTGGGAAGATATTGGCTCCATCTGCTCC
```

Kv_{7.1}

```
GTTGATCGCCAGGGAGGTACCTGGAGGCTCCTGGGCTCTGTAGTCTTCATTCACCGCCAGG
AGCTGTATCACCACCCTGTACATTTGGCTTCTGGGCTCATCTTCTCCTCTACTTTGTCTAC
CTGGCTGAGAAAGATGCAGTGAATGAGTCCGGCCGCATCGAGTTTGGCAGCTACGCAGAT
GCTCTGTGGTGGGGAGTGGTACAGTCAACCATTTGGCTACGGGGATAAGGTACCCAG
ACATGGGTGGGAAGACCATCGCCTCTGTTTCTCTGTCTTCGCCATATCCTTCTTTGCACT
CCCAGCGGGCATACTTGGCTCTGGGTTTGCAGTGAAGGTCCAGCAGAAGCAGAGGCAGAA
ACACTTCAACCGGCAGATCCCAGCCGACGCTA
```

Las secuencias de los fragmentos de ADNc de los canales Kv3 no mostraron identidad con canales de potasio por lo que no se muestran.

Hasta ahora se sabe que en algunos epitelios estos canales están relacionados con el reciclaje del K^+ , la absorción del Na^+ y la secreción de Cl^- (Lee S.Y.et al, Ouadid-Ahidouch H.et al, Turnheim K. et al, Wang L.et al). Los canales Kv también están relacionados indirectamente con la regulación de la $[Ca^{2+}]$ libre en el citosol, ya que establecen la fuerza electroquímica para el flujo del Ca^{2+} a través de la membrana (Rao J. et al.).

En el túbulo proximal el canal Kv1.7 participa en la repolarización de la membrana luminal restaurando la fuerza motriz para el transporte electrogénico de solutos (Vallon V. Et al.).

El estudio de estos canales en el riñón es un campo relativamente virgen. Ya que éste es el órgano por excelencia encargado de filtrar los solutos de la sangre, y mantener la composición y el equilibrio electrolítico de los líquidos del cuerpo, podemos especular que los canales de potasio Kv1.2, Kv1.4 y Kv4.3, también juegan un papel en el reciclaje de K^+ y la reabsorción de Na^+ y Cl^- en el riñón.

7) CONCLUSIONES.

- Se identificaron por primera vez los genes de los canales de potasio Kv1.2, Kv1.4, y Kv4.3 en el riñón de la rata y se confirmó la presencia del Kv1.7, Kv2.1 y Kv7.1 en este mismo órgano.

8) PERSPECTIVAS DEL PROYECTO.

- El estudio de la distribución de los canales de potasio Kv en los diferentes segmentos del riñón (corteza médula interna y externa).
- El estudio del papel de cada Kv en el reciclaje del K^+ y su relación con la reabsorción del Na^+ y del Cl^- .

9) BIBLIOGRAFÍA.

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.
"Molecular Biology of the cell".
Third edition. Ed. Garland, pags. 528-535.
2. Bin Li and Warren J.
"VKCDB: Voltage-gated potassium channel database".
BMC Bioinformatics 2004, 5:3.
3. Boron W., Boulpaep E.
"Medical Physiology".
Ed. Saunders, 2003 pags. 50-87.
4. Corpet F.
"Multiple sequence alignment with hierarchical clustering".
Nucl. Acids Res 1988, 16 (22), 10881-10890
5. Escobar L.
"Estructura y función de los canales que transportan al agua y al potasio en las células".
Educ. Química. Vol 15 No1 pags: 71-77.
6. Escobar L., Martínez-Téllez J., Salas M., Castilla S., Carrisoza R., Tapia D., Vázquez M., Bargas J. and Bolivar J.
"A voltage-gated K⁺ current in renal inner medullary collecting duct cells".
Am. J. Physiol. Cell Physiol. 286: C965-C974, 2004.

7. Gutman A., Chandy K., Adelman J., Aiyar J., Bayliss D., Clapham D., Covarrubias M., Desir G., Furuichi K. et al.
"International union of pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated Ion channels: Potassium Channels".
Pharmacol. Rev Vol. 55 583-586, 2003.
8. Guyton A., Hall J.
"Tratado de fisiología médica".
Décima edición. Ed. McGraw – Hill pags. 319-359.
9. Kashuba V., Kvasha S., Protopopov A., Gizatullin R., Rynditch A., Wahlestedt C., Wasserman W.W., Zabarovsky E.R.
"Initial isolation and analysis of the human Kv1.7 (KCNA7) gene, a member of the voltage-gated potassium channel gene family".
Gene 268 (2001) pp. 115-122.
10. Lang R., Lee G., Liu W., Tian S., Rafi H., Orias M., Segal A., Desir G.
"KCNA10: a novel ion channel functionally related to both voltage-gated potassium and CNG cation channels".
Am. J. Physiol. 278: F1013 – F1021, 2000.
11. Lee J., Kim S., Jung S., Lim W., Kim K., Kim J.
"Voltage dependent K⁺ currents in spiral prominence epithelial cells of rat cochlea".
Hearing Research 146 (2000) 7-16.
12. Lee S., Maniak P., Ingbar D. and O'Grady S.
"Adult alveolar epithelial cells express multiple subtypes of voltage-gated K⁺ channels that are located in apical membrane".
Am. J. Physiol. Cell Physiol. 284: C1614-C1624, 2003.

13. Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaira, Baltimore, Darnell.
"Biología celular y molecular".
Ed. Panamericana 4ª edición 2002. pags: 923-927.
14. Ouadid-Ahidouch H., Coppéolle F., Bourhis X., Belhaj A., Prevarskaya N.
"Potassium channels in rat prostate epithelial cells".
FEBS Letters 459 (1999) 15-21.
15. Rao J., Platoshyn O., Li L., Guo X., Golovina V., Yuan J. and Wang J.
"Activation of K channels and increased migration of differentiated intestinal epithelial cells after wounding".
Am. J. Physiol. Cell Physiol. 282 C885-C898, 2002.
16. Shieh C., Coghlan M., Sullivan J.P. and Gopalakrishnan M.
"Potassium channels: Molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities".
Pharmacol. Rev. Vol.52 557-593, 2000.
17. Turnheim K., Plass H., Wyskovsky W.
"Basolateral potassium channels of rabbit colon epithelium: role in sodium absorption and chloride secretion".
Biochimica et Biophysica Acta 1550 (2002) 51-66.
18. Wang L., Fyffe R., Lu L.
"Identification of a Kv3.4 channel in corneal epithelial cells".
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2004 Jun; 45(6): 1796-803.
19. Vallon V., Grahmmer F., Richter K., Bleich M., Lang F., Barhanin J., Volk H., and Warth R.
"Role of KCNE1-dependent K⁺ fluxes in mouse proximal tubule".
J. Am. Soc. Nephrol 12: 2003-2011, 2001.

20. Volk K., Usted R., Pruchno C. and Stokes J.
"Functional and molecular evidence for Shaker-like K⁺ channels in rabbit renal papillary epithelial cell line".
Am. J. Physiol. 267 F671-F678, 1994.
21. Wei A., Jegla T., y Salkoff L.
"Eight potassium channels families revealed by the *C. elegans* genome project".
Neuropharmacology vol 35 No. 7 PP805-829 1996.
22. Yao X., Segal A., Welling P., Zhang X., McNicholas C., Engel D., Boulpaep E. and Desir V.
"Primary structure and functional expression of a cGMP-gated potassium channel".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 92, pp 11711-11715, december 1995.

10) APÉNDICE.

1) Extracción de ARN con Isotiocianato de guanidina y Cloruro de cesio.

1.0.- Obtención de los órganos.

1.01.- Se anestesia la rata con cloroformo y se procede a la apertura de la cavidad abdominal.

1.02.- Se obtiene el cerebro y los riñones para su procesamiento y se pesan.

1.1.- Preparar 8 ml de isotiocianato de guanidina 4M (TG) y 4 ml de CsCl 5.7M por cada gramo de tejido.

1.2.- Transferir 1g de tejido a un tubo de plástico con 8 ml de TG.

1.3.- Homogeneizar por 15 segundos (seg) a máxima velocidad (3 veces).

1.4.- Agregar 400 µl de sarcosil al 10% y mezclar por inversión.

1.5.- Centrifugar 10 minutos (min) a 12000 rpm a 4°C.

1.6.- Transferir el sobrenadante a un tubo de ultracentrifuga con 4 ml de CsCl.

1.7.- Ultracentrifugar a 32000 rpm 18hrs a 18°C.

Día2°

1.8.-Resuspender el precipitado en 600 µl de agua (hacerlo 2 veces con 300 µl).

1.9.- Precipitarlos con 0.1 volumen de acetato de sodio pH 5.2 y con 3 volúmenes de etanol al 100% toda la noche.

Recuperación del ARN.

1.10.- Centrifugar a 14000 rpm por 30 min a 4°C.

1.11.- Retirar el sobrenadante (dejar 100µl).

1.12.- Agregar 400 µl de etanol al 70% frío.

1.13.- Centrifugar 5 min a 14000 rpm. a 4°C.

1.14.- Retirar el sobrenadante (dejar 100 µl).

1.15.- Centrifugar aprox. a 10 seg a temperatura ambiente.

1.16.- Retirar todo el sobrenadante y secar a 37°C por 15 min***.

1.17.- Resuspender cada tubo en 100 µl de agua.

1.18.- Dejar los tubos a 4°C por 1 hora.

1.19.- Almacenar el ARN en el ultracongelador a -70°C.

*****Tratamiento con DNasa 1 libre de RNasa.**

- 1.16.1.- Después de secar, resuspender en 90 μ l de agua y 10 μ l de buffer de transcripción 10X.
- 1.16.2.- Agregar 6 μ l de DNasa 1 libre de RNasa e incubar a 37°C por 15 min.
- 1.16.3.- Extraer con fenol-cloroformo agitando por inversión del tubo.
- 1.16.4.- Centrifugar a 10000 rpm y tomar la fase superior.
- 1.16.5.- Proseguir conforme al punto 1.9.

2) Electroforesis en gel de agarosa para ARN.

- 2.1.- Pesar 0.3 g de agarosa (low electroendosmosis).
- 2.2.- Agregar 25 ml de H₂O.
- 2.3.- Calentar en el horno de microondas hasta disolver la agarosa.
- 2.4.- Agregar 3 ml de MOPS 10X.
- 2.5.- Dejar que la temperatura disminuya hasta aproximadamente 35°C.
- 2.6.- Adicionar 1.5 ml de formaldehído.
- 2.7.- Vaciar la solución en el molde para gel y dejar solidificar.
- 2.8.- Agregar buffer MOPS 1X a la cámara de electroforesis.

2.1.-Mezcla de reacción para cargar el ARN en el Gel.

- 2.1.1.- En un tubo de 1.5ml añadir:

- 5 μ l de formamida.
- 1 μ l de MOPS 10x.
- 2 μ l de formaldehído.
- 0.16 μ l de EtBr.
- 1 μ l de ARN.

- 2.1.2.- Calentar por 10 min. A 65°C y cargar la mezcla en el gel.
- 2.1.3.- Correr a 90V.

3) Reacción de retrotranscripción.

3.1.- Incubar una alícuota de 10 µl de ARN extraído a 65°C por 10 min.

3.2.- Enfriar a 4°C durante 5 min.

3.3.- Preparar la mezcla de reacción siguiente:

| Reactivo | Volumen por reacción (µl) |
|--|---------------------------|
| Buffer RT 5X (Tris HCl 100mM, KCl 500mM, pH 8.3) | 4 |
| dNTP's (dATP, dTTP, dCTP, dGTP 10µM, pH 7.0) | 2 |
| DTT (0.1M) GIBCO BRL | 2 |
| Hexámeros (100pmoles) Roche | 1 |
| RT-Pol (200 U/ml) GIBCO BRL | 1 |

3.4.- Agregar la mezcla preparada al tubo con el ARN precalentado y enfriado.

3.5.- Incubar a 37°C por 1 h y después a 95°C por 5 min.

3.6.- Enfriar a 4°C.

3.7.- Adicionar 20 µl de H₂O-DEPC (este paso es opcional).

3.8.- Almacenar el producto de la reacción a -20°C (máximo 1 semana).

4) Diseño de oligonucleótidos.

4.1.- Oligonucleótidos de la subfamilia Kv1.

4.1.1.- Se buscaron las secuencias reportadas en el banco de genes de cada uno de los miembros de las subfamilias.

4.1.2.- Se alinearon dichas secuencias utilizando el programa MultAlin⁴.

4.1.3.- A partir de la región del carboxilo terminal se tomaron fragmentos conservados de aproximadamente 30 pb y se mandaron a sintetizar (Accesolab).

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados y de los pesos esperados en cada caso se enlistan a continuación.

Tabla 2.

| Canal | Secuencia | Sentido | Peso esperado (pb) |
|--------|--|------------------------|--------------------|
| Kv1.2 | 5' GAT GAG CGA GAT TCC CAG TTC CCC AGC ATC3' 5' CAT CCT CGA GTC AGA CAT CAG TTA ACA TTT TGG TAAT3' | Sentido Antisentido | 447 |
| Kv1.4 | 5' GAA CCT ACC ACC CAT TTC CAA AGC ATT CCA 3' 5' CAT CGG TAC CTC ACA CAT CAG TCT CCA CAG CCT TTGC3' | Sentido Antisentido | 456 |
| Kv1.5 | 5' AAT CAG GGG TCG CAA CTC TCC AGT ATC CCG 3' 5' CAT CCT CGA GTT ACA AAT CTG TTT CCC GGC TAG TGTC3' | Sentido Antisentido | 468 |
| Kv1.6 | 5' GTT GAC TCG CTC TTC CCT AGC ATC CCA GAT3' 5' CAT CCT CGA GTC AAA CCT CGG TGA GCA TCC TTT TCTC3' | Sentido Antisentido | 386 |
| Kv1.7 | 5' GGT GTG GGC CAG CCG GCT ATG TCC CTG GCC3' 5' CAT CCA GCT GTC ACA CCT CAG TCA CCA TGT GTT TCCC3' | Sentido Antisentido | 576 |
| Kv1.10 | 5' CCG AGT GCC CAA CAG AAC ATG TCC CTG GCC3' 5' CAT CCT CGA GTC ATT TCC TAG ACT TCT CTG TGG AACA3' | Sentido Antisentido | 552 |

4.2.- Oligonucleótidos de las subfamilias Kv2, Kv3, Kv4 y Kv7.

4.2.1.- Se buscaron secuencias reportadas en el banco de genes de cada uno de los miembros de las subfamilias.

4.2.2.- Se alinearon dichas secuencias utilizando el programa MultAlin⁴.

4.2.3.- A partir de la región del extremo amino terminal se tomaron fragmentos conservados entre los miembros de cada familia de aproximadamente 20 pb y se mandaron a sintetizar.

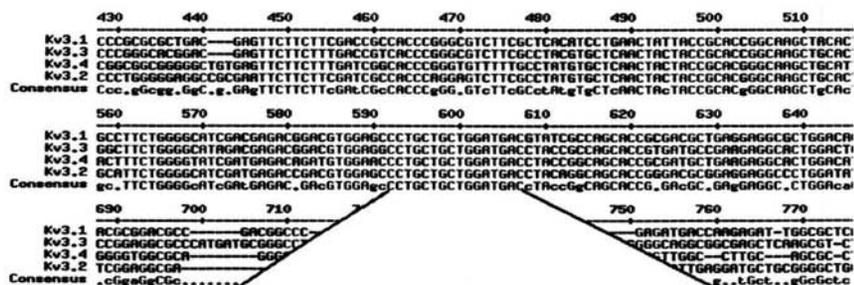


Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos sintetizados y pesos esperados.

| Subfamilia | Secuencia | Sentido | Peso aproximado (pb) |
|-----------------|---|------------------------|----------------------|
| Kv ₂ | 5' TCC AGA TCT TTC GMA TCA TGC 3' 5' GTT CAT RGA MAC GAT GCT 3' | Sentido Antisentido | 460 |
| | 5' TGG CSG CMA AGA TCC TG 3' 5' TGA TGG TAG CCC ACC A 3' | Sentido Antisentido | 560 |
| Kv ₃ | 5' TCC ATY ACM ACC TTY TG 3' 5' ATG GTY AGC ACW CCA GCC A 3' | Sentido Antisentido | 684 |
| | 5' GTG GAR SCC TGC TGC TGG ATG AC 3' 5' CAC AGC CCA CCA GAA RCC RAT GGG 3' | Sentido Antisentido | 900 |
| Kv ₄ | 5' TGG MGG GCC TTY GAG AA 3' 5' AGT TCT GAS GCA CAG CTC TT 3' | Sentido Antisentido | 450 |
| | 5' TTC TAC TAY GTG ACM GGS TTC TTC AT 3' 5' GAC KCC GCT YAG KGA GCA GAT 3' | Sentido Antisentido | 620 |
| Kv ₇ | 5' TCC GCT TCC TKC AGA TCC TGC G 3' 5' GCA GYG TGG ATG AGT 3' | Sentido Antisentido | 450 |
| | 5' ACC TGG ARG CTC CTG GGC TC 3' 5' TAC TGC TCR ATK ACA TCT 3' | Sentido Antisentido | 910 |

R= A o G

W= A o T

K= G o T

M= A o C

Y= C o T

S= G o C

Los números de acceso de NCBI para las secuencias de los canales Kv utilizadas son: Kv1.2 (M74449), Kv1.4 (P15385), Kv1.5 (Q61762), Kv2.1 (X16476), Kv2.2 (M77482), Kv3.1 (M68880), Kv3.2 (M59211), Kv3.3 (X62841), Kv3.4 (M84210), Kv4.3 (AB003587.1), Kv4.1 (NM_008423.1), Kv4.2 (NM_019697.2), Kv7.1 (AJ133685), Kv7.5 (AF263836), Kv7.4 (XM_143960), Kv7.3 (NM_152923.1) y Kv7.2 (AF087454).

5) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

5.1.- Se establecieron las condiciones óptimas variando la temperatura de alineamiento y la concentración de MgCl₂

5.2.- Preparar la mezcla de reacción para PCR.

| Reactivo | | Volumen por reacción (µl) |
|-------------------|--|---------------------------|
| H ₂ O | Grado B.M | 34.0 |
| Buffer 10X | (Tris HCl 100mM, KCl 500 mM, pH 8.3) | 5.0 |
| dNTP's | (dATP, dTTP, dCTP, dGTP 10 Mm, pH 7.0) | 1.0 |
| MgCl ₂ | (25 mM) GIBCO BRL | 1.5 (puede variar) |
| Oligo 1 | 10 µM | 2.0 |
| Oligo 2 | 10 µM | 2.0 |
| ADN templado | 50 ng | 4.0 (puede variar) |
| Taq-Pol | 5 U/µl | 0.5 |

En caso de que se formen burbujas en el tubito al momento de preparar la reacción, este se puede centrifugar brevemente.

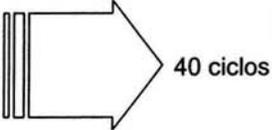
5.3.- Introducir el tubo de reacción en el termociclador con las temperaturas de incubación previamente programadas.

Establecimiento de las condiciones de reacción para PCR.

5.3.1.- Se realizan una serie de reacciones de PCR en las que únicamente se varía la temperatura de alineamiento, en un intervalo de 49 °C a 63°C con incrementos de 2°C.

5.3.2.- Se realiza una serie de reacciones variando en cada una la concentración de MgCl₂ en un intervalo de 1 mM a 4 mM con incrementos de 0.5 mM. (se utiliza la T de alineamiento óptima obtenida en el inciso 5.3.1).

En general el protocolo de tiempos y temperaturas utilizado para el PCR fue:

| | | |
|-------------------|-------------------|---|
| | 94°C → 10min | |
| Temperatura de: | | |
| Desnaturalización | 94°C → 1min |  |
| Alineamiento | 49 a 63 °C → 1min | |
| Extensión | 72°C → 1min | |
| | 72°C → 10min | |
| | 4°C → ∞ | |

6) Electroforesis en gel de agarosa para ADN.

- 6.1.- Pesar 0.3 g de agarosa LE.
- 6.2.- Agregar 30 ml de buffer TBE 1X.
- 6.3.- Calentar en el horno de microondas hasta disolver la agarosa.
- 6.4.- Agregar 1.4 µl de bromuro de etidio (10 µg/µl).
- 6.5.- Vaciar la solución en el molde para el gel y dejar enfriar.
- 6.6.- Agregar buffer TBE 1X a la cámara de electroforesis.
- 6.7.- Cargar la muestra en el gel y someterlo a 90 volts.
- 6.8.- Revelar el gel exponiéndolo a luz U.V.

7) Purificación de los productos de PCR (concert gel extraction systems, GIBCO BRL®).

| Reactivos | Componentes |
|-------------------------------------|--|
| Buffer de solubilización del gel L1 | Perclorato de sodio concentrado, acetato de sodio, solubilizador TBE |
| Buffer de lavado L2 | Cloruro de sodio, EDTA y tris-HCl |
| Agua B.M. | Tris-HCl 10 mM [pH 8], EDTA 0.1 mM |

- 7.1.- Precalear el agua a 65-70°C.
- 7.2.- Equilibrar un termoblock a 50°C.
- 7.3.- Cargar las muestra de ADN a purificar en un gel de agarosa al 1% y realizar la electroforesis.
- 7.4.- Revelar el gel exponiéndolo en luz U.V y cortar la banda que contiene el fragmento de ADN que se quiere.
- 7.5.- Pesar el fragmento de gel y ponerlo en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- 7.6.- Agregar 300 µl de buffer de solubilización L1 por cada 10 mg de gel.
- 7.7.- Incubar a 50°C por al menos 15 min o hasta que se solubilize el gel agitando cada min.
- 7.8.- Una vez solubilizado el gel dejar incubar 5 min. más.
- 7.9.- Colocar la columna en un tubo para lavado de 2 ml.
- 7.10.- Colocar máximo 500 µl del gel solubilizado en una columna.
- 7.11.- Centrifugar a 12000 rpm. durante 1min y descartar el volumen eluído.

Lavado opcional.

- 7.12.- Colocar de nuevo la columna en el tubo de lavado.
- 7.13.- Agregar 500 µl de buffer de solubilización L1 en la columna.
- 7.14.- Incubar 1 min a temperatura ambiente.
- 7.15.- Centrifugar a 12000 rpm durante 1 min.
- 7.16.- Descartar el volumen eluído.

Lavado.

- 7.17.- Colocar una vez más la columna en el tubo de lavado.
- 7.18.- Agregar 700 µl de buffer de lavado L2 (con etanol) a la columna.
- 7.19.- Incubar 5 min a temperatura ambiente.
- 7.20.- Centrifugar a 12000 rpm durante 1 min.
- 7.21.- Descartar el volumen eluído.
- 7.22.- Centrifugar 1 min más para eliminar el buffer de lavado L2 residual.

- 7.23.- Colocar las columnas en un tubo para recuperación de 1.5 ml.
- 7.24.- Adicionar 50 μ l de agua precalentada, justo en el centro de la columna.
- 7.25.- Incubar 5 min. a temperatura ambiente.
- 7.26.- Centrifugar a 12000 rpm por 2 min.
- 7.27.- Verificar la purificación realizando una electroforesis en gel de agarosa.

APÉNDICE DE SECUENCIAS.



Model 3100

Version 3.7

Basecaller-3100SR.bcp

BC 1.3.0.0

KV1-2_Poro1-2.ab1

Noe Bahena

9102

Cap 11

Signal G:2177 A:1886 T:1255 C:926

DT3100POP6(BD)jv2.mob

demo_3100

Points 643 to 5750 Pk 1 Loc: 556

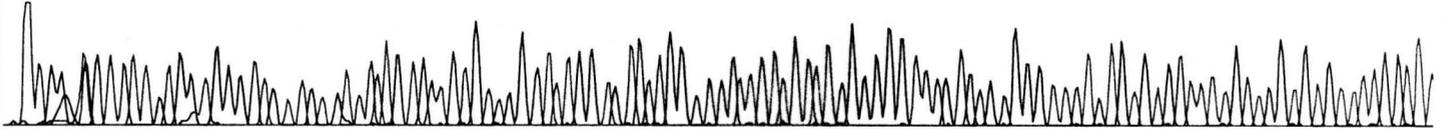
Page 1 of 1

Fri, Jan 23, 2004 6:21 PM

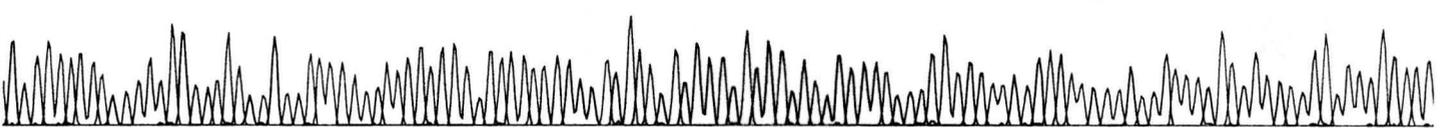
Fri, Jan 23, 2004 1:51 PM

Spacing: 11.50{11.50}

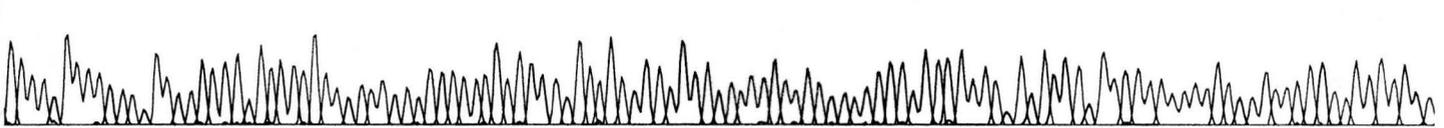
CCCGG ATG CCTT CTGGTGGG CAGT CGT CT CHTG ACAACTGTAGG CTA TGG AG ACATGG TTCCACTACCA TTGGGGGAAAG ATAG TGGGTCTCTGTGTGCAATTCGAGG TGTGT TAACCA TT
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120



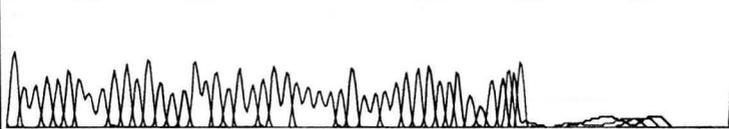
TGC CTTAC CAG TCCCCTGTCATAGTGTCTAA TTTCAACTACTTCTACAC CGGG AGACAG AGGGAGAGGAGCAGGCCAGTACTTGCAAGTGACAAG TTGTCCAAAG ATCCCGTCTCCCTGACC
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240



TAAAG AAAAGTAGAAGTGCCCTCTACCAT AAGTAAGTCTGATTACATGGAGATACAGGAGGGAGTAACAACAGTAA TGAGGAC TT TAG AGAGGAG AACTTAAAA CAGCCACTGTACCTTGGC
250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370



TAACAACAATATGTGAATA TACCAAATGTTAACTGATGCTGCTC NNNNGGAN TGGNNNN
380 390 400 410 420 430



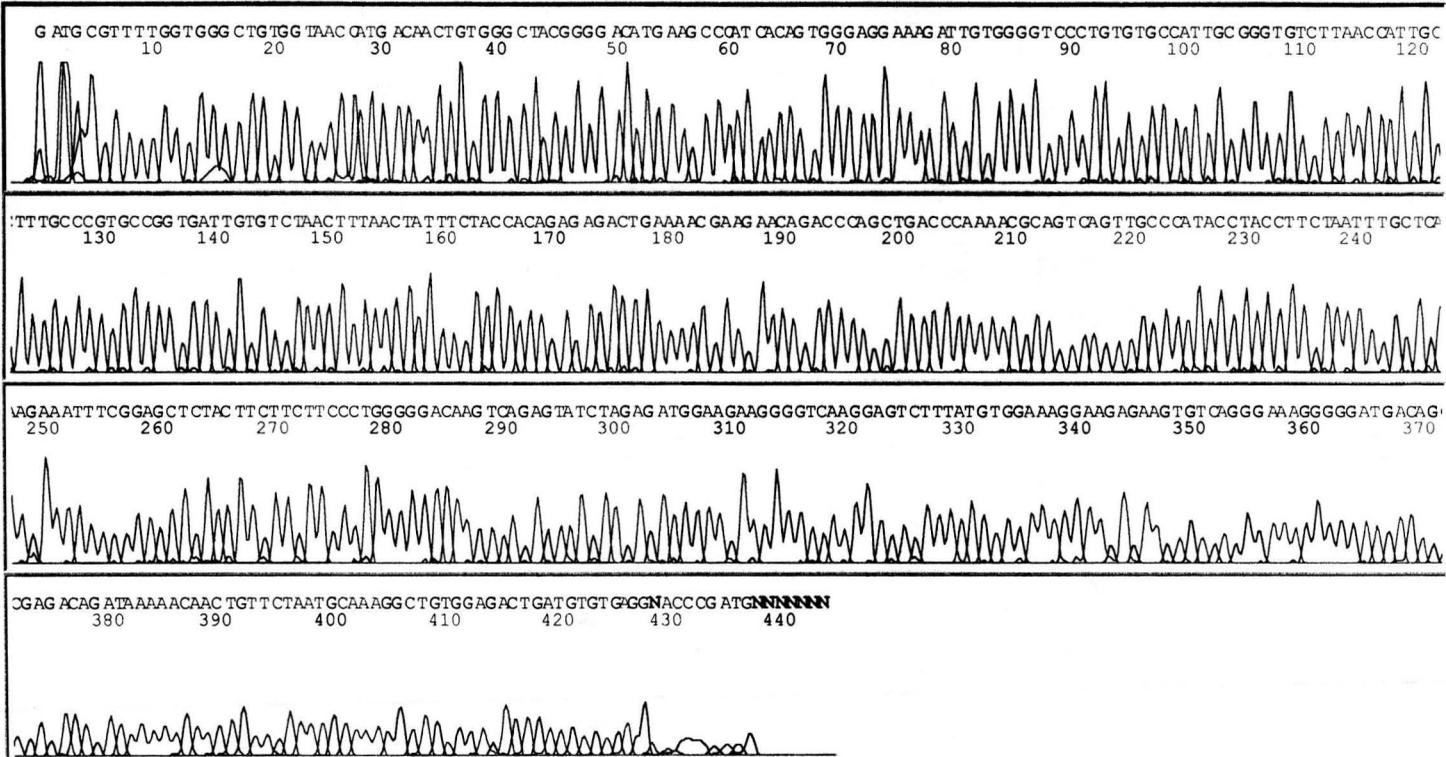


Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100SR.bcp
BC 1.3.0.0

DNA1-4_1-4PoroUP.ab1
Noe Bahena
9103
Cap 13

Signal G:1337 A:606 T:394 C:276
DT3100POP6(BD)v2.mob
demo_3100
Points 655 to 5900 Pk 1 Loc: 585

Page 1 of 1
Fri, Jan 23, 2004 6:19 PM
Fri, Jan 23, 2004 1:51 PM
Spacing: 11.50(11.50)



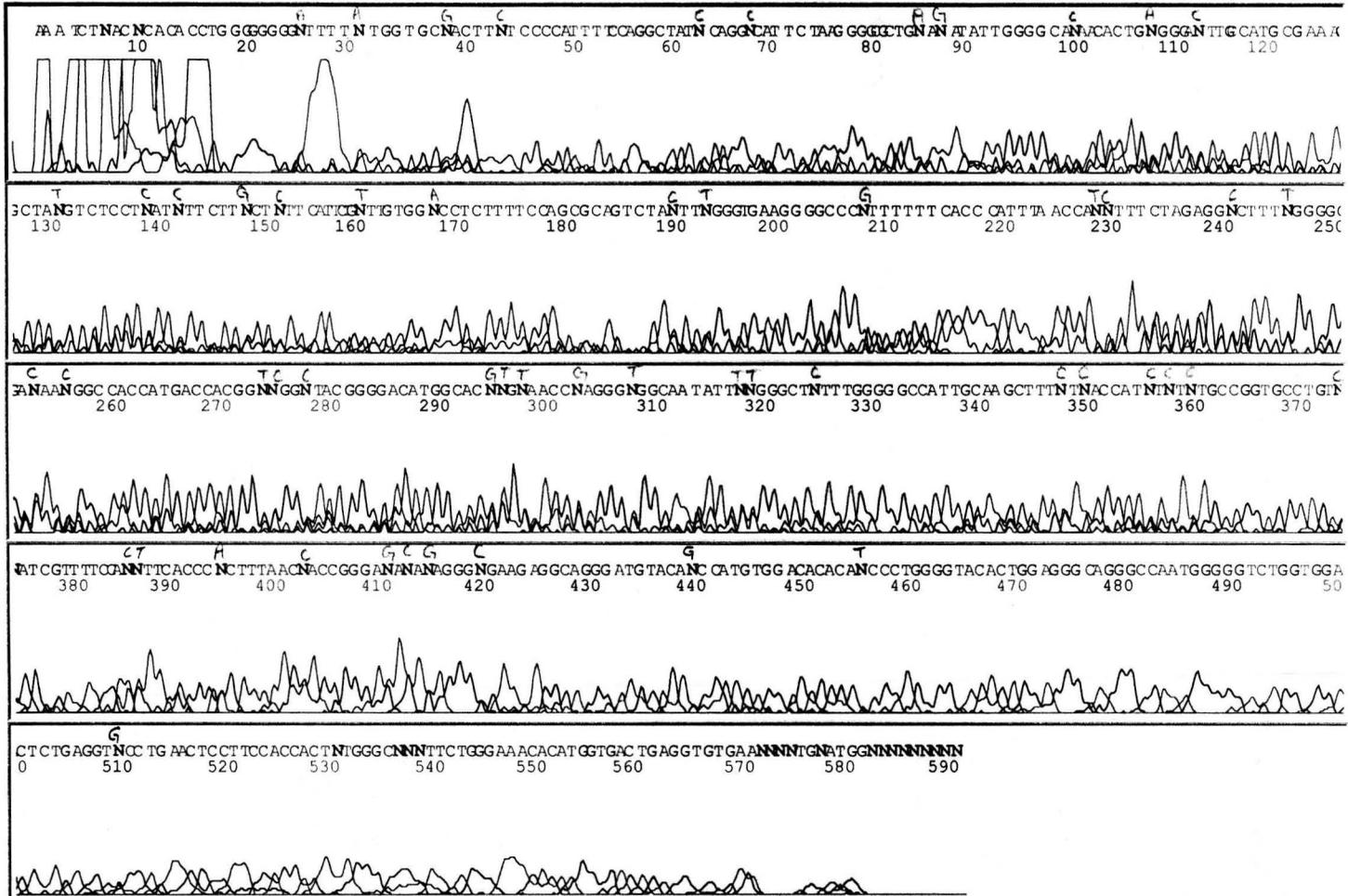


Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100SR.bcp
BC 1.3.0.0

KV1-7_1-7poroUP.ab1
Noe Bahena
9134r
Cap 1

Signal G:558 A:250 T:224 C:163
DT3100POP6(BD)v2.mob
demo_3100
Points 514 to 7250 Pk 1 Loc: 514

Page 1 of 1
Fri, Feb 06, 2004 2:03 PM
Tue, Feb 03, 2004 5:29 PM
Spacing: 11.91{11.91}



Ku2.1

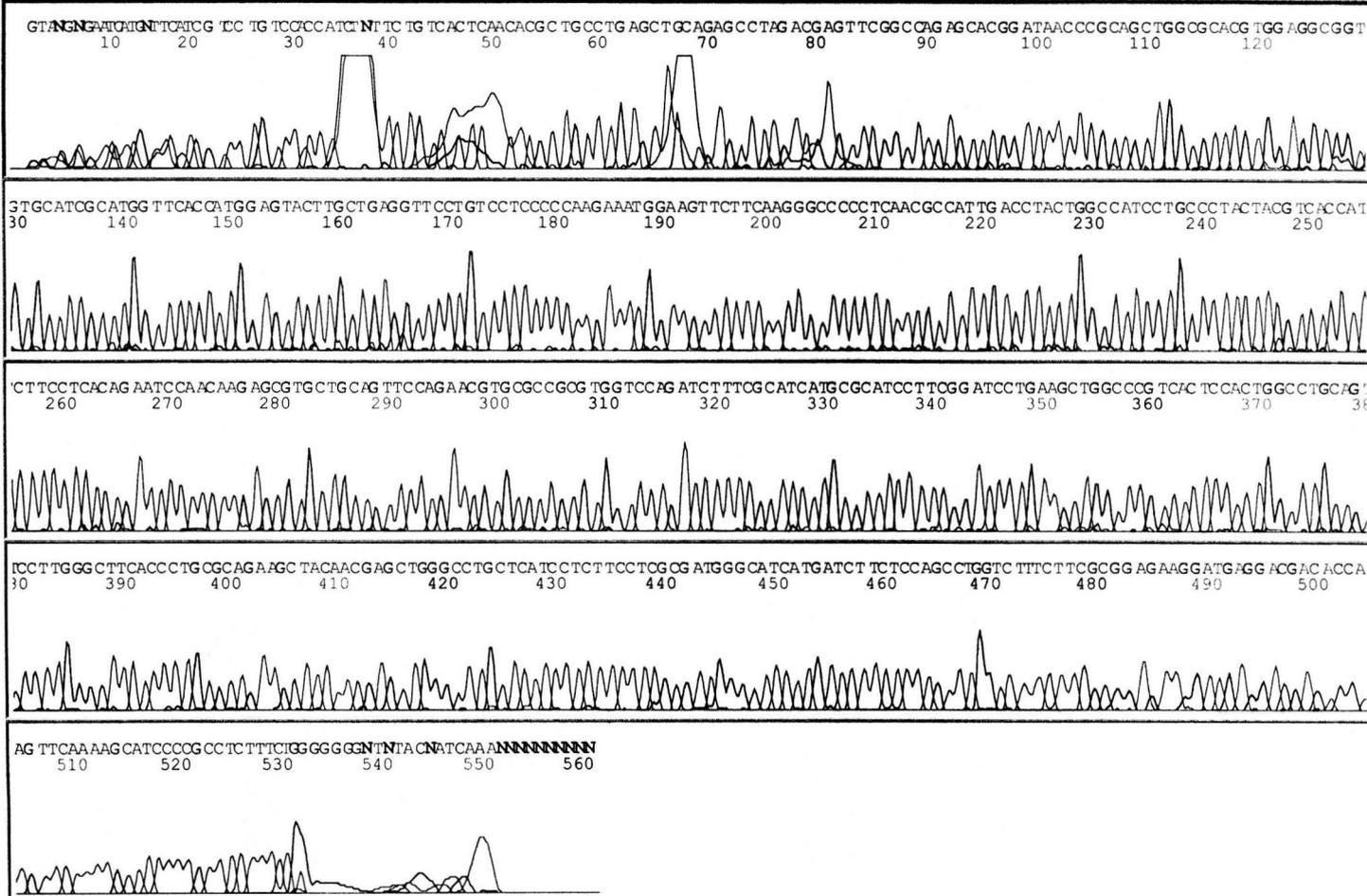


Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100POP6SF10357
BC 1.5.0.0

Ku2_2up641.ab1
Noe Bahena
Cap 14

Signal G:1060 A:684 T:636 C:889
DT3100POP6(BDv3)v1.mob
3100
Points 616 to 6750 Pk 1 Loc: 616

Page 1 of 1
Tue, Jun 22, 2004 9:28 AM
Mon, Jun 21, 2004 4:47 PM
Spacing: 11.38(11.38)



Kv 4.3

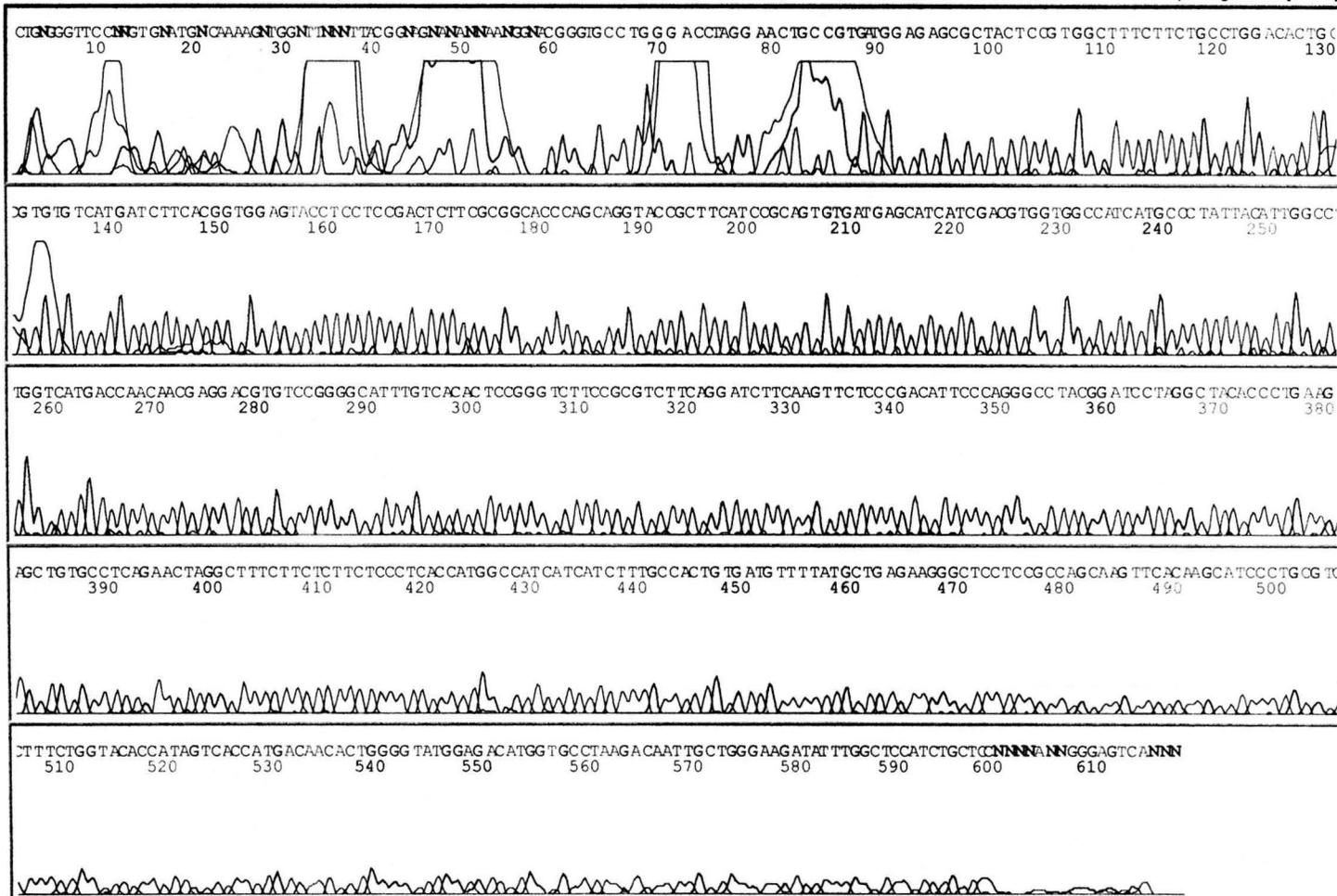


Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100POP6SF10371
BC 1.5.0.0

Kv4_4up898.ab1
Noe Bahena
Cap 13

Signal G:463 A:389 T:402 C:447
DT3100POP6{BDv3}v1.mob
3100
Points 630 to 6900 Pk 1 Loc: 620

Page 1 of 1
Fri, Jun 25, 2004 10:59 AM
Thu, Jun 24, 2004 5:34 PM
Spacing: 10.89{10.89}



Kv 7.1



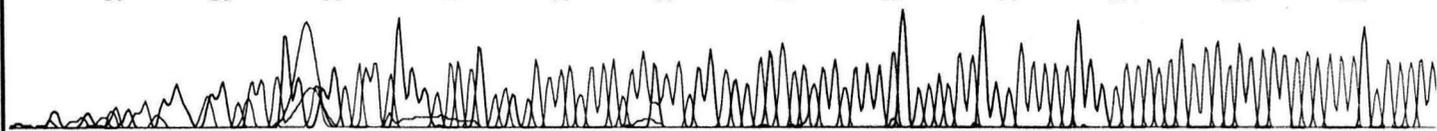
Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100POP6SF9973
BC 1.5.0.0

Kv7_7up710.ab1
Noe Bahena
Cap 8

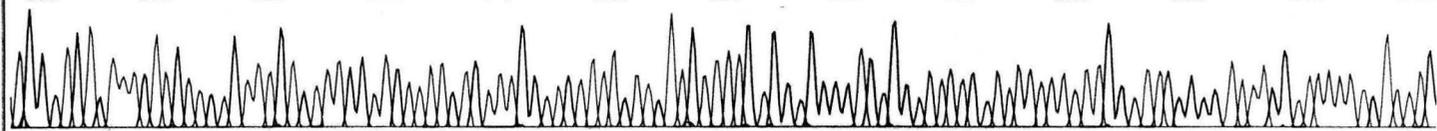
Signal G:2728 A:1399 T:1469 C:1803
DT3100POP6{BDv3}v1.mob
3100
Points 575 to 5100 Pk 1 Loc: 537

Page 1 of 1
Fri, Apr 30, 2004 10:23 AM
Thu, Apr 29, 2004 5:49 PM
Spacing: 10.78{10.78}

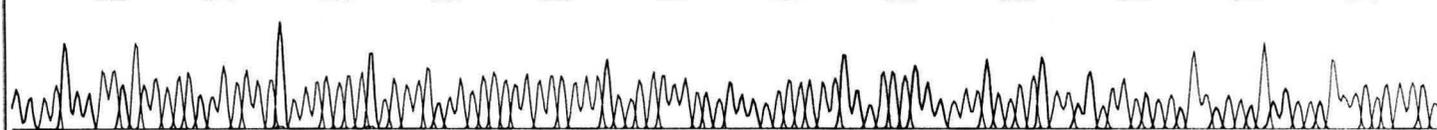
GC NG T TG A C G C C A G G G A G G T T C C T G G A G G C T C T G T A G T C T T C A T T C A C C G C C A G G A G C T G A T C A C C A C C C T G T A C A T T G G C T T T C T G G G T C T C A T C T T C T C C T A C T T T T G T C T A C C



T G G C T G A G A A G A T G C A G T G A A T G A G T C C G G C C G C A T C G A G T T T G G C A G C T A C G C A G A T G C T C T G G T G G G G A G T G G T C A C A G T C A C C A C C A T T G G C T A C G G G G A T A G G T A C C C C A G A C A T G



G G T T G G G A A G A C C A T C G C C T C C T G T T T C T C T G T C T C G C C A T A T C T C T T T G C A C T C C A G C G G G C A T A C T T G G C T C T G G G T T T G C A C T G A A G G T C C A G C A G A A G C A G A G G C A G A A A C A C T T C A



A C C G G C A G A T C C C A G C G C A G C C T A N N N T T N N C N N N A A C T G C A A N N N N N N N N N

