



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“BÚSQUEDA DE MODULADORES PARA LOS CANALES DE POTASIO TASK-1
Y TASK-3 (4TM/2P)”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias**

**PRESENTA:
ROXANA ISELA NORIEGA NAVARRO**

**TUTOR PRINCIPAL
Dr. José de Jesús García Valdés
Facultad de Química**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Juan Carlos Gómora Martínez
Instituto de Fisiología Celular**

**Dr. Roberto Carlos Muñoz Garay
Instituto de Biotecnología**

MÉXICO, D. F. Junio, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente	Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz
Vocal	Dra. Janet Murbartián Aguilar
Vocal	Dra. Norma Adriana Valdez Cruz
Vocal	Dr. Ignacio López González
Secretario	Dr. León David Islas Suárez

La presente tesis se desarrolló en el laboratorio de Electroquímica y Bioelectroquímica Analítica, 113 del edif. "F", de la Facultad de Química, UNAM; bajo la dirección del Dr. José de Jesús García Valdés.

Los resultados de este trabajo se presentaron en el 54th Annual Meeting of Biophysical Society, San Francisco, California, USA, 2010; y están publicados en: **Noriega-Navarro, R.; Lopez-Charcas, O.; Hernández-Enríquez, B.; Reyes-Gutiérrez, P.E.; Martínez, R.; Landa, A.; Morán, J.; Gomora, J.C.; Garcia-Valdes, J. (2014).** Novel TASK channels inhibitors derived from dihydropyrrolo[2,1-*a*]isoquinoline. *Neuropharmacology*. **79**, 28-36.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

Por la beca otorgada durante mis estudios de Doctorado (No. 162436).

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP)

Por el apoyo otorgado en la participación de congresos.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)

Por financiar este proyecto (IN-208307).

Al Dr. José de Jesús García Valdés

Por la guía y conocimientos brindados en todo momento, creer en mí, su paciencia y amistad.

A los miembros del Comité Tutoral

Por guiar este trabajo durante todo el trayecto.

A los Dres. Abraham Landa Piedra, Juan Carlos Gómora Martínez, Julio Morán Andrade, al QFB. Osbaldo López Charcas, a la Dra. Berenice Hernández, a las Mtras. en C. Alicia Ochoa Sánchez y Guadalupe Domínguez

Por permitirme usar los equipos, trabajar en sus laboratorios, su enseñanza, dedicación, tiempo, paciencia y amistad.

A los Dres. Roberto Martínez y Paul Eduardo Reyes Gutiérrez

Por proporcionar los compuestos que hicieron posible el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del H. Jurado

Por sus observaciones y comentarios que hicieron posible que este trabajo se enriqueciera.

A las Dras. Janet Murbartían y Lígia Toro y al Dr. Michel Lazdunski

Por proporcionar las clonas de canales de K^+ para esta proyecto.

Al Dr. José Vargas Díaz

Por brindarme la oportunidad de entrar a sus seminarios, su confianza y contagiar esa pasión por la ciencia rara veces vista.

A Leticia García Gutiérrez

Por su apoyo, paciencia y atención en todos estos años.

DEDICATORIAS

A la UNAM y a la Facultad de Química, por brindarme la oportunidad de formar, sembrar y cultivar un espíritu libre en el camino del conocimiento con gratuidad.

Mis padres, Guadalupe y Rigoberto, por ser mi mejor ejemplo a seguir: humildad, apoyo, respeto, paciencia, confianza, amistad, amor...

A mis hermanos, Laura y Roger, por haber sido mis principales cómplices de vida, apoyo, atención y amor.

A Raúl, por estar siempre conmigo, tu impresionante paciencia, apoyo, amistad, comprensión, tu familia que siempre me brinda y recuerda ese rico calor de hogar... por tu amor.

A Lucha, por todas esas horas de locura... por dejarme ser parte de tu familia. Gracias por tu amistad incondicional.

A toda mi familia, por su atención, apoyo, cobijo, cariño y amistad. Especialmente a Robertito por liberarme siempre una sonrisa y recordar la inocencia del niño que llevamos dentro.

A mis amigas Adriana, por tu hermosa familia y agradable compañía, *y Yazmín*, por tu linda amistad.

A mis compañeros, Xochiquetzal, María Helena, Thalina, Gloria, Claudia, Tania, Nancy, Rocío, Gabriela, Karla, Adán, Iván, Abel, Alexis, Alonso, Fautos, Angel, Juan Carlos...por su ayuda, apoyo y amistad.

A Dinky y Brisa, por su fiel compañía...

“Uno debe ser tan humilde como el polvo para poder descubrir la verdad”

Mahatma Gandhi

ÍNDICE

LISTA	3
Abreviaturas	3
Figuras	7
Tablas	8
RESUMEN	10
SUMMARY	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Canales iónicos de K ⁺ (4TM/2P)	12
1.2. Canales TASK	14
1.3. Dihidropirrol[2,1- <i>a</i>]isoquinolinas	16
1.4. Apoptosis	17
1.4.1. Muerte apoptótica dependiente de K ⁺	18
1.4.2. Apoptosis dependiente de K ⁺ en NGC de rata	20
2. ANTECEDENTES	22
2.1. HIPÓTESIS	25
2.2. OBJETIVOS	26
2.2.1. Objetivo general	26
2.2.2. Objetivos particulares	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Dihidropirrol[2,1- <i>a</i>]isoquinolinas	27
3.2. Preparación de ovocitos y expresión heteróloga	27
3.3. Registro en ovocitos por TEVC	29
3.4. Cultivo de neuronas granulares de cerebelo de rata (NGC)	30
3.5. Registro de la corriente IK _{so} en NGC	30
3.6. Ensayos de viabilidad en NGC	31
3.7. Análisis estadístico	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Efecto de las dihidropirrolisoquinolinas sobre la corriente de TASK-1 y TASK-3	33

4.2. Selectividad de los compuestos activos hacia los canales TASK	38
4.3. Efecto de las pirroloisoquinolinas sobre la IKso en NGC	39
4.4. Ensayos de viabilidad en NGC	43
4.4.1. Medio K25: control de viabilidad celular	44
4.4.2. Medio K5: inducción a la apoptosis por baja concentración de K ⁺	47
4.4.3. Medio con Sts: inducción a la apoptosis por un mecanismo independiente de K ⁺	50
5. DISCUSIÓN	53
5.1. Piroloisoquinolinas: nuevos moduladores para los canales TASK	53
5.2. Inhibición de la IKso en NGC	56
5.3. Protección contra la apoptosis en NGC	57
6. CONCLUSIONES	61
PERSPECTIVAS	62
BIBLIOGRAFÍA	63
APÉNDICE	70

LISTA

ABREVIATURAS

aa	aminoácido
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosin difosfato
AIF	factor inductor de la apoptosis (Apoptosis-Inducing Factor)
ANOVA	análisis de varianza (analysis of variance)
4-AP	4-aminopiridina
Apaf-1	proteína clave de la vía apoptótica (Apoptosis protease-activating factor-1)
ATP	adenosin trifosfato
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
AVD	decremento apoptótico del volumen (Apoptotic Volume Decrease)
Bcl-2	proteínas anti y pro-apoptóticas de linfoma de células B (B-cell lymphoma)
Bid	proteína pro-apoptótica del tipo Bcl-2
°C	grados Celsius
Cat.	catálogo
CAMK	cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina
CF	microscopía de contraste de fases
CHO	células derivadas de ovario de hámster chino (Chinese Hamster Ovary)
CICR	mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} (Calcium-Induced Calcium Release)
cm	centímetros
cm ²	centímetros cuadrados
COS-1	línea celular derivada de fibroblastos del mono verde africano (Cell being CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material)

DIV	días en cultivo <i>in vitro</i>
DPI	dihidropirrolisoquinolina
EGTA	ácido etilenglicol tetraacético
Em	potencial de membrana
ERK	cinasa que regula la señal extracelular de varias proteínas
Fas	proteína de superficie con un dominio conservado citoplasmático de muerte celular, pertenece a la familia TNF
GTP	guanosín trifosfato
h	hora
HCT-15	línea celular humano de adenocarcinoma de colorrectal
HeLa	línea celular humano de cáncer cérvico-uterino
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfónico
herg1	canal de K ⁺ activado por voltaje de humano (ether-a-go-go)
hKir2.1	canal de K ⁺ rectificador entrante de humano
hSLO1	canal de K ⁺ de alta conductancia, modulado por Ca ²⁺ de humano (slowpoke)
HUGO	organización del genoma humano (Human Genome Organisation)
I	corriente
Icontrol	corriente control
IC ₅₀	concentración inhibitoria al 50%
IK _{so}	corriente basal en NGC
% Inh _{máx}	porcentaje de inhibición máxima
IP	yoduro de propidio
IP ₃ -Rs	receptores de inositol trifosfato
[K ⁺] _e	concentración de K ⁺ extracelular
[K ⁺] _i	concentración de K ⁺ intracelular
K5	medio fisiológico con 5 mM de K ⁺
K25	medio fisiológico con 25 mM de K ⁺
K-562	línea celular del tipo de leucemia mielógena crónica
KB	línea celular de carcinoma humano nasofaríngeo
KCNK	canales de K ⁺ de la subfamilia K (4TM/2P)

KCNQ	canal de K ⁺ rectificador retardado lento
kHz	kilohertz
Kir	canales de K ⁺ rectificadores entrantes
Kv	canales de K ⁺ activados por voltaje
M	concentración molar
mg	miligramo
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
ms	milisegundos
mTOR	diana de rapamicina en células de mamíferos (mammalian Target of Rapamycin)
mV	milivoltios
MΩ	megaohms
MCF-7	línea celular de carcinoma de mama
μA	microamperios
μg	microgramo
μL	microlitro
μm	micrómetro
μM	micromolar
n	número de ensayos
<i>n</i>	coeficiente de Hill
ng	nanogramos
nL	nanolitros
nm	nanómetros
No.	número
ND	valor no determinado
NGC	neuronas granulares del cerebelo
NMDA	N-metil-D-aspartato
NS	valor no significativo
ORF	marco abierto de lectura (Open Reading Frame)

P	dominios formadores del poro
PC-3	línea celular de carcinoma de próstata
pH _e	pH extracelular
R	sustituyente
ROS	especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)
RR	rojo de rutenio
Ry-R	receptor de rianodina
Shaker IR	canal de K ⁺ activado por voltaje (Shaker E sin la inactivación tipo A)
SKLU-1	línea celular de adenocarcinoma de pulmón
SKOV3	línea celular humano de cáncer de ovario
Sts	estaurosporina
s	segundo
t	tiempo
TALK	canal de K ⁺ : TWIK-Related Alkaline pH-Activated K ⁺ Channel
TASK	canal de K ⁺ : TWIK-Related Acid-Sensitive K ⁺ Channel
TEA ⁺	ión tetraetil amonio
TEVC	fijación de voltaje con dos electrodos (Two Electrode Voltage Clamp)
THIK	canal de K ⁺ : Tandem Pore Domain Halotane-Inhibited K ⁺ Channel
TM	dominios transmembranales
TNF α	factor de necrosis tumoral (Tumor Necrosis Factor α)
TREK	canal de K ⁺ : TWIK-Related K ⁺ Channel
TRESK	canal de K ⁺ : TWIK-Related Spinal Cord K ⁺ Channel
TWIK	canal de K ⁺ : Tandem of Pore Domains in a Weak Inward Rectifying K ⁺ Channel
U	unidades
U-251	línea celular de carcinoma del sistema nervioso central
v	volumen
V	potencial
X	por (magnificación)

FIGURAS

Introducción

Figura 1.1 Clasificación y relación filogenética de los canales de K^+ en vertebrados.

Figura 1.2 Organización topológica de un canal de K^+ 4TM/2P.

Figura 1.3 Árbol filogenético de la familia de canales de K^+ KCNK.

Figura 1.4 Sistema dihidropirrol[2,1-*a*]isoquinolina.

Figura 1.5 Cambios morfológicos y bioquímicos durante la apoptosis.

Figura 1.6 Eventos cronológicos asociados con la regulación del K^+ en la apoptosis.

Figura 1.7 Muerte celular programada dependiente de K^+ en NGC de rata.

Antecedentes

Figura 2.1 Contribución en la corriente IK_{so} y expresión de los canales TASK en las NGC.

Resultados

Figura 4.1 Expresión del ARNm de los canales TASK.

Figura 4.2 Las dihidropirrol[2,1-*a*]isoquinolinas inhiben la corriente de los canales hTASK-1 y rTASK-3.

Figura 4.3 Inhibición mínima de las dihidropirrol[2,1-*a*]isoquinolinas activas sobre la corriente de ovocitos controles.

Figura 4.4 La inhibición de las pirroloisoquinolinas sobre la corriente TASK es independiente del voltaje.

Figura 4.5 Curvas dosis-respuesta.

Figura 4.6 Los compuestos activos presentan una disociación incompleta del canal y/o acumulación en la membrana de los ovocitos.

Figura 4.7 La corriente IK_{so} de las neuronas granulares del cerebelo se inhibe en presencia de rojo de rutenio (RR).

Figura 4.8 La corriente IK_{so} de las NGC se inhibe en presencia de las pirroloisoquinolinas activas.

Figura 4.9 Relación I-V de la corriente IK_{so} de las NGC en presencia los compuestos activos.

Figura 4.10 Efecto de las pirroloisoquinolinas activas bajo condiciones de viabilidad celular (K25) en neuronas granulares del cerebelo.

- Figura 4.11** Efecto de las pirroloisoquinolinas activas bajo condiciones de muerte celular en baja concentración de K^+ (K5) en neuronas granulares del cerebelo.
- Figura 4.12** Efecto de las pirroloisoquinolinas activas bajo condiciones apoptóticas en medio con estaurosporina (Sts) en neuronas granulares del cerebelo.

Discusión

- Figura 5.1** Moduladores selectivos de los canales TASK.
- Figura 5.2** Mecanismos de sobrevivencia neuronal dependiente de K^+ .

Apéndice

- Figura A.1** Secuenciación de la clona mTREK-pGEM (río abajo).
- Figura A.2** Secuenciación de la clona mTREK-pGEM (río arriba).
- Figura A.3** Trazos representativos del canal heterodimérico (hTASK-1/rTASK-3).
- Figura A.4** Trazos representativos del canal mTREK-1.
- Figura A.5** Trazos representativos del canal Shaker IR.
- Figura A.6** Trazos representativos del canal herg1.
- Figura A.7** Trazos representativos del canal hSLO1.
- Figura A.8** Trazos representativos del canal hKir2.1.
- Figura A.9** Presencia de la corriente de Na^+ en las NGC.

TABLAS

Resultados

- Tabla 4.1** Estructura química de los compuestos orgánicos derivados del sistema dihidropirrolo[2,1-*a*]isoquinolina y el porcentaje de inhibición sobre la corriente de hTASK-1 y rTASK-3.
- Tabla 4.2** Datos obtenidos a partir de las curvas dosis-respuesta.
- Tabla 4.3** Las pirroloisoquinolinas activas inhiben preferencialmente a los canales TASK a una concentración de 100 μ M.
- Tabla 4.4** El compuesto **1** no presenta efectos tóxicos a las NGC bajo condiciones de viabilidad celular (K25).
- Tabla 4.5** El compuesto **2** es tóxico a las NGC bajo condiciones de viabilidad celular (K25).
- Tabla 4.6** El compuesto **3** es ligeramente tóxico a las NGC bajo condiciones de viabilidad celular (K25).
- Tabla 4.7** El rojo de rutenio (RR) no presenta efectos tóxicos a las NGC bajo condiciones de viabilidad celular (K25).

Tabla 4.8	El compuesto 1 protege de la muerte celular a las NGC bajo condiciones de apoptosis dependiente de K^+ (K5).
Tabla 4.9	El compuesto 2 provoca mayor porcentaje de muerte celular a las NGC bajo condiciones de apoptosis dependiente de K^+ (K5).
Tabla 4.10	Protección mínima de muerte celular por el compuesto 3 a las NGC bajo condiciones de apoptosis dependiente de K^+ (K5).
Tabla 4.11	El rojo de rutenio protege de la muerte celular a las NGC bajo condiciones de apoptosis dependiente de K^+ (K5).
Tabla 4.12	El compuesto 1 no presenta cambios significativos en las NGC bajo condiciones de apoptosis inducida con estaurosporina (Sts)
Tabla 4.13	El compuesto 2 provoca un porcentaje mayor de muerte celular a las NGC bajo condiciones de apoptosis inducida con estaurosporina (Sts).
Tabla 4.14	El compuesto 3 no presento cambios significativos en las NGC bajo condiciones de apoptosis inducida con estaurosporina (Sts).
Tabla 4.15	El rojo de rutenio no presentó cambios significativos a las NGC bajo condiciones de apoptosis inducida por estaurosporina (Sts).
Apéndice	
Tabla A.1	Efecto del etanol sobre las corrientes de los registros electrofisiológicos.
Tabla A.2	Efecto de 1.8% de etanol en los ensayos de viabilidad celular en NGC.
Tabla A.3	Caracterización del canal heterodimérico (hTASK-1/rTASK-3).

RESUMEN

Los canales iónicos TASK pertenecen a una familia de canales de K^+ con cuatro segmentos transmembranales y dos dominios formadores del poro (4TM/2P) por subunidad alfa. Estos canales se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes tejidos, en cerebelo, principalmente en las neuronas granulares (NGC), están involucrados en la muerte celular programada o apoptosis. El canal TASK-3 se encuentra sobreexpresado en algunas células cancerígenas en otros tejidos. La corriente TASK es regulada por hormonas, neurotransmisores, anestésicos y cationes divalentes, quienes no son moduladores selectivos. Recientemente, durante la realización de este proyecto, se encontraron algunos compuestos orgánicos que inhiben la corriente TASK selectivamente. Con el propósito de encontrar otro tipo de moduladores, cinco derivados dihidropirrolo[2,1-*a*]isoquinolina (DPI), cuatro de ellos con actividad anticancerígena putativa, se evaluaron sobre las corrientes de los canales hTASK-1, rTASK-3 y el heterodímero (hTASK-1/rTASK-3). Las pirroloisoquinolinas **1**, **2** y **3** mostraron actividad inhibitoria con una $IC_{50} < 320 \mu M$ sobre la corriente de los canales hTASK-1 y rTASK-3; y actividad intermedia en el canal heterodimérico (hTASK-1/rTASK-3). A una concentración de $500 \mu M$ los compuestos activos (**1-3**) prácticamente no presentaron efecto significativo sobre la corriente de otros canales de K^+ : Shaker IR, hERG1 y hKir2.1; sin embargo, se observó una inhibición moderada sobre la corriente de mTREK-1 y hSLO1. Todos los canales se expresaron heterológicamente en ovocitos de *Xenopus laevis*. En NGC de rata los compuestos (**1-3**) a $500 \mu M$, disminuyeron entre 39-66% la corriente basal (IK_{so}), donde se ha reportado que los canales TASK contribuyen con más del 50%. Finalmente, en estas mismas neuronas, de los tres compuestos activos solo el derivado **1** mostró protección significativa (~26%) contra la muerte celular programada inducida por concentración baja de K^+ (5 mM). Estos resultados sugieren que estas pirroloisoquinolinas son potenciales candidatos para el diseño de inhibidores selectivos de los canales TASK.

SUMMARY

TASK channels belong to the family of K⁺ channels with 4 transmembrane segments and 2 pore domains (4TM/2P) per subunit. These channels have been related to apoptosis in cerebellar granule neurons (CGN), as well as cancer in other tissues. TASK current is regulated by hormones, neurotransmitters, anesthetics and divalent cations, none is selective. Recently, there has been found some organic compounds that selectively inhibit TASK current. In order to find other modulators, we studied here a group of five dihydropyrrolo[2,1-*a*]isoquinolines (DPIs), four of them with putative anticancer activity, that were evaluated on hTASK-1 and rTASK-3 channels. The compounds **1**, **2** and **3** showed IC₅₀ <320 μM on hTASK-1 and rTASK-3, intermediate activity on hTASK-1/rTASK-3 heterodimer, moderate effect over hSLO1 and mTREK-1 (500 μM), and practically no inhibition on Shaker IR, hERG1 and hKir2.1 potassium channels, when they were expressed heterologously in *Xenopus laevis* oocytes. In rat CGN, 500 μM of these three compounds induced a decrement by 39-66% of the TASK-carried leak current. Finally, only compound **1** showed significant protection (~26%) against apoptotic death of CGN induced by K⁺ deprivation. These results suggest that DPI compounds could be potential candidates for designing new selective inhibitors of TASK channels.

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. Canales iónicos de K⁺ (4TM/2P)

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que forman poros acuosos y permiten el flujo selectivo de iones a través de ésta [1], [2]. De acuerdo a su selectividad iónica existen varias familias de canales, por ejemplo a Cl⁻, Ca²⁺, H⁺, Na⁺ y K⁺. Los canales selectivos a K⁺ han sido los más estudiados, presentan gran diversidad en cuanto a mecanismo de compuerta, propiedades conductoras y farmacológicas. Éstos se clasifican de acuerdo a la topología que presenta la subunidad α formadora del poro, que toma en cuenta tanto el número de regiones transmembranales (TM), así como los dominios conservados formadores del poro (P) [3] (**fig. 1.1**).

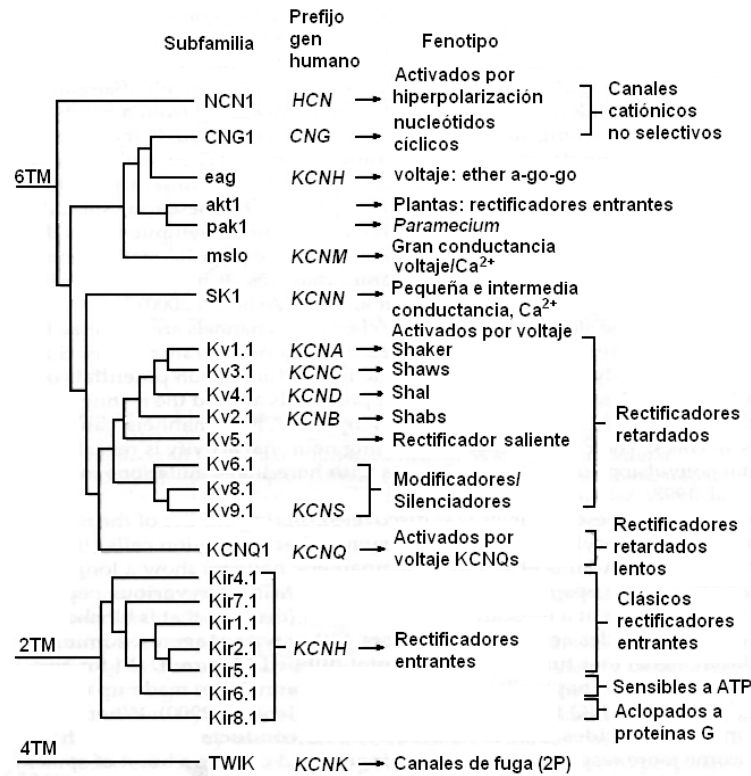


Figura 1.1. Clasificación y relación filogenética de los canales de K⁺ en vertebrados. Genes conocidos de canales de K⁺ se clasifican con base en su topología transmembranal y secuencia primaria. Se presenta sólo un miembro por cada subfamilia. Las ramificaciones representan la relación evolutiva. Figura tomada y modificada del Hille, 2001 [3].

Hace poco más de quince años, se identificaron canales de K^+ cuya subunidad α presenta cuatro segmentos transmembranales y dos dominios formadores del poro (4TM/2P) [4] (**fig. 1.2**). Se demostró que estos canales se ensamblan como dímeros [5], en contraste con los otros canales de K^+ cuya cadena polipeptídica contiene un sólo dominio formador del poro y forman tetrámeros.

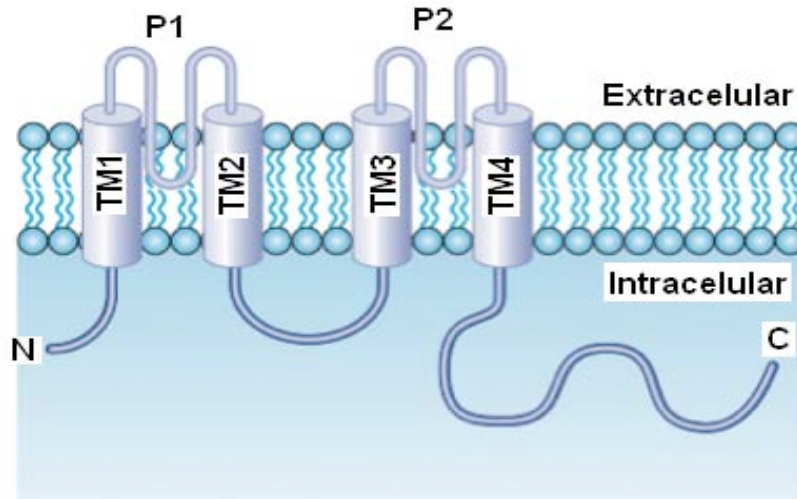


Figura 1.2. Organización topológica de un canal de K^+ 4TM/2P. Los segmentos transmembranales se representan por los cilindros azules (TM1-4) y los dominios formadores del poro se representan como P1 y P2. Las extremidades terminales se encuentran indicadas como N y C. La topología no se dibujó a escala y se presenta sólo una subunidad del dímero funcional. Figura tomada y modificada de Swartz, 2004 [6].

Hasta la fecha en mamíferos existen quince miembros de esta subfamilia y se le conoce como KCNK [7]. El primer miembro caracterizado se nombró TWIK-1 (KCNK1) por sus siglas en inglés (**T**andem of **P** domains in a **W**eak **I**nwark rectifying **K**⁺ channel) [8]. Éste y los demás miembros se han clasificado en seis grupos, con base en su secuencia primaria, propiedades electrofisiológicas y regulatorias [7] (**fig. 1.3**). Estos canales de K^+ muestran una compleja regulación por estímulos físicos y químicos, que incluye tensión membranal, temperatura, sensibilidad al oxígeno, cambios en la presión osmótica y pH intra o extracelular. Algunos de ellos se modulan intracelularmente por segundos mensajeros y/o neurotransmisores, ácidos grasos libres y anestésicos [7].

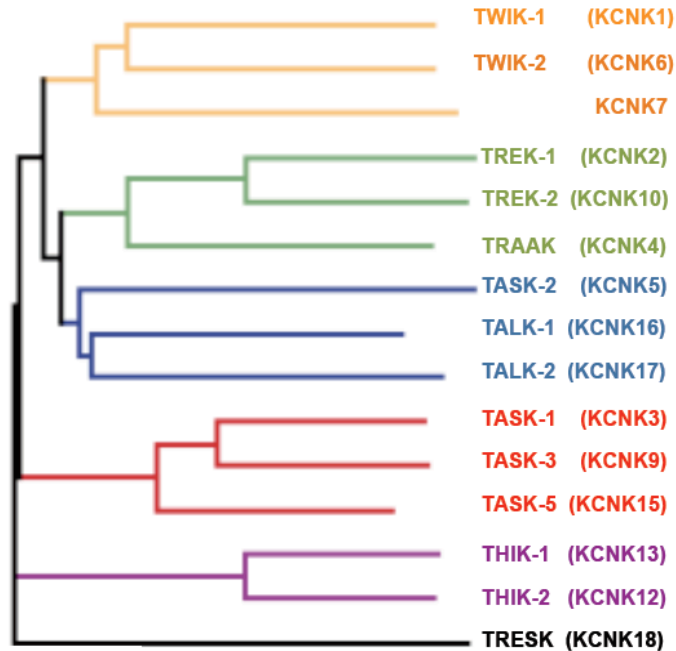


Figura 1.3. Árbol filogenético de la familia de canales de K^+ KCNK. Cada grupo se representa en un color diferente. Se presentan tanto los nombres convencionales como los sistemáticos (HUGO). KCNK8, KCNK11 y KCNK14 no existen. Figura tomada y modificada de Enyedi y Czirják, 2010 [7].

Los canales de K^+ 4TM/2P están distribuidos en varios tejidos y entre ellos generalmente muestran menos del 30% de identidad en su secuencia primaria (por ejemplo, 22% de identidad entre TASK-1 y TREK-1). Doce miembros se han expresado en sistemas heterólogos, donde presentan corrientes rectificadoras débiles selectivas a K^+ de activación rápida, sensibles al voltaje y que contribuyen a la corriente basal. Estos canales ayudan a establecer el potencial de membrana cerca del valor predicho por el equilibrio del K^+ [8], [9], [10], [11].

1. 2. Canales TASK

De la familia de canales de K^+ de 4TM/2P tres miembros son altamente sensibles al cambio de concentración de protones en el medio extracelular (pH_e), especialmente cerca del intervalo fisiológico: TASK-1 (KCNK3) [9], TASK-3 (KCNK9) [11] y TASK-5 (KCNK15) [12] (*TWIK-related Acid-Sensitive K^+ channel*). Entre los canales TASK presentan más del 55% de identidad, pero menos del 30% con otros de la misma familia (4TM/2P).

A la fecha, el canal TASK-5 no se ha expresado heterológamente, a pesar de que su ARNm es abundante en varios tejidos [7], [12], [13]. Sin embargo, TASK-1 y TASK-3 forman heterodímeros funcionales al coinyectarse en ovocitos de *Xenopus laevis* [14]. Por lo cual, en este proyecto se trabajó con los canales hTASK-1, rTASK-3 y heterodimérico (hTASK-1/rTASK-3).

Los TASK son canales basales selectivos a K^+ , su probabilidad de apertura no depende del potencial de membrana (E_m), presentan corrientes rectificadoras débiles que no se inactivan y contribuyen a fijar el potencial de reposo en la membrana de las células que lo expresan de manera nativa o heteróloga [9], [11], [15], [16]. Estos canales se expresan en varios órganos: placenta, piel, útero, páncreas, corazón, riñón, hígado, pulmón, colon, estómago, bazo, intestino delgado, testículo, próstata, músculo esquelético y sistema nervioso central, principalmente en el cerebelo [9], [11], [12], [18], [19], [20], [21], [22], [23], [24]. En las neuronas granulares del cerebelo (NGC) contribuyen con más del 50% de la corriente saliente de K^+ (IKso), controlan el potencial de membrana en reposo y regulan su excitabilidad [25], [26], [27], [28], [29]. En estas neuronas los canales TASK participan en la muerte celular programada dependiente de K^+ [28].

Particularmente, TASK-3 está sobreexpresado en tejidos cancerosos de mama, pulmón [30], colon [31], piel [32], [33], tracto gastrointestinal [34] y ovario [35]; desempeñando un papel importante como un poderoso oncogén [30], [36]. Además, estas proteínas están involucradas en hipertensión [37], arritmias cardíacas [38], inflamación [39], isquemia [40] y epilepsia [41], entre otras.

Los canales TASK son insensibles a los típicos bloqueadores de canales de K^+ como Cs^+ , tetraetilamonio (TEA^+) y 4-aminopiridina (4-AP) [9], [11], [21], [37]. Sin embargo, estas proteínas son activadas por los anestésicos halotano e isoflurano [42], [43], [44]. Se inhiben indirectamente por receptores de proteínas G del subtipo $\alpha_q/11$ [11], [45] a través de varias moléculas como neurotransmisores [15], [46], [47], [48], alcaloides [29] y hormonas [37], [44], [46]. Además son inhibidos directamente por cationes divalentes [11], [49], [50], [51], anestésicos (lidocaína, bupivacaína, mepivacaína, tetracaína, alfaxalona, etomidato, cloroformo, etc.) [11], [21], [42], [52], [53]; cannabinoides [54], [55], [56] y otro tipo de compuestos [20], [51], [57], [58].

El rojo de rutenio (RR) [59] y el Zn^{2+} [25] son bloqueadores del canal TASK-3 que prácticamente no presentan efecto sobre TASK-1 o el heterodímero TASK-1/TASK-3, por lo que se utilizan comúnmente para discernir la corriente entre estas proteínas. Ningún compuesto mencionado hasta el momento es selectivo para los canales TASK, ya que también modulan otros canales iónicos. Sin embargo, recientemente se reportaron inhibidores selectivos para el canal TASK-1: A293 [60], A1899 [61] y ML365 [62]; y para TASK-3: ML308 [63] y una serie de derivados de pirido[4,3-*d*]pirimidina [64].

1. 3. Dihidropirrolo[1,2-*a*]isoquinolinas

Gran parte del conocimiento sobre la función, estructura, purificación y localización de los canales iónicos se ha elucidado a partir de la interacción con compuestos selectivos. Entre las fuentes diversas se pueden citar: veneno de animales ponzoñosos (toxinas), compuestos sintéticos (orgánicos e inorgánicos) o productos naturales extraídos de plantas (alcaloides). Estos últimos, que presentan un esqueleto de pirroloisoquinolina, son abundantes en la naturaleza y exhiben actividad biológica interesante como relajantes musculares, antiarrítmicos, antihipertensivos [65], antivirales [66], antipsicóticos [67], [68], [69], antidepresivos [70], [71], anticancerígenos [72], etc.

Las dihidropirroloisoquinolinas (DPI) Crispina A y Crispina B se aislaron de la planta *Carduus crispus*, utilizada en la medicina tradicional china para el tratamiento de gripe, reumatismo y dolor de estómago [73]. El cardo de burro (*Carduus crispus*) es una especie de cardo de la familia Asteraceae, que se distribuye en gran parte de Europa y Norteamérica, y es el alimento favorito de las orugas de la mariposa “dama pintada” (*Vanessa cardui*) [74] (**fig. 1.4**).

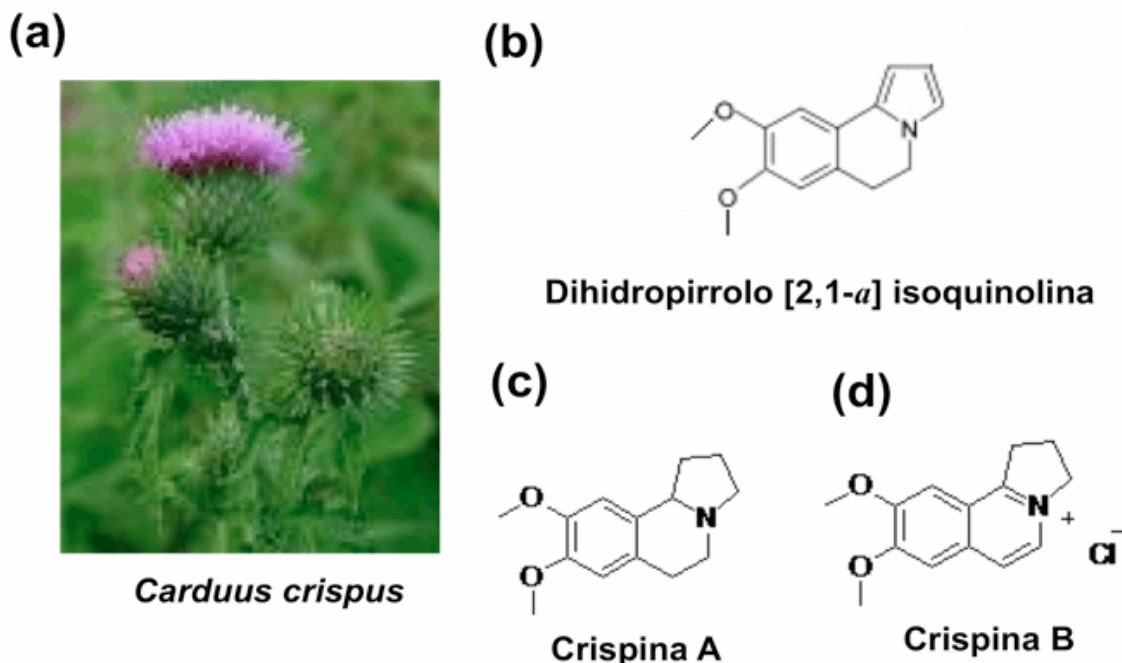


Figura 1.4. Sistema dihidropirrol[2,1-*a*]isoquinolina. Imagen de la planta *Carduus crispus* (a). Estructura química del sistema dihidropirrol[2,1-*a*]isoquinolina (b). Estructura química del alcaloide Crispina A (c). Estructura química del alcaloide Crispina B (d).

El alcaloide crispina B tiene gran relevancia ya que presenta actividad citotóxica contra las líneas celulares cancerígenas de epitelio (HeLa, KB) y de ovario (SKOV3) [73]. Esto motivó a varios grupos de investigación a sintetizar compuestos orgánicos nuevos que, inspirados en sus precursores naturales, aumenten su respuesta farmacológica y selectividad con la finalidad de reducir efectos secundarios, como náuseas, fatiga, fiebre, insomnio, daño hepático y renal, entre otros [75], [76], [77], [78]. Así, la síntesis de derivados pirrolosioquinolina, ha desempeñado un papel importante en el desarrollo de nuevos fármacos como posibles agentes anticancerígenos [79], [80], [81], [82], [83]. Hasta la fecha, la actividad de este tipo de compuestos no se ha evaluado sobre la corriente de canales iónicos.

1.4 Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada de gran importancia en varios procesos biológicos que incluyen el desarrollo embrionario, el envejecimiento, la metamorfosis y, en general, el mantenimiento homeostático de poblaciones celulares en los

tejidos de organismos [84]. También involucra la pérdida de células patológicas después de un estímulo químico, físico, ambiental o genético [85], [86]. La apoptosis se definió originalmente por sus características morfológicas y bioquímicas que incluyen encogimiento celular, condensación de la cromatina, vacuolización del citoplasma, pérdida en la estructura de la membrana plasmática, fragmentación nuclear, formación de cuerpos apoptóticos y fagocitosis, entre otros [87], [88], [89], [90], [91] (**fig. 1.5**).

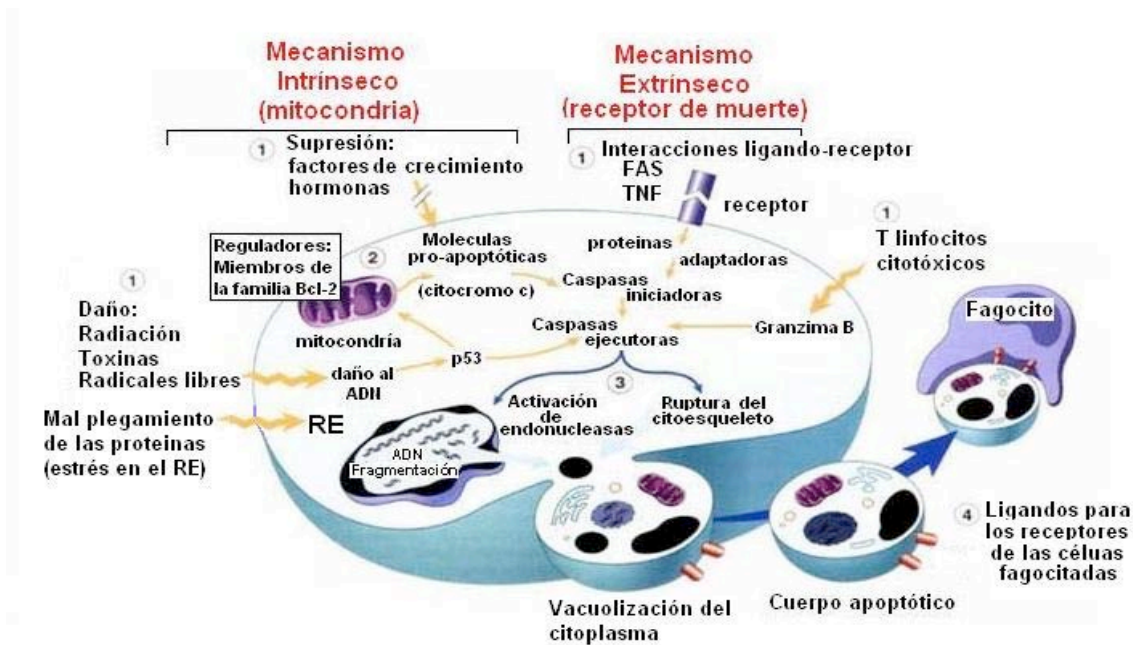


Figura 1.5. Cambios morfológicos y bioquímicos durante la apoptosis. ① Existen una gran variedad de estímulos y condiciones tanto fisiológicas como patológicas que producen apoptosis. La apoptosis se inicia por señales procedentes de dos mecanismos fundamentales: el mecanismo intrínseco o vía mitocondrial y ② el mecanismo extrínseco o vía asociada a un receptor de muerte. Estas vías se inducen por distintos estímulos y participan distintos grupos de proteínas, aunque existe cierta comunicación entre ellas y convergen en la activación de caspasas. ③ Durante el proceso apoptótico ocurren cambios morfológicos y moleculares como: encogimiento celular, activación de caspasas, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN por acción de endonucleasas, pérdida en la estructura de la membrana citoplasmática, vacuolización del citoplasma, ④ formación de cuerpos apoptóticos y fagocitosis. Figura tomada y modificada de Kumar, 2008 [92].

1.4.1. Muerte apoptótica dependiente de K^+

La regulación de la apoptosis, tanto a nivel molecular como subcelular, se ha estudiado extensamente e involucra de manera general la liberación del citocromo *c* de la mitocondria, formación del apoptosoma, participación de varias caspasas y modulación de genes de la familia *bcl-2* [93], [94], [95], [96], [97]. Sin embargo, recientemente se ha

estudiado también la regulación iónica en la apoptosis por varios grupos de investigación que han establecido un nuevo concepto, donde ésta también se controla por la homeostasis iónica celular, particularmente la del ión K^+ [98], [99], [100], [101], [102], [103], [104], [105], [106], [107].

En resumen, la muerte celular programada regulada por la homeostasis del K^+ inicia con algún estímulo apoptótico que activa varios canales iónicos de K^+ y/o receptores ionotrópicos de glutamato, posiblemente mediante una señal en el sistema de transducción, como cambios en los estados de fosforilación. Así, un aumento en la conductancia de K^+ hiperpolariza el potencial de membrana y posteriormente reduce el volumen celular. Este último, es un evento temprano en la apoptosis que se conoce como Decremento Apoptótico del Volumen (AVD), debido a la salida no sólo de K^+ , sino también de Cl^- y agua de la célula. Posteriormente, en la mitocondria ocurre la situación inversa, entrada de K^+ y agua a través de la membrana mitocondrial, que provoca depolarización e hinchamiento. Estos procesos apoptóticos son regulados por las proteínas Bcl-2 y Bid. El daño mitocondrial genera especies reactivas de oxígeno (ROS) y deficiencia en la producción energética, que consecuentemente bloquea a la ATPasa- Na^+/K^+ , esto ocasiona un deterioro celular por la salida excesiva de K^+ , disminución en el volumen celular y depolarización de la membrana plasmática. Así, bajo una condición energética desfavorable (nivel mínimo en la relación ADP/ATP), la mitocondria libera citocromo *c* y Apaf-1 que forman el apoptosoma y posterior liberación de la procaspasa-9. También, con una disminución considerable en la concentración intracelular de K^+ (50 mM) se activan endonucleasas y caspasas (caspasa-3). Finalmente, el daño al ADN y el colapso nuclear lleva a la muerte apoptótica [84], [87], [90], [91], [93], [98], [99], [103], [107], [108], [109], [110], [111] (**fig. 1.6**).

Varios son los canales de K^+ que se encuentran involucrados en la muerte celular programada en diferentes tipos de células. Activados por voltaje: Kv1.1, 1.5, 2.1 en arteria pulmonar y músculo liso [112], HERG en células tumorales [113]; activados por calcio: SLO1 (maxi-K) en músculo liso y en células vasculares de rata y humano [100], el canal IKCa1 en linfocitos T [114]; rectificadores entrantes: Kir1.1 (ROMK1) en neuronas del hipocampo [115], sensibles a ATP (K_{ATP}) en miocitos cardíaco y células COS-1 [116]; y los canales de 4TM/2P: la familia TASK en cultivos de neuronas granulares del cerebelo (NGC) de rata [28].

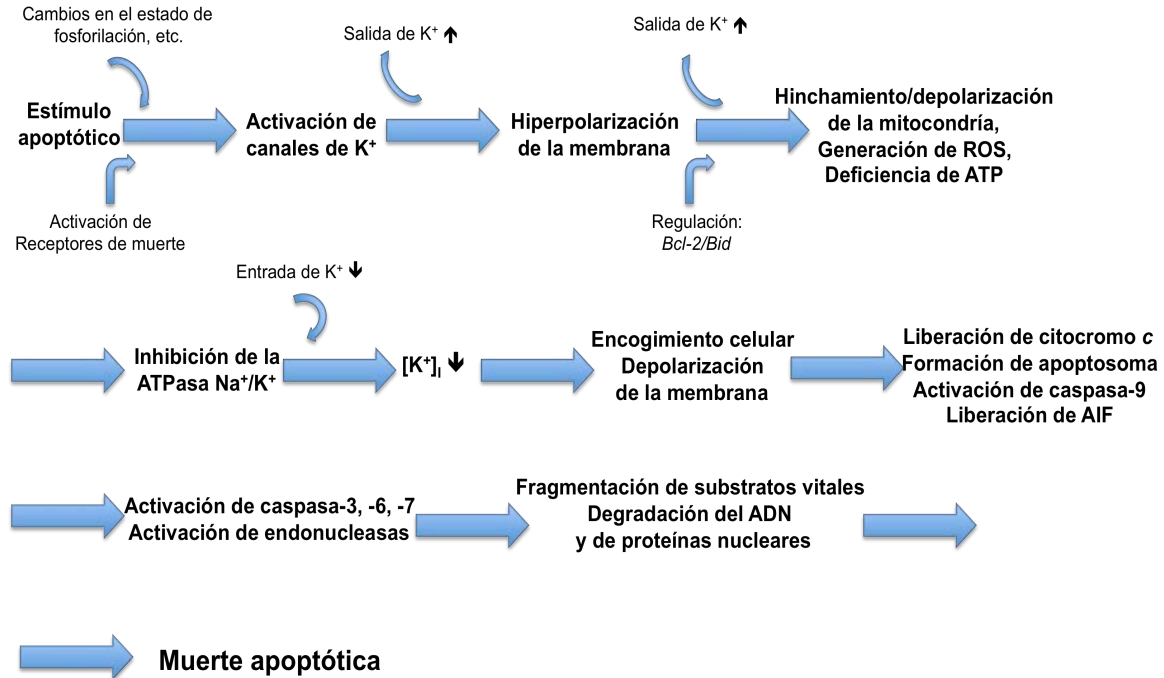


Figura 1.6. Eventos cronológicos asociados con la regulación del K⁺ en la apoptosis. Una salida excesiva de K⁺ y consecuente reducción en la concentración de K⁺ intracelular ([K⁺]_i) son eventos tempranos en la apoptosis de algunos tipos de células. Inicialmente, la alteración en la homeostasis de K⁺ es mediada por la sobreactivación de canales de K⁺ y/o receptores ionotrópicos de glutamato, y posteriormente acompañada por la disfunción de la ATPasa-Na⁺/K⁺. Fisiológica [K⁺]_i actúa como un represor de efectores apoptóticos. Sin embargo, la pérdida excesiva de K⁺ celular sirve como señal de ejecución del programa suicida por la activación de eventos claves en la cascada apoptótica (activación de caspasas, liberación de citocromo c y activación de endonucleasas, etc.). Esquema tomado y modificado de Yu, 2003 [107].

1.4.2. Apoptosis dependiente de K⁺ en NGC de rata

La muerte celular programada es de particular importancia en el desarrollo del cerebelo [117], [118], [119]. Durante las primeras semanas de nacimiento varios cientos de millones de neuronas granulares se originan en la capa granular externa y migran a través de la molecular y Purkinje para llegar finalmente a la granular interna, donde establecen conexiones sinápticas con las células Purkinje. En ambos eventos se observa apoptosis masiva [118], [119]. Una variedad de neuronas (incluyendo a las NGC de rata de 8 días de nacimiento) mueren por apoptosis cuando se cultivan en un medio con concentración fisiológica de K⁺, después del 5° día en cultivo *in vitro* (DIV) [117], [120], [121], [122], [123], [124]. Sin embargo, estas neuronas son viables en un medio de cultivo rico en K⁺ (25 mM) así como en presencia de bloqueadores de canales de K⁺, que depolarizan la

membrana celular y promueven la supervivencia neuronal *in vitro* [105], [117], [120], [121], [123], [124], [125], [126], [127].

En la primera fotografía de la **figura 1.7a** se presentan NGC cultivadas durante 6 días en un medio K25 (25 mM K^+). Las neuronas se encuentran vivas con sus características morfológicas intactas (cuerpos celulares redondos y una compleja red de neuritas). Las siguientes tres fotografías corresponden a cultivos a los que se les incubó en medio K5 (5 mM K^+) por 8, 24 y 72 h, donde se pierde la morfología con el transcurso del tiempo. Después de 8 h se forman vacuolas, algunos cuerpos celulares se reducen y las neuritas se fragmentan. A las 24 h muere aproximadamente el 50% de las neuronas (**fig. 1.7b**), se observan muchos cuerpos neuronales indefinidos que pierden su apariencia de fase brillante, disminuye el volumen celular, existe condensación nuclear, las neuritas están fragmentadas y su densidad disminuye, la presencia de vacuolas y fragmentación celular es más notable. A las 48 h la fragmentación de células es extensiva y comienzan a separarse del sustrato. Finalmente, a las 72 h pocas células sobreviven y las neuritas no son visibles [122]. Este modelo de muerte apoptótica, por bajo K^+ , se utiliza comúnmente a nivel mundial para el estudio de este mecanismo.

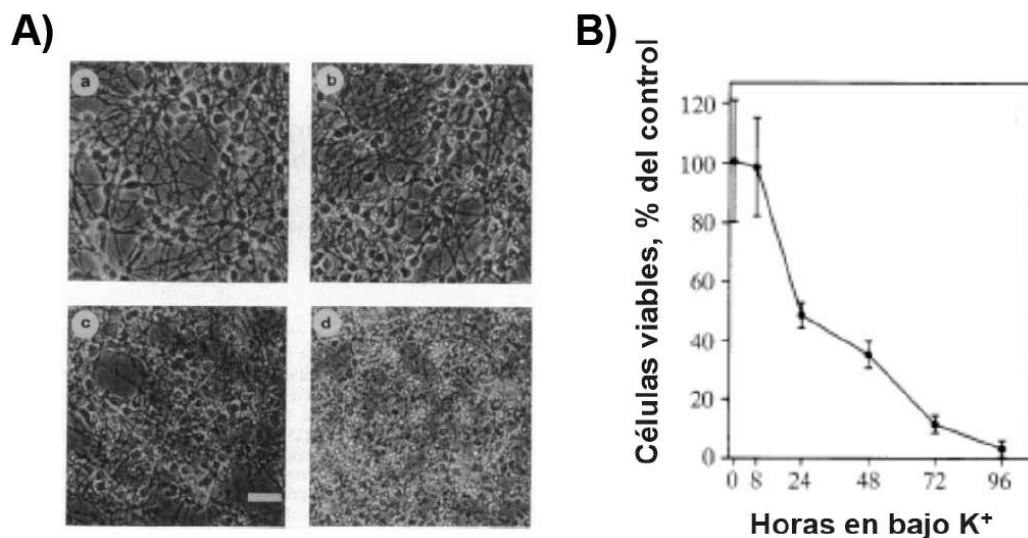


Figura 1.7. Muerte celular programada dependiente de K^+ en NGC de rata. A) Micrografías de contraste de fase muestran neuronas granulares del cerebelo mantenidas por 6 días en medio con 25 mM K^+ (a). Después de ese tiempo el medio es cambiado a 5 mM K^+ por 8 h (b), 24 h (c) y 72 h (d). Barra = 25 μ m. B) Curso temporal de la muerte celular por bajo K^+ (5 mM). El número de neuronas viables se determinó con la tinción de diacetato de fluoresceína. Las células control fueron cambiadas a un medio con 25 mM K^+ por 24 h. Los datos se expresan como promedio \pm desviación estándar de cinco campos tomados de tres cultivos diferentes. Figuras tomadas y modificadas de D'Mello *et al.*, 1993 [122].

2. ANTECEDENTES

En 1995, se identificó la existencia de una nueva familia de canales de K^+ con dos dominios de poro (2P) en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* [4]. Al año siguiente, Wei y colaboradores [128], durante el estudio del genoma de *Caenorhabditis elegans*, encontraron la presencia de 23 genes pertenecientes a la familia de canales de K^+ de 4TM/2P en la misma cadena polipeptídica. Ese mismo año en mamíferos se clonó uno de estos canales al que se le llamó TWIK-1 (*T*andem 2P domain, *W*eak *I*nward rectifier *K*⁺ Channel), ampliamente distribuido en diferentes tejidos y abundante en corazón y cerebro [8]. Se demostró que estas proteínas se ensamblan como dímeros [5], en contraste con los otros canales de K^+ cuya cadena polipeptídica contiene un solo dominio formador del poro y forman tetrameros. Duprat y colaboradores clonaron un canal similar a TWIK-1 pero dependiente del pH_e al que se le llamó TASK-1 (*T*WIK related *A*cid *S*ensitive *K*⁺ Channel) [9]. Posteriormente de cerebelo de rata se clonó a TASK-3 [11], que presentó 54% de identidad con TASK-1. Los TASK son canales basales selectivos a iones K^+ , rectificadores salientes, que prácticamente no se inactivan y contribuyen a fijar el potencial de reposo en la membrana de todas las células que los expresan [9], [11], [15], [16], [17], [23].

Las neuronas granulares del cerebelo (NGC) de rata presentan una corriente basal, estable y saliente llamada IK_{so} , que igual a la de los canales TASK no se inactiva, es sensible al pH_e ácido y no se afecta por los típicos bloqueadores de canales de K^+ como 4-AP y TEA^+ [28], [29], [129]. La amplitud de esta corriente aumenta gradualmente en función de los días en cultivo *in vitro* (DIV), que se relaciona con un incremento en el nivel de transcritos y actividad de los canales TASK [26], [28]. Estas proteínas presentan un bajo nivel de actividad los primeros días en cultivo, pero comienza a aumentar a partir del 5° DIV, sobretodo para el canal TASK-3 [26]. Así, de 7 a 8 DIV contribuyen con más del 50% en la corriente basal IK_{so} de las NGC [24], [25], [26], [28], [29] (**fig. 2.1**).

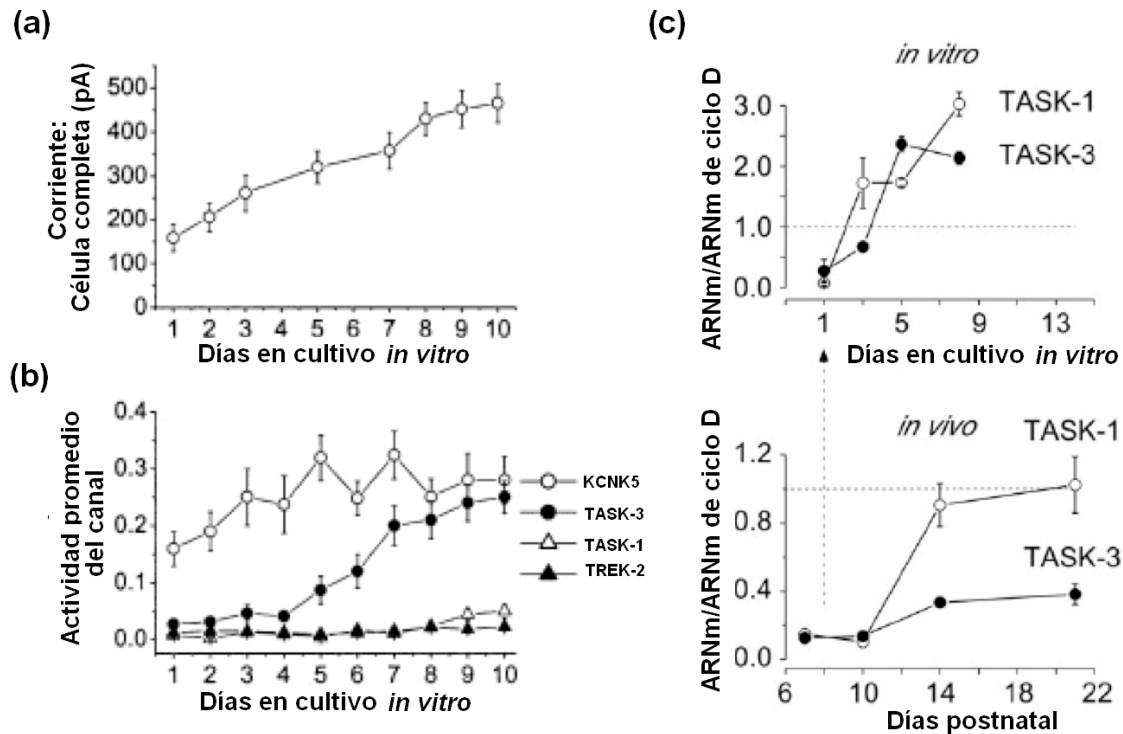


Figura 2.1. Contribución en la corriente IK_{so} y expresión de los canales TASK en las NGC. (a) La corriente IK_{so} se registró con la técnica de patch clamp en la configuración de célula completa. El pico de corriente se determinó a 0 mV. (b) Aproximadamente 40 parches por día se analizaron para los cuatro tipos de canales de K^+ de 4TM/2P que presentan mayor actividad. La actividad promedio del canal (por parche) se determinó por la técnica de patch clamp en la configuración de célula unida. (a) y (b) Células de 1 a 10 días de cultivo *in vitro* se activaron con un protocolo de rampa de -100 a 0 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -50 mV. Los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar ($n=35-42$). Figura tomada y modificada de Han *et al.*, 2002 [26]. (c) Análisis de la expresión de los canales TASK por PCR en tiempo real. *In vitro*: NGC se aislaron del cerebelo de ratas de 7 días de nacimiento y se cultivaron con 25 mM de K^+ . Los ARNm mensajeros (ARNm) se extrajeron de 1, 3, 5 y 8 DIV. *In vivo*: los ARNm se extrajeron del cerebelo de ratas a diferentes días postnatal del desarrollo. El nivel de expresión de las subunidades TASK se normalizó al nivel de ciclofilina D, que permanece constante durante el desarrollo, tanto *in vivo* como *in vitro*. Las líneas punteadas indican el nivel estándar de ciclofilina D. Figura tomada y modificada de Lauritzen *et al.*, 2003 [28].

Lauritzen y colaboradores [28] reportaron en estas neuronas la participación de los canales TASK en la muerte apoptótica dependiente de K^+ . Con el modelo de muerte celular por bajo K^+ observaron protección contra la apoptosis al tratar cultivos de NGC a valores de pH ácidos o adición de rojo de rutenio (RR). Además, demostraron que la sobreexpresión de los TASK en neuronas del hipocampo, que no presentan una corriente basal IK_{so} , induce apoptosis; lo que sugiere que el flujo de K^+ al exterior se da a través de estas proteínas. Interesantemente, TASK-3 se encuentra sobreexpresado de manera

importante en células cancerígenas de cáncer de mama, pulmón [30], colon [31], piel [32], [33], tracto gastrointestinal [34] y ovario [35], comportándose como un poderoso oncogen [30], [36]. Al suprimir la actividad de TASK-3 mediante su coexpresión con una mutante puntual G95E (región del poro), se anulan sus funciones oncogénicas, como el crecimiento y promoción tumoral [36].

TASK-1 y TASK-3 se regulan por hormonas, neurotransmisores, anestésicos e iones divalentes, sin embargo, estos compuestos no son selectivos para los TASK, ya que también modulan otros canales iónicos. Hasta la fecha, se han reportado tres compuestos selectivos para el canal TASK-1: A293 [60], A1899 [61] y ML365 [62]; y para TASK-3: ML308 [63], así como una serie de inhibidores selectivos basados en la estructura química de una pirido[4,3-*d*]pirimidina [64].

Bajo esta perspectiva en el Instituto de Química de la UNAM el grupo de investigación del Dr. Roberto Martínez reportó la síntesis de derivados de dihidropirrol[2,1-*a*]isoquinolinas y su actividad citotóxica contra algunas líneas celulares de cáncer: leucemia (K-562), sistema nervioso central (U-251), próstata (PC-3), colon (HCT-15), mama (MCF-7) y pulmón (SKLU-1) [82]; donde se encuentra expresado el canal TASK-3 [130]. Así, algunas de estas pirroloisoquinolinas se nos proporcionaron para evaluar su efecto sobre la corriente de hTASK-1 y rTASK-3, con el objeto de encontrar otro tipo de compuestos orgánicos que modifiquen selectivamente su actividad. El desarrollo de fármacos que selectivamente afecten la actividad de estos canales serán de gran valor para entender su función y podrían ser potencialmente útiles como agentes terapéuticos para detener la progresión del cáncer y la muerte celular en ciertos tejidos.

2.1. HIPÓTESIS

Si los derivados orgánicos dihidropirroló[2,1-*a*]isoquinolinas presentan actividad citotóxica contra varias líneas celulares de cáncer, donde se expresa el canal TASK-3, entonces, algunos de estos derivados serán moduladores selectivos para los canales TASK.

Se espera que los moduladores con actividad inhibitoria presenten también una disminución sobre la corriente I_{Kso} de la neuronas granulares del cerebelo, así como protección contra la muerte celular programada dependiente de K^+ en estas mismas células.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo general

Encontrar moduladores selectivos para los canales de K^+ TASK-1 y TASK-3 (4TM/2P).

2.2.2. Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de las dihidropirrolisoquinolinas sobre la corriente de canales TASK-1 y TASK-3 expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*.
- Determinar la selectividad de los compuestos activos hacia los canales TASK.
- Evaluar la actividad de los inhibidores sobre la corriente I_{Kso} de neuronas granulares del cerebelo (NGC).
- Evaluar el efecto de los inhibidores en NGC bajo condiciones apoptóticas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Dihidropirrolo[2,1-*a*]isoquinilinas

Se evaluaron cinco compuestos orgánicos derivados del sistema dihidropirrolo[2,1-*a*]isoquinolina: **1**, 8,9-dimetoxi-3-metil-2-fenil-5,6-dihidropirrolo[2,1-*a*]isoquinolina-1-carbonitrilo; **2**, 8,9-dimetoxi-3-metil-2-(tiofeno-2-*il*)-5,6-dihidropirrolo[2,1-*a*]isoquinolina-1-carboxilato; **3**, 8,9-dimetoxi-3-metil-2-(3-aminofenil)-5,6-dihidropirrolo[2,1-*a*]isoquinolina-1-carboxilato; **4**, 8,9-dimetoxi-3-metil-5,6-dihidropirrolo[2,1-*a*]isoquinolina-1-carboxilato y **5**, 8,9-dimetoxi-3-metil-2-fenil-5,6-dihidropirrolo[2,1-*a*]isoquinolina-1-carboxilato (*Ver estructuras tabla 4.1*). La identidad y pureza de los compuestos orgánicos se determinó por técnicas de cromatografía en capa fina, cristalografía de rayos-X, espectroscopía de infrarrojo, espectroscopía de masas y resonancia magnética nuclear [82]. Se prepararon soluciones de los compuestos a una concentración de 28 mM en etanol. Las diferentes cantidades de etanol (0.3-1.8% v/v), tanto en los ensayos electrofisiológicos como en la apoptosis, se tomaron cuidadosamente en consideración como control. El efecto del etanol sobre la corriente de los registros electrofisiológicos se compenso sustrayendo o adicionando el porcentaje de activación o de inhibición, respectivamente (**Apéndice I**).

3.2. Preparación de ovocitos y expresión heteróloga

Los ARN mensajeros (ARNm) de los canales de K⁺ hTASK-1, rTASK-3, mTREK-1, hSLO1, Shaker IR (Shaker E sin la inactivación tipo A), herg1 y hKir2.1 se sintetizaron *in vitro*, a partir de los plásmidos linearizados, con la enzima T7 ARN polimerasa del kit mMessage mMachine (Ambion, Cat. No. 1344). Los ovocitos se obtuvieron mediante ovariectomía de ranas africanas de la especie *Xenopus laevis* [131]. Éstas se anestesiaron sumergiéndolas en agua con hielo por 20 min, se les colocó en una cama de hielo y se les cubrió con el mismo a excepción del abdomen. Posteriormente, se realizó una incisión (~1.5 cm) en la parte baja del abdomen y uno o dos lóbulos ováricos se extrajeron quirúrgicamente. Las ranas se suturaron y se aislaron para su recuperación. Los

ovarios se disgregaron mecánicamente con pinzas de disección (Fine Science Tools, Dumont No. 55) hasta formar pequeños cúmulos de 3 a 5 ovocitos y se incubaron por 30 min en el medio OR2, libre de Ca^{2+} ([mM]: 82.5 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl_2 , 5 HEPES: pH 7.4 NaOH) en presencia de colagenasa Tipo IA (1 mg/mL) de *Clostridium histolyticum* (Sigma, Cat. No. 5138). Finalmente, los ovocitos se lavaron varias veces con medio ND-96 ([mM]: 96 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl_2 , 1.8 CaCl_2 , 5 HEPES: pH 7.4 NaOH) y se mantuvieron en una incubadora (Revolutionary Science, RSIF-201) en el medio suplementado con 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Genkova), a 18 °C. Este último se cambió diariamente. Un día después de la desfoliculación, varios ovocitos de las etapas V-VI se seleccionaron para la inyección de ~50 nL de los diferentes ARNm (2-20 ng). Para la coexpresión de hTASK-1/rTASK-3, se preparó una solución de ARNm en una relación de 5:1. La presencia del heterodímero se verificó farmacológicamente por el porcentaje de inhibición con rojo de rutenio (RR), etanol y sensibilidad al pH_e [14] (**Apéndice II**). Se utilizaron capilares de vidrio (VWR International, Cat. No. 53508-400) previamente estirados (Sutter Instrument Co., Mod. P-2000) y llenados con una solución de aceite mineral (Sigma, CAS 8042-47-5), que se utilizó para sellar el capilar del aire y visualizar la pequeña cantidad de ARNm (1.5 μL); los capilares se manejaron empleando un microinyector manual (Drummond, digital microdispenser). Los ovocitos inyectados se incubaron a 18 °C de 24-48 h en medio ND-96 con gentamicina.

Las clonas utilizadas en este proyecto fueron generosamente donadas por el Dr. Michel Lazdunski (hTASK-1), la Dra. Janet Murbartián (mTREK-1) y la Dra. Ligia Toro (Shaker IR, hERG1, hSLO1 y hKir2.1). La clona de rTASK-3 se clonó durante mis estudios de maestría [132]. El canal mTREK-1 se subclonó a partir de la clona mTREK-pRK5 [133] en el vector de expresión pGEM-T (Promega, Cat. No. A3600), de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante. La construcción se secuenció para confirmar el marco abierto de lectura (ORF) correcto, verificar la identidad de la secuencia y la orientación (promotor T7, río arriba al amino terminal) (**Apéndice III**).

Todos los animales utilizados en el presente estudio se manejaron de acuerdo con los estándares aceptados en el cuidado y procedimientos aprobados por el Comité local de Investigación y Ética de la Facultad de Química de la UNAM. Se hizo lo posible por reducir el número y sufrimiento de los animales.

3.3. Registros en ovocitos por TEVC

Todos los ensayos electrofisiológicos en ovocitos se realizaron con la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos (TEVC) [134]. El equipo empleado fue un amplificador CA-1B High Performance Oocyte Clamp (Dagan Corporation), una interfase DigiData 1440 y un software de adquisición pclamp 10 (Axon Instruments). Para el registro de las corrientes se emplearon capilares de borosilicato (WPI, Cat. No. TW150-4), con los extremos pulidos con calor y estirados con el estirador automático. Los capilares se llenaron con una solución conductora de KCl (3 M) y se les insertó un alambre de Ag⁰/AgCl. Únicamente se emplearon aquellos capilares cuya resistencia fuera de 0.3 a 0.5 MΩ para el electrodo de la corriente y 0.8 a 1.2 MΩ para el electrodo del voltaje. Las mediciones de las corrientes se filtraron a 1 kHz, se almacenaron en una computadora a una frecuencia de muestreo de 3 kHz y se analizaron con los programas Clampfit versión 10.1, Microsoft Excel versión XP y Origin 6.0. Las células se observaron a través de un microscopio estereoscópico (Nikon, SMZ2T) con una magnificación de 40X y los capilares se manejaron con micromanipuladores (WPI, M3301). Para el registro de las corrientes se empleó un protocolo de pulsos cada 3 s con un potencial de mantenimiento de: -80 mV, para los canales TASK y mTREK-1; -60 mV, para hSLO1, Shaker IR y herg1; y 0 mV, para hKir2.1. Los intervalos de potencial fueron: -120 a +80 mV, para hKir2.1 (240 ms); -100 a +80 mV, para TASK y mTREK-1 (440 ms); -60 a +60 mV, para hSLO1, Shaker IR, herg1, (240 ms); con incrementos o decrementos de potencial de membrana de 20 mV. Se impuso un prepulso a -100 mV para el canal herg1. Los ovocitos se registraron en una cámara (280 μL) con ND-96 o ND-96_{modificado} (5 mM K⁺ para herg1 y 90 mM K⁺ para hKir2.1, se reemplazó Na⁺ por K⁺). Todos los registros se realizaron a temperatura ambiente (18-20 °C). Las corrientes de los canales de K⁺ expresados en los ovocitos se registraron antes, en presencia de los compuestos y después de lavar (≈10 mL de medio para retirar todo rastro del reactivo). En cada condición experimental se midieron controles con ovocitos inyectados con agua y ovocitos sin inyectar.

3.4. Cultivos de neuronas granulares de cerebelo de rata (NGC)

Los cultivos de las neuronas granulares del cerebelo (NGC) se prepararon como se describe en la literatura [135]. Se disecaron cerebelos de ratas Wistar de 7-8 días de nacimiento y las células se disociaron con tripsina y ADNasa (Sigma-Aldrich), se sembraron en cajas de plástico a una densidad de 2×10^4 células/cm² o cajas con cubreobjetos a una densidad de 8×10^4 células/cm², previamente cubiertas con poly-L-lisina (5 µg/mL) (Sigma, peso molecular 300,000). Posteriormente, se mantuvieron por 7-8 DIV. El medio de cultivo fue base de Eagle complementado con 10% (v/v) de suero fetal de bovino (GIBCO) inactivado con calor, 2 mM de glutamina, 25 mM de KCl, 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomicina (GIBCO). Este medio se refiere como K25 y corresponde a una condición control. Los cultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera saturada con vapor de agua, con 5% de CO₂. Para evitar la presencia de células no neuronales se adicionó citosina arabinósida (10 µM, Sigma-Aldrich) 24 h después de sembrar las NGC.

3.5. Registros de la corriente IKso en las NGC

La corriente basal (IKso) de las NGC se registró mediante la técnica de patch clamp en la configuración de célula completa [136]. El equipo empleado fue un amplificador Axopatch 200B, equipado con un cabezal CV201A, una interfase Digidata 1322 A/D (Axon Instruments) y un software de adquisición pCLAMP 9.2 (Molecular Devices Inc.). Los datos se digitalizaron a 10 KHz y se filtraron a 5 KHz. Para el registro de las corrientes se emplearon capilares de borosilicato (WPI, No. TW150-3) con una resistencia de 4-6 MΩ. Los capilares se llenaron con una solución interna (mM): 139 KCl, 5 MgCl₂, 0.1 EGTA, 3 ATP, 0.3 GTP, 5 HEPES, pH 7.2 KOH y una solución externa (mM): 130 NaCl, 2 KCl, 2 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 5 glucosa, 10 TEACl, 3 4-AP, 10 HEPES, pH 7.4 NaOH. Las células se registraron con un potencial de mantenimiento de -80 mV y se les aplicó un protocolo de pulsos de -100 a +80 mV, con incrementos de 20 mV, cada 10 s, por 200 ms. Las neuronas se perfundieron por gravedad a ~1.5 mL/min. Los experimentos se realizaron

a 20 °C. El control positivo RR (10 μ M) y los compuestos orgánicos más activos (500 μ M) se aplicaron directamente a la cámara de registro.

Este estudio se realizó en el laboratorio de Neuropatología Molecular del Dr. Juan Carlos Gómora Martínez en el Instituto de Fisiología de la UNAM, con la ayuda y asesoría del QFB. Osbaldo López.

3.6. Ensayos de viabilidad en NGC

Se realizaron ensayos de viabilidad de cultivos de NGC en presencia de los compuestos activos. La muerte celular programada se indujo a las neuronas mediante la adición de estaurosporina (Sts, 1 μ M) o transfiriéndolas a un medio que contiene 5 mM de KCl (K5) [117], [122], [137]. Posteriormente, en cada condición experimental (K25, K5, Sts) se adicionaron los compuestos orgánicos activos (10, 50, 100, 250 y 500 μ M) así como RR (5 y 10 μ M). La viabilidad celular se cuantificó por la doble tinción de calceína (0.5 μ M, Molecular Probes C-1430) y de yoduro de propidio (IP, 2 μ M, Sigma, P-4170) durante 10 min a 37 °C, 24 h después del tratamiento con o sin inducción de apoptosis. Las neuronas viables se marcaron de color verde con la calceína y las muertas de color rojo con IP. Se fotografiaron los cultivos celulares con un microscopio de epifluorescencia invertido (Nikon Diaphot TMD; Nikon Corp.), se utilizaron filtros para la detección de fluoresceína y rodamina con un objetivo de fluorescencia 20X (Nikon), a una longitud de onda de excitación y de emisión de 485 y 520 nm, respectivamente. Además, se utilizó microscopía de contraste de fase para determinar el número total de células. Para la cuantificación de las células viables se escogieron tres campos aleatoriamente por experimento y se utilizó el programa ImagenJ para contar el número de células presentes en campo claro, calceína y IP. Se graficó el porcentaje de células positivas a calceína o IP con respecto al total para cada condición experimental.

Tanto los cultivos como los ensayos de viabilidad de las NGC se realizaron en el laboratorio de Neurodesarrollo y Fisiología del Dr. Julio Morán Andrade en el Instituto de Fisiología de la UNAM, con la ayuda y asesoría de la M. en C. Guadalupe Domínguez y la Dra. Berenice Hernández.

3.7. Análisis estadístico

Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar. La significancia estadística de los resultados se estableció a $p < 0.05$ y se determinó por un análisis de varianza (ANOVA). En las gráficas donde las barras de error no se observan, se debe a que son más pequeñas que el tamaño de los símbolos. Las curvas dosis-respuesta se ajustaron a una ecuación de Hill con la forma: $y = 1/[1 + (c/k_{1/2})^n]$ (Origin 6.0; OriginLab Corp.), c es la concentración, $k_{1/2}$ es la concentración donde ocurre la mitad de la máxima inhibición y n es el coeficiente de Hill.

4. RESULTADOS

4.1 Efecto de las dihidropirrolisoquinolinas sobre la corriente de TASK-1 y TASK-3

Una serie de experimentos control con el vehículo (etanol) se realizaron antes de la evaluación de las dihidropirrol[2,1-*a*]isoquinolinas (DPIs) **1-5** en todos los ensayos electrofisiológicos, así como en los de viabilidad celular en las NGC (**Apéndice I**). Las corrientes endógenas de ovocitos control fueron pequeñas ($<0.7 \mu\text{A}$) (**fig. 4.1a**), comparadas con las de los ovocitos inyectados con ARNm de los canales de K^+ estudiados ($>4 \mu\text{A}$) (**fig. 4.1b, 4.1c** y **Apéndice IV**), por lo que no se realizó compensación alguna.

En la **figura 4.1** se presentan corrientes de los canales hTASK-1 y rTASK-3, expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*, en presencia de una concentración extracelular de 2 mM de K^+ ($[\text{K}^+]_e$). Estas corrientes estables presentaron una activación rápida tal y como se encuentra descrito en la literatura [9], [23].

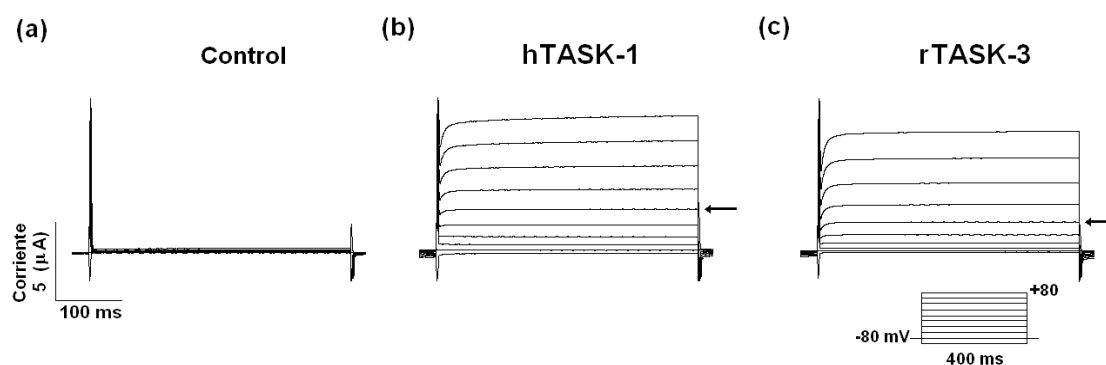
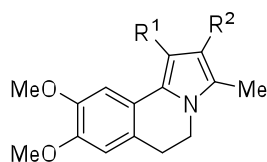


Figura 4.1. Expresión del ARNm de los canales TASK. Registro representativos de las corrientes generadas por ovocitos control inyectados con H_2O (a), ovocitos inyectados con el ARNm de los canales hTASK-1 (b) y rTASK-3 (c). Los ovocitos se estimularon con el protocolo de pulsos ilustrado en la figura. Las flechas indican los registros de las corrientes a 0 mV.

Cinco derivados del sistema DIP (100 μM), cuatro de ellos con actividad anticancerígena (compuestos **2** al **5**, **tabla 4.1**) [82], se evaluaron sobre las corrientes de los canales rTASK-1 y hTASK-3. Se observó disminución en la corriente, para los compuestos **1-3** de manera significativa (**fig. 4.2b, 4.2c, 4.2e** y **4.2f**), la forma de los registros no cambió, lo que sugiere que éstos podrían actuar como bloqueadores de poro, aunque futuros

experimentos son necesarios para corroborarlo. En la **tabla 4.1** se resume el efecto de las cinco DPIs evaluadas, en negritas se presentan los mayores porcentajes de inhibición.



Compuesto	R ¹	R ²	hTASK-1		rTASK-3	
			Inhibición (%)			
1	CN	C ₆ H ₅	27.8±2.4	(5)	45.5±1.0	(7)
2	CO ₂ Et	C ₄ H ₃ S	51.5±2.1	(6)	13.4±1.4	(5)
3	CO ₂ Et	<i>m</i> -C ₆ H ₄ -NH ₂	52.0±0.9	(6)	43.2±1.1	(7)
4	CO ₂ Et	H	13.7±3.6	(5)	9.4±3.2	(5)
5	CO ₂ Et	C ₆ H ₅	20.0±5.8	(5)	6.5±2.9	(5)

Tabla 4.1. Estructura química de los compuestos orgánicos derivados del sistema dihidropirrolo[2,1-*a*]isoquinolina y el porcentaje de inhibición sobre la corriente de hTASK-1 y rTASK-3. R¹ y R² son sustituyentes del sistema DPI. Se muestra el porcentaje de inhibición, a un potencial de +80 mV, de las corrientes de hTASK-1 y rTASK-3 en presencia de 100 μM de los compuestos. La corriente de los canales se registró con el protocolo de pulsos ilustrado en la **fig. 4.1**. Los datos se expresan como el promedio ± error estándar. (Los números entre paréntesis indican el número de ovocitos estudiados).

Las actividades mayores la presentaron el compuesto **1** sobre rTASK-3, el **2** en hTASK-1 y el **3** en ambos canales. Al evaluar los derivados más activos (**1-3**) sobre las corrientes de los ovocitos control, bajo las mismas condiciones experimentales, se observó una reducción mínima. Los porcentajes de inhibición de los derivados (100 μM) a +80 mV fueron de 5.4±0.4% para el compuesto **1**, de 6.5±0.2% para el compuesto **2** y de 3.9±1.5% para el compuesto **3**. Este efecto, sobre las corrientes de los ovocitos control, comparado con el observado sobre los canales TASK se consideró no significativo (**fig. 4.3**).

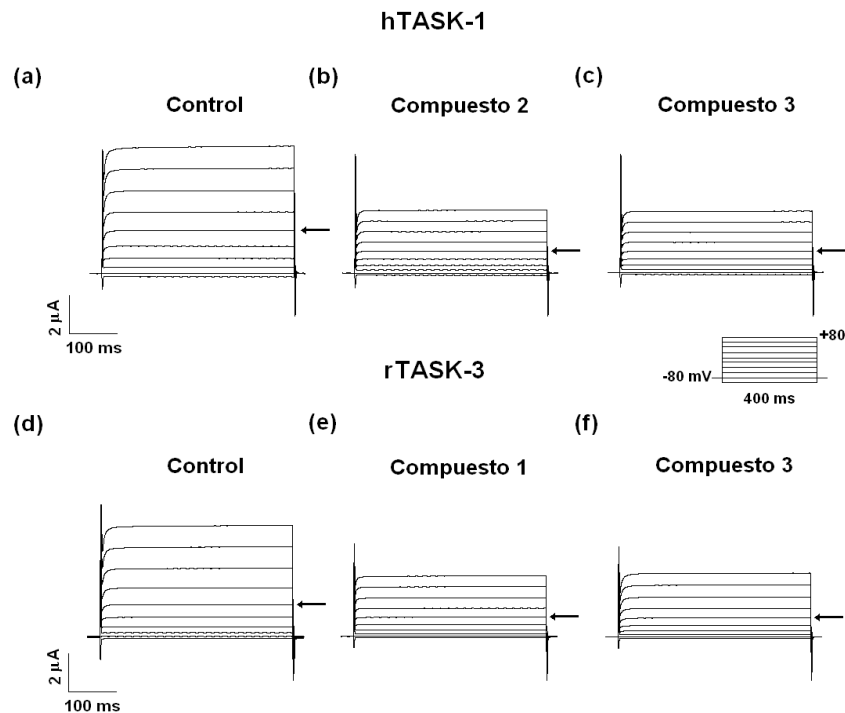


Figura 4.2. Las dihidropirrollo[2,1-*a*]isoquinolinas inhiben la corriente de los canales hTASK-1 y rTASK-3. Registro representativos de las corrientes generadas por ovocitos inyectados con el ARNm de los canales hTASK-1 (a) y rTASK-3 (d) en ausencia o en presencia de 100 μM de los compuestos orgánicos activos: 1 (e), 2 (b) y 3 (c, f). Los ovocitos se estimularon con el protocolo de pulsos ilustrado en la figura. Las flechas indican los registros de las corrientes a 0 mV.

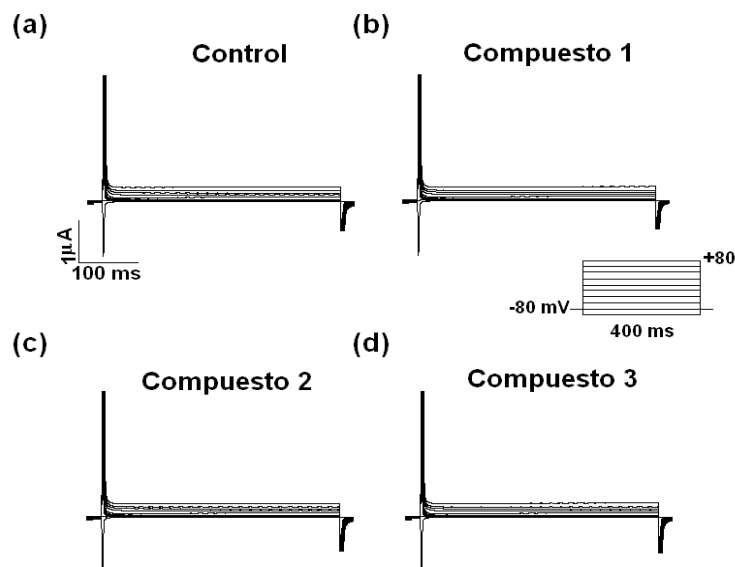


Figura 4.3. Inhibición mínima de las dihidropirrollo[2,1-*a*]isoquinolinas activas sobre la corriente de ovocitos controles. Registro representativos de las corrientes generadas por ovocitos inyectados con agua (a) en ausencia o en presencia de 100 μM de los compuestos orgánicos activos: 1 (b), 2 (c) y 3 (d). Los ovocitos se estimularon con el protocolo de pulsos ilustrado en la figura.

Con la finalidad de promediar y comparar los registros se utilizaron corrientes relativas control ($I_{\text{rel-control}} = I/I_{80\text{mV}}$) y corrientes relativas en presencia de las DIPs ($I_{\text{rel-DPI}} = I_{\text{DPI}}/I_{\text{rel-control}}$). La relación I-V de los canales TASK a baja $[K^+]_e$, en ausencia o presencia de 100 μM de los compuestos activos, presentó la respuesta típica de las corrientes salientes con rectificación. El potencial de inversión aproximadamente a -80 mV concordó con el potencial de equilibrio del ión K^+ a bajas $[K^+]_e$ (fig. 4.4a y 4.4c). El porcentaje de inhibición, $[(I_{\text{rel-control}} - I_{\text{rel-DPI}})/I_{\text{rel-control}}]*100$, sobre la corriente parece ser independiente del potencial de membrana, al menos a voltajes entre -60 a +80 mV (fig. 4.4b y 4.4d). Esta conducta era de esperarse ya que estos canales no tienen un sensor de voltaje [7] y además los compuestos no presentan carga [82]. Posiblemente estos inhibidores interaccionen con el vestíbulo externo del canal, obstaculizando el flujo de K^+ .

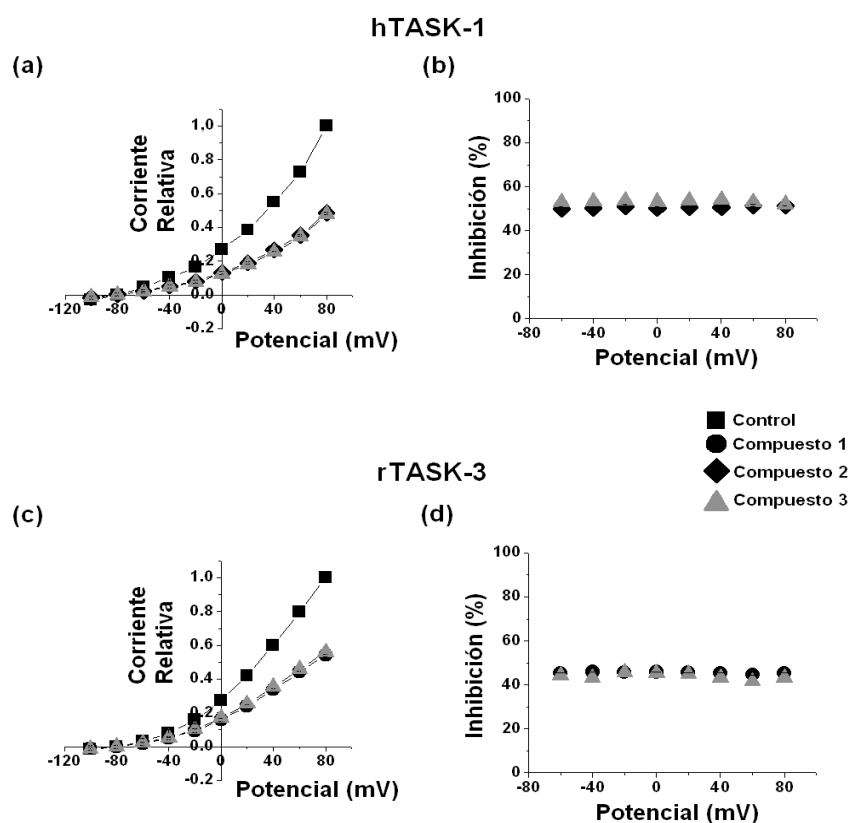


Figura 4.4. La inhibición de las pirroloisoquinolinas sobre la corriente TASK es independiente del voltaje. Relación I-V para hTASK-1 (a) y rTASK-3 (c) en ausencia como control (cuadros) o en presencia de 100 μM de los compuestos orgánicos: 1 (círculos), 2 (diamantes) ó 3 (triángulos grises). Porcentaje de inhibición de los compuestos activos (100 μM), vs. potencial para hTASK-1 (b) y rTASK-3 (d). La corriente de los canales se registraron empleando el protocolo de pulsos ilustrado en la figura 4.1. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar (n=6-7).

Posteriormente, se trazó la curva dosis-repuesta (0.3-500 μM) de los compuestos **1**, **2** y **3**, sobre las corrientes de los canales TASK (**fig. 4.5**). Las gráficas se ajustaron a una ecuación de Hill, como se describe en la sección *Métodos*. No fue posible evaluar los compuestos a una concentración mayor debido a su baja solubilidad en etanol. Los datos del porcentaje de inhibición máxima (% $\text{Inh}_{\text{máx}}$), concentración inhibitoria al 50% (IC_{50}) y del coeficiente de Hill (n) se presentan en la **tabla 4.2**.

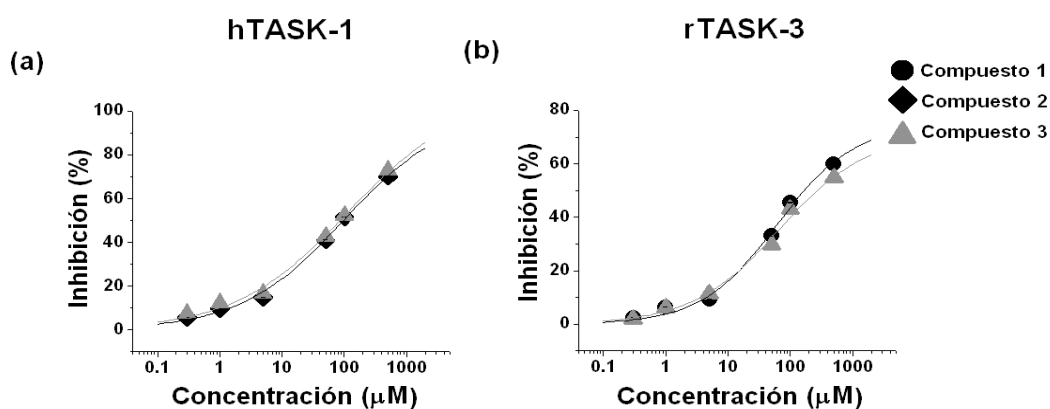


Figura 4.5. Curvas dosis-respuesta. Los canales hTASK-1 (a) y rTASK-3 (b) muestran una reducción en la corriente a diferentes concentraciones de los compuestos **1** (círculos), **2** (rombos) y **3** (triángulos grises) (0.3, 1, 5, 50, 100, 500 μM), a un potencial de +80 mV. La inhibición se ajustó a una ecuación de Hill (*ver Métodos*). Medio ND-96 a pH = 7.4. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar ($n=6-11$).

Compuesto	hTASK-1			rTASK-3		
	% $\text{Inh}_{\text{máx}}$ (500 μM)	IC_{50} (μM)	n	% $\text{Inh}_{\text{máx}}$ (500 μM)	IC_{50} (μM)	n
1	ND	ND	ND	63	189.2 \pm 27.0	0.53 \pm 0.04
2	72	96.7 \pm 6.9	0.52 \pm 0.02	ND	ND	ND
3	74	83.5 \pm 8.7	0.51 \pm 0.03	58	268.1 \pm 47.4	0.47 \pm 0.04

Tabla 4.2. Datos obtenidos a partir de las curvas dosis-respuesta. Porcentaje de inhibición máxima (% $\text{Inh}_{\text{máx}}$), concentración inhibitoria al 50% (IC_{50}) y el coeficiente de Hill (n) de los compuestos **1**, **2** y **3**, respecto a su inhibición sobre la corriente de los canales hTASK-1 y rTASK-3. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar ($n=6-11$). Valor no determinado (ND).

En la **figura 4.6** se presenta el curso temporal de la relación I/I_0 (I_0 , corriente del primer pulso repetitivo; I , corriente a $t > 0$) vs tiempo de los compuestos **1-3** sobre los canales TASK. Los valores de I/I_0 decrecieron rápidamente cuando se aplicaron a las células 100 μM de las DPIs. Este efecto permaneció durante la presencia de los compuestos

y se recuperó una fracción de I/I_0 rápidamente después de perfundir con medio ND-96. El porcentaje de recuperación de la corriente inicial de hTASK-1 fue del $64\pm 3.6\%$ para **2** y $58\pm 2.3\%$ para **3** (**fig. 4.6a**). En relación a rTASK-3 los porcentajes fueron: $73\pm 5.9\%$ para **1** y $71\pm 4.6\%$ para **3** (**fig 4.6b**). Como control, se adicionó $30\ \mu\text{M}$ de rojo de rutenio (RR) sobre la corriente del canal rTASK-3, el cual presentó una inhibición del $68.3\pm 2.3\%$ y el porcentaje de recuperación de la corriente inicial fue del $92.0\pm 1.6\%$ (**fig 4.6c**). Esto podría sugerir que los compuestos orgánicos no se disocian completamente y/o se acumulan en la membrana de los ovocitos, aunque son necesarios experimentos adicionales para corroborar estas hipótesis.

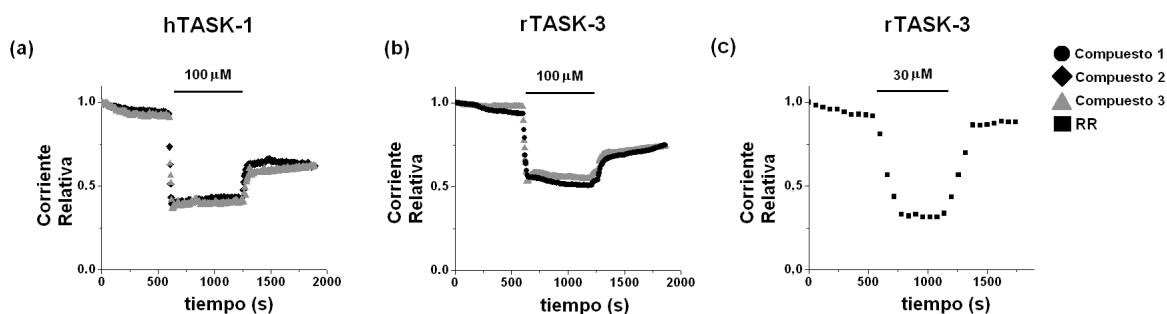


Figura 4.6. Los compuestos activos presentan una disociación incompleta del canal y/o acumulación en la membrana de los ovocitos. Curso temporal de inhibición de la corriente de los canales hTASK-1 (a) y rTASK-3 (b) en presencia de $100\ \mu\text{M}$ de los compuestos **1** (círculos), **2** (rombos), **3** (triángulos grises) y $30\ \mu\text{M}$ de rojo de rutenio (RR) (cuadros) sobre la corriente de rTASK-3 (c). Las barras indican la aplicación extracelular de los compuestos. Cada punto de la gráfica representa el promedio de la corriente registrada durante 5 s para los compuestos activos y 60 s para RR, a un pulso de $+80\ \text{mV}$. Medio ND-96 a $\text{pH} = 7.4$, ($n=5$).

4.2 Selectividad de los compuestos activos hacia los canales TASK

Con la finalidad de conocer si las pirroloisoquinolinas **1**, **2** y **3** inhiben selectivamente a los canales TASK, su actividad se evaluó sobre la corriente de canales de K^+ con distinta topología y características biofísicas: activados por voltaje (6TM/1P), Shaker IR (sin la inactivación tipo A) y herg1 (torreta grande entre 5TM-P con 43 aa); (7TM/1P), hSLO1 (alta conductancia/modulado por Ca^{2+}); e insensibles al voltaje: (2TM/1P), hKir2.1 (rectificador entrante fuerte); (4TM/2P), heterodímero hTASK-1/rTASK-3 y mTREK-1 (como canales de fuga). El último es interesante ya que también se sobreexpresa en líneas celulares cancerígenas de ovario (SKOV-3 y OVCAR-3) [138] y

próstata (PC3 y LNCaP) [139], y se coexpresa con los canales TASK en varios tejidos [7], [140], [141]. Todas estas proteínas se expresaron en ovocitos de *X. laevis* y se aplicaron protocolos adecuados de voltaje para evocar las corrientes iónicas empleando la técnica de TEVC (*ver Métodos*).

El resumen de este estudio se presenta en la **tabla 4.3**, como el porcentaje de disminución de las corrientes en presencia de las DPIs. Los compuestos activos **1-3** inhibieron de manera importante a los canales TASK (100 μ M) y hSLO1 (500 μ M); y ligeramente a los canales Shaker IR, herg1 y hKir2.1 (500 μ M). El compuesto **3** inhibió significativamente al canal mTREK-1 (500 μ M) (*Registros: Apéndice IV*). Así, las pirroloisoquinolinas **1**, **2** y **3** inhiben preferencialmente a los canales TASK a una concentración de 100 μ M.

Canales iónicos	Compuesto 1		Compuesto 2		Compuesto 3	
	Concentración (μ M)					
	100	500	100	500	100	500
hTASK-1	27.8 \pm 2.4	47.6 \pm 3.5	51.5 \pm 2.1	70.1 \pm 1.9	52.0 \pm 0.9	72.8 \pm 1.6
rTASK-3	45.5 \pm 1.0	60.0 \pm 2.6	13.4 \pm 1.4	23.3 \pm 2.0	43.2 \pm 1.1	54.7 \pm 3.1
hTASK-1/rTASK-3	24.1 \pm 2.9	43.4 \pm 5.8	45.2 \pm 2.6	52.0 \pm 3.0	52.1 \pm 2.8	60.1 \pm 1.8
mTREK-1	NS	6.8 \pm 3.2	NS	7.8 \pm 4.4	12.1 \pm 3.0	32.0 \pm 1.8
Shaker IR	3.1 \pm 0.7	NS	(5.7 \pm 3.8)	4.2 \pm 3.3	NS	8.5 \pm 2.9
herg1	2.9 \pm 0.7	10.3 \pm 2.4	(7.7 \pm 5.4)	13.5 \pm 1.9	7.2 \pm 1.4	13.8 \pm 1.8
hSLO1	10.4 \pm 1.4	24.2 \pm 3.3	16.6 \pm 1.9	41.5 \pm 3.0	13.2 \pm 0.2	25.4 \pm 2.7
hKir2.1	(1.6 \pm 0.2)	NS	1.3 \pm 1.1	1.7 \pm 0.6	2.7 \pm 0.9	2.5 \pm 1.1

Tabla 4.3. Las pirroloisoquinolinas activas inhiben preferencialmente a los canales TASK a una concentración de 100 μ M. Porcentaje de inhibición de las corrientes de los canales de K^+ expresados en ovocitos *Xenopus* en presencia de 100 y 500 μ M de los compuestos **1**, **2** y **3**. Las corrientes de los canales de K^+ se registraron con diferentes protocolos de pulsos de voltajes (*ver Métodos*). Medio ND-96 a pH = 7.4. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar (n=5). Valor no significativo (NS). Los valores entre paréntesis indican porcentaje de activación, no de inhibición.

4.3 Efecto de las pirroloisoquinolinas sobre a IKso en NGC

Las neuronas granulares del cerebelo (NGC) de rata presentan una corriente basal de K^+ , saliente y estable (IKso), previamente descrita y caracterizada inicialmente por

Watkins y Mathie en 1996 [129]. Otros grupos han encontrado que los canales TASK-1 y TASK-3 cuando se encuentran expresados a una densidad alta en NGC, contribuyen con más del 50% a la corriente IK_{so} en cultivos de 7 a 8 días *in vitro* [25], [26], [28], [29]. Por este hecho, consideramos importante determinar el efecto de los derivados activos sobre esta corriente nativa.

Para registrar mayoritariamente la corriente basal IK_{so} de las neuronas granulares del cerebelo se emplearon los típicos bloqueadores de canales de K^+ : TEA⁺ (10 mM) que inhibe aproximadamente el 82% de la corriente sostenida [142], [143] y 4-AP (3 mM) que bloquea tanto la corriente sostenida como la transitoria [142], [144], [145]; de esta manera se tiene un bloqueo mayor al 80% de la corriente saliente de K^+ . En las NGC, bajo las condiciones experimentales de trabajo (*ver Métodos*), no se detecta la presencia de corrientes de Ca^{2+} [144]. La corriente de Na^+ se observó en la mayoría de los registros como se encuentra reportado en la literatura [144] (**Apéndice V**). Sin embargo, en los registros (representativos) presentados en esta sección de resultados no se aprecia esta corriente entrante de Na^+ . La presencia de esta última no afecta el análisis de nuestros resultados, ya que se tomó el valor de la corriente al final del pulso, a los 180 ms, cuando la corriente basal es estable y los canales de Na^+ se encuentran inactivados.

La técnica de patch clamp en la configuración de célula completa se empleó para registrar las corrientes IK_{so} en presencia de 2 mM de K^+ extracelular. Éstas se activan rápidamente (**fig. 4.7a**), sin embargo en algunos registros se observó un componente transitorio, el cual se identificó por su cinética rápida de activación e inactivación, que no se remueve completamente por la 4-AP [144] (**fig. 4.8g**). Este componente en la corriente IK_{so} se origina por la presencia de canales de K^+ de la familia $K_v4.x$ y se encuentra descrito en la literatura [142].

Con el objeto de verificar la presencia del canal TASK-3 en la corriente IK_{so} , previo a la evaluación de los compuestos activos, se utilizó como control 10 μ M de rojo de rutenio (RR), ya que este canal contribuye mayoritariamente a esta corriente basal con respecto al canal TASK-1 o al heterodimérico [25], [26]. A esa concentración el RR inhibiría aproximadamente el 60% de la corriente del canal TASK-3 [49]. De facto la corriente disminuyó $48 \pm 4.9\%$, y se recuperó hasta un $88.0 \pm 4.8\%$ al lavar con el medio (**figura 4.7**). Esto sugiere que la participación del canal TASK-3 en la corriente nativa

podría ser mayor al 50%, sin embargo el RR es un compuesto muy inespecífico que también inhibe la corriente de otros canales de K^+ [146], incluyendo a otros miembros de la familia de 4TM/2P (TREK-2 y TRAAK) [147].

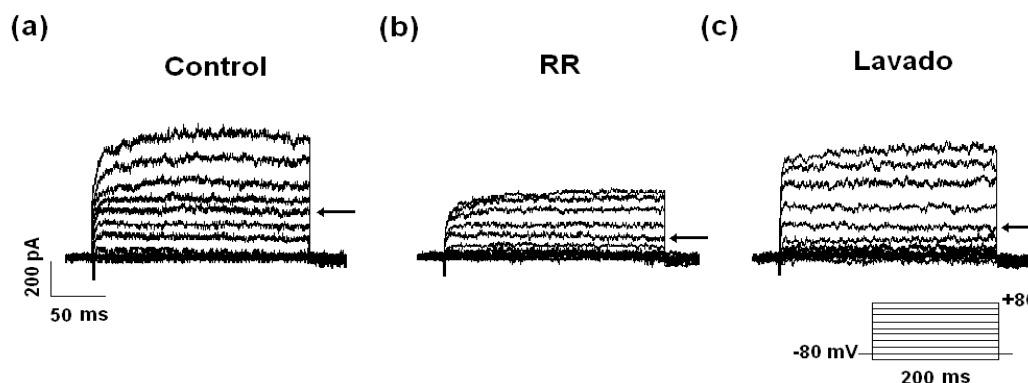


Figura 4.7. La corriente IK_{so} de las neuronas granulares del cerebelo se inhibe en presencia de rojo de rutenio (RR). Registros representativos de la corriente IK_{so} de NGC en ausencia (a), presencia (b) y lavado (c) de $10 \mu M$ de RR. Las células se registraron con el protocolo inserto en la figura. Las flechas indican los registros de las corrientes a $0 mV$.

Los compuestos **1**, **2** y **3** ($500 \mu M$) inhibieron parcialmente la corriente IK_{so} de las NGC, sin cambiar sustancialmente su forma, incluso se remarcó el componente transitorio antes mencionado (**fig. 4.8h**). El porcentaje de inhibición de los derivados a $+80 mV$ fue: de $47.7 \pm 4.5\%$, para **1** (**fig. 4.8b**); $62.4 \pm 3.9\%$, para **2** (**fig. 4.8e**) y $42.8 \pm 4.0\%$, para **3** (**fig. 4.8h**). Cuando las neuronas se lavaron profusamente la amplitud de la corriente inicial se recuperó parcialmente. El porcentaje de recuperación a $+80 mV$ para el compuesto **1** fue de $77.8 \pm 4.1\%$ (**fig. 4.8c**); para el **2**, $61.84 \pm 3.7\%$ (**fig. 4.8f**) y $68.35 \pm 4.2\%$ para **3** (**fig. 4.8i**). Este mismo porcentaje de recuperación se observó en la corriente TASK expresada en ovocitos (**fig. 4.6**). Nuevamente esto sugiere que los compuestos orgánicos no se disocian completamente y/o se acumulan en la membrana de las NGC, pero son necesarios experimentos adicionales para corroborar esta observación.

En la **figura 4.9** se presenta la relación I-V para la corriente IK_{so} , en ausencia y presencia de $500 \mu M$ de los compuestos activos y $10 \mu M$ de RR, en ella se muestra rectificación saliente y potencial de inversión similar al de equilibrio del ión K^+ ($\sim -80 mV$ a una $[K^+]_e = 2 mM$) observada para los canales TASK expresados en ovocitos (**fig. 4.4**).

Estos resultados sugieren que estas pirroloisoquinolinas podrían seleccionar la contribución de los TASK dentro de esta corriente basal.

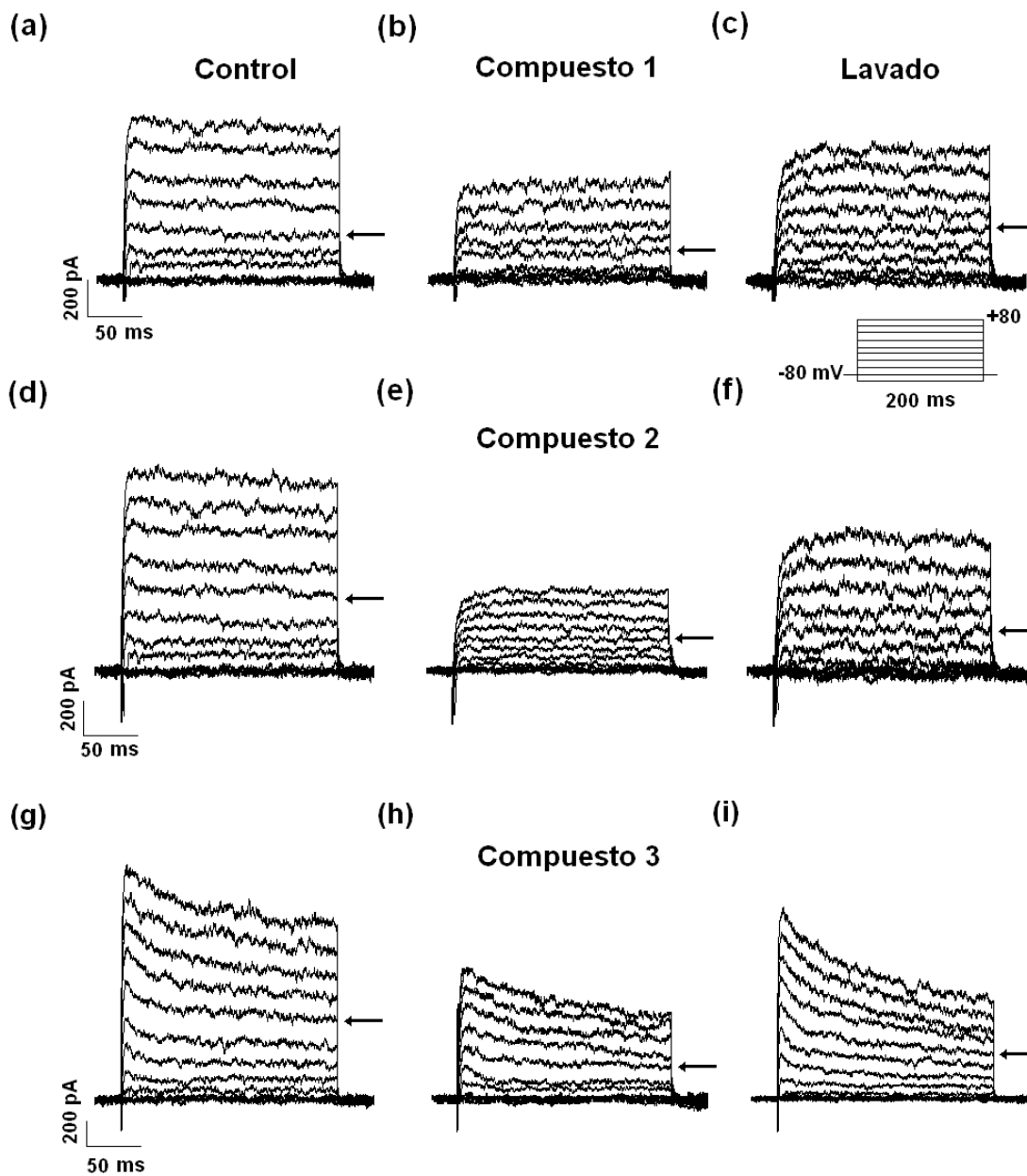


Figura 4.8. La corriente I_{Kso} de las NGC se inhibe en presencia de las pirroloisoquinolinas activas. Registros de la corriente I_{Kso} en NGC en ausencia (a, d, g), presencia de $500 \mu\text{M}$ de los compuestos 1 (b), 2 (e), 3 (h) y después del lavado con medio (c, f, i). Las células se registraron con el protocolo inserto en la figura. Las flechas indican los registros de las corrientes a 0 mV .

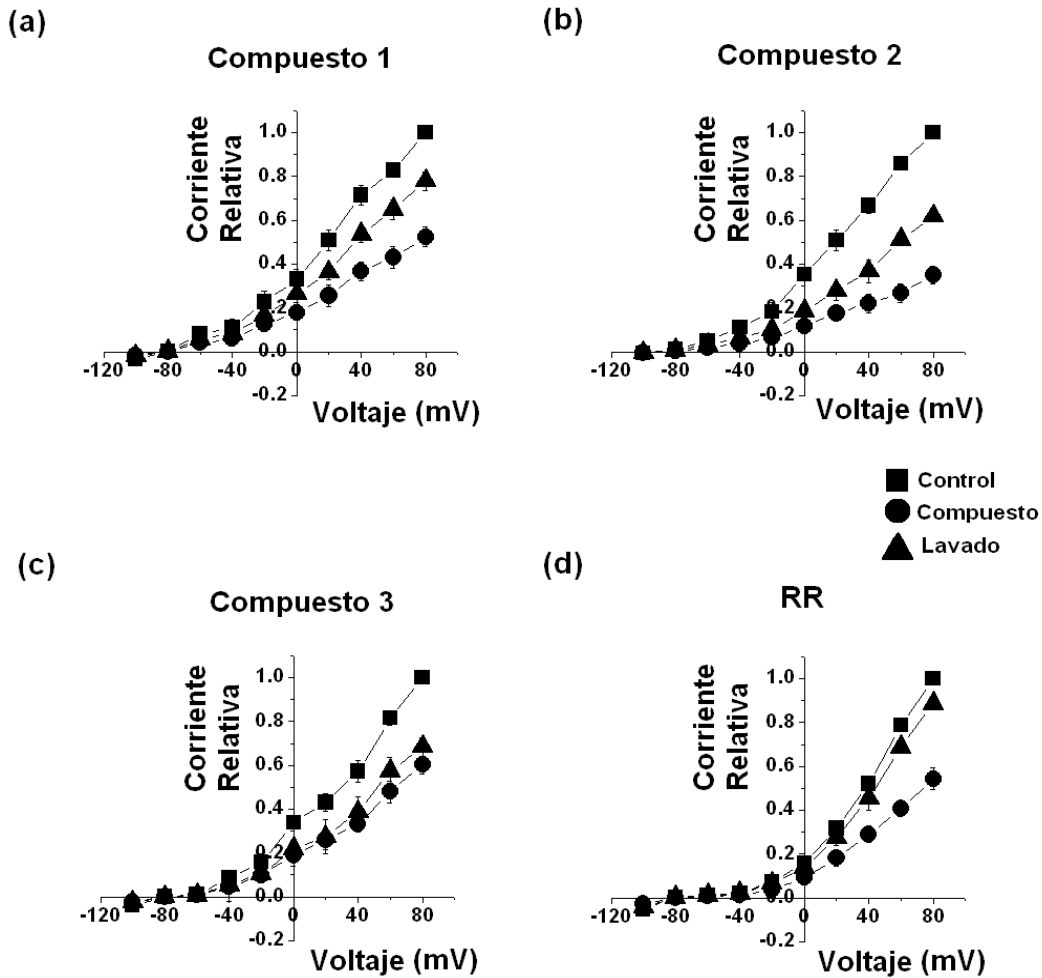


Figura 4.9. Relación I-V de la corriente *I*_{Kso} de las NGC en presencia los compuestos activos. Curvas I-V en ausencia (control, cuadros), presencia (círculos) de 500 μ M de los compuestos activos: **1** (a), **2** (b), **3** (c) y 10 μ M de rojo de rutenio (RR, d); y lavado (triángulos). La corriente *I*_{Kso} se registró al aplicar el protocolo de pulsos ilustrado en la **figura 4.8**. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar (n=5).

4.4 Ensayos de viabilidad en NGC

En vista que los compuestos activos inhibieron la corriente *I*_{Kso} de las NGC y con la finalidad de corroborar la participación de los canales TASK en la muerte celular programada de estas neuronas [28], se decidió evaluar el efecto de las DPIs sobre estas células bajo condiciones de apoptosis (dependiente de K⁺). Tres condiciones experimentales se examinaron en presencia o ausencia de las DPIs **1**, **2**, **3** y RR: a) medio K25, control de viabilidad celular; b) medio K5, inducción a la apoptosis por baja

concentración de K^+ ; y c) medio con estaurosporina (Sts), inducción a la apoptosis por un mecanismo no dependiente de K^+ (*ver Métodos*).

4.4.1 Medio K25: control de viabilidad celular

La toxicidad de las pirroloisoquinolinas activas se evaluó en condiciones de viabilidad celular (medio K25) (**fig. 4.10**). En las imágenes de microscopía de cultivos neuronales se observa a las células viables teñidas en verde por la calceína y las células muertas teñidas en rojo por el yoduro de propidio (IP), en ausencia o presencia de las DPIs activas (**fig. 4.10a**). En la gráfica de barras se presenta el porcentaje de muerte celular (células marcadas con IP) con respecto al número total de células presentes en la microscopía de contraste de fase (CF) (**fig. 4.10b**). La diferencia significativa respecto al medio K25 se presenta por dos asteriscos. En el control (medio K25) se observó un gran porcentaje de células viables teñidas de verde (88.8 ± 1.7) y un porcentaje pequeño de células muertas en rojo (8.7 ± 1.7). En presencia de los compuestos **1**, **3** y RR prácticamente no se observan efectos nocivos por 24 h, permaneciendo similar al control. Aunque, el compuesto **3** a una concentración de $500 \mu\text{M}$ fue ligeramente tóxico ya que provocó un 20.3 ± 4.9 % de muerte celular. Sin embargo, el compuesto **2** fue altamente tóxico en todas las condiciones experimentales examinadas (K25, K5 y Sts). En presencia del compuesto **2** ($500 \mu\text{M}$) se observa un porcentaje menor (62.5 ± 3.4) de células teñidas de verde y un porcentaje mayor (43.0 ± 3.7) de células en rojo, a diferencia del control.

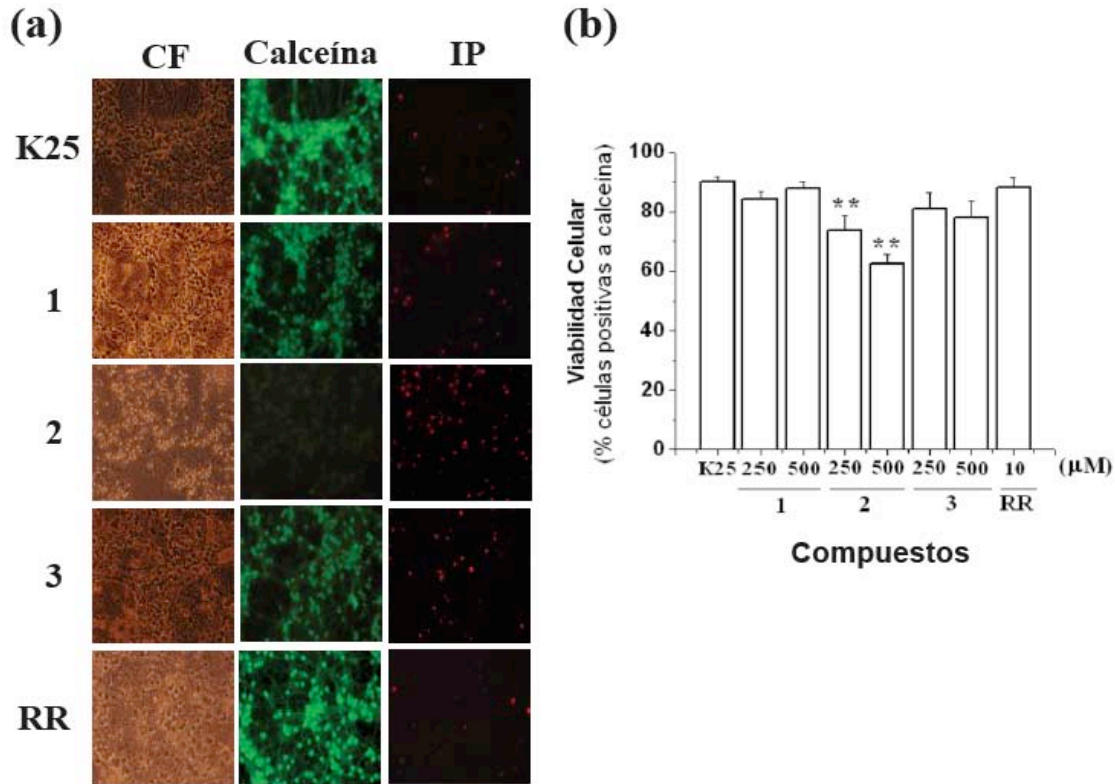


Figura 4.10. Efecto de las DPIs activas bajo condiciones de viabilidad celular (K25) en neuronas granulares del cerebelo. Imágenes de microscopía de cultivos de NGC de 8 DIV: contraste de fases (CF), tinción con calceína y yoduro de propidio (IP), en medio K25 en ausencia y presencia de los compuestos **1**, **2**, **3** (500 μM) y RR (10 μM) (a). En la gráfica de barras se muestra el porcentaje de muerte celular (células positivas a IP), en medio K25 en ausencia y presencia de los compuestos **1**, **2**, **3** (250 y 500 μM) y RR (10 μM) (b). Se muestra el error estándar (n=4-7). Los valores significativamente diferentes se indican como ** $p < 0.05$ vs. control (K25).

En las siguientes **tablas** se presentan los resultados obtenidos en este estudio:

	Calceína (%)	IP (%)
K25	88.8±1.7	8.7±1.7
Compuesto 1 (μM)		
10	86.3±1.2	11.4±1.2
50	86.0±2.3	11.7±3.8
100	86.0±1.6	11.0±0.8
250	84.3±2.6	11.3±3.4
500	87.9±2.2	11.7±2.2

Tabla 4.4. El compuesto 1 no presenta efectos tóxicos a las NGC bajo condiciones de viabilidad celular (K25). Porcentaje de células positivas a calceína y a yoduro de propidio (IP), en medio K25. Los datos se expresan como el promedio ± error estándar (n=4-7).

	Calceína (%)	IP (%)
K25	88.8±1.7	8.7±1.7
Compuesto 2 (µM)		
10	92.3±0.8	5.7±0.6
50	92.0±1.8	6.2±1.4
100	88.1±3.9	6.9±2.1
250	74.0±4.8	35.1±1.6
500	62.5±3.4	43.0±3.7

Tabla 4.5. El compuesto 2 es tóxico a las NGC bajo condiciones de viabilidad celular (K25). Porcentaje de células positivas a calceína y a yoduro de propidio (IP), en medio K25. Los datos se expresan como el promedio ± error estándar (n=4-7). En algunas condiciones experimentales (250 y 500 µM) se presenta una relación mayor al 100% entre el porcentaje de viabilidad y muerte celular, este efecto se podría deber a una sobre estimación de alguna ó de ambas condiciones, originada en el conteo celular.

	Calceína (%)	IP (%)
K25	88.8±1.7	8.7±1.7
Compuesto 3 (µM)		
10	83.1±3.8	16.0±4.5
50	86.1±3.7	12.4±3.9
100	86.0±3.7	12.4±4.2
250	81.2±5.4	17.4±5.0
500	78.1±5.6	20.3±4.9

Tabla 4.6. El compuesto 3 es ligeramente tóxico a las NGC bajo condiciones de viabilidad celular (K25). Porcentaje de células positivas a calceína y a yoduro de propidio (IP), en medio K25. Los datos se expresan como el promedio ± error estándar (n=4-7).

	Calceína (%)	IP (%)
K25	88.8±1.7	8.7±1.7
RR (µM)		
10	88.2±3.4	10.4±3.4

Tabla 4.7. El rojo de rutenio (RR) no presenta efectos tóxicos a las NGC bajo condiciones de viabilidad celular (K25). Porcentaje de células positivas a calceína y a yoduro de propidio (IP), en medio K25. Los datos se expresan como el promedio ± error estándar (n=5).

4.4.2 Medio K5: inducción a la apoptosis por baja concentración de K⁺

Con la finalidad de corroborar la participación de canales TASK en la apoptosis dependiente de K⁺ de las NGC, se evaluaron las pirroloisoquinolinas activas en condiciones de baja concentración de K⁺ (K5) (**fig. 4.11**). En ausencia de los reactivos, medio K5, el porcentaje de células viables teñidas de verde fue del 46.5±2.2 % y de células muertas teñidas en rojo fue del 52.7±2.6 %. Este resultado concuerda con lo reportado en la literatura, donde se ha observado el 50 % de muerte celular al incubarse a las NGC en un medio con 5 mM de K⁺ por 24 h [122]. En presencia de los compuestos **1**, **3** y RR, se observa en las imágenes de microscopía de cultivos neuronales que la tinción se incrementa con calceína y disminuye con IP, en comparación con el control (medio K5). Así, estos compuestos protegen significativamente a las neuronas de la muerte que se ocasiona al transferirlas a un medio con 5 mM de K⁺, lo opuesto ocurre con el compuesto **2** (**fig. 4.11a**). El compuesto **1** (500 μM) presentó una protección de ~26 %, ya que se muere únicamente el 27.2±5.1 % de las NGC. En presencia del compuesto **3** (500 μM) muere el 46.3±2.0 %, con una protección mínima de ~7 %. En contraste, la presencia del compuesto **2** (500 μM) incrementa drásticamente el porcentaje de muerte celular (87.7±3.3). En las gráficas de barras se observa la diferencia significativa presentada por los compuestos (**1-3**) y RR con respecto al medio K5 (presentada por dos cruces) (**fig. 4.11b**).

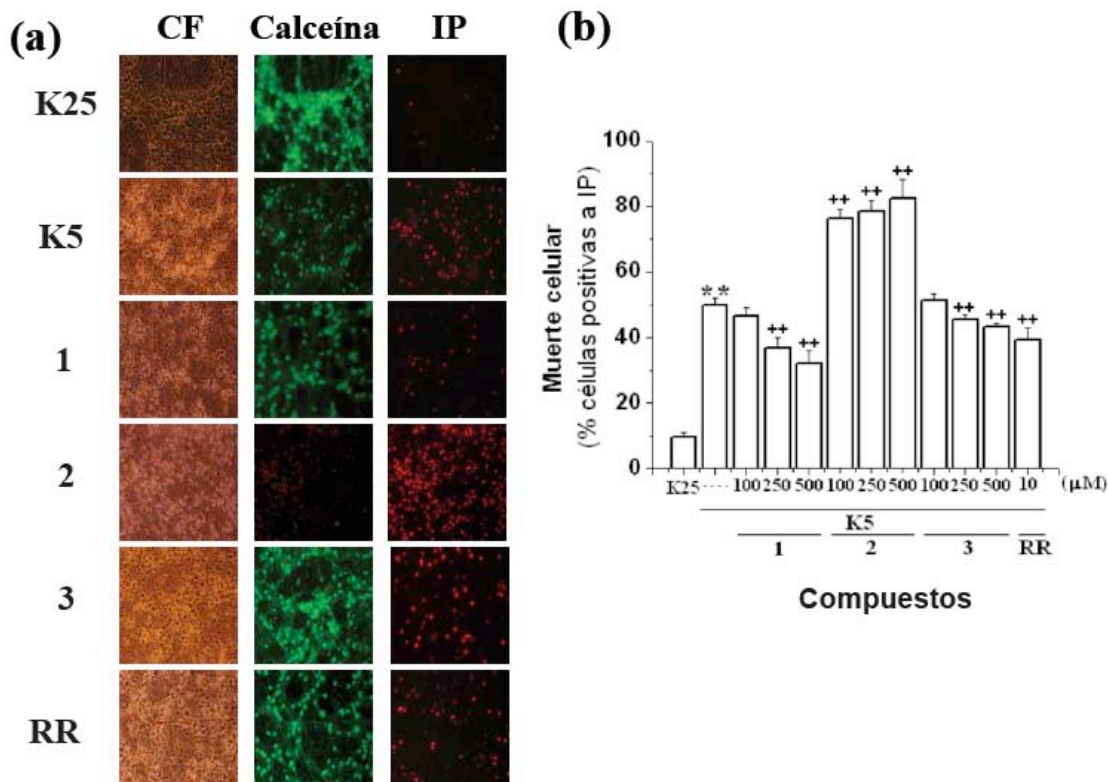


Figura 4.11. Efecto de las pirroloisoquinolinas activas bajo condiciones de muerte celular en baja concentración de K^+ (K5) en neuronas granulares del cerebelo. Imágenes de microscopía de cultivos de NGC de 8 DIV: contraste de fases (CF), tinción con calceína y yoduro de propidio (IP), en medio K5 en ausencia y presencia de los compuestos **1**, **2**, **3** (500 μ M) y RR (10 μ M) (a). En la gráfica de barras se presenta el porcentaje de muerte celular (células positivas a IP), en medio K5 en ausencia y presencia de los compuestos **1**, **2**, **3** (100, 250 y 500 μ M) y RR (10 μ M) (b). Las barras indican el error estándar (n=6-10). Los valores significativamente diferentes se indican como ** $p < 0.05$ vs. control (K25), $^{++}p < 0.05$ vs. K5.

Los resultados obtenidos en estos ensayos se presentan en las siguientes **tablas**:

	Calceína	IP
K25	88.8±1.7	8.7±1.7
K5	46.5±2.2	52.7±2.6
Compuesto 1		
(μ M)		
10	39.3±3.2	57.8±3.3
50	53.8±3.1	50.2±0.6
100	52.5±3.3	47.5±2.0
250	60.3±1.9	38.3±1.7
500	67.9±6.3	27.2±5.1

Tabla 4.8. El compuesto **1** protege de la muerte celular a las NGC bajo condiciones de apoptosis dependiente de K^+ (K5). Porcentaje de células positivas a calceína y a yoduro de propidio (IP), en medio K5. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar (n=6-10).

	Calceína	IP
K25	88.8±1.7	8.7±1.7
K5	46.5±2.2	52.7±2.6
Compuesto 2		
(μ M)		
10	35.7±3.5	50.4±5.5
50	47.9±3.2	51.16±4.3
100	18.1±2.0	68.9±1.8
250	6.4±1.0	79.5±3.5
500	5.7±2.0	87.7±3.3

Tabla 4.9. El compuesto 2 provoca un porcentaje mayor de muerte celular a las NGC bajo condiciones de apoptosis dependiente de K^+ (K5). Porcentaje de células positivas a calceína y a yoduro de propidio (IP), en medio K5. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar (n=6-10).

	Calceína	IP
K25	88.8±1.7	8.7±1.7
K5	46.5±2.2	52.7±2.6
Compuesto 3		
(μ M)		
10	47.5±3.0	52.1±3.2
50	48.6±6.3	48.8±4.3
100	49.3±3.3	49.9±2.7
250	53.6±2.2	45.0±1.9
500	53.5±1.9	46.3±2.0

Tabla 4.10. Protección mínima de muerte celular por el compuesto 3 a las NGC bajo condiciones de apoptosis dependiente de K^+ (K5). Porcentaje de células positivas a calceína y a yoduro de propidio (IP), en medio K5. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar (n=6-10).

	Calceína	IP
K25	88.8±1.7	8.7±1.7
K5	46.5±2.2	52.7±2.6
RR		
(μ M)		
10	59.1±2.0	39.2±3.8

Tabla 4.11. El rojo de rutenio protege de la muerte celular a las NGC bajo condiciones de apoptosis dependiente de K^+ (K5). Porcentaje de células positivas a calceína y a yoduro de propidio (IP), en medio K5. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar (n=5).

4.4.3 Medio con Sts: inducción a la apoptosis por un mecanismo independiente de K⁺

Por último, con la finalidad de verificar la especificidad de los compuestos hacia la muerte celular dependiente de K⁺ (medio K5), las pirroloisoquinolinas activas se evaluaron bajo condiciones de apoptosis inducida por estaurosporina (Sts) (**fig. 4.12**). En el medio con Sts y en ausencia de las DPIs el porcentaje de células viables teñidas de verde fue del 37.4±3.8 % y para las células muertas teñidas de rojo del 58.5±1.73 %. En las imágenes de microscopía de cultivos neuronales se observa que los compuestos **1**, **3** y el RR no cambian con relación al medio con Sts, no existe un aumento o disminución en la tinción con calceína y/o IP, en contraste nuevamente con el compuesto **2** (**fig. 4.12a**). En las gráficas de barras se observa la diferencia significativa que presentan los compuestos **1**, **3** y RR con respecto control (Sts) (presentada por dos cruces), donde no existe diferencia significativa por los reactivos con excepción del compuesto **2** (**fig. 4.12b**). El compuesto **2** a una concentración de 250 μM incrementa el porcentaje de muerte celular (75.1±1.6), efecto similar bajo condiciones de apoptosis dependiente de K⁺ (K5) (79.5±3.5 %).

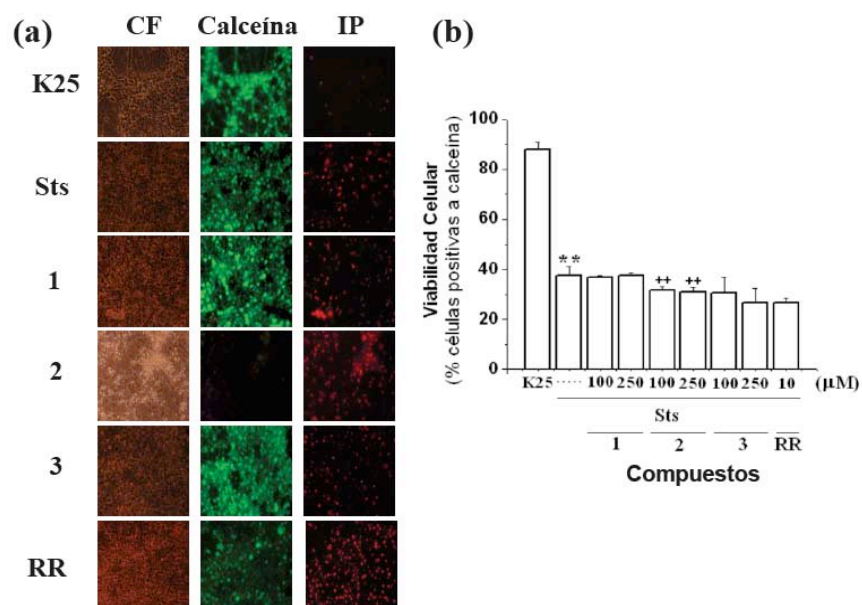


Figura 4.12. Efecto de las pirroloisoquinolinas activas bajo condiciones apoptóticas en medio con estaurosporina (Sts) en neuronas granulares del cerebelo. Imágenes de microscopía de cultivos de NGC de 8 DIV: contraste de fases (CF), tinción con calceína y yoduro de propidio (IP), en medio con Sts en ausencia y presencia de los compuestos **1**, **2**, **3** (250 μM) y RR (10 μM) (a). En la gráfica de barras se presenta el porcentaje de muerte celular (células positivas a IP), en medio con Sts en ausencia y presencia de los compuestos **1**, **2**, **3** (100 y 250 μM) y RR (10 μM) (b). Las barras indican el error estándar (n=4-6). Los valores significativamente diferentes se indican como ***p*<0.05 vs. control (K25), ++*p*<0.05 vs. Sts.

El resumen de este estudio se presenta en las siguientes **tablas**:

	Calceína	IP
K25	88.8±1.7	8.7±1.7
Sts	37.4±3.8	58.5±1.73
Compuesto 1		
(μM)		
10	26.5±3.7	67.5±0.6
50	26.1±2.5	66.0±1.8
100	36.8±0.8	61.6±1.4
250	37.3±1.4	62.5±0.7

Tabla 4.12. El compuesto 1 no presenta cambios significativos en las NGC bajo condiciones de apoptosis inducida con estaurosporina (Sts). Porcentaje de células positivas a calceína y a yoduro de propidio (IP), en medio con Sts. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar (n=4-6).

	Calceína	IP
K25	88.8±1.7	8.7±1.7
Sts	37.4±3.8	58.5±1.73
Compuesto 2		
(μM)		
10	39.2±2.0	53.5±1.3
50	33.8±2.3	55.7±1.2
100	31.5±1.5	67.4±0.9
250	30.8±2.1	75.1±1.6

Tabla 4.13. El compuesto 2 provoca un porcentaje mayor de muerte celular a las NGC bajo condiciones de apoptosis inducida con estaurosporina (Sts). Porcentaje de células positivas a calceína y a yoduro de propidio (IP), en medio Sts. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar (n=4-6). A 250 μM se presenta una relación mayor al 100% entre el porcentaje de viabilidad y muerte celular, este efecto se podría deber a una sobre estimación de alguna ó de ambas condiciones experimentales, originada en el conteo celular.

	Calceína	IP
K25	88.8±1.7	8.7±1.7
Sts	37.4±3.8	58.5±1.73
Compuesto 3		
(μ M)		
10	31.7±5.3	61.6±3.3
50	30.0±8.7	60.6±4.9
100	30.5±6.2	59.8±2.6
250	26.7±5.6	61.5±0.7

Tabla 4.14. El compuesto 3 no presentó cambios significativos en las NGC bajo condiciones de apoptosis inducida con estaurosporina (Sts). Porcentaje de células positivas a calceína y a yoduro de propidio (IP), en medio Sts. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar (n=4-6).

	Calceína	IP
K25	88.8±1.7	8.7±1.7
Sts	37.4±3.8	58.5±1.73
RR		
(μ M)		
10	26.5±1.9	69.6±3.3

Tabla 4.15. El rojo de rutenio no presentó cambios significativos a las NGC bajo condiciones de apoptosis inducida por estaurosporina (Sts). Porcentaje de células positivas a calceína y a yoduro de propidio (IP), en medio Sts. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar (n=5).

5. DISCUSIÓN

Como ya se ha mencionado, los canales TASK pertenecen a una familia de canales de K^+ de 4TM/2P, que se encuentran relacionados con la apoptosis en las neuronas granulares del cerebelo (NGC) y, particularmente el canal TASK-3, en cáncer en diferentes tejidos. Cuando se inició este trabajo aún no se habían reportado compuestos que modularan selectivamente a este tipo de canales. Así que, dada la importancia de estas proteínas se realizó este proyecto con el propósito de encontrar moduladores selectivos hacia los canales TASK. La búsqueda de moduladores nos llevó a evaluar sobre la corriente TASK el efecto de muchos posibles candidatos. Entre ellos se probaron cinco compuestos orgánicos (**1-5**) derivados del sistema dihidropirrol[2,1-*a*]isoquinolina, cuatro de ellos (**2-4**) con actividad anticancerígena putativa [82].

5.1. Pirroloisoquinolinas: nuevos moduladores para los canales TASK

A pesar de que todos los compuestos (**1-5**) evaluados presentan el esqueleto base de una dihidropirrol[2,1-*a*]isoquinolina, solo tres de ellos (**1-3**) modularon significativamente la corriente de los canales TASK (**tabla 4.1**) expresados heterológicamente en ovocitos. De acuerdo a estos resultados podemos deducir que los sustituyentes R^1 y R^2 juegan un papel importante en su actividad hacia estos canales. Tres grupos funcionales se identificaron: el carbonitrilo (R^1) en el compuesto **1**, el tiofenil (R^2) en el compuesto **2** y el *m*-aminobenceno (R^2) en el compuesto **3**. Al parecer aquellos compuestos con un grupo carboxilato en la posición R^1 ó fenilo en R^2 , no son importantes para modular a los canales TASK. Sin embargo, si el grupo fenilo se encuentra sustituido, como en el caso del compuesto **3**, incrementa su actividad hacia el canal TASK-1. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Coburn y colaboradores [64], donde se observa la importancia de los grupos aromáticos (fenilo) unidos al esqueleto base, siendo su estructura base el sistema pirido[4,3-*d*]pirimidina (**fig. 5.1d**). Parece que la presencia de un grupo aromático podría ser importante para proveer su actividad inhibitoria hacia los canales TASK, como se ha observado en los compuestos orgánicos A1899 [61], ML365 [62], ML308 [63] y C23 [64], todos selectivos hacia los canales TASK (**fig. 5.1**).

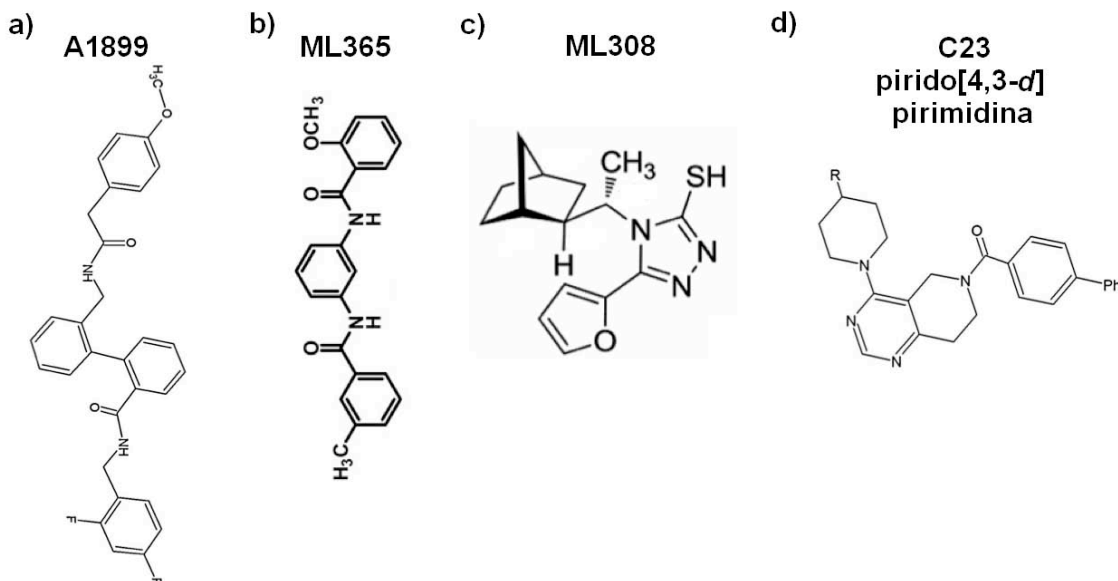


Figura 5.1. Moduladores selectivos de los canales TASK. Estructura química de los compuestos orgánicos A1899 (a); ML365 (b) ML308 (c) y C23 (d).

Como era de esperarse, los compuestos activos **2** y **3** presentaron actividad inhibitoria intermedia en el canal heterodimérico (hTASK-1/rTASK-3), tal como se ha reportado con el pH [14], doxapram [57] y el compuesto hidroxí- α -sanshool [148]. Sin embargo, el compuesto **1** (evaluado en el heterodímero) presentó una actividad muy similar al canal hTASK-1, pero mayor inhibición hacia rTASK-3, algo semejante ocurre con RR [14] (**tabla 4.3**). Así, en este estudio encontramos una nueva familia de moduladores derivados del sistema dihidropirrolol[1,2-*a*]isoquinolina, que son excelentes candidatos para diseñar y sintetizar compuestos selectivos para los canales TASK.

Los inhibidores encontrados en este trabajo mostraron ser selectivos a una concentración de 100 μM hacia los canales TASK, al no presentar actividad considerable sobre la corriente de otro tipo de canales de K^+ , incluso a altas concentraciones (500 μM) (**tabla 4.3**). Los canales de K^+ de 2, 6 y 7TM/1P, son tetrámeros que forman un poro simétrico, en contraste con los canales de 4TM/2P que se ensamblan como dímeros formando un poro asimétrico, que los hace insensibles a los típicos bloqueadores de canales de K^+ : TEA, 4-AP y Cs^+ [9], [11], [21], [37]. Los segmentos 5TM y 6TM junto con el asa que los une forman la región del poro (torreta, hélice del poro y filtro de selectividad) y constituyen los elementos que confieren la selectividad al canal y el sitio receptor más común de los moduladores. En fuentes diversas de origen natural se han encontrado

moduladores selectivos para los canales de K^+ de 2, 6 y 7TM/1P, que difieren en tipo y estructura de acuerdo a su blanco de acción. Algunos ejemplos de ellos son las toxinas: cobatoxin (Shaker) [149], ergtoxin (herg) [150], slotoxina (hSLO) [151] y compuestos orgánicos: ML33 (Kir2.1) [152], maxikadiol (hSLO) [153], adicionando a esta lista a los derivados pirroloisoquinolinas, como nuevos moduladores para los canales TASK de 4TM/2P.

Con base en nuestros resultados (**fig. 4.2**) y a lo reportado en la literatura, sobre los nuevos bloqueadores selectivos hacia los canales TASK, se podría sugerir que las pirroloisoquinolinas activas actúan como bloqueadores de poro abierto, así como ocurre con el compuesto A1899 en el canal TASK-1 [61]. Sin embargo, nosotros únicamente evaluamos extracelularmente los compuestos activos, que presentaron una inhibición incompleta sobre la corriente de los canales TASK (**fig. 4.4**). Posiblemente, este bloqueo incompleto se deba a que las pirroloisoquinolinas interaccionan con la torreta de los canales TASK y no puedan ocluir completamente el poro por la cara extracelular. Estas proteínas presentan un poro asimétrico con una torreta grande (entre 1TM-P1) de 53 aa en TASK-3 [17] y de 49 aa en TASK-1 [9]. Este efecto se ha observado en la interacción de algunas toxinas (ErgTx, δ -Dendrotoxina) con canales de K^+ (herg, Shaker), que se unen cerca del poro (torreta) alterando su dinámica estructural y ocasionan una reducción, pero no oclusión total del flujo de K^+ , por lo cual no actúan como un “tapón molecular” [154], [155]. Finalmente, otro aspecto interesante de las pirroloisoquinolinas es la recuperación parcial de la corriente inicial, incluso después de lavar profusamente, tanto en el sistema heterólogo (ovocito) (**fig. 4.6**) como nativo (NGC) (**fig. 4.8**). Posiblemente, en la unión compuesto-canal se establezcan una serie de interacciones electrostáticas y/o impedimentos estéricos con las asas (torreta) que dificultarían la salida del derivado, por lo que no se observa una disociación completa [156].

Por otra parte, el grupo de investigación del Dr. Martínez reportó la actividad citotóxica de las pirroloisoquinolinas (**2-4**) hacia algunas líneas celulares de cáncer: leucemia (K-562), sistema nervioso central (U-251), próstata (PC-3), colon (HCT-15), mama (MCF-7) y pulmón (SKLU-1) [82], donde se expresa el canal TASK-3 [130]. Este último hecho llamó nuestra atención para evaluar estos compuestos orgánicos sobre la corriente de canales TASK-3 por su relación con el cáncer de mama, pulmón [30], colon

[31], piel [32], [33], tracto gastrointestinal [34] y ovario [35], donde se desempeña como un poderoso oncogén [30], [36]. La sobreexpresión tanto de TASK-3 y TREK-1 aumenta la proliferación en las líneas celulares C8 (fibroblastos embrionarios) y CHO (ovario de hamster chino), respectivamente. Si se suprime la actividad de estos canales mediante la coexpresión con una mutante (negativa-dominante de la región del poro) no funcional o con inhibidores selectivos se anula su actividad oncogénica como la proliferación en bajo suero y resistencia a la apoptosis [36], [139]. Notablemente, el compuesto **3** inhibe la actividad de rTASK-3 y mTREK-1 (**tabla 4.3**) y presenta actividad citotóxica contra varias líneas celulares de cáncer como PC-3 de próstata, donde el canal TREK-1 está sobreexpresado [82], [139]. Así, la síntesis de nuevas pirroloisoquinolinas con mayor selectividad y afinidad podrían utilizarse como agentes terapéuticos para suprimir la actividad oncogénica de los canales de 4TM/2P.

5.2. Inhibición de la IKso en NGC

Posteriormente se confirmó la actividad de los compuestos (**1-3**) sobre la corriente basal (IKso) de las neuronas granulares del cerebelo (**fig. 4.8**). Los porcentajes de inhibición de los compuestos **1** y **3** (500 μ M) se parecen a los observados en el sistema heterólogo (**tabla 4.3**) y a los descritos en la literatura. Se ha reportado que los canales TASK-3 y TASK-1 contribuyen con el 50-70% y 10% de la corriente IKso en las NGC (7 a 8 DIV), respectivamente [25], [26], [28]. El heterodímero TASK-1/TASK-3 contribuye a esta corriente basal (\approx 44%) en cultivos de 3 DIV [27], por lo que es probable su presencia de 7-8 DIV. Así, la inhibición de la corriente IKso en NGC por los compuestos **1** y **3** podría ser preferencialmente sobre los canales TASK.

De acuerdo a los resultados en ovocitos (**tabla 4.1**), se esperaba una inhibición menor por el compuesto **2**, sin embargo presentó la mayor actividad sobre la corriente IKso, lo que sugiere una posible modulación hacia otros canales de fuga. La presencia de otros canales de 4TM/2P, a nivel transcrito, se reportó en las NGC: TWIK-1, THIK-2, TREK-2 y KCNK-7 a un nivel de expresión alto; TRAAK, TWIK-2, TREK-1 y KCNK5, a un nivel de expresión bajo [142], [157]. Sólo los canales TREK-2 y KCNK5 se han caracterizado

funcionalmente y contribuyen con alrededor del 10 y 40% de la corriente IK_{so} , respectivamente [26], [158].

5.3. Protección contra la apoptosis dependiente de K^+ en NGC

Por último, con la finalidad de verificar la participación de los canales TASK en la muerte celular programada de las NGC de rata, los compuestos activos (**1-3**) se evaluaron bajo condiciones de apoptosis. El compuesto **1** presentó el mayor efecto inhibitorio (60.0 ± 2.6 %) sobre la corriente del canal rTASK-3 (**tabla 4.3**) y la mayor protección (~ 26 %) contra la muerte neuronal por bajo K^+ (**fig 4.11**). Estos resultados coinciden con los reportados por Lauritzen y colaboradores [28], donde se disminuye mayoritariamente el porcentaje de muerte celular en NGC de rata, al inhibir la actividad del canal TASK-3 con acidificación extracelular del medio (~ 5 %), rojo de rutenio (~ 10 %) y muscarina (~ 40 %). Ellos observaron mayor protección contra la muerte neuronal por bajo K^+ , sin embargo ninguno de los inhibidores que utilizaron son selectivos para los canales TASK.

De acuerdo a nuestros resultados electrofisiológicos, tanto en ovocitos (**tabla 4.3**) como en las NGC (**fig. 4.8h**), también se esperaba que el compuesto **3** disminuyera el porcentaje de células muertas, sin embargo la protección fue menor; posiblemente este efecto se deba a su ligera toxicidad hacia las NGC, puesto que a $500 \mu M$ provoca el 20.3 ± 4.9 % de muerte neuronal (**fig. 4.10b**). El hecho que la pirroloisoquinolina **2** sea muy tóxica a concentraciones superiores de $100 \mu M$, sugiere que pudiera inhibir también a los canales de Ca^{2+} activados por voltaje. Se sabe que altas $[K^+]_e$ son necesarias para la supervivencia de las NGC *in vitro*. Bajo condiciones despolarizantes los canales de Ca^{2+} se activan y permiten la entrada moderada de Ca^{2+} , que a su vez actúa como segundo mensajero y prolonga la supervivencia neuronal [117], [159] (Mecanismo *ver fig. 5.2*). Como se observa en nuestros resultados la pirroloisoquinolina **2** ($500 \mu M$) es el compuesto menos selectivo, presenta la mayor inhibición para el canal hsl0 ($\sim 41\%$) y para la corriente IK_{so} ($\sim 62\%$) (**tabla 4.3** y **fig. 4.8e**). De esta forma el compuesto **2** posiblemente modula otros tipos de canales iónicos, aunque futuros experimentos son necesarios para corroborar esta hipótesis.

Una alteración en la homeostasis K^+/Ca^{2+} cambia los niveles celulares de *bcl-2* (factor anti-apoptótico) y con ello regula la sobrevivencia de las NGC [159]. Bajo condiciones depolarizantes (25 mM de K^+) las NGC de ratón presentan un perfil de expresión genético inmaduro [160], baja expresión de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), fuerte inducción de los canales TASK y como consecuencia la entrada de Ca^{2+} a través de los canales Cav tipo L [161] y de los receptores de inositol trifosfato (IP3-Rs) [161], [162]. Posteriormente, se reduce la salida de K^+ de la membrana plasmática a través de los canales TASK y el Ca^{2+} se libera del retículo endoplásmico a través de los IP3-Rs. El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta los niveles de BCL2, mediante la cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CAMK) que inhibe su autofagocitosis, así la acumulación de BCL2 evita la muerte neuronal. Bajo condiciones no depolarizantes (5 mM de K^+) las NGC de ratón presentan un perfil de expresión genético maduro [160], con baja inducción de los canales TASK [28] y de los IP3-Rs; y una sobre-regulación de NMDA [161], [162]. Las NGC de ratón no mueren por apoptosis cuando se cultivan organotípicamente bajo condiciones de bajo K^+ , en esta situación existe una salida de K^+ fisiológica a través de los canales TASK y entrada de Ca^{2+} que provoca el mecanismo de liberación Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} (CICR) activando al receptor de rianodina (Ry-Rs) responsable de un incremento de $[Ca^{2+}]_i$ con la acumulación de BCL2 (**fig. 5.2**). Sin embargo, es probable que en las NGC de rata bajo condiciones no depolarizantes (5 mM K^+) ocurra el caso contrario, alta inducción de canales de K^+ , incluyendo a los TASK, provoca una salida excesiva de K^+ , pérdida de K^+ citosólico y la consecuente disminución en la $[K^+]_i$ [28], [103], [108], [109], [110], [111]. Al inicio, la salida excesiva de K^+ ocasiona encogimiento celular (AVD); pero consecuentemente, la disminución en la $[K^+]_i$ (50 mM) activa endonucleasas y caspasas (caspasa-3), desencadenando completamente el mecanismo de muerte apoptótica: condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, vacuolización del citoplasma, pérdida en la estructura de la membrana plasmática, formación de cuerpos apoptóticos y fagocitosis [84], [87], [88], [89], [90], [91], [93], [98], [99], [103], [107], [108], [109], [110], [111]. Así, el inhibir el flujo de K^+ extracelular a través de los canales de K^+ , incluyendo a los TASK, previene la muerte neuronal por bajo K^+ en las NGC de rata [28], [163], [164].

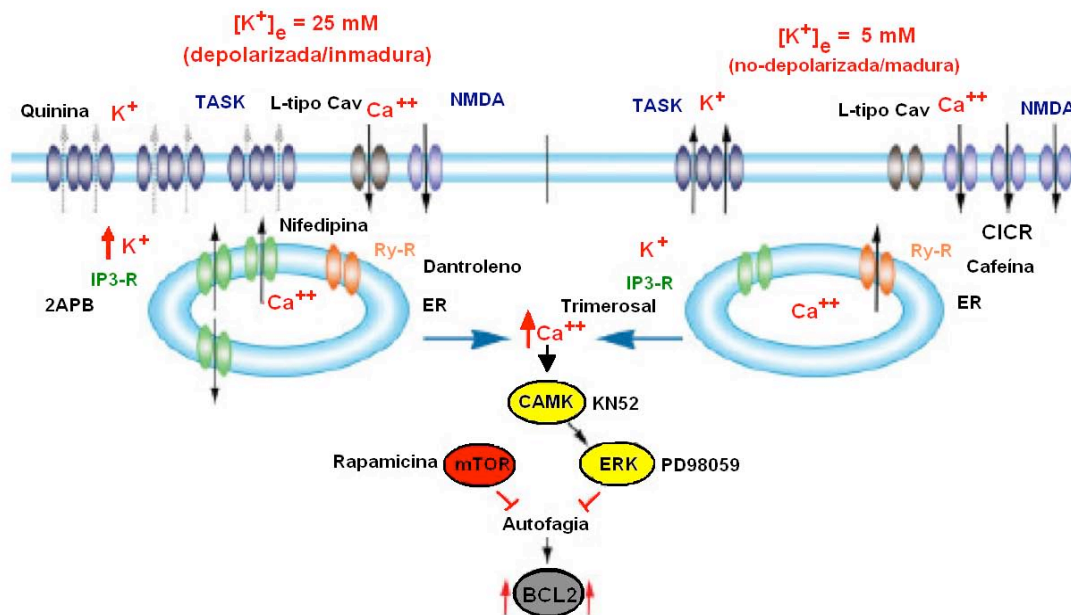


Figura 5.2 Mecanismos de supervivencia neuronal dependiente de K^+ . Representación esquemática sugerida para la cascada de señalización que da origen a la acumulación postraduccional de BCL2, en las NGC de ratón. Tanto en condiciones depolarizantes (izquierda) como no depolarizantes (derecha) existe un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, el cual regula a mTOR (activador de macroautofagia) y CAMK/ERK (cinasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina/cinasa que regula la señal extracelular). Estos últimos inhiben la autofagia de BCL2, el cual se acumula intracelularmente y regula la supervivencia de las NGC. Los antagonistas/agonistas utilizados son indicados en la figura. Figura tomada de Lossi *et al.*, 2009 [159].

Es importante mencionar que los compuestos **1** y **3** no presentaron efectos significativos bajo condiciones de muerte inducida por estaurosporina (Sts). Estos resultados sugieren que estos compuestos orgánicos inhiben el flujo extracelular de K^+ , ya que presentan una neuro-protección específica hacia la apoptosis dependiente de K^+ [28], [164]. El mecanismo de muerte neuronal inducido por Sts sugiere una dependencia por el ión Cl^- . En cultivos de NGC y corticales de rata se demostró que la aplicación de bloqueadores de canales Cl^- es más efectiva contra la apoptosis inducida por Sts que con los bloqueadores de canales de K^+ [164], [165], [166].

Los canales TASK se encuentran involucrados en varias condiciones patofisiológicas donde presentan una conducta protectora o dañina, que depende de varios factores como: 1) patrón diferencial de expresión de cada subunidad, 2) tipo celular, 3) propiedades biofísicas, 4) regulación fisicoquímica y 5) ambiente celular [167]. Por ejemplo, en condiciones de apoptosis los canales TASK hiperpolarizan la membrana y

pueden actuar benéficamente en un estado temprano de un estímulo patofisiológico (isquemia aguda) [40]; o perjudicialmente en la evolución a largo plazo, una vez que cierto umbral de daño severo es alcanzado (isquemia inflamatoria crónica) [167], [168]. En esta última situación la inhibición de los canales TASK previene la muerte celular programada.

Así, el desarrollo de moduladores selectivos para los canales TASK tiene primordial importancia para el estudio funcional, estructural y patológico de estos canales de 4TM/2P. El inhibidor A293 permitió conocer la contribución de los canales TASK en la corriente basal y en el potencial de acción en cardiomiocitos ventriculares [60], así como también el mecanismo de señalización muscarínico en neuronas talamocorticales en rata [169]. El bloqueador A1899 se utilizó para validar un modelo de homología de poro abierto del canal TASK-1 [61]. Pang y colaboradores [170] mostraron que roedores knockout de TASK-3 presentan alteraciones en los estados de sueño-vigilia, un efecto similar se observó cuando el compuesto C23 se administró en roedores wild-type [64]. Tanto A1899 como C23 son estimulantes respiratorios y podrían utilizarse como fármacos para tratar desordenes respiratorios [171]. Las pirroloisoquinolinas, nuevos inhibidores de los canales TASK, permitieron confirmar su participación en la muerte celular programada dependiente de K^+ en las neuronas granulares del cerebelo [163] (**Apéndice VI**).

6. CONCLUSIONES

Se encontraron tres compuestos orgánicos derivados de dihidropirroloisoquinolina que presentaron actividad inhibidora sobre la corriente de los canales TASK (hTASK-1, rTASK-3 y el heterodímero: hTASK-1/rTASK-3), tanto en un sistema de expresión heteróloga (ovocitos de *Xenopus laevis*: 100 μM , >40%) como en células nativas disociadas (corriente IK_{so} en NGC: 500 μM , >39%). Estos derivados presentaron selectividad (100 μM) hacia los canales TASK sobre otro tipo de canales de K^+ , donde los grupos funcionales carbonitrilo ($-\text{CN}$), tiofenilo ($-\text{C}_4\text{H}_3\text{S}$) y *meta*-aminofenilo ($-m\text{-C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$) podrían ser importantes para brindar su efecto inhibitorio.

Finalmente, sólo el compuesto **1** ($-\text{CN}$, ~26%, 500 μM) protegió considerablemente contra la muerte celular programada dependiente de K^+ en las NGC. En vista de estos estudios preliminares de estructura-actividad, el laboratorio del Dr. Roberto Martínez continúa sintetizando nuevas pirroloisoquinolinas con la finalidad de aumentar la selectividad y afinidad hacia los canales de $4\text{TM}/2\text{P-K}^+$, con mayor interés para los TASK debido a su importancia no sólo en cáncer y apoptosis sino también en otras condiciones patológicas. Así, la síntesis de nuevos moduladores hacia esta tipo de proteínas es una estrategia farmacológica para el estudio del tratamiento de enfermedades neurodegenerativas o proliferativas.

PERSPECTIVAS

- 1.- Sintetizar pirroloisoquinolinas con mayor selectividad y afinidad con base en estos estudios de estructura-actividad.
- 2.- Evaluar el efecto de estos compuestos orgánicos en:
 - Los canales de K^+ TASK-1 y TASK-3.
 - El canal heterodimérico TASK-1/TASK-3.
 - Canales de K^+ de 4TM/2P: TREK-1, TASK-2, TWIK-1, TRESK y THIK-1.
 - En otras familias de canales de K^+ : Kv_x , Kir_x , $KCNQ_x$, erg, SLO.
- 3.- Corroborar la interacción con aproximaciones computacionales como modelado por homología, *docking*, dinámica molecular y mutaciones sitio dirigidas.
- 4.- Evaluar el efecto de los compuestos activos sobre otras corrientes basales relacionadas con alguna funcionalidad de los canales TASK (secreción de aldosterona, quimiorrepción, arritmias cardiacas y anestesia general).

BIBIOGRAFÍA

- [1] **Friederich, P. (2003).** Basic concepts of ion channel physiology and anaesthetic drug effects. *Eur. J. Anaesthesiol.* **20**, 343-353.
- [2] **Herrera, E. (1996).** *Bioquímica. Biología Molecular y Bioquímica Fisiológica.* 2^{da} Reimpresión; MacGraw-Hill Interamericana; España, Madrid. Vol. II, 1113-1117.
- [3] **Hille, B. (2001).** *Ion channels of excitable membranes.* 3th edition; Sinauer Associates, Inc. USA. 131-160.
- [4] **Ketchum, K.A.; Joiner, W.J.; Sellers, A.J.; Kazmareck, L.K.; Goldstein, S.A.N (1995).** A new family of outward rectifying potassium channels proteins with two pore domains in tandem. *Nature.* **376**, 690-695.
- [5] **Lesage, F.; Reyes, R.; Fink, M.; Duprat, F.; Gillemare, E.; Lansdunzki, M. (1996).** Dimerization of TWIK K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *J. EMBO* **15**, 6400-6407.
- [6] **Swartz, K.J. (2004).** Towards a structural view of gating in potassium channels. *Nature Rev.* **5**, 905-916.
- [7] **Enyedi, P.; Czirják, G. (2010).** Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol. Rev.* **90**, 559-605.
- [8] **Lesage, F.; Guillemare, E.; Fink, M.; Duprat, F.; Lazdunski, M.; Romey, G.; Barhanin, J. (1996).** TWIK, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *J. EMBO.* **5**, 1004-1011.
- [9] **Duprat, F.; Lesage, F.; Fink, M.; Reyes, R.; Huerteaux, C.; Lazdunski, M. (1997).** TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *J. EMBO.* **16**, 5464-5471.
- [10] **Fink, M.; Duprat, F.; Lesage, F.; Reyes, R.; Romey, G.; Heurteaux, C.; Lazdunski, M. (1996).** Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *J. EMBO.* **15**, 6854-6862.
- [11] **Kim, Y.; Bang, H.; Kim, D. (2000).** TASK-3, a new member of the tandem pore K (+) channel family. *J. Biol. Chem.* **275** (13), 9340-9347.
- [12] **Kim, D.; Gnatenco, C. (2001).** TASK-5, a new member of the tandem-pore K⁺ channel family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 923-930.
- [13] **Ashmole, I.; Goodwin, P.A.; Stanfield, P.R. (2001).** TASK-5, a novel member of the tandem pore K⁺ channel family. *Eur. J. Physiol.* **442**, 828-833.
- [14] **Czirják, G.; Enyedi, P. (2002).** Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J. Biol. Chem.* **277** (7), 5426-5432.
- [15] **Talley, E.M.; Lei, Q.; Sirois, J.E.; Bayliss, D.A. (2000).** TASK-1, a two-pore domain K⁺ channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons. *Neuron.* **25**, 399-410.
- [16] **Washburn, C.P.; Sirois, J.E.; Talley, E.M.; Guyenet, P.G.; Bayliss, D.A. (2002).** Serotonergic raphe neurons express TASK channel transcripts and a TASK-like pH- and halothane- sensitive K⁺ conductance. *J. Neurosci.* **22** (4), 1256-1265.
- [17] **Champman, C.G.; Meadows, H.J.; Godden, R.J.; Campbell, D.A.; Duckworth M.; Kelsell, R.E.; Murdock, P.R.; Randall, A.D.; Rennie, G.I.; Gloger, I. S. (2000).** Cloning, localization and functional expression of a novel human, cerebellum specific, two pore domain potassium channel. *Mol. Brain Res.* **82**, 74-83.
- [18] **Karschin, C.; Wischmeyer, E.; Preisig-Müller R.; Rajan, S.; Derst, C.; Grzeschik, K.-H.; Daut, J.; Karschin A. (2001).** Expression pattern in brain of TASK-1, TASK-3, and a tandem pore domain K⁺ channel subunit, TASK-5, associated with the central auditory nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* **18**, 632-648.
- [19] **Kim, Y.; Bang, H.; Kim, D. (1999).** TBAK-1 and TASK-1, two-pore K⁺ channel subunits: Kinetic properties and expression in rat heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.* **277**, H1669-H1678.
- [20] **Leonoudakis, D.; Gray, A.T.; Winegar, B.D.; Kindler, C.H.; Harada, M.; Taylor, D.M.; Chavez, R.A.; Forsayeth, J.R.; Yost, C.S. (1998).** An open rectifier potassium channel with two pore domains in tandem cloned from rat cerebellum. *J. Neurosci.* **18** (3), 868-877.
- [21] **Meadows, H.J.; Randall, A.D. (2001).** Functional characterization of human TASK-3, an acid-sensitive two-pore domain potassium channel. *Neuropharmacol.* **40**, 551-559.

- [22] **Medhurst, A.; Rennie, G.; Chapman, C.G.; Meadows, H.; Duckworth, M.D.; Kelsell, R.E.; Gloger, I.I.; Pangalos, M.N. (2001).** Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Mol. Brain Res.* **86**, 101-114.
- [23] **Rajan, S.; Wischmeyer, E.; Liu, G.X.; Preisig-Muller, R.; Daut, J.; Karschin, A.; Derst, C. (2000).** TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histidine as pH sensor. *J. Biol. Chem.* **275** (22), 16650-16657.
- [24] **Talley, E.M.; Solórzano, G.; Lei, Q.; Kim, D.; Bayliss, D.A. (2001).** CNS distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J. Neurosci.* **21** (19), 7491-7505.
- [25] **Clarke, C.E.; Veale, E.L.; Green, P.J.; Meadows, H.J.; Mathie, A. (2004).** Selective block of the human 2-P domain potassium channel, TASK-3, and the native leak potassium current, IK_{so}, by zinc. *J. Physiol.* **560.1**, 51-62.
- [26] **Han, J.; Truell, J.; Gnatenco, C.; Kim, D. (2002).** Characterization of four types of background potassium channels in rat cerebellar granule neurons. *J. Physiol.* **542**, 431-444.
- [27] **Kang, D.; Han, J.; Talley, E.M.; Bayliss, D.A.; Kim, D. (2003).** Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebellar granule cells. *J. Physiol.* **554** (1), 64-77.
- [28] **Lauritzen, I.; Zanzouri, M.; Honore, E.; Duprat, F.; Ehrenguber, M.U.; Lazdunski, M.; et al. (2003)** K⁺-dependent cerebellar granule neuron apoptosis: Role of TASK leak channels. *J. Biol. Chem.* **278** (34), 32068-32076.
- [29] **Millar, J.A.; Barratt, L.; Southan, A.P.; Page, K.M.; Fyffe, R.E.W.; Robertson, B.; Mathie, A. (2000).** A functional role for the two-pore domain potassium channel, TASK-1, in cerebellar granule neurons. *PNAS.* **97**, 3614-3618.
- [30] **Mu, D.; Chen, L.; Zhang, X.; See, L.H.; Koch, C.M.; Yen, C.; Tong, J.J.; Spiegel, I.; Nguyen, K.C.Q.; Servoss, A.; Peng, Y.; Pei, L.; Marks, J.R.; Lowe, S.; Hoey, T.; Jan, L.Y.; McCombie, W.R.; Wigler, M.H.; Powers, S. (2003).** Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene. *Cancer Cell.* **3**, 297-302.
- [31] **Kim, C.J.; Cho, Y.G.; Jeong, S.W.; Kim, Y.S.; Kim, S.Y.; Nam, S.W.; Lee, S.H.; Yoo, N. J.; Lee, J.Y.; Park, W.S. (2004).** Altered expression of KCNK9 in colorectal cancers. *APMIS.* **112**, 588-594.
- [32] **Pocsai, K.; Kostka, L.; Bakondi, G.; Gönczi, M.; Fodor, J.; Dienes, B.; Szentesi, P.; Kovács, I.; Feniger-Barish, R.; Kopf, E.; Zharhary, D.; Szücs, G.; Csernoch, L.; Rusznák, Z. (2006).** Melanoma cells exhibit strong intracellular TASK-3-specific immunopositivity in both tissue sections and cell culture. *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 2364-2376.
- [33] **Rusznák, Z.; Bakondi, G.; Kosztka, L.; Pocsai, K.; Dienes, B.; Fodor, J.; Telek, A.; Gönczi, M.; Szücs, G.; Csernoch, I. (2008).** Mitochondrial expression of the two-pore domain TASK-3 channels in malignantly transformed and non-malignant human cells. *Virchows Arch.* **452**, 415-426.
- [34] **Kovács, I.; Pocsai, K.; Czifra, G.; Sarkadi, L.; Szucs, G.; Nemes, Z.; Rusznák, Z. (2005).** TASK-3 immunoreactivity shows differential distribution in the human gastrointestinal tract. *Virchows Arch.* **446**, 402-410.
- [35] **Innamma, A.; Jackson, L.; Asher, V.; Van Shalkwyk, G.; Warren, A.; Hay D., Bali, A., Sowter, H.; Khan, R. (2013).** Expression and prognostic significance of the oncogenic K2P potassium channel KCNK9 (TASK-3) in ovarian carcinoma. *Anticancer Res.* **33** (4), 1401-1408.
- [36] **Pei, L.; Wiser, O.; Slavin, A.; Mu, D.; Powers, S.; Jan, L.Y.; Hoey, T. (2003).** Oncogenic potential of TASK3 (Kcnk9) depends on K⁺ channel function. *PNAS USA.* **100**, 7803-7807.
- [37] **Czirják, G.; Fischer, T.; Spät, A.; Lesage, F.; Enyedi, P. (2000).** TASK (TWIK-Related Acid-Sensitive K⁺ Channel) Is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol. Endocrinol.* **14** (6), 863-874.
- [38] **Barbuti, A.; Ishii, S.; Shimizu, T.; Robinson, R.B.; Feinmark, S.J. (2002).** Block of the background K⁺ channel TASK-1 contributes to arrhythmogenic effects of platelet-activating factor. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **282**, H2024-H2030.
- [39] **Meuth, S.G.; Kanyshkov, T.; Melzer, N.; Bittner, S.; Kieseier, B.C.; Budde, T.; Wiendl, H. (2008).** Altered neuronal expression of TASK1 and TASK3 potassium channels in rodent and human autoimmune CNS inflammation. *Neurosci. Lett.* **446**, 133-138.
- [40] **Meuth, S.G.; Kleinschnitz, C.; Broicher, T.; Austinat, M.; Braeuninger, S.; Bittner, S.; Fischer, S.; Bayliss, D.A.; Budde, T.; Stoll, G.; Wiendl, H. (2009).** The neuroprotective impact of the leak potassium channel TASK1 on stroke development in mice. *Neurobiol. Dis.* **33** (1), 1-11.

- [41] Taverna, S.; Tkatch T., Metz, A.E.; Martina, M. (2005). Differential expression of TASK channels between horizontal interneurons and pyramidal cells of rat hippocampus. *J. Neurosci.* **25**, 9162-9170.
- [42] Patel, A.J.; Honore, E.; Lesage, F.; Fink M.; Romey, G.; Lazdunski, M. (1999). Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat. Neurosci.* **2**, 422-426.
- [43] Sirois, J.E.; Lei, Q.; Talley, E.M.; Lynch III, C.; Bayliss, D.A. (2000). The TASK-1 two-pore domain K⁺ channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalation anesthetics. *J. Neurosci.* **20** (17), 6347-6354.
- [44] Talley, E.M.; Bayliss, D.A. (2002). Modulation of TASK-1 (Kcnk3) and TASK-3 (Kcnk9) potassium channels: volatile anesthetics and neurotransmitters share a molecular site of action. *J. Biol. Chem.* **277**, 17733-17742.
- [45] Chen, X.; Talley, E.M.; Patel, N.; Gomis, A.; McIntire, W.E.; Dong, B.; Viana, F.; Garrison, J.C.; Bayliss, D.A. (2006). Inhibition of a background potassium channel by Gq protein α -subunits. *PNAS.* **103** (9), 3422-3427.
- [46] Czirják, G.; Petheö, G.L.; Spät, A.; Enyedi, P. (2001). Inhibition of TASK-1 potassium channel by phospholipase C. *AM. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**, C700-C708.
- [47] Sirois, J.E.; Lynch III, C.; Bayliss, D.A. (2002). Convergent and reciprocal modulation of a leak K⁺ current and I_h by an inhalational anaesthetic and neurotransmitters in rat brainstem motoneurons. *J. Physiol.* **541.3**, 717-729.
- [48] Weber, M.; Schmitt, A.; Wischmeyer, E.; Döring, F. (2008). Excitability of pontine startle processing neurons is regulated by two-pore-domain K⁺ channel TASK-3 coupled to 5-HT_{2c} receptors. *Eur. J. Neurosci.* **28**, 931-940.
- [49] Czirják, G.; Enyedi, P. (2002). TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *Mol. Endocrinol.* **16** (3), 621-629.
- [50] Gruss, M.; Mathie, A.; Lieb, W.R.; Franks, N.P. (2004). The Two-Pore-Domain K⁺ Channels TREK-1 and TASK-3 Are Differentially Modulated by Cooper and Zinc. *Mol. Pharmacol.* **66** (3), 530-537.
- [51] Musset, B.; Meuth, S.G.; Liu, G.X.; Derst, C.; Wegner, S.; Pape, H.C.; Budde, T.; Preisig-Müller, R.; Daut, J. (2006). Effects of divalent cations and spermine on the K⁺ channel TASK-3 and on the outward current in thalamic neurons. *J. Physiol.* **572.3**, 639-657.
- [52] Kindler, C.H.; Yost, C.S.; Gray, A.T. (1999). Local anesthetic inhibition of baseline potassium channels with two pore domains in tandem. *Anesthesiol.* **90**, 1092-1102.
- [53] Putzke, C.; Hanley, P.J.; Schlichthörl, G.; Preisig-Müller, R.; Rinné, S.; Anetseder, M.; Eckenhoff, R.; Berkowitz, C.; Vassiliou, T.; Wulf, H.; Eberhart, L. (2007). Differential effects of volatile and intravenous anesthetics on the activity of human TASK-1. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **293**, C1319-C1326.
- [54] Linden, A.-M.; Aller, M. I.; Leppä, E.; Vekovischeva, O.; Aitta-aho, T.; Veale, E.L.; Mathie, A.; Rosenberg, P.; Wisden, W.; Korpi, E.R. (2006). The in vivo contributions of TASK-1-containing channels to the actions of inhalation anesthetics, the α_2 adrenergic sedative dexmedetomidine, and cannabinoid agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **317** (2), 615-626.
- [55] Maingret, F.; Patel, A.J.; Lazdunski, M.; Honoré, E. (2001). The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K⁺ channel TASK-1. *J. EMBO.* **20** (1), 47-54.
- [56] Veale, E.L.; Buswell, R.; Clarke, C.E.; Mathie, A. (2007). Identification of a region in the TASK-3 two pore domain potassium channel that is critical for its blockade by methanandamide. *Br. J. Pharmacol.* **152**, 778-786.
- [57] Cotten, J.F.; Keshavaprasad, B.; Laster, M.J.; Eger, E.I.; Yost, C.S. (2006). The ventilatory stimulant doxapram inhibits TASK tandem pore (K_{2p}) potassium channel function but does not affect minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesth. Analg.* **102**, 779-785.
- [58] Kennard, L.E.; Chumbley, J.R.; Ranatunga, K.M.; Armstrong, S.J.; Veale, E.L.; Mathie, A. (2005). Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *Br. J. Pharmacol.* **144**, 821-829.
- [59] Czirják, G.; Enyedi, P. (2003). Ruthenium red inhibits TASK-3 potassium channel by interconnecting glutamate 70 of the two subunits. *Mol. Pharmacol.* **63** (3), 646-652.
- [60] Putzke, C.; Wemhöner, K.; Sachse, F.B.; Rinné, S.; Schlichthörl, G.; Li, X.T.; Jaé, L.; Eckhardt, I.; Wischmeyer, E.; Wulf, H.; Preisig-Müller, R.; Daut, J.; Decher, N. (2007). The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle. *Cardiovasc. Res.* **75**, 59-68.

- [61] Streit, A.K.; Netter, M.F.; Kempf, F.; Walecki, M.; Rinné, S.; Bollepalli, M.K.; Preisig-Müller, R.; Renigunta, V.; Daut, J.; Baukowitz, T.; Sansom, M.S.; Stansfeld, P.J.; Decher, N. (2011). A specific two-pore domain potassium channel blocker defines the structure of the TASK-1 open pore. *J. Biol. Chem.* **286** (16), 13977-12984.
- [62] Zou, B.; Flaherty, D.P.; Simpson, D.S.; Maki, B.E.; Miller, M.R.; Shi, J., Wu, M.; McManus, O.B.; Golden, J.E.; Aubé, J.; Li, M. ML365: Development of Bis-Amides as Selective Inhibitors of the KCNK3/TASK1 Two Pore Potassium Channel. **2013** Apr 15 [Update 2013 Nov 14]. In: Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2010-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK179826/>
- [63] Miller, M.R.; Zou, B.; Shi, J.; Flaherty, D.P.; Simpson, D.S.; Yao, T.; Maki, B.E.; Day, V.W.; Douglas, J.T.; Wu, M.; McManus, O.B.; Golden, J.E.; Aubé, J.; Li, M. Development of a Selective Chemical Inhibitor for the Two-Pore Potassium Channel, KCNK9. **2012** Apr 16 [Updated 2013 Feb 28]. In: Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2010-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1334227/>
- [64] Coburn, C.A.; Luo, Y.; Cui, M.; Wang, J.; Soll, R.; Dong, J.; Hu, B.; Lyon, M.A.; Santarelli, V.P.; Kraus, R.L.; Gregan, Y.; Wang, Y.; Fox, S.V.; Binns, J.; Doran, S.M.; Reiss, D.R.; Tannenbaum, P.L.; Gotter, A.L.; Meinke, P.T.; Renger, J.J. (2012). Discovery of a pharmacologically active antagonist of the two-pore-domain potassium channel K_{2p}9.1 (TASK-3). *Chem. Med. Chem.* **7**, 123-133.
- [65] Casagrande, C.; Invernizzi, A.; Ferrini, R.; Ferrari, G.G. (1968). Synthesis and pharmacological evaluation of some pyrrolo[2,1-*a*]isoquinolines. *J. Med. Chem.* **11** (4), 765-770.
- [66] An, T.; Huang, R.; Yang, Z.; Zhang, D.; Li, G.; Yao, Y.; Gao, J. (2001). Alkaloids from *Cynanchum komarovii* with inhibitory activity against the tobacco mosaic virus. *Phytochem.* **58**, 1267-1269.
- [67] Kolis, S.J.; Williams, T.H.; Mowles, T.F.; Burghardt, B.; Toome, V.; Schwartz, M. A. (1983). Metabolites of an antipsychotic chiral pyrroloisoquinoline and their effect on prokactin secretion in the rat. *J. Pharmacol.. Exp. Ther.* **227** (3), 652-657.
- [68] Nikajima, T.; Iwata, K. (1984). [³H]Ro 22-1319 (Piquindone) Binds to the D₂ dopaminergic receptor subtype in a sodium-dependent manner. *Mol. Pharmacol.* **26**, 430-438.
- [69] Nock, B.; Sedvall, G.; Mcewen, B.S. (1986). Quantitative autoradiography of [³H]piquindone binding sites (dopamine D₂ receptors) in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* **121**, 387-393.
- [70] Maryanoff, B. E.; McComsey, D.F.; Gardocki, J.F.; Shank, R.P.; Costanzo, M.J.; Nortey, S.O.; Schneider, C.R.; Setler, P.E. (1987). Pyrroloisoquinoline antidepressants. 2. In-depth exploration of structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **30** (8), 1433-1454.
- [71] Maryanoff, B.E.; Vaught, J.L.; Shank, R.P.; McComsey, D.F.; Costanzo, M. J.; Nortey, S.O. (1990). Pyrroloisoquinoline antidepressants. 3. A focus on serotonin. *J. Med. Chem.* **33** (10), 2793-2797.
- [72] Anderson, W.K.; Heider, A.R.; Raju, N.; Yucht, J.A. (1988). Synthesis and antileukemic activity of bis[[carbamoyl)methyl]-Substituted pyrrolo[2,1-*a*]isoquinolines, pyrrolo[1,2-*a*]quinolines, pyrrolo[2,1-*a*]isobenzazepines and pyrrolo[1,2-*a*]benzazepines. *J. Med. Chem.* **31** (11), 2097-2102.
- [73] Zhang, Q.; Tu, G.; Zhao, Y.; Cheng, T. (2002). Novel bioactive isoquinoline alkaloids from *Carduus crispus*. *Tetrahedron.* **58**, 6795-6798.
- [74] *Flora of North America* (2006). Magnoliophyta: Asteridae, part 6: Asteraceae, part 1. 19: i-xxiv. In *Fl. N. Amer.*. Editorial Committee. Oxford University Press, New York.
- [75] Nuti, E.; Casalini, F.; Santamaria, S.; Fabbri, M.; Carbotti, G.; Ferrini, S.; Marinelli, L.; La Pietra, V.; Novellino, E.; Camodeca, C.; Orlandini, E.; Nencetti, S.; Rossello, A. (2013). Selective arylsulfonamide inhibitors of ADAM-17: hit optimization and activity in ovarian cancer cell models. *J. Med. Chem.* **56** (20), 8089-8103.
- [76] Batey, M.A.; Zhao, Y.; Kyle, S.; Richardson, C.; Slade, A.; Martin, N.M.; Lau, A.; Newell, D.R.; Curtin, N.J. (2013). Preclinical evaluation of a novel ATM inhibitor, KU59403, *in vitro* and *in vivo* in p53 functional and dysfunctional models of human cancer. *Mol. Cancer Ther.* **12** (6), 959-967.

- [77] Li, D.; Li, P.; Lin, H.; Jiang, Z.; Gou, L.; Li, B. (2013). A novel chlorin-PEG-folate conjugate with higher water solubility, lower cytotoxicity, better tumor targeting and photodynamic activity. *J. Photochem. Photobiol. B*. **127**, 28-37.
- [78] Xu, R.; Wang, Q. (2014). Combining automatic table classification and relationship extraction in extracting anticancer drug-side effect pairs from full-text articles. *J. Biomed. Inform.* 2014 Oct 13. pii: S1532-0464(14)00221-4. doi: 10.1016/j.jbi.2014.10.002. [Epub ahead of print].
- [79] Knölker, H.J.; Agarwal, S. (2005). Total synthesis of the antitumor active pyrrolo[2,1-*a*]isoquinoline alkaloid(±)-crispine A. *Tetrahedron Lett.* **46**, 1173-1175.
- [80] Martínez, R.; Arzate, M.M.; Ramírez-Apan, T. (2009). Synthesis and cytotoxic activity of new azepino[3,4':4,5]pyrrolo[2,1-*a*]isoquinolin-12-ones. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 1849-1856.
- [81] Pla, D.; Marchal, A.; Olsen, C.A.; Francesch, A.; Cuevas, C.; Albericio, F.; Álvarez, M. (2006). Synthesis and structure-activity relationship study of potent cytotoxic analogues of the marine alkaloid lamellarin D. *J. Med. Chem.* **49**, 3257-3268.
- [82] Reyes-Gutiérrez, P.E.; Camacho, J.R.; Ramírez-Apan, M.T.; Osornio, J.M.; Martínez, R. (2010). Synthesis of 5,6-dihidropyrrolo[2,1-*a*]isoquinolines featuring an intramolecular radical-oxidative cyclization of polysubstituted pyrroles, and evaluation of their cytotoxic activity. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 4374-4382.
- [83] Vlachou, M.; Tsotinis, A.; Kelland, L.R.; Thurston, D.E. (2002). An expeditious synthesis of cytotoxic pyrroloisoquinoline derivatives. Structure-activity comparative studies with isomeric pyrroloquinolines. *Eur. J. Pharm. Sci.* **17**, 139-143.
- [84] Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell.* **88**, 355-365.
- [85] Raff, M.C.; Barres, B.A.; Burne, J.F.; Coles, H.S.; Ishizaki, Y.; Jacobson, M.D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science.* **262**, 695-700.
- [86] Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* **267**, 1456-1462.
- [87] Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *J. Biochem.* **326**, 1-16.
- [88] Kerr, J.F.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* **26**, 239-257.
- [89] Majno, G.; Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* **146**, 3-15.
- [90] Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA Fragmentation. *Exp. Cell Res.* **256**, 12-18.
- [91] Remillard C.V.; Yuan, J.X.-J. (2004). Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **286**, L49-L67.
- [92] Kumar, V.; Abbas, A.K.; Fausto, N.; Aster, J.C. (2008). Robbins y Cotran Patología estructural y funcional. 8ª Edición. Elsevier Saunders. Barcelona, España. 27-29.
- [93] Adams, J. M.; Cory, S. (2002). Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 715-720.
- [94] Hengartner, M.O.; Ellis, R.E.; Horvitz, H.R. (1992). *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature.* **356**, 494-499.
- [95] Jacobson, M.D.; Evan, G.I. (1994). Apoptosis. Breaking the ICE. *Curr. Biol.* **4**, 337-340.
- [96] Johnson Jr., E.M.; Greenlund, L.J.; Akins, P.T.; Hsu, C.Y. (1995). Neuronal apoptosis: current understanding of molecular mechanisms and potential role in ischemic brain injury. *J. Neurotrauma.* **12**, 843-852.
- [97] Li, H.; Yuan, J. (1999). Deciphering the pathways of life and death. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 261-266.
- [98] Borthers, C.D.; Cidlowki, J.A. (1998). A necessary role for cell shrinkage in apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* **56**, 1549-1559.
- [99] Hughes Jr., F.M.; Cidlowski, J.A. (1999). Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes *in vitro* and *in vivo*. *Adv. Enzyme Regul.* **39**, 157-171.
- [100] Krick, S.; Platoshyn, O.; Sweeney, M.; Kim, H.; Yuan, J.X. (2001). Activation of K⁺ channels induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**, C970-C979.
- [101] Marklund, L.; Behnam-Motlagh, P.; Henriksson, R.; Grankvist, K. (2001). Bumetanide annihilation of amphotericin B-induced apoptosis and cytotoxicity is due to its effect on cellular K⁺ flux. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**, 781-786.

- [102] **Marklund, L.; Henriksson, R.; Grankvist, K. (2001).** Cisplatin-induced apoptosis of mesothelioma cells is affected by potassium ion flux modulator amphotericin B and bumetanide. *Int. J. Cancer.* **93**, 577-583.
- [103] **Montague, J. W.; Bortner, C.D.; Hughes Jr., F.M.; Cidlowski, J.A. (1999).** A necessary role for reduced intracellular potassium during the DNA degradation phase of apoptosis. *Steroids.* **64**, 563-569.
- [104] **Xiao, A.Y.; Homma, M.; Wang, X.Q.; Wang, X.; Yu, S.P. (2001).** Role of K⁺ efflux in apoptosis induced by AMPA and kainite in mouse cortical neurons. *Neurosci.* **108**, 61-67.
- [105] **Yu, S.P.; Yeh, C.H.; Sensi, S.L.; Gwag, B.J.; Canzoniero, L.M.; Farhangrazi, Z.S.; Ying, H.S.; Tian, M.; Dugan, L.L.; Choi, D.W. (1997).** Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science.* **278**, 114-117.
- [106] **Yu, S.P.; Canzoniero, L.M.; Choi, D.W. (2001).** Ion homeostasis and apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 405-411.
- [107] **Yu, S.P. (2003).** Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog. Neurobiol.* **70**, 363-386.
- [108] **Hughes Jr., F.M.; Bortner, C.D.; Purdy, G.D.; Cidlowski, J.A. (1997).** Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 30567-30576.
- [109] **Barbiero, G.; Duranti, F.; Bonelli, G.; Amenta, J.S.; Baccino, F.M. (1995).** Intracellular ionic variations in the apoptotic death of L cells by inhibitors of cell cycle progression. *Exp. Cell Res.* **217**, 410-418.
- [110] **Benson, R.S.; Heer, S.; Dive, C.; Watson, A.J. (1996).** Characterization of cell volume loss in CEM-C7A cells during dexamethasone-induced apoptosis. *Am. J. Physiol.* **270**, C1190-C1203.
- [111] **Dellaporta, B.; Hirsch, T.; Susin, S.A.; Zamzami, N.; Larochette, N.; Brenner, C.; Marzo, I.; Kroemer, G. (1998).** Potassium leakage during the apoptotic degradation phase. *J. Immunol.* **160**, 5605-5615.
- [112] **Ekhterae, D.; Platoshyn, O.; Krick, S.; Yu, Y.; McDaniel, S.S.; Yuan, J.X. (2001).** Bcl-2 decreases voltage-gated K⁺ channel activity and enhances survival in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**, C157-C165.
- [113] **Wang, H.; Zhang, Y.; Cao, L.; Han, H.; Wang, J.; Yang, B.; Nattel, S.; Wang, Z. (2002).** HERG K⁺ channel, a regulator of tumor cell apoptosis and proliferation. *Cancer Res.* **62**, 4843-4848.
- [114] **Elliott, J.I.; Higgins, C.F. (2003).** IKCa1 activity is required for cell shrinkage, phosphatidylserine translocation and death in T lymphocyte apoptosis. *EMBO Rep.* **4**, 189-194.
- [115] **Nadeau, H.; McKinney, S.; Anderson, D.J.; Lester, H.A. (2000).** ROMK1 (Kir1.1) causes apoptosis and chronic silencing of hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* **84**, 1062-1075.
- [116] **Fan, Z.; Neff, R.A. (2000).** Susceptibility of ATP-sensitive K⁺ channels to cell stress through mediation of phosphoinositides as examined by photoirradiation. *J. Physiol. (Lond.).* **529**, 707-721.
- [117] **Gallo, V.; Kingsbury, A.; Balázs, R.; Jorgensen, O.S. (1987).** The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* **7**, 2203-2213.
- [118] **Lossi, L.; Mioletti, S.; Merighi, A. (2002).** Synapse-independent and synapse-dependent apoptosis of cerebellar granule cells in postnatal rabbits occur at two subsequent but partly overlapping developmental stages. *Neurosci.* **112**, 509-523.
- [119] **Wood, K.A.; Dipasquale, B.; Youle, R.J. (1993).** In situ labeling of granule cells for apoptosis-associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum. *Neuron.* **11**, 621-632.
- [120] **Bennett, M.; White, W. (1979).** The survival and development of cholinergic neurons in potassium-enriched. *Brain Res.* **173**, 549-553.
- [121] **Chalazonitis, A.; Fishbach, G.D. (1980).** Elevated potassium induces morphological differentiation of dorsal root ganglionic neurons in dissociated cell culture. *Dev. Biol.* **78**, 173-183.
- [122] **D'Mello, S.R.; Galli, C.; Ciotti, T.; Calissano, P. (1993).** Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *PNAS.* **90**, 10989-10993.
- [123] **Phillipson, D.T.; Sandler, M. (1975).** The influence of nerve growth factor, potassium depolarization and dibutyryl (cyclic) adenosine 3', 5'-monophosphate on explant cultures of chick embryo sympathetic ganglia. *Brain Res.* **90**, 273-281.

- [124] **Scott, B.S. (1977).** The effect of elevated potassium on the time course of neuron survival in cultures of dissociated dorsal root ganglia. *J. Cell. Physiol.* **91**, 305-316.
- [125] **Galli, C.; Meucci, O.; Scorziello, A.; Werge, T.M.; Calissano, P.; Schettini, G. (1985).** Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *J. Neurosci.* **15**, 1172-1179.
- [126] **Mao, Z.; Bonni, A.; Xia, F.; Nadal-Vicens, M.; Greenberg, M.E. (1999).** Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science.* **286**, 785-790.
- [127] **Yan, G.M.; Ni, B.; Weller, M.; Wood, K.A.; Paul, S.M. (1994).** Depolarization or glutamate receptor activation blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res.* **656**, 43-51.
- [128] **Wei, A.; Jegla, T.; Salkoff, L. (1996).** Eight potassium families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacol.* **35** (7), 805-829.
- [129] **Watkins, C.S.; Mathie, A. (1996).** A non-inactivating K⁺ current sensitive to muscarinic receptor activation in rat cultured cerebellar granule neurons. *J. Physiol.* **491**, 401-412.
- [130] **KCNK9 – NCI60 Cancer cell line panel (s.f.).** Recuperado el 30 de enero del 2015, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/86814620>.
- [131] **Wagner, C.A.; Friedrich, B.; Setiawan, I.; Lang, F.; Bröer, S. (2000).** The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell. Physiol. Biochem.* **10**, 1-12.
- [132] **Noriega, R. (2007).** Evaluación del veneno de alacrán sobre el canal de potasio TASK-3 (4TM/2P). Tesis para optar por el grado de Maestro en Ciencias. UNAM.
- [133] **Murbartían, J.; Lei, Q.; Sando, J.J.; Bayliss, D.A. (2005).** Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels. *J. Biol. Chem.* **280** (34), 30175-30184.
- [134] **Stühmer, W. (1998).** Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. In: Con MP (ed.): Ion channels. Part B. *Meth. Enzymol.* **293**, 280-300.
- [135] **Moran, J.; Patel, A.J. (1989).** Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Bain Res.* **46**, 97-105.
- [136] **Hamill, O.P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F.J. (1981).** Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391** (2), 85-100.
- [137] **Caballero-Benitez, A.; Morán, J. (2003).** Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2. *J. Neurosci. Res.* **71**, 383-396.
- [138] **Innamaa, A.; Jackson, L.; Asher, V.; van Schalkwyk, G.; Warren, A.; Keightley, A.; Hay, D.; Bali, A.; Sowter, H.; Khan, R. (2013).** Expression and effects of modulation of the K2P potassium channels TREK-1 (KCNK2) and TREK-2 (KCNK10) in the normal human ovary and epithelial ovarian cancer. *Clin. Transl. Oncol.* **15** (11), 910-908.
- [139] **Voloshyna, I.; Besana, A.; Castillo, M.; Matos, T.; Weinstein, I.B.; Mansukhani, M.; Robinson, R.B.; Cordon-Cardo, C.; Feinmark, S.J. (2008).** TREK-1 is a novel molecular target in prostate cancer. *Cancer Res.* **68** (4), 1197-1203.
- [140] **Blankenship, M.L.; Coyle, D.E.; Baccei, M.L. (2013).** Transcriptional expression of voltage-gated Na⁺ and voltage-dependent K⁺ channels in the developing rat superficial dorsal horn. *Neurosci.* **231**, 305-314.
- [141] **Brenner, T.; O’Shaughnessy, K.M. (2008).** Both TASK-3 and TREK-1 two-pore loop K channels are expressed in H295R cells and modulate their membrane potential and aldosterone secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **295**, E1480-E1486.
- [142] **Mathie, A.; Clarke, C.E.; Ranatunga, K.M.; Veale, E.L. (2003).** What are the roles of the many different types of potassium channel expressed in cerebellar granule cells? *Cerebellum.* **2**, 11-25.
- [143] **Watkins, C.S.; Mathie, A. (1996).** Effect on K⁺ currents in rat cerebellar granule neurons of a membrane-permeable analogue of the calcium chelator BAPTA. *Brit. J. Pharmacol.* **118**, 1772-1778.
- [144] **Cull-Candy, S.G.; Marshall, C.G.; Ogden, D. (1989).** Voltage-activated membrane current in rat cerebellar granule neurons. *J. Physiol.* **414**, 179-199.

- [145] **Watkins C.S.; Mathie, A. (1994).** Modulation of the gating of the transient outward potassium current of rat isolated cerebellar granule neurons by lanthanum. *Pflügers Archiv/Eur J. Physiol.* **428**, 209-216.
- [146] **Hirano, M.; Imaizumi, Y.; Yamada, A.; Watanabe, M. (1998).** Effects of ruthenium red on membrane ionic currents in urinary bladder smooth muscle cells of guinea-pig. *Pflügers Arch.* **435**, 645-653.
- [147] **Braun, G.; Lengyel, M.; Enyedi, P.; Czirják, G. (2014).** Differential sensitivity of TREK-1, TREK-2 and TRAAK background potassium channels to the polycationic dye ruthenium red. *Br. J. Pharmacol.* Nov 19. doi: 10.1111/bph.13019. [Epub ahead of print].
- [148] **Bautista, D.M.; Sigal, Y.M.; Milstein, A.D.; Garrison, J.L.; Zorn, J.A.; Tsuruda, P.R.; Nicoll, R.A.; Jullius, D. (2008).** Pungent agent from Szechuan peppers excite sensory neurons by inhibiting two-pore potassium channels. *Nat. Neurosci.* **11**, 772-779.
- [149] **Possani, L.D.; Selisko, B.; Gurrola, G.B. (1999).** Structure and function of scorpion toxins affecting K⁺ channels. In Darbon, H.; Sabatier, J.M. (Eds.). Perspectives in Drugs Discovery and Design: Animal Toxins and Potassium Channels, **15/16**. *Kluwer/Escom*. Dordrecht. 15-40.
- [150] **Pardo-López, L.; García-Valdés, J.; Gurrola, G.B.; Robertson, G.A.; Possani, L.D. (2002).** Mapping the receptor site for ergotoxin, a specific blocker of ERG channels. *FEBS Lett.* **510**, 45-49.
- [151] **García-Valdés, J.; Zamudio, F.Z.; Toro, L.; Possani, L.D. (2001).** Slotoxin, α KTx1.11, a new scorpion peptide blocker of MaxiK channels that differentiates between α and $\alpha+\beta$ (β 1 or β 4) complexes. *FEBS Lett.* **505**, 369-373.
- [152] **Wu, M.; Wang, H.; Yu, H.; Makhina, E.; Xu, J.; Dawson, E.S.; Hopkins, C.R.; Lindsley, C.W.; McManus, O.B.; Li, M. (2010).** A potent and selective small molecule Kir2.1 inhibitor. Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
- [153] **Singh, S.B.; Goetz, M.A.; Zink, D.L.; Dombrowski, A.W.; Polishook, J.D.; García, M.L.; Schmalhofer, W.; McManus, O.B.; Kaczorowski, G.J. (1994).** Maxikdiol: A novel dihydroxyisoprimane as an agonist of Maxi-K Channels. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 3349-3352.
- [154] **Pardo-Lopez, L.; Zhang, M.; Liu, J.; Jiang, M.; Possani, L.D.; Tseng, G.-N. (2002).** Mapping the binding site of a human ether-a-go-go-related gene-specific peptide toxin (ErgTx) to the channel's outer vestibule. *J. Biol. Chem.* **227** (19), 16403-16411.
- [155] **Imredy, J.P.; Mackinnon, R. (2000).** Energetic and structural interactions between δ -Dendrotoxin and a voltage-gated potassium channel. *J. Mol. Biol.* **296**, 1283-1294.
- [156] **García, J. J. (2003).** Estudio de la interacción de toxinas de alacranes mexicanos sobre el maxicanal de potasio activado por calcio. Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias. UNAM.
- [157] **Gabriel, A.; Abdallah, M.; Yost, C.S.; Winegar, B.D.; Kindler, C.H. (2002).** Localization of the tandem pore domain K⁺ channel KCNK5 (TASK-2) in the rat central nervous system. *Mol. Brain Res.* **98**, 153-163.
- [158] **Cotten, J.F.; Zou, H.L.; Liu, C.; Au, J.D.; Yost, C.S. (2004).** Identification of native rat cerebellar granule cell currents due to background K channel KCNK5 (TASK-2). *Mol. Brain Res.* **128**, 112-120.
- [159] **Lossi, L.; Gambino, G.; Ferrini, F.; Alasia, S.; Merighi, A. (2009).** Posttranslational regulation of BLC2 levels in cerebellar granule cells: a mechanism of neuronal survival. *Dev. Neurobiol.* **69** (13), 855-870.
- [160] **Sato, M.; Suzuki, K.; Yamazaki, H.; Nakanishi, S. (2005).** A pivotal role of calcineurin signaling in development and maturation of postnatal cerebellar granule cells. *PNAS USA.* **102**, 5874-5879.
- [161] **Bui, C.J.; McGann, A.C.; Middleton, F.A.; Beaman-Hall, C.M.; Valano, M.L. (2006).** Transcriptional profiling of depolarization-dependent phenotypic alteration in primary cultures of developing granule neurons. *Brain Res.* **1119**, 13-25.
- [162] **Nakanishi, S.; Okazawa, M. (2006).** Membrane potential-regulated Ca²⁺ signaling in development and maturation of mammalian cerebellar granule cells. *J. Physiol.* **575**, 389-395.
- [163] **Noriega-Navarro, R.; Lopez-Charcas, O.; Hernández-Enríquez, B.; Reyes-Gutiérrez, P.E.; Martínez, R.; Landa, A.; Morán, J.; Gomora, J.C.; Garcia-Valdes, J. (2014).** Novel TASK channels inhibitors derived from dihydropyrrolo[2,1-a]isoquinoline. *Neuropharmacol.* **79**, 28-36.
- [164] **Hernández-Enríquez, B.; Arellano, R.O.; Morán, J. (2010).** Role of ionic fluxes on cell death and apoptotic volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *Neurosci.* **167**, 298-311.

- [165] **Wei, L.; Xiao, A.Y.; Jin, C.; Yang, A.; Lu, Z.Y.; Yu, S.P. (2004).** Effects of chloride and potassium channel blockers on apoptotic cell shrinkage and apoptosis in cortical neurons. *Pflugers Arch.* **448**, 325-334.
- [166] **Small, D.L.; Tauskela, J.; Xia, Z. (2002).** Role for Chloride but not potassium channels in apoptosis in primary rat cortical cultures. *Neurosci. Lett.* **334**, 95-98.
- [167] **Bittner, S.; Budde, T.; Weindl, H.; Meuth, S.G. (2010).** From the background to the spotlight: TASK channels in pathological conditions. *Brain Pathol.* **20**, 999-1009.
- [168] **Bittner, S.; Meuth, S.G.; Göbel, K.; Melzer, N.; Herrmann, M.; Simon, O.J.; Weishaupt, A.; Budde, T.; Bayliss, D.A.; Bendszus, M.; Weindl, H. (2009).** TASK1 modulates inflammation and neurodegeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Brain.* **132**, 2501-2516.
- [169] **Bista, P.; Meuth, S.G.; Kanyshkova, T.; Cerina, M.; Pawlowski, M.; Ehling, P.; Landgraf, P.; Borsotto, M.; Heurteaux, C.; Pape, H.C.; Baukrowitz, T.; Budde, T. (2012).** Identification of the muscarinic pathway underlying cessation of sleep-related burst activity in rat thalamocortical relay neurons. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **463**, 89-102.
- [170] **Pang, D.S.J.; Robledo, C.J.; Car, D.R.; Gent, T.C.; Vyssotski, A.L.; Caley, A.; Zecharia, A.Y.; Wisden, W.; Bickley, S.G.; Franks, N.P. (2009).** An unexpected role for TASK-3 potassium channels in network oscillation with implications for sleep mechanism and anesthetic action. *PNAS.* **106** (41), 17546-17551.
- [171] **Cotten, J.F. (2013).** TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) tandem pore potassium channel antagonist stimulate breathing in isoflurane-anesthetized rats. *Anesth. Analg.* **116** (4), 810-816.

APÉNDICE

I. Efecto del etanol

I.1. Ensayos electrofisiológicos (% de inhibición)

Canal iónico	Etanol		n
	0.3%	1.8%	
hTASK-1	4.9±0.7	24.6±3.5	60
rTASK-3	1.0±0.1	5.3±0.7	70
hTASK-1/rTASK-3	2.6±0.3	13.1±1.7	30
mTREK-1	(12.3±4.2)	(36.5±8.6)	30
Shaker IR	2.3±0.1	11.4±0.4	30
herg1	1.4±0.5	7.0±2.3	30
hSLO1	(12.9±1.1)	(64.4±5.6)	30
hKir2.1	1.0±0.5	3.6±0.1	30
Ovocitos endógenos	(2.0±0.1)	(4.8±3.4)	35
IK _{so}	-	8.5±3.0	10

Tabla A.1. Efecto del etanol sobre las corrientes de los registros electrofisiológicos. Porcentaje de inhibición de las corrientes de los canales de K⁺ (por 0.3 y 1.8% de etanol) expresados tanto en ovocitos de *Xenopus* como en NGC. Las corrientes de los canales de K⁺ se registraron con diferentes protocolos de pulsos de voltaje (*ver Métodos*). Los datos se expresan como el promedio ± error estándar (n = número de ensayos). Nota: los valores entre paréntesis indican porcentaje de activación.

I.2. Ensayos de viabilidad celular

	Calceína (%)	IP (%)
K25	88.8±1.7	8.7±1.7
EtOH	87.8±4.1	14.4±4.5
K5	46.5±2.2	52.7±2.6
EtOH	45.7±4.9	51.0±2.6
Sts	37.4±3.8	58.5±1.73
EtOH	32.9±4.4	56.8±4.8

Tabla A.2. Efecto de 1.8% de etanol en los ensayos de viabilidad celular en NGC. Porcentaje de células positivas a calceína ó a yoduro de propidio (IP), en medio K25, K5 y con Sts. Los datos se expresan como el promedio ± error estándar (n=4-5).

II. Caracterización del canal heterodimérico (hTASK-1/rTASK-3)

Canal iónico	RR [10mM, (7)]	Etanol [1.8%]	pH =6.0 (5)	pH =7.0 (5)
hTASK-1	4.2±1.0	24.6±3.5 (60)	95.7±1.1	38.6±2.5
hTASK-1/rTASK-3	2.8±1.2	13.1±1.7 (30)	75.7±2.4	11.6±1.6
rTASK-3	59.6±2.1	5.3±0.7 (70)	47.1±3.1	2.4±0.8

Tabla A.3. Caracterización del canal heterodimérico (hTASK-1/rTASK-3). Porcentaje de inhibición de las corrientes de los canales TASK (expresados en ovocitos *Xenopus*) por rojo de rutenio (RR), etanol y pH. Las células se estimularon con un pulso de potencial: +80 mV, potencial de mantenimiento: -80 mV, en un tiempo de 400 ms. Medio ND-96. Los porcentajes de inhibición para los valores de pH = 6 y 7, son con respecto a pH = 8, donde la probabilidad de apertura de los canales TASK es mayor. Los datos se expresan como el promedio ± error estándar. El dato entre paréntesis representan el número de ensayos evaluados.

III. Subclonación de mTREK-1

```

TREK-pRK5 -----
TREK-pGEM NNNNNNNNCGACGTCGCATGCTCCCGGCCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTACCA

                10      20      30      40
TREK-pRK5 -----ATGGCGGCCCTGACTTGCTGGATCCCAAGTCTGCTGCTCAGAACTCCA
TREK-pGEM AGCTTGCCACCATGGCGGCCCTGACTTGCTGGATCCCAAGTCTGCTCAGAACTCCA

50      60      70      80      90      100
TREK-pRK5 AACCGAGGCTCTCATTCTCCTCAAAACCCACCGTGCTTGCTTCCCGGGTGGAGAGTGACT
TREK-pGEM AACCGAGGCTCTCATTCTCCTCAAAACCCACCGTGCTTGCTTCCCGGGTGGAGAGTGACT

110     120     130     140     150     160
TREK-pRK5 CGGCCATTAATGTTATGAAATGGAAGACAGTCTCCACGATTTTCTGGTGGTGCCTCT
TREK-pGEM CGGCCATTAATGTTATGAAATGGAAGACAGTCTCCACGATTTTCTGGTGGTGCCTCT

170     180     190     200     210     220
TREK-pRK5 ACCTGATCATCGGAGCCACGGTGTTC AAGGCATTGGAGCAGCCTCAGGAGATTTCCAGAG
TREK-pGEM ACCTGATCATCGGAGCCACGGTGTTC AAGGCATTGGAGCAGCCTCAGGAGATTTCCAGAG

230     240     250     260     270     280
TREK-pRK5 GGACCACCATTGTGATCCAGAGGCAGACCTTCATAGCCAGCATGCCTGCGTCAACTCCA
TREK-pGEM GGACCACCATTGTGATCCAGAGGCAGACCTTCATAGCCAGCATGCCTGCGTCAACTCCA

290     300     310     320     330     340
TREK-pRK5 CCGAGCTGGACAAACTCATCCAGCAAATAGTGGCAGCAATAAACGCAGGGATTATCCCCT
TREK-pGEM CCGAGCTGGACAAACTCATCCAGCAAATAGTGGCAGCAATAAACGCAGGGATTATCCCCT

350     360     370     380     390     400
TREK-pRK5 TAGGAAACAGCTCCAATCAAGTTAGTCACTGGGACCTCGGAAGCTCTTTCTCTTTGCTG
TREK-pGEM TAGGAAACAGCTCCAATCAAGTTAGTCACTGGGACCTCGGAAGCTCTTTCTCTTTGCTG

410     420     430     440     450     460
TREK-pRK5 GTACTGTTATCACAACCATAGGATTTGGAAACATCTCCCCACGAACTGAAGGTGGAAAAA
TREK-pGEM GTACTGTTATCACAACCATAGGATTTGGAAACATCTCCCCACGAACTGAAGGTGGAAAAA

470     480     490     500     510     520
TREK-pRK5 TATTCTGCATCATCTATGCCTTGCTGGGAATTCCCCTCTTTGGCTTTCTACTGGCTGGGG
TREK-pGEM TATTCTGCATCATCTATGCCTTGCTGGGAATTCCCCTCTTTGGCTTTCTACTGGCTGGGG

530     540     550     560     570     580
TREK-pRK5 TTGGTGATCAGCTAGGAACTATATTTGGAAAAGGAATTGCCAAAGTGGAAGACACATTA
TREK-pGEM TTGGTGATCAGCTAGGAACTATATTTGGAAAAGGAATTGCCAAAGTGGAAGACACATTA

590     600     610     620     630     640
TREK-pRK5 TTAAGTGGAAATGTTAGTCAGACGAAGATTCGTATCATCTCCACCATCATCTTCATCCTGT
TREK-pGEM TTAAGTGGAAATGTTAGTCAGACGAAGATTCGTATCATCTCCACCATCATCTTCATCCTGT

650     660     670     680     690     700
TREK-pRK5 TTGGCTGTGTCCCTTTGTGGCTCTCCCTGCGGTCATATCAAGCACATAGAAGGCTGGA
TREK-pGEM TTGGCTGTGTCCCTTTGTGGCTCTCCCTGCGGTCATATCAAGCACATAGAANGNTGGA

710     720     730     740     750     760
TREK-pRK5 GCGCCCTGGACGCTATCTATTTTGTGGTTATCACTCTGACGACCATTGGATTGGAGACT
TREK-pGEM GCGCCCTGNN-GCTATCTATTTTGTNGNTATCACTCTGACGAC-ATTGN-----

```

Figura A.1. Secuenciación de la clona mTREK-pGEM (río abajo). Comparación de la secuencia obtenida con la reportada (GenBank™ U73488.1). Se empleó el oligonucleótido T7. El codón de inicio se presenta en negritas y la región utilizada para el diseño del oligonucleótido 5' se muestra subrayada.

Figura A.2. Secuenciación de la clona mTREK-pGEM (río arriba). Comparación de la secuencia obtenida con la reportada mTREK-pRK5 (GenBankTM U73488.1). Se empleó el oligonucleótido SP6. El codón de término se presenta en negritas y la región utilizada para el diseño del oligonucleótido 3' se muestra subrayada.

TREK-pGEM	TTNNCGCGCCCTGCAGGTCNCNCATATATGGANAGCTCCCAAAGCANNNGATGCNNNGC
TREK-pRK5	-----
TREK-pGEM	CTGGTGAAGACATAGCTGTGCATTGGAAAGCATAGTAAGCTCGAGCGTAAATCACTAGTAA
TREK-pRK5	CTGGTGAAGACATAGCTGTGCATTGGAAAGCATAGTAAAGTAG
	1200 1210 1220 1230
TREK-pGEM	TCCTGCCTCCCTTGGCTGAAGGCTGAAGAGCATCTATCTGAAACGGTCTGACACACCACTGTG
TREK-pRK5	TCCTGCCTCCCTTGGCTGAAGGCTGAAGAGCATCTATCTGAAACGGTCTGACACACCACTGTG
	1140 1150 1160 1170 1180 1190
TREK-pGEM	AGGAACCTGACTCCGCTGTAGGAGGAGGACCCCTGTGTGTAACCACTGACCCAGGAGGGAAG
TREK-pRK5	AGGAACCTGACTCCGCTGTAGGAGGAGGACCCCTGTGTGTAACCACTGACCCAGGAGGGAAG
	1080 1090 1100 1110 1120 1130
TREK-pGEM	TCAGCGTGCACATCCCGTGAAGCGGAAAGCTCTCCGCAAGAGCTGGCGGGCAACCAACC
TREK-pRK5	TCAGCGTGCACATCCCGTGAAGCGGAAAGCTCTCCGCAAGAGCTGGCGGGCAACCAACC
	1020 1030 1040 1050 1060 1070
TREK-pGEM	ATGTCACGGCCCGAGTTCAAGGAAACGAGGAGGCGGCTGAGCGGTGGAGATNTACGACAAAGT
TREK-pRK5	ATGTCACGGCCCGAGTTCAAGGAAACGAGGAGGCGGCTGAGCGGTGGAGATNTACGACAAAGT
	960 970 980 990 1000 1010
TREK-pGEM	CTAAGAAAGCAAGGAAAGGAGGTTCAAGAGCGCATGAGGCGGCTGAGTGGACACGCA
TREK-pRK5	CTAAGAAAGCAAGGAAAGGAGGTTCAAGAGCGCATGAGGCGGCTGAGTGGACACGCA
	900 910 920 930 940 950
TREK-pGEM	TTGNN-TGGCCTACTTTTGCCNNN-GTTN-GAGCATGATTTGGGGAACCTNNCTACGGGNGATCT
TREK-pRK5	TTGGGCTGGCCTACTTTTGCCACTTTGTCAGACTTGTCTTCTGAGCATGATTTGGGGAACCTGACTGATCT
	840 850 860 870 880 890
TREK-pGEM	GTGATCAGACATTTAATNNN-GGACTTCTACAAANCCCTGTGTGTTGGATCCCTTG
TREK-pRK5	GTGATCAGACATTTGAAATATCTGGACCTTCTACAAAGCCTGTGTGTTGGATCCCTCG
	780 790 800 810 820 830
TREK-pGEM	CCTATNTTATTTTGGGGTTATCATTTCTGACGACCATTTGGATTGGAGAAATACGNGGAG
TREK-pRK5	GCTACTA--TTTGTGGTTTATCCTGACGACCATTTGGATTGGAGAAATACGCTGAG
	730 740 750 760 770
TREK-pGEM	-----AGAAAGGTTG-AGCGCCCTGGNN
TREK-pRK5	CTCTTTTGTGGCTCTCCCTGCGGTTCATATTTCAAGCACATAGGAGGCTGGAGCGCCCTGAGC

IV. Efecto de las pirroloisoquinolinas activas sobre la corriente de canales de K^+

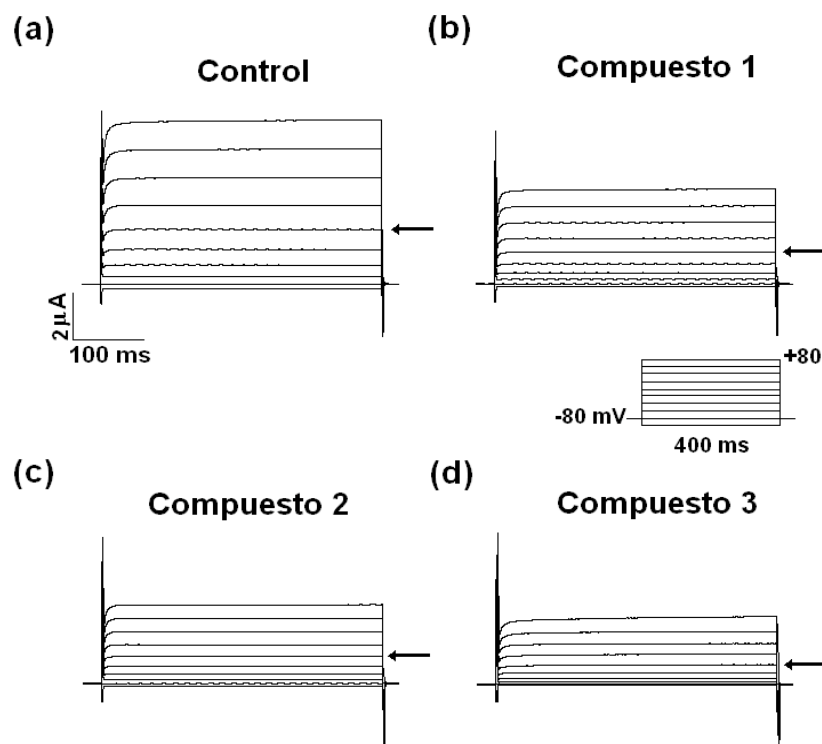


Figura A.3. Trazos representativos del canal heterodimérico (hTASK-1/rTASK-3). Registros en ausencia (a, control) o en presencia de 500 μ M de los compuestos **1** (b), **2** (c) y **3** (d). Medio ND-96, pH = 7.4. Las corrientes se registraron con el protocolo de pulsos ilustrado en la figura. Las flechas indican los registros de las corrientes a 0 mV.

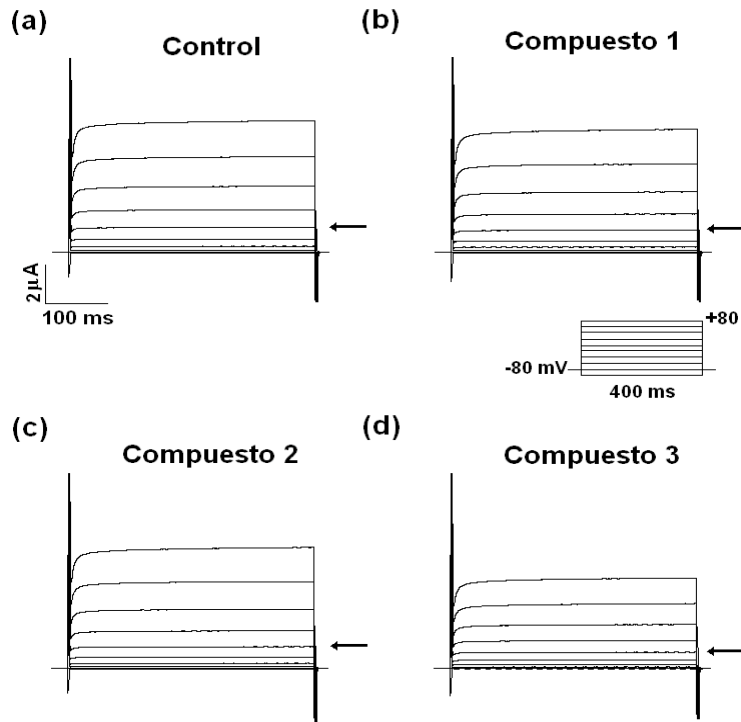


Figura A.4. Trazos representativos del canal mTREK-1. Registros en ausencia (a, control) o en presencia de 500 μM de los compuestos 1 (b), 2 (c) y 3 (d). Medio ND-96, pH = 7.4. Las corrientes se registraron con el protocolo de pulsos ilustrado en la figura. Las flechas indican los registros de las corrientes a 0 mV.

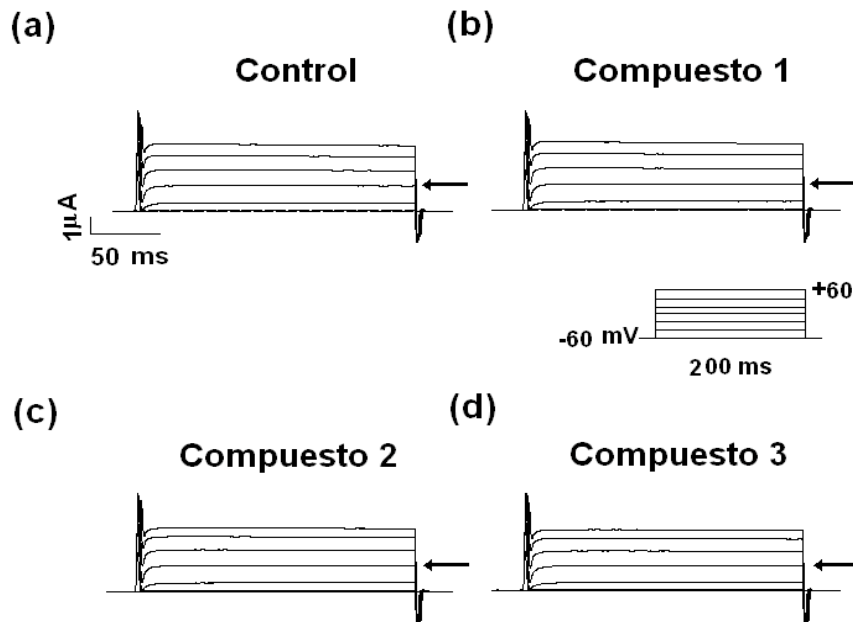


Figura A.5. Trazos representativos del canal Shaker IR. Registros en ausencia (a, control) o en presencia de 500 μM de los compuestos 1 (b), 2 (c) y 3 (d). Medio ND-96, pH = 7.4. Las corrientes se registraron con el protocolo de pulsos ilustrado en la figura. Las flechas indican los registros de las corrientes a 0 mV.

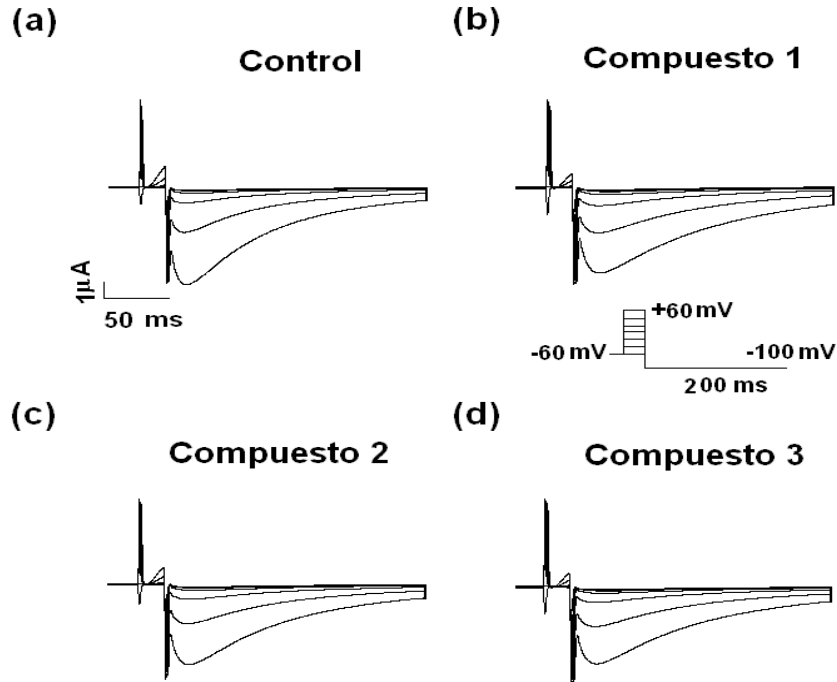


Figura A.6. Trazos representativos del canal hERG1. Registros en ausencia (a, control) o en presencia de $500 \mu\text{M}$ de los compuestos 1 (b), 2 (c) y 3 (d). Medio ND-96 modificado con 5 mM de K^+ , $\text{pH} = 7.4$. Las corrientes se registraron con el protocolo de pulsos ilustrado en la figura.

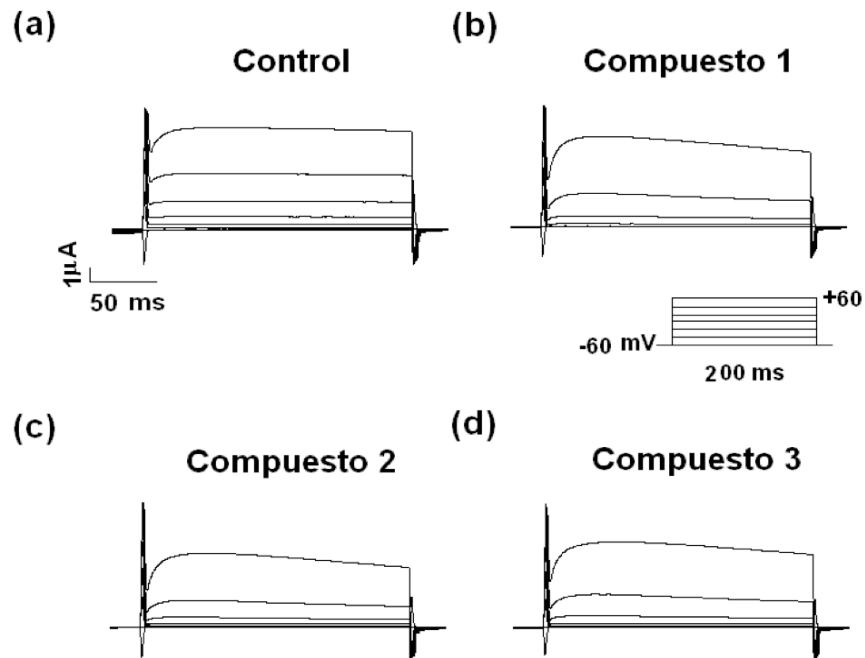


Figura A.7. Trazos representativos del canal hSLO1. Registros en ausencia (a, control) o en presencia de $500 \mu\text{M}$ de los compuestos 1 (b), 2 (c) y 3 (d). Medio ND-96, $\text{pH} = 7.4$. Las corrientes se registraron con el protocolo de pulsos ilustrado en la figura.

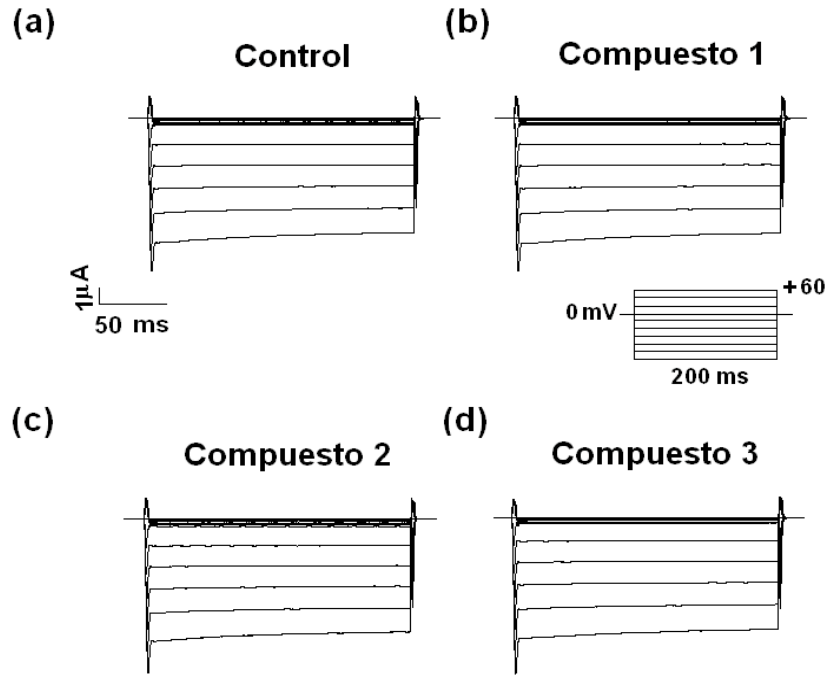


Figura A.8. Trazos representativos del canal hKir2.1. Registros en ausencia (a, control) o en presencia de 500 μM de los compuestos **1** (b), **2** (c) y **3** (d). Medio ND-96 modificado con 90 mM de K^+ , pH = 7.4. Las corrientes se registraron con el protocolo de pulsos ilustrado en la figura.

V. Presencia de la corriente de Na^+ en las neuronas granulares del cerebelo (NGC)

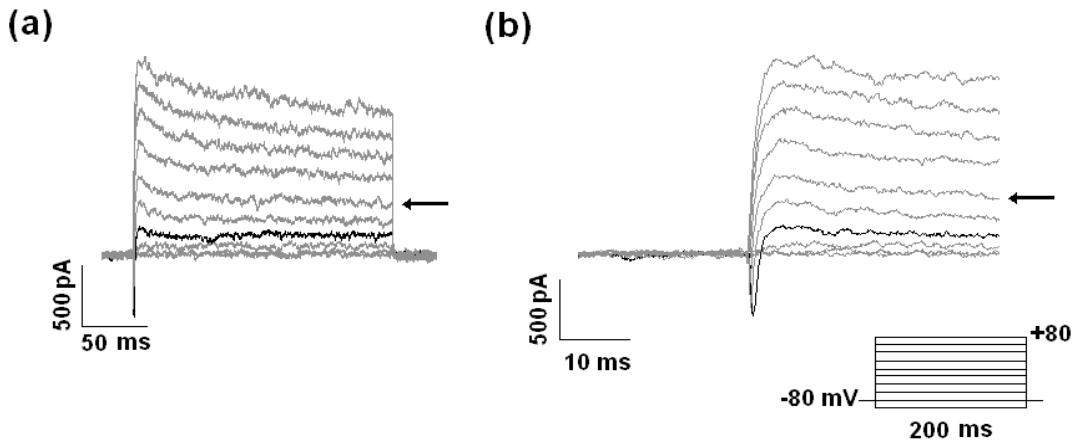
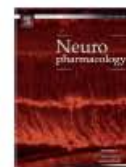


Figura A.9. Presencia de la corriente de Na^+ en las NGC. Registros de la corriente IK_{so} de las NGC donde se observa la presencia de la corriente entrante de Na^+ (a), que se aprecia mejor al modificar la escala de tiempo (b). La corriente entrante de Na^+ máxima (>400 pA) se observa a -40 mV (registro en color negro) y se inactiva rápidamente (~ 2 ms). Las corrientes se registraron con el protocolo de pulsos ilustrado en la figura. Las flechas indican los registros de las corrientes a 0 mV.



Novel TASK channels inhibitors derived from dihydropyrrolo[2,1-*a*]isoquinoline



R. Noriega-Navarro^a, O. Lopez-Charcas^b, B. Hernández-Enríquez^c, P.E. Reyes-Gutiérrez^d, R. Martínez^d, A. Landa^c, J. Morán^c, J.C. Gomora^b, J. García-Valdes^{a,*}

^aDepartamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, México City 04510, México

^bDepartamento de Neuropatología Molecular, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, México City 04510, México

^cDepartamento de Neurodesarrollo y Fisiología, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, México City 04510, México

^dDepartamento de Química Orgánica, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, México City 04510, México

^eDepartamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, México City 04510, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 May 2012

Received in revised form

22 October 2013

Accepted 27 October 2013

Keywords:

TASK channels

DPI

Dihydropyrrolo[2,1-*a*]isoquinoline

Apoptosis

Leak channels

ABSTRACT

TASK channels belong to the family of K⁺ channels with 4 transmembrane segments and 2 pore domains (4TM/2P) per subunit. These channels have been related to apoptosis in cerebellar granule neurons (CGN), as well as cancer in other tissues. TASK current is regulated by hormones, neurotransmitters, anesthetics and divalent cations, which are not selective. Recently, there has been found some organic compounds that inhibit TASK current selectively. In order to find other modulators, we report here a group of five dihydropyrrolo[2,1-*a*]isoquinolines (DPIs), four of them with putative anticancer activity, that were evaluated on TASK-1 and TASK-3 channels. The compounds **1**, **2** and **3** showed IC₅₀ < 320 μM on TASK-1 and TASK-3, intermediate activity on TASK-1/TASK-3 heterodimer, moderate effect over *h*sl_o and TREK-1 (500 μM), and practically not inhibition on *Shaker-IR*, *hERG* and IRK2.1 potassium channels, when they were expressed heterologously in *Xenopus laevis* oocytes. In rat CGN, 500 μM of these three compounds induced a decrement by >39% of the TASK-carried leak current. Finally, only compound **1** showed significant protection (~36%) against apoptotic death of CGN induced by K⁺ deprivation. These results suggest that DPI compounds could be potential candidates for designing new selective inhibitors of TASK channels.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The K⁺ channels show a wide diversity in gating mechanisms, conductance and pharmacological properties. These channels are classified according to the number of both transmembrane regions (TM) and loop pore-forming domains (P) of the α -subunit (Hille, 2001). Among them there is a subfamily of leak channels containing four transmembrane segments and two pore domains (4TM/2P). Channels are assembled by two α -subunits and until today there are 15 members (Enyedi and Czirják, 2010). Two of them are

sensitive to extracellular pH, so they are dubbed as TASK (TWIK¹-related Acid-Sensitive K⁺ channels). TASK-1 (Duprat et al., 1997) and TASK-3 (Kim et al., 2000) show 54% sequence identity between them, but only ~30% with other 4TM/2P channels.

TASK channels are responsible for background or leak K⁺ current, which is outwardly rectifying and practically non-inactivated. They are always opened and contribute for setting the resting membrane potential in cells that express them (Talley et al., 2000; Washburn et al., 2002). TASK channels are expressed in several tissues (Duprat et al., 1997; Kim et al., 2000) including the cerebellum in the central nervous system (Chapman et al., 2000; Leonoudakis et al., 1998). In cerebellar granule neurons (CGN) cultures, TASK channels contribute with more than 50% of the standing outward K⁺ current (IK_{so}) (Clarke et al., 2004; Han et al., 2002; Kang et al., 2003; Millar et al., 2000) and they are also related

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56223899x44139; fax: +52 55 56223723.

E-mail address: jesusgv@unam.mx (J. García-Valdes).

¹ TWIK: Tandem 2P domain, Weak Inward rectifier K⁺ channel.

to K⁺-dependent apoptosis (Lauritzen et al., 2003). In contrast, TASK-3 channels are well known to be overexpressed in cancer cells from skin, colon, prostate, breast, lung and ovary (Innamma et al., 2013a; Kim et al., 2004; Mu et al., 2003; Pei et al., 2003; Pocsai et al., 2006; Ruzsák et al., 2008). TASK channels are also involved in inflammation, ischemia, epilepsy, chemoreception, cardiac arrhythmias, and anesthesia, among others (Barbuti et al., 2002; Bittner et al., 2010; Buckler et al., 2000; Patel et al., 1999).

TASK channels are insensitive to typical K⁺-channel blockers as Cs⁺, tetraethylammonium (TEA⁺) and 4-aminopyridine (4-AP) (Czirják et al., 2000; Duprat et al., 1997; Kim et al., 2000; Meadows and Randall, 2001). These channels are regulated by a diversity of molecules as neurotransmitters (Czirják et al., 2001; Talley et al., 2000), hormones (Czirják et al., 2000, 2001), alkaloids (Millar et al., 2000), cannabinoids (Maingret et al., 2001; Veale et al., 2007), divalent cations (Czirják and Enyedi, 2002a; Kim et al., 2000) and anesthetics (Kim et al., 2000; Leonoudakis et al., 1998; Patel et al., 1999), none of these compounds are selective for TASK channels. Ruthenium red (RR) (Czirják and Enyedi, 2002b) or Zn²⁺ (Clarke et al., 2004) are used to block TASK-3 currents with little or no effect over TASK-1 or TASK-1/TASK-3 heterodimer currents. It has recently been reported that organic compounds as A293 (Putzke et al., 2007) and A1899 (Streit et al., 2011); ML308 (Miller et al., 2012) and pyrido[4,3-d]pyrimidine derivatives (Coburn et al., 2012) are selective inhibitors for TASK-1 and TASK-3 channels, respectively.

Reyes-Gutiérrez et al. (2010) synthesized a series of organic compounds with dihydropyrrolo[2,1-*a*]isoquinoline (DPI) as the basic structure, which displayed cytotoxic activity against cancer cell lines from bone marrow, prostate, colon, breast, lung and central nervous system. In an effort to find another kind of selective compounds for TASK channels we evaluated some of the DPIs. Three compounds showed inhibition and selectivity on heterologous (oocytes) and native (IK_{so}) TASK currents. Active DPIs were tested on rat CGN in apoptotic conditions. Compound **1** showed significant protection against K⁺-dependent programmed cell death in CGN.

2. Methods

2.1. Organic compounds

Five DPI derivatives were evaluated: **1**, 8,9-dimethoxy-3-methyl-2-phenyl-5,6-dihydropyrrolo[2,1-*a*]isoquinoline-1-carbonitrile; **2**, 8,9-dimethoxy-3-methyl-2-(thiophen-2-yl)-5,6-dihydropyrrolo[2,1-*a*]isoquinoline-1-carboxylate; **3**, 8,9-dimethoxy-3-methyl-2-(3-aminophenyl)-5,6-dihydropyrrolo[2,1-*a*]isoquinoline-1-carboxylate; **4**, 8,9-dimethoxy-3-methyl-5,6-dihydropyrrolo[2,1-*a*]isoquinoline-1-carboxylate and **5**, 8,9-dimethoxy-3-methyl-2-phenyl-5,6-dihydropyrrolo[2,1-*a*]isoquinoline-1-carboxylate (See chemical structures in Table 1). Before using, the identity and purity of all organic compounds were assessed by thin layer chromatography, x-ray crystallography, mass spectrometry, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance techniques, as it was described in Reyes-Gutiérrez et al. (2010). Fresh stock solutions (28 mM) were prepared in ethanol for each compound. The different amount of ethanol (0.3–1.8%) in electrophysiological and cell death evaluation were carefully taken into account as control, subtracting or adding to the respective modulation.

2.2. Cloning of rTASK-3 and subcloning of mTREK-1 channels

Animals used for all experiments described in the present study were treated in accordance with the accepted standards of animal care and with the procedures approved by the local Committee of Research and Ethics of the Universidad Nacional Autónoma de México. All efforts were made to reduce the number of animals and the suffering.

The rTASK-3 was cloned from rat brain total RNA isolated with TRIzol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions and cDNA was prepared using Omniscript RT kit (Qiagen). The complete coding region for the rTASK-3 was amplified by PCR using specific primers: forward (5'-CCCAAGCTTGC-CACCATGAAGGGCAGAACGTG-3') and reverse (5'-CCCAAGCTTTTGA-GATCGACTTGGACCGA-3'), both were designed using the genetic sequence data base at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) (GenBank ID: NM_053405). The fragment was amplified using HotStarTaq Master Mix (Qiagen)

following the next program: 1 cycle for 15 min at 95 °C, followed by 30 cycles of PCR. Each cycle consisted of three temperature steps: 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C and 60 s at 72 °C. Amplification was ended with a final elongation step at 72 °C for 10 min. The PCR fragment was cloned into the pCRII-TOPO vector (Life technologies). On one hand, mTREK-1 was subcloned from mTREK-pRKS clone (Murbartán et al., 2005) into the pGEM-T vector (Promega). Both constructs were sequenced to confirm the correct open reading frame (ORF). The other clones of K⁺ channels were generously donated by other research groups.

2.3. Oocytes preparation and expression of channels

cRNAs for rTASK-3, hTASK-1, mTREK-1, h_{iso}, shaker-IR (Shaker E without inactivation type A), hERG and hIRK2.1 were transcribed *in vitro* from the T7 promoter of linearized DNA templates using the mMESAGE mMACHINE kit (Ambion). The oocytes were prepared following the methodology described earlier (Wagner et al., 2000). In brief, female *Xenopus laevis* frogs (Nasco) were anesthetized, and ovarian lobes were surgically removed, then frogs were sutured and placed in water to allow recovery. Oocytes were manually disaggregated into small clumps and defolliculated by incubation with gentle agitation for 20 min in 1 mg/mL collagenase Type IA (Sigma) in Ca²⁺-free OR-2 medium (in mM): 82.5 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl₂, 5 HEPES buffer adjusted to pH 7.4 with NaOH. Oocytes were stored at 18 °C in ND-96 solution (in mM): 96 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 5 HEPES buffer adjusted to pH 7.4 with NaOH, supplemented with 50 µg/mL gentamycin. Healthy stage V-VI oocytes were chosen and 50 nL of cRNA (2–20 ng) was injected using a microdispenser (Drummond). For coexpression of hTASK-1 and rTASK-3, cRNA solutions were injected in a 5:1 ratio. The presence of hetero dimers was verified pharmacologically by the percentage of inhibition using RR and pH sensitivity (data not shown) (Czirják and Enyedi, 2002b). Injected oocytes were incubated at 18 °C for 24–48 h in supplemented ND-96 medium before recording. Uninjected or water-injected oocytes were used as controls.

2.4. Two-electrode voltage clamp recording

Oocytes were placed in a 280 µL recording chamber and membrane currents were elicited by two-electrode voltage clamp (TEVC) technique (Stühmer, 1998). Currents were filtered at 1 kHz, digitally sampled at 3 kHz with a CA18 high performance amplifier (Dagan Corporation) and Digidata 1440 Interface (Molecular Devices Inc.). Recording and data analysis were performed using pClamp 10.1 software (Molecular Devices Inc.). Microelectrodes were made of borosilicate glass capillaries with resistance of 1.0–1.5 and 0.3–0.5 MΩ for voltage and current electrodes respectively, when filled with 3 M KCl. Channel currents were recorded using voltage steps applied every 450 ms, holding potentials were: –100 mV for hIRK2.1; –80 mV for TASK and mTREK-1; –60 mV for h_{iso}, shaker-IR and hERG. Potentials were stepped during 400 ms from –120 to +60 mV for hIRK2.1; –100 to +80 mV for TASK and mTREK-1; +60 to –60 mV for h_{iso}, shaker-IR, hERG; with 20 mV increments or decrements. For hERG, post-test potential was stepped to –100 mV. The bath solution was ND-96 for most of K⁺ channels or modified ND-96: 5 mM K⁺ for hERG and 90 mM K⁺ for hIRK2.1 (replacing Na⁺/K⁺). All experiments were performed at room temperature (18–20 °C). Organic compounds at different concentrations were evaluated on K⁺ channel currents. Stability in recordings was monitored prior to the addition of compounds, which were removed from the bath to show recovery.

2.5. Cerebellar granule neurons cultures and cell death

Cerebellar granule neurons (CGN) cultures were prepared as previously described (Morán and Patel, 1989). From the cerebellum of 7–8 days-old Wistar rats, dissociated cell suspensions were seeded on poly-L-lysine (5 µg/mL, Sigma) treated coverslips at a density of 8 × 10⁴ cells/cm² or plastic dishes at 2 × 10⁴ cells/cm² and cultured in Eagle's basal medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, 25 mM KCl, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (K25). Cultures were incubated at 37 °C in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere, and they were maintained for 7–8 days *in vitro* (DIV). To prevent growth of glial cells, 10 µM cytosine arabinoside (Sigma) was added to the cultures 24 h following plating. Cell death was induced by replacing medium (K25) to an identical medium containing 5 mM KCl (5K) or by treating cells with 1 µM staurosporine (Sts) (Caballero-Benitez and Morán, 2003; D'Mello et al., 1993; Gallo et al., 1987). Cell death was estimated by the stain of 2 µM propidium iodide (PI, Sigma) by incubating CGN for 10 min after 24 h of the cell death induction. Cells were analyzed by epifluorescence microscopy using excitation and emission wavelengths of 485 and 520 nm, respectively.

2.6. Whole-cell patch-clamp recordings

Cerebellar granule neurons leak current (IK_{so}) was recorded by using the whole-cell patch clamp technique (Hamill et al., 1981). Recordings were made with an Axopatch 200B amplifier, which was connected to a computer through a Digidata 1322 A/D converter and controlled using the pClamp 9.2 software (Molecular Devices Inc.). Data were filtered at 5 kHz and digitized at 10 kHz. Recording pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries to a final resistance of 4–6 MΩ. Pipettes were filled with internal solution containing (in mM): 139 KCl, 5 MgCl₂, 0.1 EGTA, 3 ATP, 0.3 GTP, 5 HEPES, pH 7.2 with KOH. The external solution contained (in

mM): 130 NaCl, 2 KCl, 2 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 5 glucose, 10 TEACl, 3.4-AP, 10 HEPES, pH 7.4 with NaOH. The cells were held at a holding potential of -80 mV and 200-ms depolarization pulses were applied from -100 to +80 mV in 20 mV steps, every 10 s. The recording chamber was continuously perfused by gravity at a rate of ~1.5 mL/min. Experiments were performed at 20 °C. Active organic compounds and RR were applied locally into the chamber.

2.7. Statistical analysis

The results are given as means ± standard error (SE). Statistical analysis was performed by *t* test or one-way analysis of variance (ANOVA). Differences were considered significant if *p* < 0.05. In plots where error bars are not visible, they are smaller than the size of the symbols. Dose-response curves were fitted (Origin 6.0; Origin Lab Corp.) to a Hill equation of the form: $y = 1/(1 + (c/k_{1/2})^n)$, where *c* is the concentration, *k*_{1/2} is the concentration at which half-maximal inhibition occurs, and *n* is the Hill coefficient.

3. Results and discussion

3.1. Inhibition of the TASK channels by dihydropyrrolo[2,1-*a*]isoquinoline derivatives

The rat TASK-3 channel, cloned in this work, behaved as previously described in the literature (Rajan et al., 2000) according to kinetics and pharmacology, i.e., it presented an outwardly rectifying K⁺ current that was strongly decreased in the presence of extracellular Ba²⁺ or RR and by decreasing the pH (data not shown). Endogenous currents, for uninjected or water-injected control oocytes, were small (<0.5 μA) compared to the overexpressed K⁺ channels currents (>5 μA) (data not shown). Fig. 1 shows representative traces generated by TASK-1 (Fig. 1a) and TASK-3 (Fig. 1d) channels expressed in *X. laevis* oocytes. Recordings were obtained by TEVC technique in ND-96. Currents from both channels were fast activated and they did not show inactivation during the test pulse.

The five DPI derivatives were evaluated at 100 μM, and they decreased TASK-1 and TASK-3 currents, some compounds inhibited importantly (Fig. 1). The shape of the curves did not change, it might suggest that compounds 1 and 3 could act as pore blockers. Although, further experiments are needed to test this hypothesis. Table 1 summarizes the percent inhibition values of the compounds on these channels at +80 mV. The active derivatives (1–3) with the greatest inhibition percentage are in bold. These compounds showed trivial effect on oocytes endogenous currents (data not shown). So, compound 1 showed a greater inhibitory effect on TASK-3 than over TASK-1, while the inhibition of compound 2 was stronger

on TASK-1 than on TASK-3. Finally, compound 3 is similarly active on both channels. In order to get an average of several recordings we decide to use relative currents: for the control currents ($I_{rel-control} = I/I_{0(mV)}$) or for the currents in the presence of active DPI ($I_{rel-DPI} = I_{DPI}/I_{rel-control}$). The resulting relative I–V relationships for TASK channels, in absence or in the presence of 100 μM of the active organic compounds, showed similar outward rectifying current and the reversal potential agreed with the calculated K⁺ equilibrium potential (E_K) ~80 mV, in low (2 mM) extracellular [K⁺] (Figs. 2a and c). The compounds 1–3 did not have significant voltage-dependent inhibition (% inhibition = $[(I_{rel-control} - I_{rel-DPI})/I_{rel-control}] * 100$) on TASK channels, from -100 to +80 mV (Figs. 2b and d). This behavior was expected, since these channels do not have voltage sensor and the tested compounds are not charged.

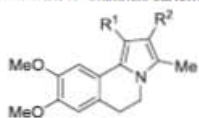
Fig. 3 shows dose-response curves for the DPIs 1–3 fitted with Hill equations (% inhibition at +80 mV, Figs. 3a and c). It was not possible to test DPIs at higher concentration due to their low solubility in aqueous medium. According to this, for TASK-1 the maximum inhibition for compound 2 was 72% at 500 μM, with an IC₅₀ at 96.7 ± 6.9 μM, a Hill coefficient (*n*) of 0.52 ± 0.02; meanwhile, for compound 3 the values were 74%, IC₅₀ = 83.5 ± 8.7 μM, *n* = 0.51 ± 0.03 (Fig. 3b). For TASK-3 the maximum inhibition for compound 1 was 63%, IC₅₀ = 189.2 ± 27.0 μM, *n* = 0.53 ± 0.04 and for compound 3 was 58%, IC₅₀ = 268.1 ± 47.4 μM, *n* = 0.47 ± 0.04 (Fig. 3d). Panels 3b and 3d show the I/I_0 ratio (where *I*₀ is the current at the first repetitive pulse, *I* is the current at *t* > 0) vs. time of compounds 1–3 on TASK channels. When the DPIs were applied the currents decreased almost instantaneously, and the effect was maintained. Currents were recovered immediately when the cells were washed profusely, however the initial amplitudes were not recovered: $I/I_0 = 0.55–0.75$ (Figs. 3a and c). This observation may suggest that organic compounds do not dissociate completely and/or they are accumulated in the membrane of oocytes. Although, further experiments are needed to test these hypotheses.

In spite of all the compounds (1–5) have a DPI skeleton, only three of them (1–3) showed significant inhibition over TASK channels (Table 1). According to the results, we can deduce that the substituents R¹ and R² are playing an important role in the activity. Three active functional groups were found: the carbonitril (R¹) in compound 1, the thiophenyl (R²) in compound 2, and the *m*-aminobenzyl (R²) in compound 3. Compounds with a carboxylate in R¹ or a phenyl in R² did not show important activity, however, the substituted-phenyl in R² shows more inhibition on TASK channels, similar to the previously reported by Coburn et al. (2012) where some substituted-phenyl linked to pyrido[4,3-*d*]pyrimidine core increased the activity. It seems that the presence of aromatic moiety could be important to imprint inhibitory activity over the TASK channels, as it is also observed by A293 (Putzke et al., 2007), A1899 (Streit et al., 2011), ML308 (Miller et al., 2012), and C23 (Coburn et al., 2012).

3.2. Selectivity on different types of K⁺ channels

Active compounds 1–3 (100 and 500 μM) were evaluated on other K⁺ channels, some of them with distinct topology and biophysical characteristics: voltage-gated channels: 6TM/1P, *Shaker-IR* and *hERG* (the last one with long TMS-P linker with 43 residues); 7TM/1P, *hSlo* (large conductance and calcium modulated); and non voltage-gated channels: 2TM/1P, hIRK2.1 (strong inward rectifier); (4TM/2P), TASK-1/TASK-3 heterodimer and mTREK-1 (as leak channels). The last one is interesting, since it is coexpressed with TASK channels (Blankenship et al., 2013; Brenner and O'Shaughnessy, 2008; Eryedi and Czirjak, 2010). Moreover it has been related to cancer (Innamma et al., 2013b; Patel et al., 2013; Voloshyna et al., 2008).

Table 1
Chemical structure of compounds derived from system dihydropyrrolo[2,1-*a*]isoquinoline and their effects on TASK K⁺ channels currents.



Compound	R ¹	R ²	hTASK-1	rTASK-3
			Inhibition (%)	
1	CN	C ₆ H ₅	27.8 ± 2.4 (5)	45.5 ± 1.0 (7)
2	CO ₂ Et	C ₄ H ₃ S	51.5 ± 2.1 (6)	13.4 ± 1.4 (5)
3	CO ₂ Et	<i>m</i> -C ₆ H ₄ -NH ₂	52.0 ± 0.9 (6)	43.2 ± 1.1 (7)
4	CO ₂ Et	H	13.7 ± 3.6 (5)	9.4 ± 3.2 (5)
5	CO ₂ Et	C ₆ H ₅	20.0 ± 5.8 (5)	6.5 ± 2.9 (5)

R¹ and R² are the substituents in the dihydropyrrolo[2,1-*a*]isoquinoline core. Significant percentages of inhibition TASK currents by compounds at 100 μM are in bold. Values are means ± SE, (numbers in parentheses indicate the number of tested oocytes).

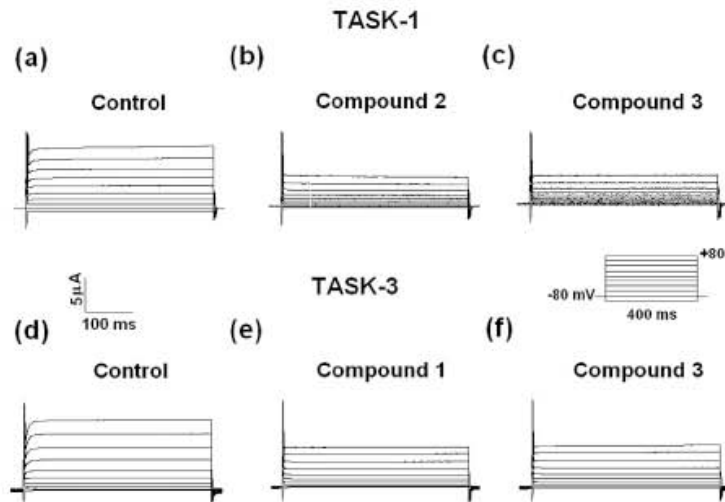


Fig. 1. Dihydropyrrolo[2,1-*a*]isoquinolines inhibit TASK current. Representative traces of human TASK-1 or rat TASK-3; recorded in the absence (control, a) and (d), or in the presence of 100 μM of the organic compounds 1 (e), 2 (b) and 3 (c, f). Currents were elicited with the voltage protocol illustrated in the figure.

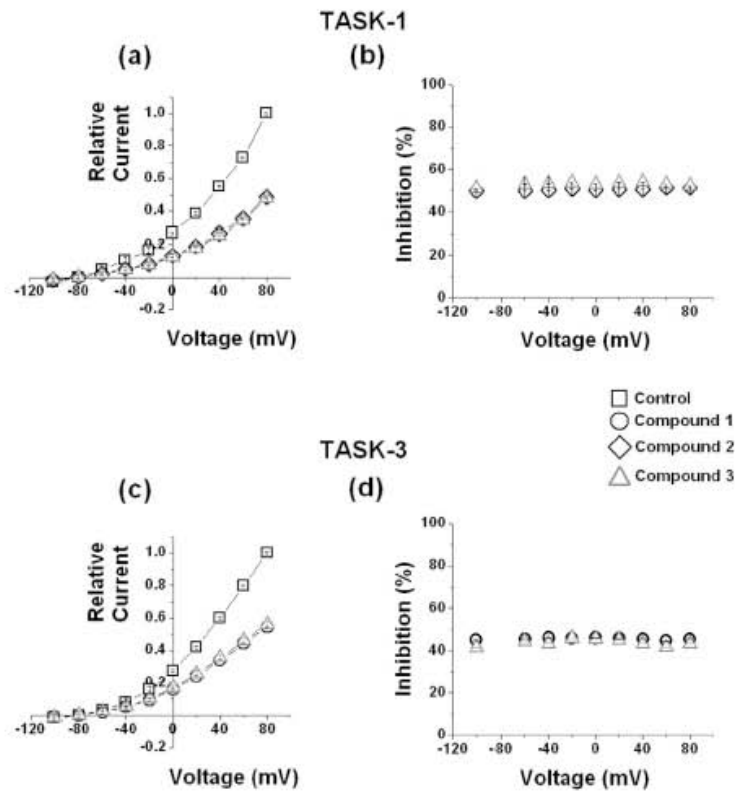


Fig. 2. The inhibition by dihydropyrroloisoquinolines is not voltage-dependent. Relative I–V relationships for TASK-1 (a) and TASK-3 (c) in absence (control, squares), or in the presence of 100 μM of the organic compounds: 1 (circles), 2 (diamonds) or 3 (gray triangles). Inhibition percentage vs. voltage (b, d) for the indicated active compounds (100 μM). Currents were recorded using the same protocol showed in Fig. 1. Values are means ± SE (n = 7).

TASK channels were modulated by compounds **1**, **2** and **3** (100 μM). At 500 μM *hsl* was inhibited, meanwhile *Shaker-IR*, *hERG* and *hIRK2.1* channels were affected slightly, and *mTREK-1* was only inhibited by compound **3** (Table 2). As expected, active compounds **2** and **3** showed intermediate activity on the TASK-1/TASK-3 heterodimeric channel, as it has been reported the inhibition by pH (Czirják and Enyedi, 2002b), doxapram (Cotten et al., 2006) and hydroxy- α -sanshool (Bautista et al., 2008). However, the compound **1** tested on the TASK-1/TASK-3 heterodimer showed an activity almost equal to TASK-1 channel. The DPIs **1**, **2** and **3** could be preferably blockers of TASK channels at concentrations of 100 μM .

On the other hand, Martínez group (Reyes-Gutiérrez et al., 2010) showed previously that DPIs 2-5 are cytotoxic for cancer cell lines like SKLU-1 and PC-3, where TASK-3 and TREK-1 are overexpressed, and they act as oncogenes, respectively (Mu et al., 2003; Voloshyna et al., 2008). TASK-3 or TREK-1 overexpression leads to proliferation on embryonic fibroblast (C8) and Chinese hamster ovary (CHO) cell lines, respectively. Non-functional co-expression with dominant-negative mutants or inhibition with selective inhibitors abolishes oncogenic activity (Pei et al., 2003; Voloshyna et al., 2008). Noteworthy compound **3** inhibits both TASK-3 as TREK-1 activity (Table 2) and shows cytotoxic activity against lung and prostate cancer cell lines. The pyrroloisoquinolines could be used to design new compounds as important tools to test the oncogenic activity of 4TM/2P channels.

3.3. Inhibition of I_{Kso} currents in CGN by compounds **1**, **2** and **3**

Cerebellar granule neurons (CGN) display a non-inactivating standing outward K^+ current (I_{Kso}), previously described and characterized by Watkins and Mathie (1996) and some other groups. TASK channels are important contributors to this current

(Clarke et al., 2004; Han et al., 2002; Kang et al., 2003; Lauritzen et al., 2003; Millar et al., 2000; Talley et al., 2001), therefore we decided to test the active DPIs on these cells.

I_{Kso} current in CGN was recorded with the patch clamp technique in the whole-cell configuration in low (2 mM) extracellular $[K^+]$. Elicited currents were fast activated (Fig. 4a), and mainly non-inactivating, although some cells showed also a fast inactivating component which was not completely removed by typical K^+ channel blockers: 4-AP (3 mM) and TEA (10 mM; data not shown). Additional current component could be due to the presence of K_v4x potassium channels, as it is described previously in the literature (Mathie et al., 2003). DPI **1** (500 μM) inhibited the I_{Kso} currents, without any important change in the current kinetics (Fig. 4b), and when the neuron was washed profusely the initial amplitudes were recovered partially (Fig. 4c). Relative currents (at +80 mV) decreased $47.7 \pm 4.5\%$ for **1**, $62.4 \pm 3.9\%$ for **2**, $42.8 \pm 4.0\%$ for **3** and $48.0 \pm 4.9\%$ for RR (10 μM) (Fig. 4). Recovery percentages of the initial amplitudes for active DPIs were between 62 and 79% (Fig. 4d–f), the same effect was observed in the TASK currents expressed in oocytes (Figs. 3b and d). Again it may suggest that organic compounds do not dissociate completely and/or they are accumulated in the membrane of CGN. Further experiments are needed to test these hypotheses. The resulting relative I–V relationships for I_{Kso} current in absence or in the presence of 500 μM of the active compounds showed similar outward rectifying current, and reversal potential than TASK channels expressed in oocytes (Figs. 2a and c), with the K^+ equilibrium potential (E_K) ~ 80 mV, in low (2 mM) extracellular $[K^+]$ (Fig. 4d–f).

These results suggest that DPIs **1** and **3** are selective for this leak current. Inhibition percentages of these compounds in CGN cells are in agreement with the results observed in the heterologous system and with those reported in the literature. Some

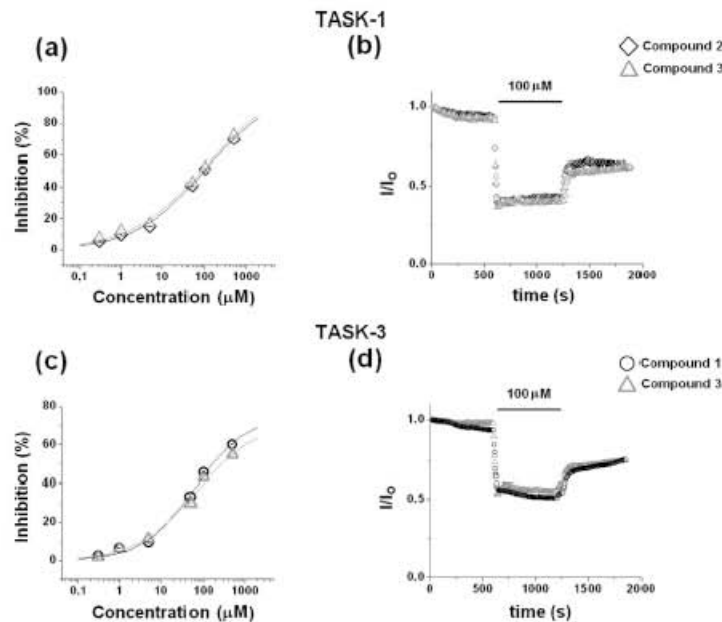


Fig. 3. Inhibition over TASK channels by pyrroloisoquinolines. Dose-response curves for TASK-1 (a) and TASK-3 (c) channels for active compounds at 0.3, 1.0, 5.0, 50.0, 100.0, and 500.0 μM concentrations ($n = 6-11$). Inhibition percentage data were fitted by Hill equation (see Methods). Time course of I/I_0 over TASK-1 (b) and TASK-3 (d) channels by 100 μM of compounds: **1** (circles), **2** (diamonds) or **3** (gray triangles) ($n = 5$). Horizontal lines indicate extracellular compound presence. Values are means \pm SE.

Table 2
Inhibition percentage by dihydropyrrroloisoquinolines on K⁺ channels.

Ion channel	Compound 1		Compound 2		Compound 3	
	Concentration (μM)					
	100	500	100	500	100	500
htASK-1	27.8 ± 2.4	47.6 ± 3.5	51.5 ± 2.1	70.1 ± 1.9	52.0 ± 0.9	72.8 ± 1.6
rtASK-3	45.5 ± 1.0	60.0 ± 2.6	13.4 ± 1.4	23.3 ± 2.0	43.2 ± 1.1	54.7 ± 3.1
Heterodimer	24.1 ± 2.9	43.4 ± 5.8	45.2 ± 2.6	52.0 ± 3.0	52.1 ± 2.8	60.1 ± 1.8
mTREK-1	1.0 ± 1.8	6.8 ± 3.2	1.5 ± 3.0	7.8 ± 4.4	12.1 ± 3.0	32.0 ± 1.8
Shaker-IR	3.1 ± 0.7	(0.3 ± 1.5)	(5.7 ± 3.8)	4.2 ± 3.3	(0.07 ± 0.7)	8.5 ± 2.9
herg	2.9 ± 0.7	10.3 ± 2.4	(7.7 ± 5.4)	13.5 ± 1.9	7.2 ± 1.4	13.8 ± 1.8
hsto	10.4 ± 1.4	24.2 ± 3.3	16.6 ± 1.9	41.5 ± 3.0	13.2 ± 0.2	25.4 ± 2.7
hIRK2.1	(1.6 ± 0.2)	(0.4 ± 2.2)	1.3 ± 1.1	1.7 ± 0.6	2.7 ± 0.9	2.5 ± 1.1

Inhibition by compounds **1**, **2** and **3** at 100 and 500 μM over K⁺ currents were recorded with a different protocol (see Methods). Values are means ± SE (n = 5). Values on parentheses indicate increase, not inhibition percentage.

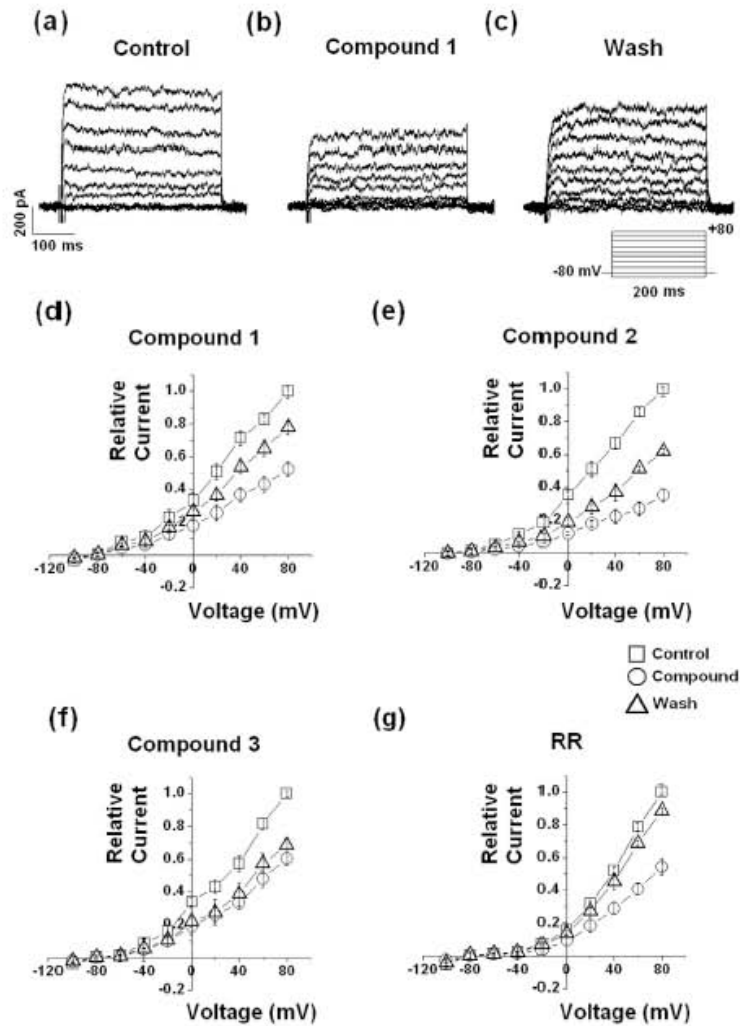


Fig. 4. Cerebellar granule neurons IK_{so} current is sensitive to organic compounds. Representative traces for IK_{so} current, in the absence (control, a), presence (b) and wash out (c) of compound **1** (500 μM). IK_{so} currents were elicited with the voltage protocol (insert). Relative I–V relationships in absence (control, squares), presence (circles) and wash out (triangles), of organic compounds (500 μM): **1** (d), **2** (e), **3** (f) and 10 μM ruthenium red (RR, g). Values are means ± SE (n = 5).

studies indicate that TASK-1 contributes to approximately 10% and TASK-3 participates between 40 and 60% of IK_{so} current (Clarke et al., 2004; Han et al., 2002), when both are expressed at a high density (7 to 8-DIV of CGN cultures). The heterodimeric channel has also been characterized, and it contributes to 44% of IK_{so} current on CGN cultured for 1–3 DIV (Kang et al., 2003), but it is also possible its presence at 7 to 8 DIV. So, inhibition by compounds 1 and 3 could be preferentially over TASK channels on the IK_{so} current.

On the other hand, according to the results in oocytes (Table 1), it was expected less inhibition by compound 2 in CGN; however, it was the most active on IK_{so} current, suggesting a possible inhibition over other leak channels. The presence as transcripts of another 4TM/2P K⁺-channels has been reported in CGN: TWIK-1, THIK-2, TREK-2 and KCNK-7, as high; TRAAK, TWIK-2, TREK-1 and KCNK-5, as low level of expression (Gabriel et al., 2002; Mathie et al., 2003). But only TREK-2 and KCNK-5 have been functionally characterized and contributed to about 10% and 40% of IK_{so} current, respectively (Cotten et al., 2004; Han et al., 2002).

3.4. Effect of organic compounds on the apoptotic cell death of CGN

As previously mentioned the TASK channels seemed to be involved in K⁺-dependent cell death of CGN (Lauritzen et al., 2003). Since DPLs were IK_{so} current inhibitors, it was mandatory to evaluate their effect on these neurons in apoptotic circumstances. Three media were explored: a) K25, as control of cell viability, b) K5 and c) Sts, as induction of apoptosis by K⁺-dependent or non-K⁺-dependent mechanism, respectively

(see Methods). Fig. 5 (panel a) illustrates fluorescence images of PI-staining cell cultures in K25, K5 or Sts medium in the absence or presence of active compounds at 500 μ M. The compound 1 did not alter the viability under K25 conditions (Fig. 5b). When cells were treated with K5 medium this compound protected against death at 250 and 500 μ M by 26% and 36%, respectively (Fig. 5c). In contrast, this compound did not reduce cell death induced by Sts (Fig. 5d). On the other hand, compound 3 was toxic at 500 μ M, but not at 250 μ M in K25 conditions (Fig. 5b). This compound protected against cell death induced by K5 at 250 and 500 μ M by 9% and 13% respectively (Fig. 5c), and it did not reduce cell death induced by Sts (Fig. 5d). The compound 2 was toxic in all the evaluated conditions (Fig. 5).

The compound 1 was the most effective inhibitor over TASK-3 channel on oocytes and it also showed the greatest protection against K⁺-dependent apoptosis on CGN. These results agreed with those reported by Lauritzen et al. (2003), when neuronal death is also prevented by RR or acidosis, it suggests TASK-3 is involved actively on programmed cell death.

According to electrophysiological results in oocytes and CGN neurons, it was expected that compound 3 protected as compound 1, however it was actually lower probably due to the fact that compound 3 is slightly toxic to neurons as shown in Fig. 5b. These results demonstrated a specific neuro-protection by compounds 1 and 3 to K⁺-dependent cell death in CGN. It is well known that TASK channels are involved in several pathophysiological conditions, where they can present a behavior protective or harmful, which depends on several factors as: 1) differential expression pattern of each subunit, 2) cell type-specific, 3) biophysical properties, 4)

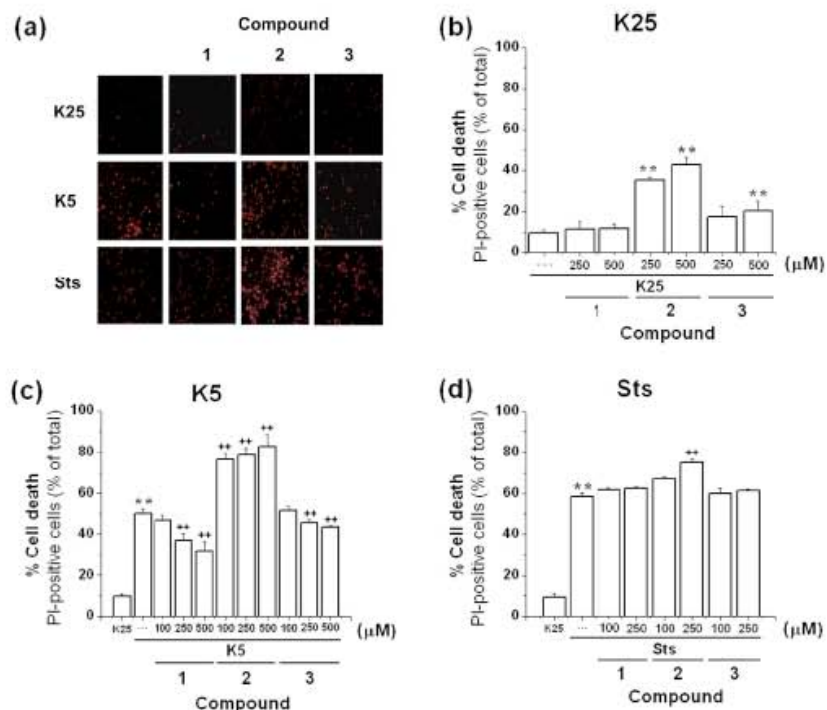


Fig. 5. Effect of active DPLs on cell death of CGN treated with K5 or staurosporine. Fluorescence images of 7–8 DIV cultures illustrate PI-staining of cell cultures in 25 mM KCl (K25), 5 mM KCl (K5) and 1 μ M staurosporine (Sts) conditions in absence or presence of 500 μ M compounds 1, 2, and 3 (a). Neurons were grown in a medium with K25 for 7–8 DIV and incubated for 24 h with K25 (b), K5 (c) or Sts (d) in the absence or presence of 100, 250 and 500 μ M of compounds 1, 2, and 3. Values are means \pm SE ($n = 3–6$), statistical differences are indicated by ** $p < 0.05$ vs. control (K25) or *** $p < 0.05$ vs. K5 or Sts.

physicochemical regulation, and 5) cellular environment (Bittner et al., 2010). For example, in apoptosis TASK channels hyperpolarized the membrane, and they act as: beneficial in the early stage of a pathophysiological stimulus (acute ischemia) (Meuth et al., 2009); or prejudicial in the long-term course, once a certain threshold of damage severity is reached (chronic inflammatory ischemia) (Bittner et al., 2009; Bittner et al., 2010). In the last situation channel inhibition prevent programmed cell death.

Thus, the development of novel specific modulators to TASK channels has primary importance to the functional, structural, and pathological study of these 4TM/2P-K⁺ channels. The inhibitor A293 shed light over TASK channels contribution in the leak current percentage, and in the action potential in rat ventricular cardiomyocytes (Putzke et al., 2007); as well as in the muscarinic signaling pathway in rat thalamocortical relay neurons (Bista et al., 2012). The blocker A1899 was useful to validate a 4TM/2P-K⁺ channel open-pore homology model of TASK-1 (Streit et al., 2011). Pang et al. (2009) showed that TASK-3 KO rodents modified sleep-to-wake states, a similar effect was observed when the compound C23 was administered to wild-type rodents (Coburn et al., 2012). Both A1899 and C23 are breath stimulants and they could be used as drugs for treating breathing disorder (Cotten, 2013).

In conclusion, we found three DPTs (1–3) with significant activity over TASK channels on oocytes and IK_{so} current in CGN cells. Compounds 1 and 3 protect to CGN against K⁺-dependent programmed cell death. The functional groups –CN, –C₄H₉S and –m-C₆H₄NH₂ are important to imprint inhibitory effect. In view of these structure–activity relationship studies, we are currently synthesizing and testing new pyrrolo[1,2-*a*]isoquinolines toward development of specific modulators for the 4TM/2P-K⁺ channels family. Our main focuses are TASK channels due to the importance not only in cancer or apoptosis but also other normal- and/or pathological conditions. The inhibition or activation of these channels might be neuroprotective depending on the cell type, strength and duration of pathophysiological stimulus. Therefore, synthesis of novel modulators targeting TASK channels is a useful pharmacological strategy to the study and treatment of neurodegenerative and proliferative diseases.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Guadalupe Dominguez and Alicia Ochoa Sánchez for their excellent technical assistance. This work was supported by the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA/IN-208307). This study was performed in partial fulfillment of the requirements for R.N.N. to obtain the PhD degree in Biochemistry at the Universidad Nacional Autónoma de México. She was supported by a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología fellowship No. 162436. We thank M. Lazdunski for hTASK-1 clone, J. Murbartián for m-TREK-1 clone and L. Toro for *Shaker-IR*, *herg*, *hsl* and *hIRK2.1* clones. We thank Patricia Arenas for English language style correction.

References

Barbuti, A., Ishii, S., Shimizu, T., Robinson, R.B., Feinmark, S.J., 2002. Block of the background K⁺ channel TASK-1 contributes to arrhythmogenic effects of platelet-activating factor. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282, H2024–H2030.

Bautista, D.M., Sigal, Y.M., Milstein, A.D., Garrison, J.L., Zom, J.A., Tsuruda, P.R., Nicoll, R.A., Julius, D., 2008. Pungent agents from Szechuan peppers excite sensory neurons by inhibiting two-pore potassium channels. *Nat. Neurosci.* 11 (7), 772–779.

Bista, P., Meuth, S.G., Kanyshkova, T., Cerina, M., Pawlowski, M., Ehling, P., Landgraf, P., Borsotto, M., Heurteaux, C., Pape, H.C., Baulkrowitz, T., Budde, T., 2012. Identification of the muscarinic pathway underlying cessation of sleep-related burst activity in rat thalamocortical relay neurons. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 463, 89–102.

Bittner, S., Meuth, S.G., Göbel, K., Melzer, N., Herrmann, M., Simon, O.J., Weishaupt, A., Budde, T., Bayliss, D.A., Bendzus, M., Weindl, H., 2009. TASK1 modulates inflammation and neurodegeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Brain* 132, 2501–2516.

Bittner, S., Budde, T., Weindl, H., Meuth, S.G., 2010. From the background to the Spotlight: TASK channels in pathological conditions. *Brain Pathol.* 20, 999–1009.

Blankenship, M.L., Coyle, D.E., Baccell, M.L., 2013. Transcriptional expression of voltage-gated Na⁺ and voltage-independent K⁺ channels in the developing rat superficial dorsal horn. *Neurosci* 231, 305–314.

Brenner, T., O'Shaughnessy, K.M., 2008. Both TASK-3 and TREK-1 two-pore loop K channels are expressed in H295R cells and modulate their membrane potential and aldosterone secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E1480–E1486.

Buckler, K.J., Williams, A., Honore, E., 2000. An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J. Physiol.* 525 (1), 135–142.

Caballero-Benitez, A., Morán, J., 2003. Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2. *J. Neurosci. Res.* 71, 383–396.

Chapman, C.G., Meadows, H.J., Godden, R.J., Campbell, D.A., Duckworth, M., Kelsell, R.E., Muddock, P.R., Randall, A.D., Rennie, G.L., Gloger, I.S., 2000. Cloning, localization and functional expression of a novel human, cerebellum specific, two pore domain potassium channel. *Mol. Brain Res.* 82, 74–83.

Clarke, C.E., Veale, E.L., Green, P.J., Meadows, H.J., Mathie, A., 2004. Selective block of the human 2-P domain potassium channel, TASK-3, and the native leak potassium current, IK_{so}, by zinc. *J. Physiol.* 560 (1), 51–62.

Coburn, C.A., Luo, Y., Cui, M., Wang, J., Soll, R., Dong, J., Hu, B., Lyon, M.A., Santarelli, V.P., Kraus, R.L., Cregan, Y., Wang, Y., Fox, S.V., Binns, J., Doran, S.M., Reiss, D.R., Tannenbaum, P.L., Gotter, A.L., Meinke, P.T., Renger, J.J., 2012. Discovery of a pharmacologically active antagonist of the two-pore-domain potassium channel K_{2P9.1} (TASK-3). *Chem. Med. Chem.* 7, 123–133.

Cotten, J.F., Zou, H.L., Liu, C., Au, J.D., Yost, C.S., 2004. Identification of native rat cerebellar granule cell currents due to background K channel KCNK5 (TASK-2). *Mol. Brain Res.* 128, 112–120.

Cotten, J.F., Keshavaprasad, B., Laster, M.J., Eger II, E.L., Yost, C.S., 2006. The ventilatory stimulant doxapram inhibits TASK tandem pore (K_{2P}) potassium channel function but does not affect minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesth. Analg.* 102, 779–785.

Cotten, J.F., 2013. TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) tandem pore potassium channel antagonists stimulate breathing in isoflurane-anesthetized rats. *Anesth. Analg.* 116 (4), 810–816.

Czirják, G., Enyedi, P., 2002a. TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *Mol. Endocrinol.* 16 (3), 621–629.

Czirják, G., Enyedi, P., 2002b. Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J. Biol. Chem.* 277 (7), 5426–5432.

Czirják, G., Fischer, T., Spät, A., Lesage, F., Enyedi, P., 2000. TASK (TWIK-Related acid-sensitive K⁺ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol. Endocrinol.* 14 (6), 863–874.

Czirják, G., Petheő, G.L., Spät, A., Enyedi, P., 2001. Inhibition of TASK-1 potassium channel by phospholipase C. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281, C700–C708.

D'Mello, S.R., Galli, C., Ciotti, T., Calissano, P., 1993. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *PNAS* 90, 10989–10993.

Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Huerteaux, C., Lazdunski, M., 1997. TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J.* 16, 5464–5471.

Enyedi, P., Czirják, G., 2010. Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol. Rev.* 90, 559–605.

Gabriel, A., Abdallah, M., Yost, C.S., Winegar, B.D., Kindler, C.H., 2002. Localization of the tandem pore domain K⁺ channel KCNK5 (TASK-2) in the rat central nervous system. *Mol. Brain Res.* 98, 153–163.

Gallo, V., Kingsbury, A., Balázs, R., Jørgensen, O.S., 1987. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* 7, 2203–2213.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J., 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391 (2), 85–100.

Han, J., Truell, J., Gnatenco, C., Kim, D., 2002. Characterization of four types of background potassium channels in rat cerebellar granule neurons. *J. Physiol.* 542, 431–444.

Hille, B., 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*, third ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.

Inamma, A., Jackson, L., Asher, V., Van Shalkwyk, G., Warren, A., Hay, D., Bali, A., Sowter, H., Khan, R., 2013a. Expression and prognostic significance of the oncogenic K_{2P} potassium channel KCNK9 (TASK-3) in ovarian carcinoma. *Anticancer Res.* 33 (4), 1401–1408.

Inamma, A., Jackson, L., Asher, V., van Shalkwyk, G., Warren, A., Keightley, A., Hay, D., Bali, A., Sowter, H., Khan, R., 2013b. Expression and effects of

- modulation of the K2P potassium channels TREK-1 (KCNK2) and TREK-2 (KCNK10) in the normal human ovary and epithelial ovarian cancer. *Clin. Transl. Oncol.* <http://dx.doi.org/10.1007/s12094-013-1022-4>.
- Kang, D., Han, J., Talley, E.M., Bayliss, D.A., Kim, D., 2003. Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebellar granule cells. *J. Physiol.* 554 (1), 64–72.
- Kim, Y., Bang, H., Kim, D., 2000. TASK-3, a new member of the tandem pore K (+) channel family. *J. Biol. Chem.* 275 (13), 9340–9347.
- Kim, C.J., Cho, Y.G., Jeong, S.W., Kim, Y.S., Kim, S.Y., Nam, S.W., Lee, S.H., Yoo, N.J., Lee, J.Y., Park, W.S., 2004. Altered expression of KCNK9 in colorectal cancers. *APMIS* 112, 588–594.
- Lauritzen, I., Zanzouri, M., Honore, E., Duprat, F., Ehrengruber, M.U., Lazdunski, M., Patel, A.J., 2003. K⁺-dependent cerebellar granule neuron apoptosis: role of TASK leak K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 278, 32068–32076.
- Leonoudakis, D., Gray, A.T., Winegar, B.D., Kindler, C.H., Harada, M., Taylor, D.M., Chavez, R.A., Forsythe, J.R., Yost, C.S., 1998. An open rectifier potassium channel with two pore domains in tandem cloned from rat cerebellum. *J. Neurosci.* 18 (3), 868–877.
- Maingret, F., Pater, A.J., Lazdunski, M., Honore, E., 2001. The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K⁺ channel TASK-1. *EMBO J* 20 (182), 47–54.
- Mathie, A., Clarke, C.E., Ranatunga, K.M., Veale, E.L., 2003. What are the roles of the many different types of potassium channel expressed in cerebellar granule cells? *Cerebellum* 2, 11–25.
- Meadows, H.J., Randall, A.D., 2001. Functional characterisation of human TASK-3, an acid-sensitive two-pore domain potassium channel. *Neuropharmacol* 40, 551–559.
- Meuth, S.G., Kleinschnitz, C., Broicher, T., Austinat, M., Braeuninger, S., Bittner, S., Fischer, S., Bayliss, D.A., Budde, T., Stoll, G., Weindl, H., 2009. The neuroprotective impact of the leak potassium channel TASK1 on stroke development in mice. *Neurobiol. Dis.* 33, 1–11.
- Millar, J.A., Barratt, L., Southan, A.P., Page, K.M., Fyffe, R.E.W., Robertson, B., Mathie, A., 2000. A functional role for the two-pore domain potassium channel TASK-1 in cerebellar granule neurons. *PNAS* 97 (7), 3614–3618.
- Miller, M.R., Zou, B., Shi, J., Flaherty, D.P., Simpson, D.S., Yao, T., Maki, B.E., Day, V.W., Douglas, J.T., Wu, M., McManus, O.B., Golden, J.E., Aubé, J., Li, M., 2012 Apr 16. Development of a selective chemical inhibitor for the two-pore potassium channel, KCNK9 [Updated 2013 Feb 28]. In: *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2010. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK133422/>.
- Moran, J., Patel, A.J., 1989. Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Bain Res. Dev. Brain Res.* 46 (1), 97–105.
- Mu, D., Chen, L., Zhang, X., See, L.H., Koch, C.M., Yen, C., Tong, J.J., Spiegel, L., Nguyen, K.C.Q., Servoss, A., Peng, Y., Pei, L., Marks, J.R., Lowe, S., Hoey, T., Jan, L.Y., McCombie, W.R., Wiger, M.H., Powers, S., 2003. Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene. *Cancer Cell* 3, 297–302.
- Murbartán, J., Lei, Q., Sando, J.J., Bayliss, D.A., 2005. Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels. *J. Biol. Chem.* 280 (34), 30175–30184.
- Pang, D.S.J., Robledo, C.J., Carr, D.R., Gent, T.C., Vyssotski, A.L., Caley, A., Zecharta, A.Y., Wisden, W., Bickley, S.G., Franks, N.P., 2009. An unexpected role for TASK-3 potassium channels in network oscillations with implications for sleep mechanisms and anesthetic action. *PNAS* 106 (41), 17546–17551.
- Patel, A.J., Honore, E., Lesage, F., Fink, M., Romey, G., Lazdunski, M., 1999. Inhalation anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat. Neurosci.* 2 (5), 422–426.
- Patel, S.K., Jackson, L., Warren, A.Y., Arya, P., Shaw, R.W., Khan, R.N., 2013. A role for two-pore potassium (K2P) channels in endometrial epithelial function. *J. Cell. Mol. Med.* 17 (1), 134–146.
- Pei, L., Wisner, O., Slavin, A., Mu, D., Powers, S., Jan, L.Y., Hoey, T., 2003. Oncogenic potential of TASK-3 (kcnk9) depends on K⁺ channel function. *PNAS* 100 (13), 7803–7807.
- Pocsai, K., Kostka, L., Bakondi, G., Gönczi, M., Fodor, J., Dienes, B., Szentesi, P., Kovács, I., Feniger-Barish, R., Kopf, E., Zharhary, D., Szűcs, G., Csemoch, L., Rusznák, Z., 2006. Melanoma cells exhibit strong intracellular TASK-3-specific immunopositivity in both tissue sections and cell culture. *Cell Mol. Life Sci.* 63, 2364–2376.
- Putzke, C., Wemhöner, K., Sachse, F.B., Rinné, S., Schlichthörl, G., Li, X.T., Jaé, L., Eckhardt, I., Wischmeyer, E., Wulf, H., Preisig-Müller, R., Daut, J., Decher, N., 2007. The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle. *Cardiovasc. Res.* 75, 59–68.
- Rajan, S., Wischmeyer, E., Liu, G.X., Preisig-Müller, R., Daut, J., Karschin, A., Derst, C., 2000. TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histidine as pH sensor. *J. Biol. Chem.* 275 (22), 16650–16657.
- Reyes-Gutiérrez, P.E., Camacho, J.R., Ramírez-Apan, M.T., Osornio, J.M., Martínez, R., 2010. Synthesis of 5,6-dihydropyrrolo[2,1-*g*]isoquinolines featuring an intramolecular radical-oxidative cyclization of polysubstituted pyrroles, and evaluation of their cytotoxic activity. *Org. Biomol. Chem.* 8, 4374–4382.
- Rusznák, Z., Bakondi, G., Koszta, L., Pocsai, K., Dienes, B., Fodor, J., Telek, A., Gönczi, M., Szűcs, G., Csemoch, L., 2008. Mitochondrial expression of the two-pore domain TASK-3 channels in malignantly transformed and non-malignant human cells. *Vitrochows Arch.* 452, 415–426.
- Streit, A.K., Netter, M.F., Kempf, F., Walecki, M., Rinné, S., Bollepalli, M.K., Preisig-Müller, R., Renigunta, V., Daut, J., Baukowitz, T., Sansom, M.S., Stansfeld, P.J., Decher, N., 2011. A specific two-pore domain potassium channel blocker defines the structure of the TASK-1 open pore. *J. Biol. Chem.* 286 (16), 13977–13984.
- Stühmer, W., 1998. Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. In: Conn, M.P. (Ed.), *Ion Channels*. Meth. Enzymol. 293 (8), 280–300.
- Talley, E.M., Lei, Q., Sirois, J.E., Bayliss, D.A., 2000. TASK-1, a two-pore domain K⁺ channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons. *Neuron* 25, 399–410.
- Talley, E.M., Solorzano, G., Lei, Q., Kim, D., Bayliss, D.A., 2001. CNS distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J. Neurosci.* 21, 7491–7505.
- Veale, E.L., Buswell, R., Clarke, C.E., Mathie, A., 2007. Identification of a region in the TASK-3 two pore domain potassium channel that is critical for its blockade by methanandamide. *Br. J. Pharmacol.* 152, 778–786.
- Voloshyna, I., Besana, A., Castillo, M., Matos, T., Weinstein, I.B., Mansukhani, M., Robinson, R.B., Gordon-Cardo, C., Feinmark, S.J., 2008. TREK-1 is a novel molecular target in prostate cancer. *Cancer Res.* 68 (4), 1197–1203.
- Wagner, C.A., Friedrich, B., Setiawan, I., Lang, F., Brörer, S., 2000. The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol. Biochem.* 10 (1–2), 1–12.
- Washburn, C.P., Sirois, J.E., Talley, E.M., Guyenet, P.G., Bayliss, D.A., 2002. Serotonergic Raphe neurons express TASK channel transcripts and a TASK-like pH- and halothane-sensitive K⁺ conductance. *J. Neurosci.* 22 (4), 1256–1265.
- Watkins, C.S., Mathie, A., 1996. A non-inactivating K⁺ current sensitive to muscarinic receptor activation in rat cultured cerebellar granule neurons. *J. Physiol.* 491, 401–412.