



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL
SULFONATO DE TETRAFENIL PORFIRINA
SOBRE CANALES DE POTASIO.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Q U Í M I C A

P R E S E N T A :

NANCY EVELYN ORTIZ NEPOMUCENO



MÉXICO D.F.

2009



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. Carmen Giral Barnés

VOCAL: Prof. José Luz González Chávez

SECRETARIO: Prof. José de Jesús García Valdés

1er. SUPLENTE: Prof. José Ignacio Páramo Ramírez

2do. SUPLENTE: Prof. Minerva Carrasco Fuentes

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 113 "Bioelectroquímica Analítica" Edificio F, Facultad de Química.
Ciudad Universitaria, México D.F.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José de Jesús García Valdés

SUSTENTANTE:

Nancy Evelyn Ortiz Nepomuceno

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por regalarme la vida, el tiempo y la capacidad para realizar mis estudios a nivel profesional en esta Universidad Nacional.

Gracias.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por la prestación de sus servicios y por el cobijo en sus instalaciones de la Facultad de Química para poder realizar mis estudios.

Gracias

A mi asesor de tesis, **Dr. José de Jesús García Valdés**, que fue mi guía para realizar esta investigación, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su apoyo, paciencia, tiempo dedicado y por su amistad.

Gracias

Al apoyo financiero otorgado por el **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)** Claves IN215508 e IN208305 a través de la DGAPA.

Gracias

A mi jurado asignado **Carmen Giral Barnés, José Luz González Chávez, José de Jesús García Valdés, José Ignacio Páramo Ramírez y Minerva Carrasco Fuentes**, por su revisión y observaciones de este trabajo.

Gracias

A los que me acompañaron en el laboratorio: **Roxana, Paty, Xochiquetzal, Iván, Thalina, Suany y Sandra**.

Gracias

A mis compañeros de trabajo **Nabor, Rubí, Silvia, Liliana, Cristina, Mauricio, Juan, Eduardo, Daniel, Cecy, Victor, Angel, Saúl, Lidia, Maritza** y especialmente a **Rosalía Rodríguez** por su comprensión y apoyo para terminar la tesis.

Gracias

DEDICATORIAS

A **Dios** por permitirme realizar el presente trabajo que marca el fin de mis estudios de licenciatura en Química, siendo uno de los logros más importantes en mi vida, por permitirme contar con el apoyo de muchas personas para ello, por darme la fuerza, la vida y el impulso para terminar mi carrera profesional.

A mi padre **Daniel** y a mi madre **Cruz**, por sus valiosos consejos, y aunque hemos tenido una gran cantidad de momentos difíciles, siempre su figura me ha ayudado a lograr mis objetivos y uno de ellos es este logro profesional.

A mis hermanos **Mileny, Isaac, Berenyce y Daniela**, a ustedes más que a nadie les agradezco su apoyo, porque aunque seguimos inmersos en un gran problema, su protección, cariño y confianza en mí han sido muy necesarios para poder terminar mi licenciatura.

A **Blanca, Gerardo, Salvador y Giovanny**, porque han apoyado incondicionalmente a mi familia.

A **Alfredo Aguilar**, porque tu presencia en mi vida alimenta mi alma de amor, felicidad y alegría, porque nada, ni este escrito sería lo mismo sin ti.

A **Humberto Díaz** por ser mi aliado en el mundo de las locuras, por haberme encontrado y ofrecerme tu mano para no caer en los momentos más difíciles, por tu gran cariño, amistad y compañía. A tu familia, por los consejos y apoyo otorgados hasta hoy en día.

Por su complicidad en la facultad, por los momentos buenos y malos que he pasado con cada uno de ustedes, mis amigos y compañeros Químicos: **Jair, Paty L., Sandra, Paty C., Yunuem, Melisa, Araceli, Suany, Erándi, Alicia, Andrea, Eduardo, Chucho, Norma, Iván, Alberto C., César, Ana, Moisés, Fermín, Omar, Pily, Tere, Toño, Xóchitl, Karla, Yareth y Mauricio**.

A **Alberto** laboratorista por tu amistad y ayuda a lo largo de mis estudios.

A aquellos que estuvieron conmigo en los primeros niveles escolares, porque siempre me impulsaron en el camino del estudio, porque una de nuestras metas hoy la estoy logrando, por ustedes **Oscar, Reyna, Marcela, Rocío y Esmeralda**.

*Entre las penumbras del hombre y sus vicios,
nace la esperanza que alimenta toda fe;
siempre es mal momento,
siempre es buen momento,
solo hay el presente para probar ser feliz...*

Alfredo O. Aguilar

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas.	3
Índice de figuras.	5
Resumen.	6
1. MARCO TEÓRICO.	
1.1 Canales iónicos: Definición y función.	9
1.2 Canales de potasio.	12
1.3 Canal <i>Shaker</i> .	15
1.4 Canal TASK-3.	17
1.5 Terapia fotodinámica y sulfonato de tetrafenil porfirina.	18
1.6 Especies reactivas de oxígeno y apoptosis.	22
1.7 <i>Xenopus laevis</i> , expresión heteróloga en ovocitos.	30
1.8 Fijación de voltaje por dos electrodos.	31
2. ANTECEDENTES.	34
3. OBJETIVOS.	
3.1 Objetivo general.	37
3.2 Objetivos particulares.	37
4. DISEÑO EXPERIMENTAL.	
4.1 Extracción de ovocitos.	38
4.2 Inyección del mRNA.	39

4.3 Estudio electrofisiológico de los canales iónicos.	39
4.4 Expresión heteróloga del mARN.	40
4.5 Estudio espectroscópico UV- Visible.	41
4.6 Ensayos electrofisiológicos y actividad del sulfonato de tetrafenil porfirina.	41
5. RESULTADOS.	
5.1 Expresión heteróloga del canal iónico.	43
5.2 Efecto del sulfonato de tetrafenil porfirina sobre los canales iónicos.	47
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	
6.1 Expresión heteróloga de los canales iónicos	52
6.2 Expresión del sulfonato de tetrafenil porfirina sobre los canales iónicos.	52
7. CONCLUSIONES.	55
 Perspectivas.	 56
Bibliografía.	57
Apéndice.	64

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AGP	Ácidos grasos poliinsaturados.
APAF	Apoptosis protease-activating factor-1.
Arg	Arginina.
ATP	Adenosine triphosphate.
Bad	Bcl- associated death promoter.
Bak	Bcl-2- antagonist killer.
Bax	Bcl-2- associated X protein.
Bcl-2	B-cell leukemia-lymphoma 2.
DTNB	5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico).
E	Potencial.
FADD	Factor associated death domain.
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico.
HpD	Hematoporfirina.
I	Corriente iónica.
IAP	Inhibitors apoptosis proteins.
KHz.	Kilo hertz.
Kv	Voltage-gated potassium channel.
L [·]	Radical lipídico.
Lys	Lisina.
M	Molar.
mARN	Ácido ribonucleico mensajero.

MTSEA	Metanotiosulfonato etil amonio.
OH [·]	Radical hidroxilo.
P	Poro.
PDT	Photodynamic Therapy.
POL	Peroxidación lipídica.
PS	Photosensitizer.
ROS	Reactive oxygen species.
S	Segmento transmembranal.
-SH	Grupo sulfhídrico.
SOD	Superóxido dismutasa.
t	Tiempo.
TASK	TWIK-related acid sensitive K ⁺ channel.
TWIK	Tandem pore-domain in weak inward K ⁺ channels.
TEA	Tetra etil amonio.
TEVC	Two electrodes voltage clamp.
TNF	Tumoral necrosis factor.
TPPS ₄	Meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin. (Sulfonato de tetrafenil porfirina)
X.	Xenopus.
2TM-1P	Dos segmentos transmembranales con un solo poro.
4TM/2P	Cuatro segmentos transmembranales y dos poros.
6TM-1P	Seis segmentos transmembranales con un solo poro.

Índice de figuras.

1.1	Estructura de la membrana celular.	9
1.2	Clasificación de los canales de potasio en cuanto a su topología.	15
1.3	Estructura del sulfonato de tetrafenil porfirina, TPPS ₄ .	21
1.4	Metabolismo celular del O ₂ .	23
1.5	Vías de señalización para activar las caspasas efectoras de la apoptosis.	29
1.6	Rana <i>X.laevis</i> y ovocitos utilizados para los ensayos electrofisiológicos.	31
1.7	Protocolo típico empleado en la técnica de fijación de voltaje.	32
5.1	Gráfica de la $I = f(t)$ e $I = f(V)$ del canal <i>Shaker</i> expresado en ovocitos.	45
5.2	Gráfica de la $I = f(t)$ e $I = f(V)$ del canal TASK-3 expresado en ovocitos.	46
5.3	Gráfica de la actividad del TPPS ₄ en canales endógenos.	47
5.4	Gráfica de la actividad del TPPS ₄ en el canal <i>Shaker</i> .	49
5.5	Gráfica de la actividad del TPPS ₄ en el canal TASK-3.	50

RESUMEN.

La membrana celular es una estructura que envuelve a las células y las dota de identidad, está formada de una bícapa lipídica, glúcidos, y proteínas. Para que los iones atraviesen la membrana requieren de un mecanismo de transporte específico, llamado canales iónicos (Guyton, 1997).

Los canales iónicos son proteínas transmembranales oligoméricas con un poro hidrofílico en toda su longitud que comunica los medios intra y extracelular, estos canales permiten flujos de orden de millones de iones por segundo y están involucrados en la regularización metabólica, secreción hormonal, tono vascular y señalización para el sistema nervioso, entre otras. Además son selectivos, permitiendo el paso de un tipo específico de iones y casi todos son activables, es decir, pueden pasar de un estado cerrado (que no permite el paso de iones) a un estado abierto (Guyton, 1997).

Los canales iónicos dependientes de potencial son indispensables para la generación, determinación y transducción de señales eléctricas en ciertas células (típicamente nerviosas y musculares). Presentan la característica de ser excitables, es decir, tienen la capacidad de cambiar rápida y transitoriamente su potencial de membrana en respuesta a un estímulo, lo que conduce a la expresión del pasaje de iones por el canal, ejemplo de este canal es el formado por cuatro subunidades separadas e iguales, cada una de las cuales tienen seis tramos

hidrófobos transmembranales (S1-S6), entre los cuales se encuentran el canal Shaker (Doyle, 1998).

Otro canal iónico a estudiar que no es dependiente del voltaje, es TASK-3, el cual pertenece a una familia no muy estudiada de canales de potasio con cuatro segmentos transmembranales y dos segmentos formadores del poro (4TM/2P) (Kim, 2000). Ciertos canales de potasio y en especial TASK-3 son sobreexpresados en células cancerígenas y están involucrados con la muerte celular programada o apoptosis (Mu, 2003).

La terapia fotodinámica (PDT) es una forma de tratamiento local citotóxico, actualmente muy estudiado, que puede ser efectiva para una amplia variedad de condiciones: neovascularización corneal, queratosis actínica, Sarcoma de Kaposi y varios tipos de cáncer. Fundamentalmente se basa en un agente fotosensibilizador (PS), que puede ser porfirinas y sus derivados; preferentemente se acumulan en los tejidos blanco e interactúan con la luz visible y oxígeno molecular, para generar especies reactivas de oxígeno (ROS), causando la apoptosis celular y por lo tanto destrucción del tumor (Chang, 2003).

Las porfirinas fueron usadas por primera vez como PS en 1911, se comenzó con derivados de hematoporfirina pero eran altamente retenidas en la célula, actualmente se encuentran en investigación los derivados de tetrafenilporfirina sulfonato, rodamina 123 entre otros (Alcocer, 2000).

La importancia de este proyecto es ver la acción del sulfonato de tetrafenil porfirina (TPPS₄) sobre estos canales iónicos de potasio. Se utilizará la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos (TEVC) para caracterizar y monitorear las corrientes iónicas de los canales Shaker y TASK-3.

MARCO TEÓRICO.

1.1 Canales iónicos: Definición y Función.

La membrana celular está constituida por una bicapa lipídica, con un gran número de proteínas, muchas de ellas atravesando esta bicapa (transmembranales) o sobre ella (periféricas), esta membrana actúa como barrera que separa el medio extracelular del intracelular, ambos acuosos y de distinta composición (Figura 1.1).

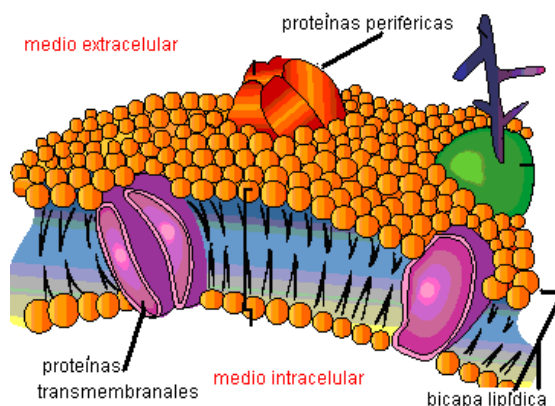


Figura 1.1. Estructura de la membrana celular

Los iones son inmiscibles en los lípidos de la membrana y que para atravesarla requieren de mecanismos específicos de transporte. En algunos

casos, los iones pasan a través de poros hidrofílicos denominados canales iónicos a favor de su gradiente de concentración o uniéndose a proteínas transportadoras “carriers”; ambos sistemas de transporte son pasivos y, por tanto, no consumen energía. Otras veces, el transporte iónico se realiza contra un gradiente electroquímico, desde la zona más diluida a la más concentrada, utilizando unas proteínas denominadas bombas iónicas. Esta forma de transporte es activa y requiere el consumo de energía procedente del metabolismo energético celular.

Los canales iónicos regulan una amplia gama de funciones fisiológicas como la señalización neuronal, la excitabilidad cardíaca y las respuestas del sistema inmune (Friederich, 2003). Principalmente desarrollan 3 funciones fundamentales (Tamargo, 2004):

- a) Permiten el flujo de iones a una velocidad muy superior a la de cualquier otro sistema biológico (10^8 iones/s frente a 10^3 iones/s que mueve un transportador o una ATPasa con función de bomba iónica). El flujo de iones que atraviesa cada canal puede medirse como una corriente eléctrica, que produce rápidos cambios en el potencial de membrana.
- b) Las características del propio canal, como son sus cambios eléctricos en su superficie interna y estructura, definen la selectividad de los iones y moléculas transportadas.

c) En respuesta a un estímulo, las proteínas del canal son capaces de adoptar diversos estados conformacionales. En general, existe un estado conductor (estado abierto, que permite el paso de iones), y otro, no conductor (estado inactivo y de reposo). A nivel del potencial de reposo celular, la probabilidad de apertura de algunos canales es mínima, es decir, que sólo un reducido número de canales puede abrirse al azar, pero sí pueden abrirse en respuesta a un estímulo adecuado. La despolarización celular aumenta la probabilidad de apertura del canal. La magnitud de la corriente que cruza la membrana depende de la densidad de canales, de la conductancia del canal abierto y de cuánto tiempo el canal permanece en dicho estado.

De acuerdo a sus propiedades cinéticas (activación-inactivación), características farmacológicas y al estímulo que determina el cambio conformacional, podemos clasificar los canales iónicos en:

- a)** activados por cambios de voltaje (canales voltaje-dependientes Kv),
- b)** activados tras la interacción de un agonista con su receptor específico localizado en la superficie de la membrana celular (canales receptor-dependientes),
- c)** activados por mediadores intracelulares (Ca^{2+} , ATP, proteínas-quinasas) y
- d)** activados por deformación mecánica celular (canales activados por distensión o aumento del volumen celular).

1.2 Canales de potasio.

Los canales de K^+ representan el grupo más numeroso, heterogéneo y ubicuo de proteínas estructurales de membrana. Están compuestos por subunidades α y β , siendo la primera, responsable de la conducción del ion a través de la membrana (Florez, 1987). En las células excitables, la apertura de los canales de K^+ facilitan la salida de este catión a través de la membrana y su mecanismo de acción se basa en la sensibilidad a la diferencia de potencial en ambos lados de ésta. En una célula en reposo, la concentración intracelular de potasio es mucho mayor a la exterior (155 mM frente a 4 mM en células musculares), lo que facilita la salida del catión a favor de su gradiente electroquímico, generando así una corriente de salida (Armstrong y Hille, 1998).

Estos canales juegan un papel importante en el mantenimiento del potencial de reposo celular, la liberación de neurotransmisores y hormonas, la excitabilidad celular, el transporte de electrolitos por las células epiteliales, la contracción del músculo liso y la regulación del volumen celular. Además, constituyen la diana terapéutica de fármacos, toxinas y neurotransmisores que modulan la función celular. Las disfunciones y mutaciones en estas proteínas están relacionadas con las enfermedades neurológicas como Alzheimer, Parkinson y epilepsia, así también con cáncer, metástasis, disfunciones de los músculos lisos, disfunciones neuromusculares, parálisis muscular, ataxias, sordera, arritmia cardíaca e infartos al miocardio (Cooper y Jan, 1999; Jan y Jan, 1997; Lehmann y Jurkat, 1999; Minor, 2001).

Las principales características de los canales de potasio es que poseen un poro que permite el flujo de iones a través de la membrana, un filtro de selectividad para un tipo de iones y un mecanismo de apertura que se encarga del cambio conformacional del canal para abrirlo o cerrarlo.

Una clasificación general se basa en la secuencia primaria de aminoácidos que forman el poro y a la topología que presentan en la membrana (Figura 1.2). Tres grupos son reconocidos:

A) **6TM-1P**. Los voltaje dependientes (Kv), que contienen subunidades de seis segmentos hidrofóbicos transmembranales (S1-S6), con un solo poro. En el segmento S4, cada tres aminoácidos uno se encuentra con carga positiva (Lys/Arg) y los otros dos son hidrofóbicos, esta estructura y su movimiento es la base de la sensibilidad al voltaje (Papazian y cols., 1991; Aggarwal y MacKinnon, 1996).

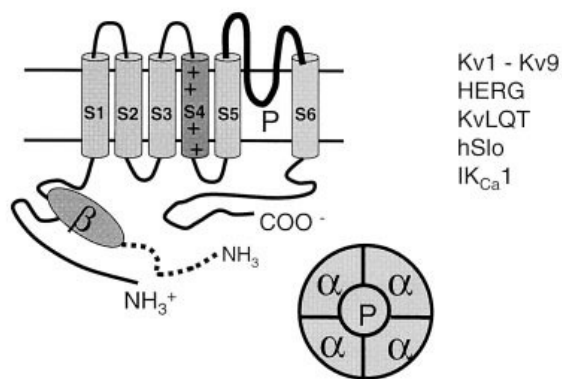
B) **2TM-1P**. Los rectificadores entrantes de potasio (Kir), formados por subunidades de dos segmentos transmembranales (S1-S2), con un solo poro. El primer canal Kir fue clonado en 1993 (Kubo, 1993) y actualmente se conocen siete subfamilias. Describen la tendencia a actuar como válvula favoreciendo la entrada de iones potasio durante hiperpolarizaciones de la membrana y bloqueando la salida frente a despolarizaciones de ésta (Nichols y Lopatin, 1997).

C) **4TM-2P.** Los formados por subunidades de cuatro segmentos transmembranales, con dos poros. Tienen un comportamiento de activación rápida con corrientes rectificadoras débiles selectivas a potasio, son sensibles al voltaje de activación y contribuyen a fijar el potencial de membrana cercano al de equilibrio del K^+ (Rajan y cols., 2000). Hasta la fecha existen 16 miembros de esta familia y muestran una compleja regulación por estímulos físicos y químicos incluyendo tensión membranal, hipoxia, cambios en osmolaridad, temperatura o pH (Noriega, 2007).

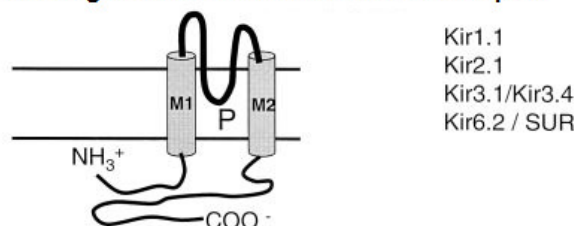
La estructura básica de estos canales está formada por dos dominios transmembranales conectados por una región bucle que entra y sale de la bicapa lipídica por el lado exterior de la membrana plasmática. Este bucle, llamado dominio P, forma parte esencial del poro, en el caso de los 4TM se encuentra repetido. Este dominio tiene una secuencia de aminoácidos conservada, que constituye parte esencial del filtro de selección para el ion potasio (Heginbotham, 1994; Aiyar, 1996).

Mediante predicciones por unión a toxinas (Mackinnon, 1991) y más tarde por estudios de microscopía electrónica y cristalografía, se ha demostrado que los canales de potasio los conforman tetrámeros de subunidades alfa (Li, 1994; Doyle, 1998).

A. Seis segmentos transmembranales con un poro



B. Dos segmentos transmembranales con un poro



C. Cuatro segmentos transmembranales con dos poros

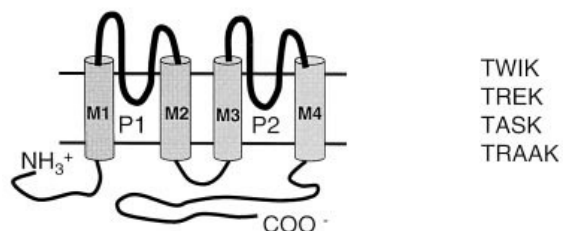


Figura 1. 2. Clasificación de los canales de potasio en cuanto a su topología. A) Canales 6TM-1P, B) Canales 2TM-1P Y C) Canales 4TM-2P. Char-Chang 2000.

1.3 Canal *Shaker*.

Yuh Nung y Lily Jan fueron los primeros en determinar la secuencia de ADN del canal Shaker en el año 1987 (Papazian, 1987), y es Roderick Mackinnon y colaboradores quienes elucidan la estructura tridimensional de este canal y explican de qué forma se lleva la selectividad hacia el ion potasio, haciéndose acreedores del premio Nobel de Química en el año 2003.

El canal *Shaker* de *Drosophila melanogaster* es uno de los canales voltaje-dependientes más estudiado, pertenece al grupo de canales de **6TM-1P**. El segmento S4 (sensor de voltaje), tiene cuatro cargas eléctricas positivas, por lo que se desplaza hacia el exterior durante la despolarización (cuando el potencial intracelular se vuelve más positivo) de la membrana (Wang y cols., 1999). Este movimiento de S4 lleva al cierre o a la apertura de la vía de paso de la corriente eléctrica.

La región entre los segmentos S5 y S6 forma el poro que es el responsable de la rápida y selectiva conducción iónica (Shih y Goldin 1997).

Como respuesta a una despolarización de membrana prolongada, se restringe el movimiento de iones a través del poro mediante el proceso de inactivación, en la cual se distinguen dos: tipo N y tipo C. La primera ocurre en los primeros milisegundos después de la apertura, tiene cierta dependencia de voltaje.

A finales de los setenta se desarrolló un modelo llamado “bola y cadena”, en la cual una bola de inactivación (primeros 20 aminoácidos del extremo N-terminal) bloquea el canal por la parte interna del poro (Shih y Goldin 1997; Chyuan, 1992). La tipo C es más lenta, se origina por cambios conformacionales de la parte externa del poro y depende de la ocupación de un lugar de unión para iones potasio externamente, de tal forma que ésta tiene que quedar libre para que proceda la inactivación (Holmgren y cols. 1996).

1.4 Canal **TASK-3**.

El canal TASK-3, es un polipéptido de 374 aminoácidos, perteneciente al grupo 4TM-2P, formado de dos subunidades que se dimerizan mediante puentes disulfuro (Florez, 1987), es sensible al pH del medio y se expresa en riñón, hígado, pulmón, colon, músculo esquelético, sistema nervioso central y particularmente en cerebelo (Rusznák, 2007).

Es un canal rectificador saliente y se distingue por estar activo o abierto en el rango fisiológico de potencial de membrana, esto ayuda a recuperar el potencial de reposo después de una excitabilidad celular, por lo que se le ha llamado canal de fuga.

Su actividad es sensible al pH, anestésicos inhalatorios (halotano, enflurano), anestésicos locales (lidocaína, bupivacaína), tensión de oxígeno, cambios en presión osmótica, temperatura y neurotransmisores que se unen a receptores de proteínas G. Aumenta cuando se depolariza el potencial de membrana, y se ve ligeramente afectada por Ba^{2+} , tetraetilamonio, y aminopiridina, siendo totalmente inhibida por rojo de rutenio (Kim, 2005).

TASK-3 está envuelto en un gran número de funciones fisiológicas, que incluyen la regulación de aldosterona, restauración de excitabilidad neuronal, duración de eventos post sináptico y participa de manera interesante aunque su función exacta no es muy clara en la inducción de la muerte celular programada o

apoptosis, como consecuencia de una disminución en el volumen celular, provocada por la reducción de la concentración intracelular de potasio y la activación de caspasas y nucleasas (Rusznák, 2007).

A pesar de las funciones pro-apoptosis, también tiene funciones tumorogénicas. Se ha observado que en tumores cancerígenos (cáncer de mama, pulmón, colon y próstata), el gen KCNK9 que codifica la proteína de TASK-3 es sobreexpresada de 5 a 100 veces, llevando a un aumento del 44 % del canal. (Rusznák, 2007). Bloqueando su actividad por disminución en el pH o por medio de la transfección con una mutante no funcional, se observa una disminución de la apoptosis en ese tipo de células (Lauritzen et al., 2003).

1.5 Terapia fotodinámica y sulfonato de tetrafenil porfirina.

La terapia fotodinámica (PDT) fue descrita por primera vez en 1900 cuando el agente fotosensible acridina fue encontrado en la paramecio expuesta a la luz. Es una nueva forma de tratamiento local citotóxico que puede ser efectivo para una amplia variedad de condiciones: neovascularización corneal, queratosis actínica, Sarcoma de Kaposi y varios tipos de cáncer que incluye: pulmón, mama, esófago, vejiga, estómago, cuello uterino, cabeza, cerebro, intestino y piel, entre otros. Fundamentalmente se basa en un agente fotosensibilizador (PS) que se acumula en los tejidos blancos e interactúa con la luz visible y oxígeno molecular, generando especies reactivas de oxígeno (Gelfuso, 2007).

Esta terapia se puede llevar a cabo por dos reacciones, una implica la generación de los radicales libres, y la otra incluye la producción de oxígeno singulete, el cual es el principal responsable de la muerte celular. El tratamiento para llevar una terapia fotodinámica consiste en:

- Aplicación endovenosa de un fotosensibilizador (PS) a dosis de 2 mg/kg
- Aplicación de luz laser al tercer día de la aplicación.
- Una segunda aplicación de luz laser puede ser dada entre las 96 y 120 horas de post- aplicación.
- Los pacientes pueden recibir una segunda dosis de PS, 30 días después de haber iniciado la terapia y es posible realizar hasta tres ciclos, es importante evaluar al paciente para descartar fístula traqueo bronquial.

Las ventajas de la PDT son que técnicamente es fácil de aplicar, provoca destrucción selectiva del tumor, tiene menor posibilidad de perforación bronquial o esofágica, puede ser aplicada con anestesia local, disminuye el riesgo de sangrado intraoperatorio y se puede combinar con otro tipo de procedimientos como radioterapia y cirugía (Alcocer, 2000).

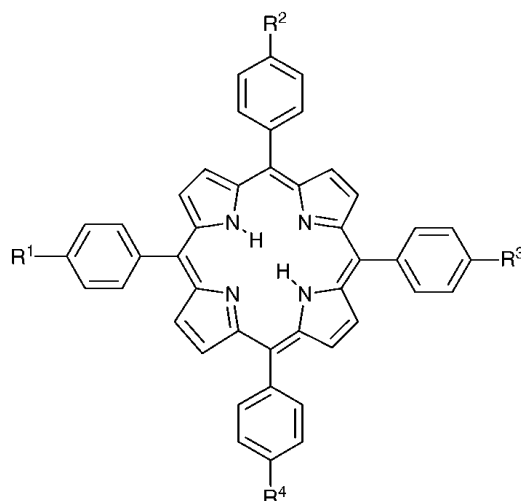
La terapia fotodinámica se ve afectada por las propiedades físicas del sensibilizador (PS), su distribución en el tejido biológico, profundidad de penetración y longitud de onda de la luz de activación (Gelfuso, 2007).

Agentes fotosensibles como las porfirinas fueron usados por primera vez en 1911, pero es hasta 1950 cuando Lipson y col. prepararon derivados de hematoporfirina (HpD), encontrando que ésta era retenida en un gran porcentaje por las células adenocarcinomas y carcinomas de células escamosas. Usando múltiples sesiones de tratamiento con HpD, Lipson reportó una evidencia citotóxica en una paciente con cáncer de mama (Lipson, 1960).

Se ha observado que la porfirina es acumulada y retenida por el endotelio vascular a través del mecanismo de endocitosis. En modelos con ratas los niveles más altos se han encontrado en el hígado, glándulas adrenales y vejiga. La vida media en el suero humano es de 20 a 30 horas, pero en la piel se encuentra hasta por seis semanas.

Actualmente el mecanismo de acción de la PDT usando derivados de porfirina es explorada en áreas de oncología y principalmente se encuentran en investigación derivados de sulfonatos de tetrafenil porfirina y rodamina 123, entre otros (Alcocer, 2000).

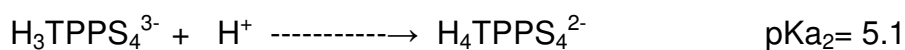
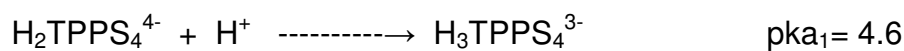
El TPPS₄ es una porfirina formada por un macrociclo tetrapirrólico (Figura 1.3), con distintos efectos biológicos, es estable y soluble en agua a temperatura ambiente; proporciona un gran rendimiento de especies reactivas de oxígeno (ROS). Su purificación es muy importante, debido a que puede tener efectos neurotóxicos.



TPPS₄; R¹ = R² = R³ = R⁴ = SO₃Na

Figura 1.3. Estructura del sulfonato de tetrafenil porfirina, TPPS₄.

Puede ser protonado en medio ácido y son Satoshi Tsukahara y Hitoshi Watarai, quienes demostraron que en solución acuosa el TPPS₄ tiene dos valores de pka muy cercanos para las dos protonaciones que se pueden llevar a cabo en los nitrógenos del anillo porfirínico.



Las porfirinas en solución pueden formar agregados, lo cual depende de la concentración, pH, fuerza iónica, temperatura, sustituyente y disolvente (Rubires, 1999). El cambio en su estructura, así como su pureza, pueden ser estudiadas por espectroscopia UV-Visible; muestran una banda característica llamada banda de Soret cercana a 400 nm.

Para identificar qué especie se tiene presente a un pH de trabajo y además verificar que no hay interferencia de algún agregado, se analizan sus espectros de absorción del TPPS₄ a diferente pH. En medio básico y neutro se observa una absorción máxima de la especie no protonada H₂TPPS₄⁴⁻ en 414 nm de longitud de onda y cuatro muy cercanas a 519, 522, 580 y 634 nm (Gandini, 2003).

En medio ácido se observa una banda de absorción máxima de la especie biprotonada H₄TPPS₄²⁻ en 434 nm y otras dos en 594 y 645 nm.

Cuando existen agregados de porfirina, la banda de Soret se ve afectada por los efectos bato e hipsocrómico, dando una señal diferente al de las especies libres. Este efecto sólo es posible verlo con espectroscopía UV-Visible.

1.6 Especies reactivas de oxígeno y apoptosis.

En todos los tipos celulares se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) como consecuencia del metabolismo celular del oxígeno (Figura 1.4). Las mitocondrias son las principales proveedoras de energía química en forma de ATP, y son las responsables del uso de más del 95 % del oxígeno en la célula. Se ha estimado que cerca de 1-5 % del oxígeno consumido por las mitocondrias es convertido a ROS en condiciones fisiológicas normales. Por otro lado, también existen factores externos que forman estos radicales como la luz ultravioleta, la radiación ionizante, altas temperaturas y sustancias químicas (Martínez, 2005).

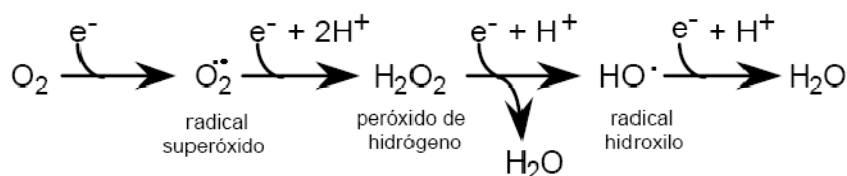


Figura 1.4. Metabolismo celular del O₂. Reducción del oxígeno a agua en sucesivas cesiones de un electrón

Tienen funciones fisiológicas, entre ellas participar en los mecanismos de señalización celular, la eliminación de gérmenes, entre otras. Por otra parte, cuando se desajusta el equilibrio oxidante/antioxidante a favor de los primeros se conduce al estrés oxidativo, de forma que se llega a afectar el estado redox celular (Martínez, 2005). Una oxidación moderada puede desencadenar la apoptosis, mientras que si es muy intensa puede provocar la necrosis.

El oxígeno molecular (O₂) en su estado basal es un diradical que presenta dos electrones desapareados de *espines* paralelos, por lo que no puede aceptar en su orbital molecular un par de electrones con *espines* antiparalelos a la vez, sino que debe aceptar uno por uno; lo que impide que el O₂ reaccione directamente.

El principio de exclusión de Pauli (1925) establece que un orbital atómico no puede ser ocupado por más de 2e⁻ y para que estos 2e⁻ lo ocupen deben tener *spines* contrarios (+1/2 y -1/2). La restricción de *spin* puede evadirse de tres formas (lo que permite que el O₂ pueda ser utilizado para la generación de energía):

1. Al excitarse el O₂, uno de los e⁻ sin parrear puede pasar a otro orbital de

más energía y así invertir su *spin*. De esta forma se genera el oxígeno singlete (altamente reactivo) representado como $^1\text{O}_2$.

2. La unión del O_2 a un metal de transición que contiene e^- sin aparear forma complejos que pueden aceptar un par de e^- de otros sustratos sin violar el principio de exclusión de Pauli.
3. La restricción de *spin* puede violarse mediante la adición de e^- al O_2 paso a paso. La reducción univalente del O_2 involucra la producción de especies parcialmente reducidas de O_2 . (Martínez, 2005)

Los radicales originados en las reducciones parciales del oxígeno son:

Radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Se forma a partir de una molécula de oxígeno en presencia de una cantidad de energía suficiente, que le permita adquirir un electrón. Es un radical poco reactivo pero puede penetrar las membranas biológicas y causar daños a blancos específicos, con un $t_{1/2}$ de milisegundos, se dismuta por vía enzimática en H_2O_2 y O_2 (Fridovich, 1989). En presencia de metales como el hierro o el cobre, inicia una cascada de eventos oxidativos que tienen como componente crítico la reacción de Haber-Weiss, produciendo el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Bajo condiciones de sobreproducción puede interactuar con los grupos sulfhídricos $-\text{SH}$ de las proteínas y enzimas de su vecindad e inactivarlas (Martínez, 2005).

Radical hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$). Se forma esencialmente a partir de H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$, a través de las reacciones de Haber-Weiss y Fenton. Es el radical más reactivo

encontrado en los sistemas biológicos, tiene la capacidad de reaccionar con casi todas las moléculas biológicas, dañando las hebras y las bases del ADN, además oxida cualquier molécula orgánica. Su interacción con los ácidos grasos poliinsaturados (AGP), que componen los fosfolípidos de las membranas, son esenciales en el origen del daño oxidativo celular. El $\cdot\text{OH}$ puede atacar un átomo de hidrógeno metilénico de un AGP y formar un radical lipídico ($\text{L}\cdot$), el cual se combina con una molécula de oxígeno e inicia una reacción en cadena, este proceso es conocido como peroxidación lipídica (POL), que compromete la pérdida de fluidez en la membrana, alteraciones en las funciones secretoras y en los gradientes iónicos (Martínez, 2005).

Entre las especies no radicalarias de mayor interés biológico está el H_2O_2 .

Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2). Se forma in vivo en la mitocondria predominantemente por dismutación espontánea o enzimática (SOD y varias oxidasas) del anión superóxido. A bajas concentraciones es poco reactivo, sin embargo, a altas concentraciones pueden interactuar con los sistemas de generación de energía de las células e inactivarlas, estimula la liberación de calcio por la mitocondria (ciclo de calcio) y es capaz de oxidar grupos $-\text{SH}$. Su efecto más nocivo es la formación de $\cdot\text{OH}$ catalizado por metales de transición (reacción de Fenton). Estos efectos conllevan a la apoptosis o necrosis celular (Martínez, 2005; Chakraborti et al., 1999).

Recientemente se ha sugerido que el nivel intracelular de las especies reactivas de oxígeno, tienen un papel en la regulación de expresión de algunos genes (Roberfroid, 1995), y que la regulación del estado redox intracelular es un mecanismo de control versátil en las expresiones génicas y de transducción de señal, incluyendo aquellos que median la apoptosis (Arakaki et al, 1999).

Robert Horvitz investigador del Instituto de Massachusetts, compartió con Sydney Brenner de California y John Sulston en Cambridge, Inglaterra el premio Nobel 2002 de Fisiología por sus descubrimientos acerca de la regulación genética del desarrollo de órganos y la muerte celular programada o apoptosis, en el gusano nematodo *Caenorhabditis elegans*. La apoptosis se caracteriza por el encogimiento del citoplasma, condensación de la cromatina y la fragmentación de la membrana nuclear, que trae como consecuencia la formación de cuerpos apoptóticos.

Una vez que la célula está destinada a una muerte programada sigue una vía de eventos reproducibles que consiste en tres etapas secuenciales. Primero en matar a la célula, después librarse del cuerpo y en tercer lugar destruir la evidencia.

Estos investigadores han descubierto que en el mecanismo molecular que controla la apoptosis actúan varios agentes, de los cuales unos son los más importantes y mejor estudiados: los complejos cisteinil-aspartato proteasas (caspasas). Presentan un residuo de cisteína que media la ruptura de otras

proteínas y son las responsables de la degradación proteica bien definida hasta llegar a la formación de cuerpos apoptóticos (Ellis, 1991). Se han descrito 11 caspasas en células humanas; su clasificación es en iniciadoras (caspasas -10, -8 y -9) y efectoras (caspasas -3, -6 y -7) del proceso catalítico. Las primeras activan las formas inactivas de las efectoras, para que a su vez procesen a otros sustratos proteicos que mediarán las distintas vías de apoptosis. (Miller, 1998)

La activación de las caspasas, se puede llevar a cabo de forma extrínseca o intrínseca. (Figura 1.5). En la primera se establecen conexiones con el espacio extracelular recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y las células vecinas. Dos familias de receptores se han identificado con estas características: la proteína Fas y el factor de necrosis tumoral (TNF). La proteína transmembranal FAS en su porción intracelular enlaza un factor intermedio denominado FADD (factor associated death domain), activando las caspasas 8 y 10. Las cuales activan a la caspasa-3.

De forma intrínseca, se llevan a cabo la activación de proteínas proapoptóticas, **a)** se produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembranal, entre ellas el citocromo c. Este citocromo activa un complejo proteico llamado apoptosoma, que activa directamente a la caspasa-9, y ésta posteriormente a la caspasa -3, lo que desencadena las últimas fases de la apoptosis. (Miller, 1998); **b)** liberación de Smac de las mitocondrias, uniéndose a un grupo de proteínas conocidas como “proteínas inhibidoras de apoptosis” (IAP),

que regulan a su vez otros complejos para activar las caspasas efectoras; **c)** La inhibición de la actividad represora de Bcl-2 (oncogén que bloquea la apoptosis) sobre APAF-1. Una vez liberado APAF-1, activa la caspasa-3, que hace estragos en la célula.

La familia de Bcl-2 se ha dividido en dos grupos, agonistas (Bax, Bad, Bak) y antagonistas (Bcl-2, Mcl-1) de acuerdo a su habilidad para favorecer o bloquear la apoptosis. Se ha demostrado que estas proteínas agonistas, producen canales iónicos no selectivos en las bicapas lipídicas; al parecer ésta es una de las vías mediante las cuales desencadena muerte celular, al alterar los niveles de iones intracelulares. En el caso de las proteínas antagonistas, se ha observado que la sobreexpresión de Bcl-2 y Mcl-1 en células, las hace parcialmente resistentes y aumentan la sobrevivencia de las células expuestas a luz UV e inducidas por radiación (Gilbert, et al.1996).

Esta sobreexpresión de Bcl-2 y Mcl-1 se asocia con un potencial de membrana hiperpolarizado con respecto a las células nativas. Lo más importante fue el hallazgo de que despolarizando a las células que sobreexpresan estas proteínas pierden el efecto protector, es decir presentan una mortalidad semejante a la de las células nativas (Gilbert, et al., 1996 y Wang et. al., 1999).

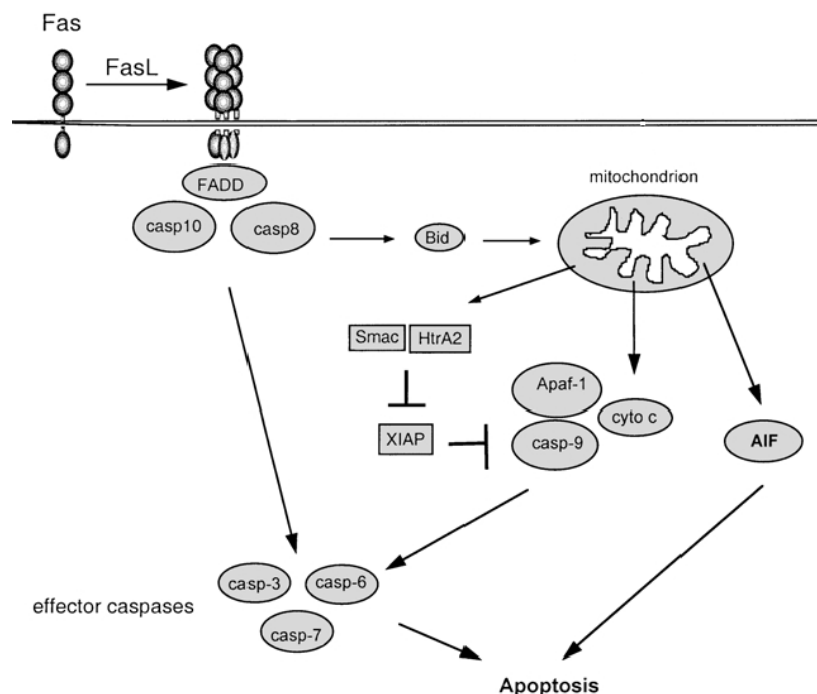


Figura 1.5. Vías de señalización para activar las caspasas efectoras de la apoptosis. (Chen, 2002)

Uno de los cambios morfológicos más característicos durante la apoptosis es la pérdida de volumen o encogimiento celular; esta alteración es típicamente mediada por cambios en los niveles de iones intracelulares (Hughes, et al.1997).

Se ha sugerido que en células cancerosas al utilizar diferentes inductores de apoptosis (Anti-Fas, taspigargina y A23187), se desencadena como evento intracelular inicial: el movimiento de iones, donde disminuye la concentración de K^+ intracelular y se da un aumento temprano en la concentración del Na^+ , estos cambios conducen a la despolarización de la membrana plasmática, la cual, precede a la reducción de volumen celular y se mantiene durante todo el fenómeno de apoptosis (Bortner et al., 2001).

1.7 *Xenopus laevis*, expresión heteróloga en ovocitos.

En 1971 se demostró la capacidad de los ovocitos de *Xenopus* para sintetizar hemoglobina después de la inyección del mRNA de la proteína correspondiente (Noriega, 2007), siendo aplicada esta técnica por primera vez en Neurobiología (1982), cuando el grupo de Ricardo Miledi mostró que la microinyección de mRNA procedente de músculo, inducía la expresión e incorporación funcional de receptores nicotínicos de acetilcolina en la membrana del ovocito.

La expresión en sistemas heterólogos ha sido una herramienta ampliamente utilizada en los últimos años para el estudio funcional y estructural de proteínas.

Los ovocitos de la rana sudafricana *X. laevis* aparte de traducir eficientemente la información genética inyectada en su citoplasma (Gurdon, 1971) y de ensamblar e insertar canales iónicos en su membrana para generar respuestas electrofisiológicas, proporciona ciertas ventajas, como son: su fácil manipulación ya que su diámetro es de 1.1-1.3 mm, son muy resistentes siempre y cuando se mantengan a temperaturas de 15-17 °C y el medio donde se encuentren sea removido al menos dos veces al día. Para una eficiente traducción y expresión de proteínas se necesita inyectar de 1–5 ng de mRNA. Bajo estos cuidados los ovocitos son funcionales hasta por 10 días después de la inyección. (Wagner, 2000).



Figura 1.6. Rana *X. laevis* (Izquierda) y ovocitos utilizados para los ensayos electrofisiológicos (derecha).

1.8 Fijación de voltaje por dos electrodos TEVC.

El estudio de las propiedades eléctricas de las células excitables ha sido vital para la comprensión de los mecanismos que regulan su función. Ejemplos típicos de células excitables son las musculares, glandulares y nerviosas, en las cuales la actividad eléctrica induce la contracción, la liberación de hormonas y el procesamiento de información, respectivamente.

El estudio detallado de las propiedades eléctricas se ha desarrollado con el empleo de dos técnicas fundamentales: La técnica de fijación de corriente y la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos *TEVC*. Con la primera se aplican pulsos rectangulares de corriente y se observan los cambios asociados en el potencial de la membrana de las células; y en el segundo, que es el de nuestro interés, se aplican pulsos rectangulares o rampas de voltaje y se observan las corrientes de membrana inducidas.

La técnica *TEVC* fue desarrollado por Cole (1949) y Hodgking (1952) para estudiar el axón gigante de calamar. Es usada para medir, en la célula completa,

las corrientes de los canales iónicos expresados en ovocitos de *X. Laevis*, permitiendo el control del potencial de membrana (Stühmer and Parekn, 1995), es indispensable el uso de protocolos de estimulación donde se introducen datos de los pulsos como son el número, la magnitud del primero, el incremento en amplitud de los subsiguientes y el intervalo de tiempo entre ellos. En los protocolos de estudio más empleados los pulsos tienen la misma duración, pero diferente amplitud, e inducen la apertura de los canales iónicos voltaje dependientes (Figura 1.7).

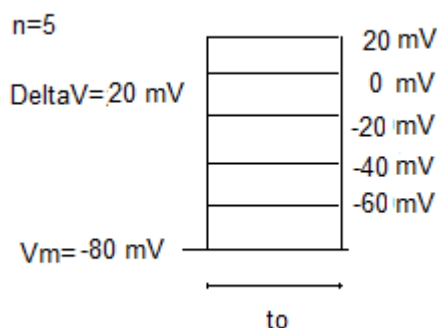


Figura 1.7. Protocolo típico empleado en la técnica de fijación de voltaje. A partir de un potencial de -80 mV se aplican 5 pulsos de voltaje de la misma duración (t_0) con incrementos de 20 mV.

Con esos datos se construyen curvas corriente-voltaje y se puede analizar la cinética de las corrientes iónicas (Velasco, 2005).

La técnica consiste en insertar dos electrodos de registro hechos con capilares de vidrio llenos de KCl (3 M) y en su interior electrodos de Ag/AgCl a la membrana de los ovocitos, un electrodo detecta el voltaje (E) y el otro inyecta una corriente (I). El electrodo *E* detecta el voltaje que se encuentra conectado a un amplificador, esta señal es comparada con un voltaje control dado por un

generador. La diferencia de potencial amplificada es suministrada como corriente a través del electrodo que inyecta corriente, a través de la membrana y un electrodo de referencia que se encuentra en el baño conectado a tierra. La corriente inyectada se mide para obtener una corriente total de la membrana. Cuando el flujo de iones o sustancias electrogénicas atraviesan la membrana se mide como desviación de la corriente base (Wagner, 2000 y Halliwell, 1994).

Las corrientes de los canales iónicos se activan con los pulsos a diferentes valores de potencial a un tiempo determinado (especificados en el protocolo de pulsos), estas corrientes se miden con un amplificador para ser registradas con un convertidor analógico digital conectado a una computadora que almacena los datos y mediante el software adecuado hacer el posterior análisis de las corrientes obtenidas.

ANTECEDENTES

La expresión en sistemas heterólogos es una herramienta ampliamente utilizada y fundamental para el estudio funcional y estructural de proteínas y para la caracterización de las propiedades biofísicas de canales, bombas y transportadores. En general el sistema para llevar a cabo la expresión es el ovocito de la rana sudafricana *Xenopus laevis* que ha mostrado una eficiente traducción de la información genética inyectada en su citoplasma (Chávez, 2003).

Este estudio reporta la actividad del compuesto porfirínico TPPS₄ en dos canales de potasio, *Shaker* y *TASK-3*; a este trabajo lo anteceden investigaciones sobre sus propiedades y uso en la terapia fotodinámica contra el cáncer; así también el efecto de agentes oxidantes en canales iónicos.

El desarrollo de medicamentos que afecten selectivamente estos canales y los estudios sobre las proteínas que causan apoptosis, serían de gran importancia para ofrecer los blancos en la terapia fotodinámica.

Actualmente en el tratamiento a la progresión del cáncer, se encuentran en investigación agentes fotosensibles, como es el TPPS₄ que genera especies

reactivas de oxígeno; conduciendo a la muerte celular programada (Bonchio, 2002 y Alcocer, 2000).

Berg y Moan estudian la fototoxicidad del TPPS₄ en células cancerígenas de cérvix, encontrando una inhibición del 20 % en el crecimiento tumoral en las primeras horas después de aplicar el tratamiento fotodinámico, ellos relacionan este resultado con la destrucción de la membrana celular en la interface, lo cual detiene el proceso de mitosis celular (Berg, 1990).

La apoptosis se define morfológicamente por el encogimiento del citoplasma, condensación de la cromatina y fragmentación del núcleo y de la célula como resultado de los cambios bioquímicos, entre ellos el movimiento de iones, disminuyendo la concentración iónica intracelular. Se han utilizado inhibidores de estos canales para poder ver el efecto en el proceso de apoptosis; al inhibir canales de potasio sensibles a TEA entre ellos Shaker y Maxicanal se ha visto una reducción del 40 % en la actividad de la caspasa 3 (Benitez y col., 2008).

Dada la importancia del movimiento intracelular existen sugerencias sobre qué canales o bombas iónicas son los responsable de los cambios iónicos y de la despolarización del potencial de membrana como parte de los eventos ocurridos durante la apoptosis. Sin embargo éstos no han sido muy estudiados (Guerrero, 2005).

El canal TASK-3 y el gen *kcnk9* que codifica para esta proteína han mostrado un 44 % de sobreexpresión en células cancerígenas. Pei modificó por mutación puntual la región del poro y encontró que se suprimían las funciones oncogénicas del canal. Además Lauritzen demostró que al inhibir las corrientes de TASK-3 la muerte celular es reducida (Mu, 2003; Ruznack, 2008; Pei, 2003 y Lauritzen, 2003).

La participación de TASK-3 en la apoptosis celular no es muy clara, en su investigación Rusznák cita que al activarse estos canales existe una serie de señalización que activa las enzimas proteolíticas (caspasas) dando lugar a la muerte celular (Ruznák, 2008).

Xiang y col. utilizaron Cloroamina-T para oxidar específicamente metioninas en la estructura de canales voltaje dependientes, expresados heterológamente y encuentran una actividad por medio del incremento en las corrientes macroscópicas. En contraste, experimentaron con DTNB: 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico) Y MTSEA: metanotiosulfonato etil amonio, agentes oxidantes específicos para cisteínas y encuentran una inhibición del canal al ver la disminución en las corrientes (Xiang, 2001).

OBJETIVOS.

3.1 Objetivo General.

Determinar la actividad del sulfonato de tetrafenil porfirina sobre las corrientes iónicas en los canales de potasio: *Shaker* y *TASK-3*.

3.2 Objetivos Particulares.

- Expresar heterológamente los canales *Shaker* y *TASK-3* en ovocitos de *Xenopus laevis*.
- Caracterizar los canales expresados, sometiéndolos a un protocolo de pulsos.
- Llevar a cabo ensayos control en ovocitos nativos.
- Realizar ensayos de actividad del sulfonato de tetrafenil porfirina, en ovocitos que expresan los canales iónicos *Shaker* y *TASK-3*.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

4.1 Extracción de Ovocitos.

La rana *Xenopus laevis* se anestesió por inmersión en hielo a 4 °C durante 40 minutos, se colocó en una cama de hielo y se cubrió con el mismo, dejando descubierta la parte baja del abdomen. Se le realizó una incisión de 0.5 cm aproximadamente y se extrajeron los lóbulos ováricos. La herida se cerró por capas con sutura quirúrgica catgut crómico # 5 (Atramat) y se dejó recuperar a la rana aislada durante 12 a 24 horas.

Al ser extraídos los lóbulos se colocaron en la solución ND-96, y posteriormente se disgregaron de forma mecánica con pinzas de disección hasta obtener cúmulos de 2-5 ovocitos; se enjuagaron con la solución OR-2 libre de calcio para ser tratados con colagenasa de *Clostridium histolyticum* (2 mg/mL) (SIGMA C-5138) durante 20-25 minutos con agitación suave y constante, transcurrido este tiempo se hicieron lavados con medio ND-96 para finalmente conservarlos en medio ND-96 con gentamicina (50 µg/mL) en incubación a 17 °C.

4.2 Inyección del mARN.

Se inyectaron ~50 nL (~2 ng) del mARN del canal iónico TASK-3 y de Skaker a cada ovocito desfoliculado de *X. laevis*.

Para esto se utilizó una micropipeta hecha de capilar de vidrio, previamente estirada en el estirador de capilares (Sutter Instrument CO., Mod. P-2000); la cual se rellenó con aceite mineral (SIGMA), y se sometió con el microinyector manual (Drummond, digital microdispenser) para manipular la cantidad de mARN.

Este microinyector se sujetó a un micromanipulador (WPI Inc. Mod.M3301) para controlar la distancia milimétrica necesaria en el acercamiento y posterior inyección al ovocito. Una vez inyectados se colocaron a 18 °C en ND96 con gentamicina de 1 a 2 días.

4.3 Estudio electrofisiológico de los canales iónicos.

Para el estudio electrofisiológico de los canales se utilizó la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (TEVC). El equipo utilizado fue un amplificador (Dagan Co., CA-1B), una interfase digital (Digidata 1440A, Axon CNS) conectada a una computadora. Las corrientes iónicas fueron estudiadas utilizando dos electrodos de Ag/AgCl insertados dentro de una solución conductora de KCl 3 M en micropipetas de capilar de vidrio (WPI Inc. Cat. No. TW150-4) previamente estiradas con el puller.

Estos microelectrodos se montaron en los cabezales del amplificador (V_1 y V_i) que son sostenidos por micromanipuladores (WPI Inc. Mod.M3301). Sólo se utilizaron electrodos con resistencia entre 0.3 y 1.5 M Ω , un microscopio binocular (Nikon SMZ-2T) y un iluminador de fibra óptica (Techniquip) para poder visualizar el ovocito en la cámara de perfusión

4.4 Expresión heteróloga del mARN.

Para determinar si el mARN de cada canal se expresó en los ovocitos, fueron sometidos a un protocolo de pulsos de forma particular para ver las corrientes macroscópicas.

Canal TASK-3

8 pulsos con duración de 465 ms desde -80 hasta 60 mV con un ΔV de 20 mV y un potencial de mantenimiento de -80 mV.

Canal Shaker

8 pulsos con duración de 465 ms desde -60 hasta 80 mV con un ΔV de 20 mV y un potencial de mantenimiento de -60 mV.

Las mediciones de las corrientes se realizaron a 2 KHz. El programa de adquisición utilizado fue Clampex (pClamp 10, Molecular Devices), la información obtenida se analizó con el programa Clampfit (Molecular Devices) y Microsoft Excel versión 2000.

Se trabajó con lotes diferentes de ovocitos sumergidos en medio ND-96, realizando tres series de experimentos (inyectados con mARN, H₂O y sin inyectar), cada uno con un mínimo de tres diferentes ovocitos.

4.5 Estudio espectroscópico UV-Visible.

Este estudio se hizo con la finalidad de ver que especie está presente y si hay formación de agregados en la disolución del sulfonato de tetrafenil porfirina (58.7 µM, medio ND-96, pH 7) utilizada para el ensayo de actividad iónica.

Se obtuvo el espectro UV-Visible al hacer un barrido en las longitudes de onda de 200 a 800 nm de longitud onda, con el espectrofotómetro UV-Visible (HP 8452A). En la lectura de la absorbancia se observaron dos bandas características de la especie no protonada H₂TPPS₄⁴⁻ en 414 y en 520 nm. No se ve desplazamiento de estas bandas, ni presencia de otras que puedan indicar formación de agregados de la porfirina. (Apéndice B).

4.6 Ensayos electrofisiológicos y actividad del sulfonato de tetrafenil porfirina.

Los ensayos electrofisiológicos se realizaron después de 1 a 7 días de la inyección de ARN, mediante la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos, a temperatura ambiente (22-24 °C). Los ovocitos se mantuvieron en una cámara de perfusión de 1 mL con medio ND-96 y se caracterizaron las corrientes macroscópicas de los canales de potasio en diferentes condiciones, iniciando con

ovocitos nativos, seguido de ovocitos inyectados con ARN, y después ambos en presencia de TPPS₄ en el medio (concentración final de 58.7 μ M en la celda).

Para hacer el ensayo de actividad, se registraron las corrientes iniciales hasta estabilizarlas, por lo que se perfundió varias veces el medio (con un intervalo de 5 min) con ND-96, hasta que no hubiera variación en la lectura de las corrientes. Ya estabilizadas se agregó el TPPS₄ y se registró la actividad minuto a minuto durante 10 minutos, pasado este tiempo se perfundió el medio con ND96 para retirar la porfirina.

Este procedimiento se realizó en al menos tres lotes diferentes, para ovocitos nativos e inyectados con mARN de cada uno de los canales.

El análisis de los datos se presenta como promedios $\pm$ desviación estándar. Las diferencias se consideraron con la prueba t de student, estadísticamente significativas a $P < 0 - 0.5$.

RESULTADOS.

5.1 Expresión heteróloga del canal iónico.

Los ovocitos utilizados para la expresión heteróloga de los canales iónicos se trataron previamente con colagenasa para remover la membrana folicular y se inyectaron con 50 nL (2 ng) el mRNA del canal de potasio TASK-3 y Shaker, después de 12 a 24 h post-tratamiento. Se mantuvieron a 17 °C en medio ND-96 con gentamicina.

Para observar la expresión de los canales, después de 4 días de ser inyectados con mRNA, se estimularon mediante un protocolo de pulsos específico para cada uno. Se compararon las corrientes de los ovocitos nativos sin inyectar, con respecto a los ovocitos inyectados con el mRNA del canal *Shaker* (Figura 5.1, Trazos $I = f(t)$) y TASK-3 (Figura 5.2, Trazos $I = f(t)$).

En la figura 5.1, inciso a), vemos que las corrientes endógenas de los ovocitos nativos con H₂O y sin inyectar son menores a 1 μ A ; en el inciso b), se presentan las corrientes iónicas, mayores a 5 μ A, correspondientes a los ovocitos inyectados con el mRNA del canal Shaker y en el inciso c), se muestra el análisis

en función del potencial, a 450 ms, un tiempo cercano al final del pulso de las corrientes presentadas en los dos casos anteriores.

En la figura 5.2, inciso a), vemos que las corrientes endógenas de los ovocitos nativos con H₂O y sin inyectar son menores a 1 μ A ; en el inciso b), se presentan las corrientes iónicas, mayores a 6 μ A, correspondientes a los ovocitos inyectados con el mARN del canal TASK-3 y en el inciso c), se muestra el análisis en función del potencial, a 450 ms, un tiempo cercano al final del pulso de las corrientes presentadas en los dos casos anteriores.

Estos resultados indican una diferencia marcada entre las corrientes endógenas de los ovocitos ($\ll 1 \mu$ A) y aquellas que fueron inyectados con el mARN del canal Shaker ($> 5 \mu$ A) y TASK-3 ($> 6 \mu$ A); indicando una expresión adecuada del ARN inyectado en la célula, de tal forma que al estimular el canal iónico con el protocolo de pulsos establecido, podremos evaluar la apertura como una corriente específica.

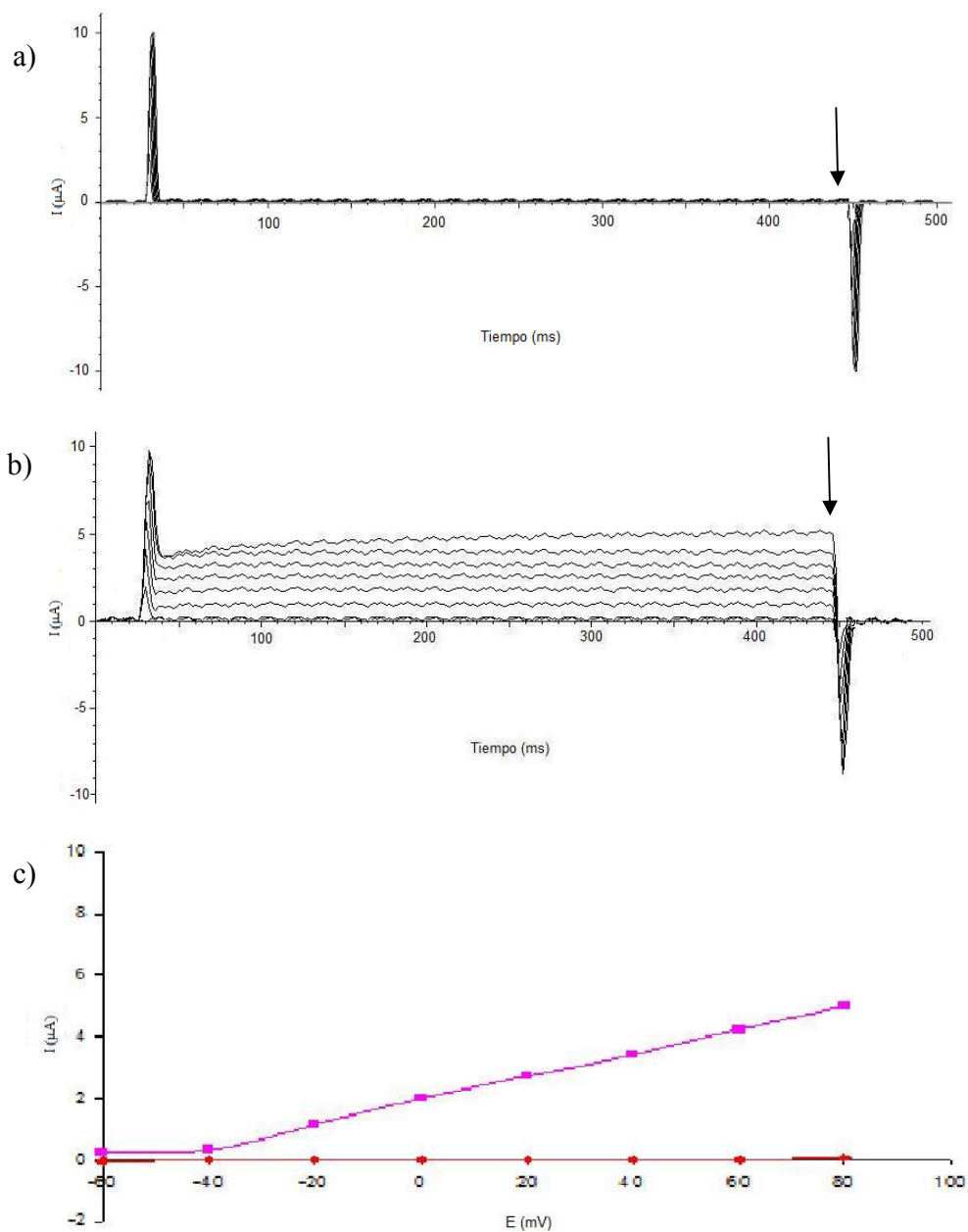


Figura 5.1 Expresión del mARN de Shaker. Trazos $I = f(t)$ a diferentes pulsos de potencial. a) Registro de las corrientes generadas por ovocitos nativos inyectados con H_2O y sin inyectar, b) Ovocitos inyectados con el mARN del canal Shaker. Los ovocitos se estimularon con pulsos de potencial de 80 a -60 mV y variaciones de -20 mV, a un potencial de mantenimiento de -60 mV, el tiempo total de registro fue de 450 ms., c) Análisis de la corriente en función del potencial en un tiempo cercano al final del pulso (indicado por flechas) para ovocitos nativos en rojo y ovocitos que expresan el canal Shaker en rosa.

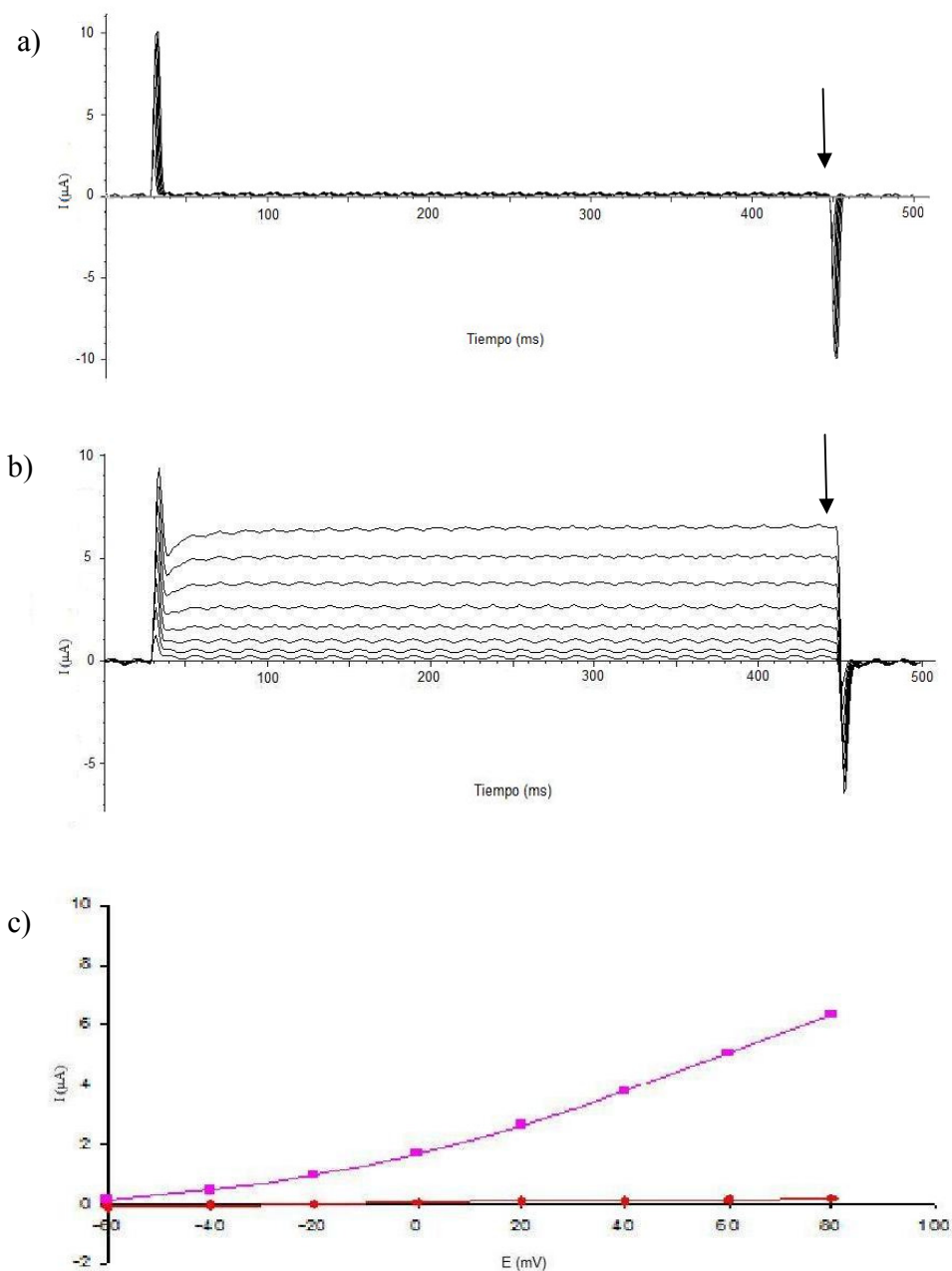


Figura 5.2 Expresión del mRNA de TASK-3. Trazos $I = f(t)$ a diferentes pulsos de potencial. a) Registro de las corrientes generadas por ovocitos nativos inyectados con H₂O y sin inyectar, b) Ovocitos inyectados con el mRNA del canal TASK-3. Los ovocitos se estimularon con pulsos de potencial de 60 a -80 mV y variaciones de -20 mV, a un potencial de mantenimiento de -80 mV, el tiempo total de registro fue de 450 ms., c) Análisis de la corriente en función del potencial en un tiempo cercano al final del pulso (indicado por flechas) para ovocitos nativos en rojo y ovocitos que expresan el canal TASK-3 en rosa.

5.2 Efecto del sulfonato de tetrafenil porfirina sobre los canales iónicos.

Se probó la actividad del TPPS₄ sobre los canales endógenos *Shaker* y TASK-3 de los ovocitos nativos (figura 5.3) durante 10 minutos en el baño, pasado este tiempo se perfundió totalmente con medio ND-96.

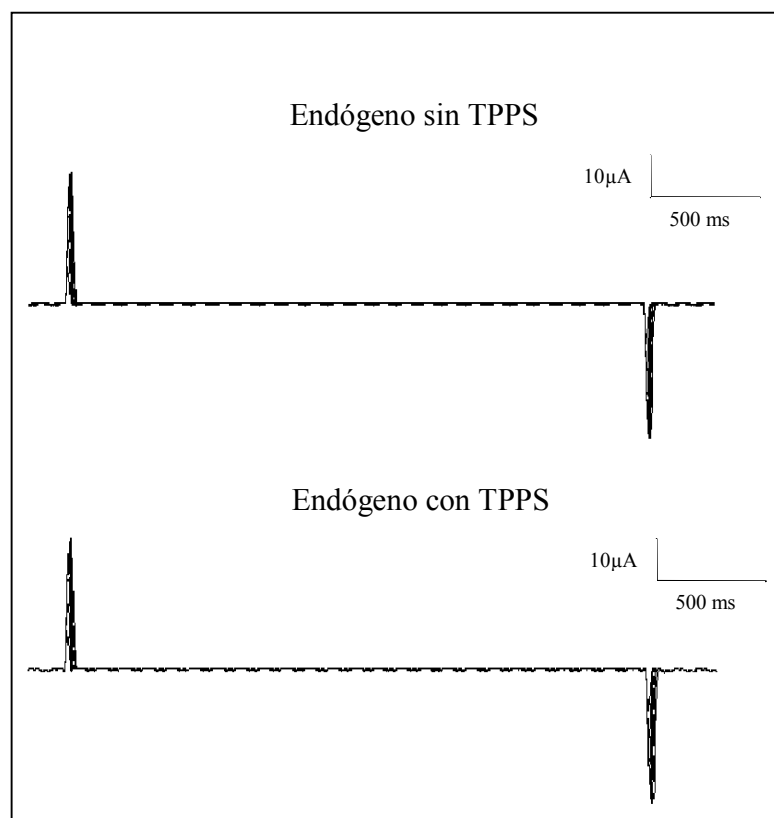


Figura 5.3. Actividad del TPPS₄ en canales endógenos. Arriba en ausencia de TPPS₄ y abajo en presencia de TPPS₄ 58.7 μ M.

Al analizar la figura 5.3 se observa que las corrientes en ausencia y en presencia de TPPS₄ son mucho menores a 1 μ A y no muestran variación notable

entre ellas. Lo cual nos permite tener una respuesta clara en la actividad sobre los canales expresados de *Shaker* y TASK-3, al no verse afectada por los canales endógenos.

En los ovocitos que mostraron expresión de los canales iónicos, se practicaron los ensayos de actividad, siguiendo el procedimiento establecido anteriormente.

En la figura 5.4, inciso a), se muestran los trazos $I = f(t)$ en *Shaker*. La parte superior, muestra el ensayo de lograda la estabilización de las corrientes, sin TPPS₄, y en la parte inferior, el ensayo a los 10 minutos de estar presente. En el inciso b), se muestra el gráfico de actividad en barras, que indican la corriente normalizada inicial (azul), actividad de la porfirina sobre la corriente de *Shaker* (morada) y el efecto del lavado con medio ND-96 para retirar el TPPS₄ (verde).

En la figura 5.5, inciso a), Se muestran los trazos $I = f(t)$ en TASK-3. La parte superior, muestra el ensayo de las corrientes iniciales estabilizadas, antes de agregar el TPPS₄, y en la parte inferior, el ensayo a los 10 min de estar presente. En el inciso b), se muestra el gráfico de actividad en barras, que indica la corriente de TASK-3 normalizada inicial (azul), actividad de la porfirina sobre la corriente (verde) y el efecto del lavado con medio ND-96 para retirar el TPPS₄ (roja).

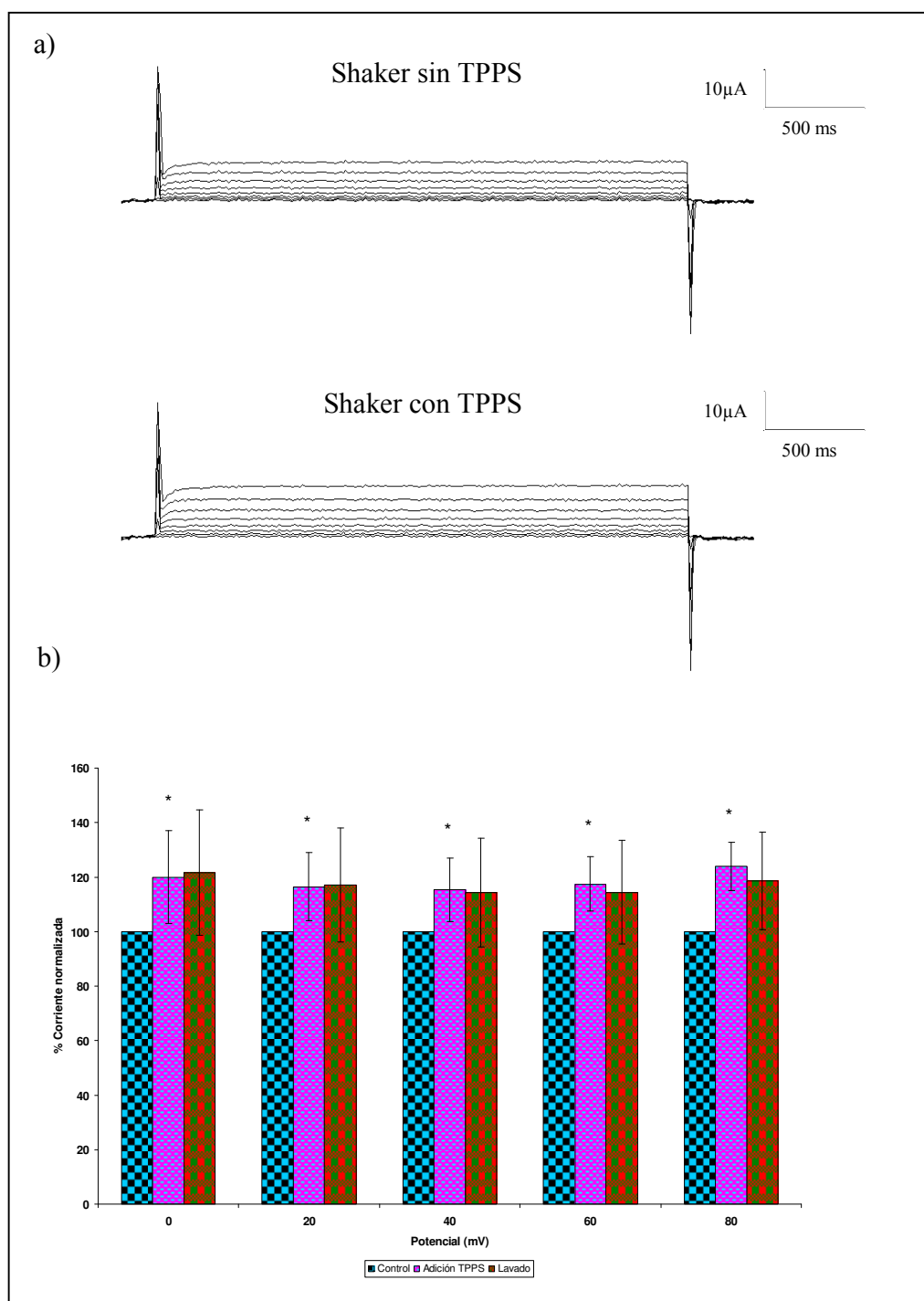


Figura 5.4. Actividad del TPPS4 en el canal *Shaker*. a) Trazos $I = f(t)$ del canal *Shaker* en ausencia y en presencia de TPPS4 58.7 μ M, b) Actividad del TPPS4 sobre las corrientes iónicas del canal *Shaker*, mostrada en porcentajes. En actividad del TPPS4 $n = 10$. (*) Media significativamente diferente de la corriente inicial.

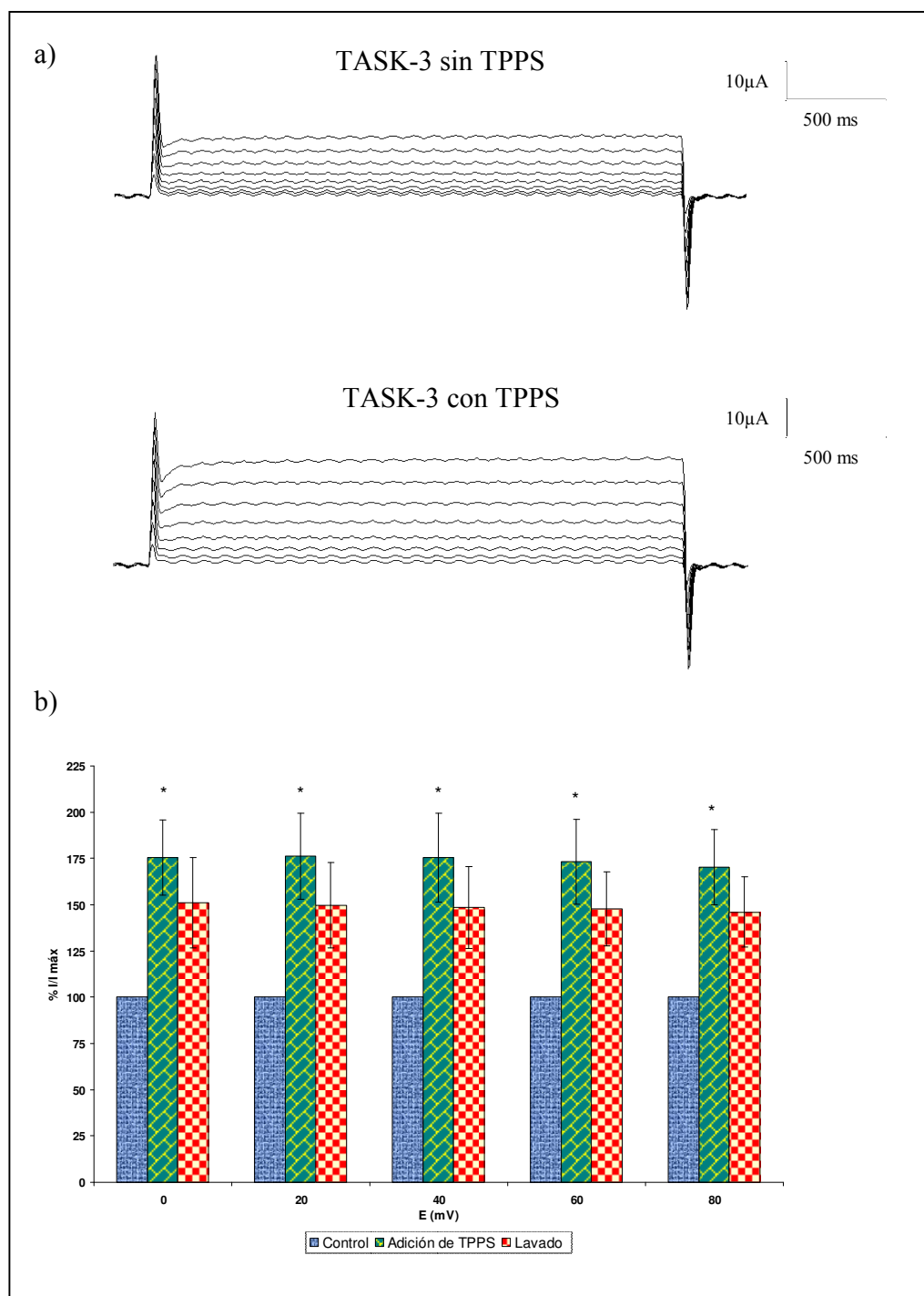


Figura 5.5. Actividad del TPPS4 en el canal TASK-3. a) Trazos $I = f(t)$ del canal TASK-3 en ausencia y en presencia de TPPS4 58.7 μ M, b) Actividad del TPPS4 sobre las corrientes iónicas del canal TASK-3, mostrada en porcentajes. En actividad del TPPS4 $n = 7$. (*) Media significativamente diferente de la corriente inicial.

Para calcular la actividad en ambos canales se hizo la normalización de la intensidad de corriente de los ensayos realizados, en los valores de potencial de 0 a 80 mV, ya que los resultados que se obtienen en los potenciales por debajo de cero no son confiables debido a que las corrientes son muy pequeñas y el ruido de fondo no permite una clara respuesta.

En la figura 5.4, observamos un incremento en las corrientes iónicas del canal Shaker al agregar el TPPS₄ y en el gráfico de actividad, la corriente iónica inicial (sin TPPS₄), representada con un valor de 100 %, se ve aumentada en un 20 % pasados 10 minutos de agregar el TPPS₄ en el baño, lo cual se puede observar con claridad en la segunda barra de cada uno de los potenciales. Esta actividad es significativamente diferente de la corriente inicial; en la tercera barra de cada uno de los potenciales podemos ver que el efecto no es completamente reversible después de perfundir el medio para eliminar la porfirina.

De similar manera en la figura 5.5, observamos un incremento en las corrientes iónicas del canal TASK-3 al agregar el TPPS₄; en el gráfico de actividad se observa la corriente iónica inicial del canal representada como 100%, la cual se ve incrementada en un 75 % pasados 10 minutos de estar en contacto con el TPPS₄, esta actividad es significativamente diferente de la corriente inicial. Después de perfundir el medio para eliminar la porfirina, no se ve un efecto de reversibilidad en ningún valor de potencial.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

6.1 Expresión heteróloga de los canales iónicos.

Al comparar las corrientes macroscópicas de los ovocitos nativos y los ovocitos inyectados con mARN del canal iónico, empleando los protocolos de potencial específicos, podemos ver que los primeros muestran corrientes muy cercanas a cero (mucho menores a 1 μA) y los segundos muestran corrientes mayores a 5 y a 6, para los canales *Shaker* y TASK-3, respectivamente, lo cual demuestra que la expresión heteróloga de los canales iónicos en los ovocitos de *X. laevis* se llevó a cabo exitosamente.

6.2 Efecto del sulfonato de tetrafenil porfirina sobre los canales iónicos.

Al agregar TPPS₄ sobre los canales Shaker se muestra en las corrientes iónicas una actividad del 20 % con respecto al control y de acuerdo a la prueba estadística

t de Student aplicada en los diferentes valores de potencial, indica que esta activación es significativamente diferente de las corrientes iniciales.

En el caso de TASK-3, al aplicar el TPPS₄ se tiene una actividad cercana al 75 % en las corrientes iónicas, la cual es significativamente diferente en cada uno de los potenciales a las corrientes iniciales.

En ambos casos para Shaker y TASK-3 el efecto de actividad como respuesta al agregar el TPPS₄ no es completamente reversible, ya que no se regeneran los valores iniciales de corriente.

La actividad que se tiene es netamente asociada a los canales iónicos expresados heterológicamente y no a los canales endógenos de los ovocitos, ya que al hacer el ensayo sobre ovocitos nativos no se muestra una alteración en la corriente iónica.

Al ver estos resultados no podemos aseverar de qué forma se está llevando a cabo el efecto que tiene el TPPS₄ sobre los canales iónicos de potasio y éstos a su vez con el proceso de apoptosis. Sin embargo la activación de ellos nos da pie a sugerir algunos mecanismos posibles.

Se sabe que uno de los cambios morfológicos más característicos es la pérdida de volumen o encogimiento celular durante todo el fenómeno de apoptosis (Bortner, 2001); esta alteración es típicamente mediada por cambios en los niveles

de iones intracelulares (Hughes, et al, 1997), la activación de estos canales de potasio (Shaker y TASK-3) puede estar ayudando a la salida de K^+ intracelular, induciendo la salida de moléculas de agua, generando una compactación de la célula (Ruznák, 2008; Maeno, 2000; Bortner, 2001; Bortner y Cidloski, 2003).

Además, este movimiento de iones conduce a la despolarización de la membrana plasmática, la cual precede a la inactivación de proteínas (Bcl-2), que dan paso a la actividad de caspasa-3, favoreciendo la muerte celular programada. (Gilbert, et al, 1996 y Wang, et al, 1999).

El $TPPS_4$ al generar especies reactivas de oxígeno, produce agentes oxidantes como el H_2O_2 , los cuales por un proceso de oxidación a grupos sulfhídricos en las estructuras de los canales iónicos, inducen su activación.

Por otra parte, esta generación de especies reactivas de oxígeno, causan un desequilibrio oxidante/antioxidante a favor de los primeros, conduciendo a la célula a un estrés oxidativo (Martínez, 2005), lo cual desencadena la activación de proteínas (FAS, SMAC, BAX, BAD Y BAK) que conllevan como punto final la apoptosis, mientras que si este estrés es muy intenso, puede provocar la necrosis (Miller, 1998; Gilbert, et al, 1996).

Sin embargo la actividad del $TPPS_4$ sobre los canales Shaker y TASK-3, tienen un efecto más complejo involucrando las ROS en la apoptosis, que la simple activación de estos canales.

7.

CONCLUSIONES.

La expresión heteróloga y caracterización con la técnica TEVC de los canales iónicos TASK-3 y Shaker en ovocitos de *X. laevis* se llevó a cabo exitosamente.

Al evaluar el Sulfonato de Tetrafenil Porfirina sobre los canales de potasio Shaker y TASK-3, se encontró un efecto activador del 20 % con recuperación y del 75 % sin recuperación respectivamente, sobre las corrientes iónicas.

Estos resultados abren la puerta, para próximos estudios con objetivo de aclarar el papel de los canales iónicos en la inducción de apoptosis, utilizando agentes formadores de especies reactivas de oxígeno.

PERSPECTIVAS.

Hacer ensayos de actividad modificando más variables como el pH, la intensidad de luz y la presencia de oxígeno en el medio de trabajo.

Hacer un estudio con la técnica de patch-clamp, para poder encontrar una explicación de cómo se lleva a cabo la activación del canal TASK-3 y Shaker, primero en células con canales expresados heterológamente y después en células cancerosas.

Estudio de microscopía óptica, del efecto con el tiempo del TPPS₄, sobre células cancerosas.

BIBLIOGRAFÍA.

1. **Aggarwal, L. y Borissevitch I. (2005).** On the dynamics of the TPPS₄ aggregation in aqueous solutions. Successive formation of H and J aggregates. *Spectrochimica Acta Part A*: 1-7.
2. **Aggarwal, S. K. y MacKinnon, R. (1996).** Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. *Neuron*. **16**: 1169—1177.
3. **Aiyar, J.; Rizzi, J. P.; Gutman, G. A. y Chandy, G. K. (1996).** The signature sequence of voltage-gated potassium channels projects into the external vestibule. *J. Biol. Chem.* **271**: 31013-31016.
4. **Alcocer, M. y Cogordán C. J. (2000).** Terapia fotodinámica, una nueva modalidad de tratamiento oncológico. *Neumología y Cirugía de Tórax*. **59 (3)**: 88-91.
5. **Armstrong, C. M. y Hille, B. (1998).** Voltage gated ion channels and electrical excitability. *Neuron*. **20**: 371-380.
6. **Berg, K.; Moan, J.; Bommer, J. C. y Winkelman, J. (1990).** Cellular inhibition of microtubule assembly by photoactivated sulphonated meso-tetraphenylporphyrines. *Int. J. Radiat. Biol.* **58 (3)**: 475-487.

7. **Bezanilla, F.; Perozo, E.; Papazian, D. M. y Stefani, E. (1991).** Molecular basis of gating charge immobilization in *Shaker* potassium channels. *Science*. **254**: 679-683.
8. **Bonchio, M.; Carofiglio, T.; Carraro, M.; Fornasier, R. y Tonellato, U. (2002).** Efficient Sensitized Photooxygenation in Water by a Porphyrin-Cyclodextrin Supramolecular Complex *Organic Letters*. **4 (26)**: 4635-4637.
9. **Bortner, D. C.; Gómez-Angelats, M. y Cidlowski A. J. (2001).** Plasma membrane depolarization without repolarization is an early molecular event in Anti-Fas-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276 (6)**: 4304-4314.
10. **Chang, C.; Coghlan, M.; Sullivan, J. y Gopalakrishnan, M. (2000).** Potassium Channels: Molecular Defects, Diseases, and Therapeutic Opportunities. *Pharmacology Rev.* **52 (4)**: 557–593.
11. **Chyuan, L. (1992).** Hypothesis on the activation-inactivation coupling in *Shaker* potassium channels. *Federation of European Biochemical Societies*. **306(2,3)**: 95-97.
12. **Cooper, E. C. y Jan, L. Y. (1999).** Ion Channel Genes y Human Neurological Disease: Recent Progress, Prospects and Challenges. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**: 4759-4766.

13. **Doyle, D. A.; Morais, C. J.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A.; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T. y MacKinnon, R. (1998).** The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. *Science*. 280: 69-77.
14. **Florez, J.; Armijo, J. y Mediavilla, A. (1987).** Farmacología Humana, Pamplona EUNSA, USA. 23-25.
15. **Friederich, P. (2003).** Basic Concepts of Ion Channel Physiology and Anesthetic Drug Effects. *European Journal of Anesthesiology*. **20**: 343-353.
16. **Gelfuso, G.; Vasconcelos F.; Gratieri, T. y Vianna, R. F. (2007).** The Effects of pH and Ionic Strength on Topical Delivery of a Negatively Charged Porphyrin (TPPS₄). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1-9.
17. **Gilbert, M.; Saad, A.; Rupnow, B. y Knox, S. (1996).** Association of BCL-2 with membrane hiperpolarization and radioresistance. *J. Cell Physiol*. **168**: 114-122.
18. **Guyton, A.,** Tratado de Fisiología Medica, novena edición, Editorial Interamericana Mc Graw Hill, México 1997, 45-77.
19. **Heginbotham, L.; Lu, Z.; Abramson, T. y MacKinnon, R. (1994).** Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *J. Biophys*. **66**: 1061-1067.

20. **Hille, B. (1992).** Ionic channels of excitable membranes. *Sunderland Massachusetts Sinaur Associates.*
21. **Holmgren, M.; Jurman, M. y Yellen G. (1996).** N-type Inactivation and the S4-S5 Region of the Shaker K⁺ Channel. *J. Gen. Physiol.* **108**: 195-206.
22. **Hoshi, T.; Zagotta, W. N. y Aldrich, R. W. (1990).** Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science.* **250 (4980)**: 533-538.
23. **Jan, L.Y., y Jan N. Y. 1997.** Cloned Potassium Channels from Eukaryotes and Prokaryotes. *Annual Review of Neurosciences.* **20**: 91-123.
24. **Kim, D. (2005).** Physiology and Pharmacology of Two-Pore domain potassium channels. *Curr. Pharm. Des.* **11**: 2717-2736.
25. **Kim, Y.; Bang, H. y Kim, D. (2000).** TASK-3, a New Member of the Tandem Pore K (+) Channel Family. *J. Biol. Chem.* **275 (13)**, 9340-9347.
26. **Kubo, Y.; Baldwin, T.J.; Jan, Y.N. y Jan, L.Y. (1993).** Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature.* **362**: 127-133.

27. **Lauritzen, I.; Zanzouri, M.; Honore, E.; Duprat, F.; Ehrenguber, M.U. y Lazdunski, M. (2003)** K⁺-dependent cerebellar granule neuron apoptosis: Role of TASK leak channels. *J. Biol. Chem.* **278 (34)**: 32068-32076.
28. **Li, M.; Unwin, N.; Stauffer, K.A.; Jan, Y.N. y Jan, L.Y. (1994)**. Images of purified *Shaker* potassium channels. *Curr. Biol.* **4**: 110-115.
29. **Lipson, R. L y Baldes, E. J. (1960)**. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. *Arch Dermatol.* **82**: 508-516.
30. **Minor, D. L. Jr. (2001)**. Potassium Channels: Life in the Post-Structural World. *Current Opinion in Structural Biology.* **11**: 408-414.
31. **Mu, D.; Chen, L.; Zhang, X.; See, L.H.; Koch, C. M. y Yen, C. (2003)**. Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene. *Cancer Cell.* **3**: 297-302.
32. **Nichols, C. G. y Lopatin, A. N. (1997)**. Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* **59**: 171-191.
33. **Noriega-Navarro, R. (2007)**. Evaluación del veneno de alacrán sobre el canal de potasio TASK-3 (4TM/2P). **Tesis de Maestría**. Facultad de Química. UNAM.

34. **Papazian, D. M.; Schwarz, T. L.; Tempel, B. L.; Jan, Y. N. y Jan, L. Y. (1987).** Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science*. **23**: 749-753.
35. **Pei, L.; Wiser, O.; Slavin, A.; Mu, D.; Powers, S.; Jan, L. Y. y Hoey, T. (2003)** Oncogenic potential of TASK3 (KCNK9) depends on K⁺ channel function. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**: 7803-7807.
36. **Rajan, S.; Wischmeyer, E.; Liu, G.X.; Preisig-Muller, R.; Daut, J.; Karschin, A. y Derst, C. (2000).** TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histidine as pH sensor. *J. Biol. Chem*. **275 (22)**: 16650-16657.
37. **Rusznák, Z.; Bakondi, G.; Kosztka, L.; Pocsai, K.; Dienes, B.; Fodor, J.; Telek A.; Gönczi, M.; Szűcs, G. y Csernoch, L. (2008).** Mitochondrial expression of the two-pore domain TASK-3 channels in malignant transformed and non-malignant human cells. *Virchows Arch*. **452**: 415–426
38. **Shih, T. y Goldin, A. (1997).** Topology of the shaker potassium channel probed with hydrophilic epitope insertions. *The Journal of Cell Biology*. **136**: 1037-1040.
39. **Tamargo, J. (2004).** Los poros y los canales iónicos regulan la actividad celular. *An. R. Acad. Nac. Farm*. **70**: 9-31.

40. **Tang, X.; Daggett, H.; Hanner, M.; Garcia, M.; McManus, O.; Brot, N.; Weissbach, H.; Heinemann, S. y Hoshi, T. (2001).** *Oxidative regulation of large conductance calcium-activated potassium channels. J. Gen. Physiol.* **117**: 253–273.
41. **Wang, M. H.; Yusaf, S. P.; Elliott, D. J. , Wray, D. y Sivaprasadarao, A. (1999).** Effect of cysteine substitutions on the topology of the S4 segment of the Shaker potassium channel: implications for molecular models of gating. *J. Gen. Physiol.* **521 (2)**: 315—326
42. **Wang, L.; Zhou, P.; Craig, R. W. y Lu, L. (1999).** Protection from cell death by mcl-1 is mediated by membrane hyperpolarization induced by K⁺ channel activation. *J. Membrane Biol.* **172**: 113-120.

APÉNDICE.

A.

Medios electrofisiológicos

a) ND-96

Compuesto	Peso en gramos para 1 L	Concentración final (mM)
NaCl	5.845	100
KCl	0.149	2
CaCl ₂	0.2646	1.8
MgCl ₂	0.2033	1
HEPES	1.191	5

Se ajustó a pH 7 con NaOH_(ac) 1 M

b) ND-96 con gentamicina

Compuesto	Peso en gramos para 1 L	Concentración final (mM)
NaCl	5.845	100
KCl	0.149	2
CaCl ₂	0.2646	1.8
MgCl ₂	0.2033	1
HEPES	1.191	5
Gentamicina	50 µg/mL	

Se ajustó a pH 7 con NaOH_(ac) 1 M

C) OR-2

Compuesto	Peso en gramos para 1 L	Concentración final (mM)
NaCl	4.82	82.5
KCl	0.149	2
MgCl ₂	0.203	1
HEPES	1.191	5

- Se ajustó a pH 7 con NaOH_(ac) 1 M.

B.

Espectro de absorción del TPPS₄ a pH =7 (color de la solución café). TPPS₄ [58.7 μ M], en solución ND96 ([mM]:100, NaCl; 2, KCl; 1, MgCl₂; 5, HEPES, 1.8, CaCl₂; pH= 7),

