



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Clonación de subunidades de
canales de potasio de dos dominios
de poro (K2P) presentes en el tallo
ocular del acocil *Procambarus
clarkii*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Juan Manuel Hernández Martínez

Director de tesis: Dr. Juan Manuel Arias
Montaño



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Para la realización del presente trabajo se contó con el financiamiento otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), en el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), clave IN218818, Al Dr. Juan Manuel Arias Montaña.

El trabajo experimental se realizó en los laboratorios de electrofisiología del Proyecto de Neurociencias, en la Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y Educación (UIICSE), de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI), de la Universidad Nacional Autónoma de México; y en el laboratorio 15 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN)

Este trabajo se llevó a cabo bajo la asesoría y dirección del

Dr. Juan Manuel Arias Montaña

Proyecto de Neurociencias, UIICSE, FES Iztacala – UNAM

DEDICATORIAS

A mi madre, Elvia Martínez, y a mis hermanos Ricardo y Luis.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco y dedico este trabajo a mi familia que me ha apoyado y guiado durante toda mi vida, y que me ha enseñado el valor del esfuerzo y del trabajo.

Para mi mamá, quien ha estado siempre para mí, llenándome de su amor, de confianza, seguridad, y siempre impulsándome a lograr mejores objetivos, gracias por ser mi gran ejemplo.

Para mis dos hermanos, Ricardo y Luis, mis dos grandes admiraciones, compañeros de vida, cómplices y grandes consejeros, que siempre están para mí como yo para ustedes.

A Maria José Fernández por tanto amor y apoyo incondicional, por ser una gran compañera y por compartir tantos grandes momentos.

Al Dr. Juan Manuel Arias Montaña, por las grandes oportunidades que me ha dado, por las enseñanzas, la dedicación y la confianza que en mí ha depositado.

A todos mis amigos que he conocido en la facultad que son de gran importancia para mí y para toda mi vida, con los que he crecido y seguiremos haciéndolo juntos.

A la universidad Nacional Autónoma de México, mi segundo gran hogar, por permitirme crecer dentro de como profesionista y persona.

A mis sinodales de tesis; la Dra. Bertha Segura Alegría, al Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero, la Dra. Ana Victoria Vega Salcedo y al Dr. Ubaldo García Hernández por la revisión y asesoramiento durante la realización y conclusión de este trabajo.

Contenido

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
I. Membrana celular	2
II. Canales iónicos	3
III. Canales de potasio (K ⁺).....	4
IV. Canales de potasio con dos dominios de poro K2P	6
a) Potencial de membrana en reposo	7
b) Estructura de los canales K2P.....	8
c) Subfamilias de los canales K2P.....	9
1) TWIK, canales rectificadores entrantes débiles de K ⁺ (TWIK-1, TWIK-2 y KCNK7);.	10
2) TREK, canales de K ⁺ sensibles a lípidos relacionados con TWIK (TREK-1, TREK-2 y TRAAK);	11
3) TASK, canales de K ⁺ ácido-sensibles relacionados con TWIK (TASK-1, TASK-3, y TASK-5);	11
4) TALK, canales de K ⁺ activados por pH alcalino relacionado con TWIK (TALK-1, TALK-2 y TASK-2 ácido-sensible);	12
5) THIK, canales de K ⁺ inhibidos por halotano (THIK-1 y THIK-2);	12
6) TRESK, canales de K ⁺ de la médula espinal relacionados con TWIK.....	13
V. Sistemas neuroendocrinos	14
VI. Órgano X y glándula sinusal	14
VII. Antecedentes	17
VIII. Justificación	18
HIPOTESIS	19
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS PARTICULARES	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
I. Identificación de transcritos que potencialmente codifiquen para canales K2P en el tallo ocular de <i>P. clarkii</i>	20
II. Extracción de ARN total del tallo ocular	20
III. Diseño de oligonucleótidos específicos	21
IV. Transcripción en reversa acoplada a la amplificación de ADN por la reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	22
V. Amplificación por PCR anidada	23
VI. Electroforesis por gel de agarosa.....	23
VII. Purificación de los fragmentos por escisión de gel de las subunidades amplificadas de ADNc de <i>P. clarkii</i>	24

VIII. Ligación de los insertos amplificados de ADNc al vector de clonación pJET1.2/blunt	24
IX. Transformación de bacterias competentes de <i>Escherichia coli</i>	25
X. Purificación de ADN plasmídico por miniprep por lisis alcalina	25
XI. Análisis de restricción	26
XII. Secuenciación de los fragmentos seleccionados	27
XIII. Subclonación en el vector de expresión pIRES2-EGFP	27
RESULTADOS	28
I. Identificación de tres secuencias candidatas para canales K2P	28
II. Transcripción reversa acoplada a la amplificación de ADN por la reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	28
III. Amplificación por PCR anidada	29
IV. Clonación de los fragmentos amplificados en el vector pJET1.2/blunt	30
V. Secuenciación de los tres plásmidos	32
VI. Purificación de los fragmentos clonados en pJET1.2/blunt	32
VII. Construcción de los plásmidos con el vector de expresión pIRES2-EGFP	34
VIII. Purificación de los tres plásmidos pIRES2 – Pck2PA, pIRES2 – Pck2PB y pIRES2 – Pck2PC	38
IX. Análisis in silico de las secuencias de aminoácidos predichas para las subunidades Pck2P	39
X. Identidad de las tres subunidades para canales K2P	41
XI. Regiones importantes dentro de las tres secuencias Pck2P	42
XII. Análisis filogenético	48
DISCUSION	49
I. Pck2PA	52
II. Pck2PB	54
III. Pck2PC	56
CONCLUSIONES	57
PERSPECTIVAS	58
BIBLIOGRAFÍA	59

RESUMEN

Los canales de potasio son el grupo de canales iónicos más grande y heterogéneo, y presentan una gran variedad de funciones importantes en todos los organismos. Estos canales son ubicuos y se agrupan, de acuerdo a la topología de las subunidades formadoras del poro, en tres familias: la primera con subunidades con seis dominios transmembranales (TM), la segunda con dos TM y la tercera y menos estudiada con cuatro TM. Esta última familia conocida como canales de potasio con dos dominios de poro (K2P), además de las cuatro hélices transmembranales, presenta dos motivos de poro, dos hélices extracelulares y se dimerizan para formar un canal funcional. Dentro de las principales funciones de los canales K2P es contribuir a las conductancias de K⁺ y a establecer el potencial de membrana en reposo. Dentro de los miembros de estos canales existe una subfamilia sensible a cambios de temperatura denominada TREK (canales de K⁺ sensibles a lípidos relacionados con TWIK). El modelo de estudio de nuestro laboratorio ha sugerido la presencia de estos canales en el sistema neurosecretor órgano X – glándula sinusal del acocil *Procamabrus clarkii*, que posiblemente regulan la secreción de las hormonas de importancia fisiológica para este organismo. Por estas razones el objetivo de este trabajo fue clonar las secuencias que potencialmente codifiquen para subunidades de canales de potasio K2P presentes en el tallo ocular del acocil *P. clarkii*. Por medio de herramientas de bioinformática fue posible identificar tres secuencias en el transcriptoma del tallo ocular del acocil para las cuales se diseñaron oligonucleótidos específicos con los que se amplificó el ADN codificante utilizando como molde el ARN total. Las clonas obtenidas fueron subclonadas en el vector de expresión pIRES2-EGFP para su posterior expresión y caracterización biofísica y electrofisiológica. Finalmente, se realizó un análisis bioinformático de las secuencias de aminoácidos identificadas y se determinó la homología de cada una, presentando una de ellas una identidad del 33–39% con canales de la subfamilia TREK de varios organismos, otra presentó una identidad del 44–64% con canales TWIK de varios organismos y la tercera secuencia presenta una identidad del 52–71% con canales TASK de diversos organismos. Además, se reconocieron regiones y motivos característicos de cada subfamilia de canales para confirmar la posible identidad de cada secuencia.

INTRODUCCIÓN

1. Membrana celular

Las membranas celulares son cruciales para la vida ya que envuelven a la célula definiendo sus límites y la de sus organelos, manteniendo las diferencias esenciales entre su contenido y el entorno. La estructura básica común de las membranas consiste en una fina capa de moléculas lipídicas y proteínicas que se mantienen unidas fundamentalmente por interacciones no covalentes. Las moléculas fosfolipídicas anfipáticas están dispuestas en forma de una doble capa continua de ~5 nm de grosor (Alberts *et al.*, 2016).

En el caso de la membrana plasmática, esta bicapa lipídica actúa como barrera semipermeable selectiva entre la célula y el ambiente extracelular. Sus propiedades de permeabilidad aseguran que las moléculas esenciales como los iones, la glucosa y los aminoácidos entren y salgan fácilmente de la célula, que los intermediarios metabólicos permanezcan en ella y que los compuestos de desecho la abandonen. En pocas palabras, la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática le permite a la célula mantener un ambiente interno constante. Los movimientos de casi todas las moléculas y iones a través de las membranas celulares son mediados por las proteínas transportadoras de la membrana inmersas en la bicapa fosfolipídica. Debido a que diferentes tipos celulares requieren distintas mezclas de compuestos de bajo peso molecular, la membrana plasmática de cada tipo de célula contiene un conjunto específico de proteínas transportadoras que solo permiten que pasen ciertos iones y moléculas (Lodish *et al.*, 2016).

Si una sustancia transportada tiene una carga neta, su movimiento está influido tanto por su gradiente de concentración como por el potencial de la membrana. La combinación de estas dos fuerzas, denominado *gradiente electroquímico*, determina las direcciones de transporte energéticamente favorables de una molécula cargada a través de una membrana. El potencial eléctrico que existe a través de la mayoría de las membranas celulares es el resultado de desequilibrios en la concentración de iones cargados en los dos lados de la membrana (Alberts *et al.*, 2016).

Algunas de las proteínas transmembranales transportan agua o tipos específicos de iones y moléculas hidrofílicas pequeñas a favor de su concentración o del gradiente de potencial eléctrico. Ciertos tipos de estas proteínas forman poros hidrofílicos a través de la membrana denominados *canales iónicos* por la cual se mueven simultáneamente múltiples moléculas de iones a gran velocidad. Algunos canales iónicos están abiertos

la mayor parte del tiempo, son los canales *no regulados*; sin embargo, la mayoría de los canales se abren solo en respuesta a señales químicas o eléctricas específicas, son los canales *regulados* (Lodish *et al.*, 2016; Alberts *et al.*, 2016).

II. Canales iónicos

La membrana plasmática contiene canales proteínicos que les permite a los principales iones celulares (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^-) pasar a través de ellos a diferentes velocidades a favor de su gradiente electroquímico para poder regular una gran variedad de procesos fisiológicos, incluidos los impulsos nerviosos, la contracción muscular, la regulación del volumen celular y la señalización celular en todos los organismos. La conducción de potenciales de acción por las células nerviosas depende de la apertura y el cierre de canales iónicos en respuesta a cambios en el potencial de membrana (Zheng y Trudeau, 2015).

Los iones son moléculas hidrofílicas impermeables en los lípidos de la membrana, y para atravesarla requieren de mecanismos específicos de transporte. Dichos iones son transportados a favor de su gradiente de concentración, en algunos casos, pasan a través de canales iónicos, y en otros se transportan uniéndose a proteínas transportadoras o *acarreadores*; ambos sistemas de transporte son pasivos y por tanto no consumen energía (Tamargo, 2004). Así, los canales iónicos son proteínas transmembranales que forman poros y que en respuesta a estímulos son capaces de adoptar diversos estados conformacionales. A través de dichos canales existe las más de las veces difusión selectiva de iones, que es esencial para la homeostasis de los electrolitos, el desarrollo celular y la generación de los potenciales eléctricos necesarios para la función neural (excitabilidad). Por esta razón, los canales se caracterizan por velocidades de transporte muy rápidas, cercano a la difusión simple, i.e. $\sim 10^8$ iones $\cdot\text{s}^{-1}$ (Zheng & Trudeau, 2015; Vivier *et al.*, 2015).

Los canales pueden ser abiertos de tres maneras: I) por la unión de un ligando específico, ya sea directamente al canal o a una proteína de membrana acoplada al canal; II) por el cambio de voltaje en la membrana; o III) en respuesta a estímulos mecánicos como vibración, presión, gravedad y ondas sonoras. El primer mecanismo es característico de los canales dependientes de ligando como lo son los receptores ionotrópicos para el glutamato o la acetilcolina. El segundo mecanismo es característico de los canales dependientes de voltaje. Mientras que el tercer mecanismo es considerado un transductor de fuerza mecánica. Actualmente se sabe que los canales

iónicos son elementos fundamentales en las membranas de células excitables, trabajando en completa armonía (Lacinova, 2005; Ranade *et al.*, 2015).

La apertura de los canales de sodio (Na^+) permite el movimiento hacia el interior de la célula de cargas positivas que promueven la despolarización de la membrana, mientras que los canales de potasio (K^+) permiten que los iones de K^+ salgan de la célula creando un exceso de cargas negativas dentro de la célula y conduciendo el potencial de membrana a valores negativos. Por tanto, la excitabilidad celular se basa directamente en la actividad de los canales iónicos (Zheng y Trudeau, 2015).

III. Canales de potasio (K^+)

Desde que el primer gen de los canales de K^+ fue identificado, el número de componentes clonados y caracterizados ha crecido enormemente. Actualmente, con cerca de 80 genes en el genoma humano, los canales de K^+ son el grupo más diverso, heterogéneo y ubicuo de los canales iónicos. En las células excitables, la apertura de los canales de K^+ facilita la salida de este catión a favor de su gradiente electroquímico y juega un papel importante en el mantenimiento del potencial de reposo celular. De tal forma, estos canales regulan una amplia gama de funciones neurales como la frecuencia de disparo de las células, la forma y duración de los potenciales de acción, el postpotencial hiperpolarizante, la liberación de neurotransmisores y hormonas, la excitabilidad celular, el transporte de electrolitos por las células epiteliales, la contracción del músculo liso y la regulación del volumen celular. Además, los canales de K^+ constituyen la diana terapéutica de fármacos y toxinas que modulan la función celular (Coetzee *et al.*, 1999; Tamargo, 2004).

Gracias al análisis estructural de alta resolución de un canal de K^+ , que fue el primer canal de membrana natural para el cual se dispuso de información estructural real, se obtuvo fuerte evidencia sobre la estructura tetramérica del mismo; además de las subunidades formadoras del poro o principales (comúnmente llamadas subunidades α) que determinan la infraestructura del canal, muchos canales contienen proteínas auxiliares que pueden modificar las propiedades de los mismos, a menudo de forma significativa. La mayoría de las subunidades de canal K^+ conocidas se expresan en sistemas de expresión heterólogos como complejos de canales homomultiméricos funcionales (Coetzee *et al.*, 1999).

Todas las subunidades α de los canales de K^+ muestran cierta similitud en sus secuencias y en su estructura, y todas ellas pueden estar relacionadas a través de la

evolución. Las subunidades auxiliares o subunidades β tienen secuencias que no se asemejan a las principales; éstas interactúan con complejos de canales que contienen subunidades principales y pueden modificar tanto sus propiedades biofísicas como las farmacológicas, y los niveles o patrones de expresión. Además, muchos complejos de los canales de K^+ interactúan con proteínas adicionales tales como enzimas reguladoras o elementos del citoesqueleto (Coetzee *et al.*, 1999).

Las diversas corrientes de K^+ muestran distintas propiedades dependientes del voltaje y sensibilidades farmacológicas, lo que permite la separación electrofisiológica y su caracterización, así como la delimitación del impacto funcional de las propiedades biofísicas de diferentes tipos de canales de K^+ en neuronas en reposo y activas (Nerbonne, 2016).

Las membranas plasmáticas de las células animales contienen muchos canales de K^+ abiertos, pero pocos canales de Na^+ o Ca^{2+} abiertos durante el reposo; como resultado, el principal movimiento iónico a través de la membrana plasmática en reposo es el del K^+ , desde el interior hacia el exterior, dejando un exceso de carga negativa en el interior y carga positiva al exterior; así, el flujo hacia afuera de los iones K^+ a través de estos canales, llamados canales de K^+ de fuga, es el determinante principal del potencial de membrana negativo en reposo (Lodish *et al.*, 2012).

Actualmente se conoce que los canales de K^+ son tetrámeros de subunidades principales, las cuales pueden formar canales hetero- y homo-méricos con subunidades principales estrechamente relacionadas en varias combinaciones; el número de posibles canales de K^+ distintos basados en estas diferentes combinaciones puede ser del orden de cientos, si no es que de miles (Coetzee *et al.*, 1999).

De esta manera existen varios tipos de canales de K^+ , incluidos los dependientes de voltaje y los dependientes de Ca^{2+} , los rectificadores entrantes, los dependientes de Na^+ y los canales de fuga. Las subunidades principales de estos canales han sido identificadas y se han dividido en tres grupos basados en la topología que presenta la subunidad α formadora del poro, para lo cual se toma en cuenta tanto el número de regiones transmembranales (TM), así como los dominios conservados formadores del poro (P) (Figura 1). El primer grupo consiste en proteínas de seis dominios transmembranales (TMD), el cual está compuesto por los canales de K^+ dependientes de voltaje (K_v) y por los canales dependientes de calcio (K_{Ca}). El segundo grupo consiste en proteínas con dos dominios transmembranales; a este grupo pertenecen los canales de K^+ rectificadores entrantes (Kir). El tercer grupo, del cual se cuenta con menos información, es conocido como canales con subunidades de dos poros (K2P) y está

compuesto por los canales de K⁺ de fuga. Cada uno de estos grupos está dividido en familias que están divididas en subfamilias, con varios miembros estrechamente relacionados entre sí en cada subfamilia (Coetzee *et al.*, 1999; Nerbonne, 2016).

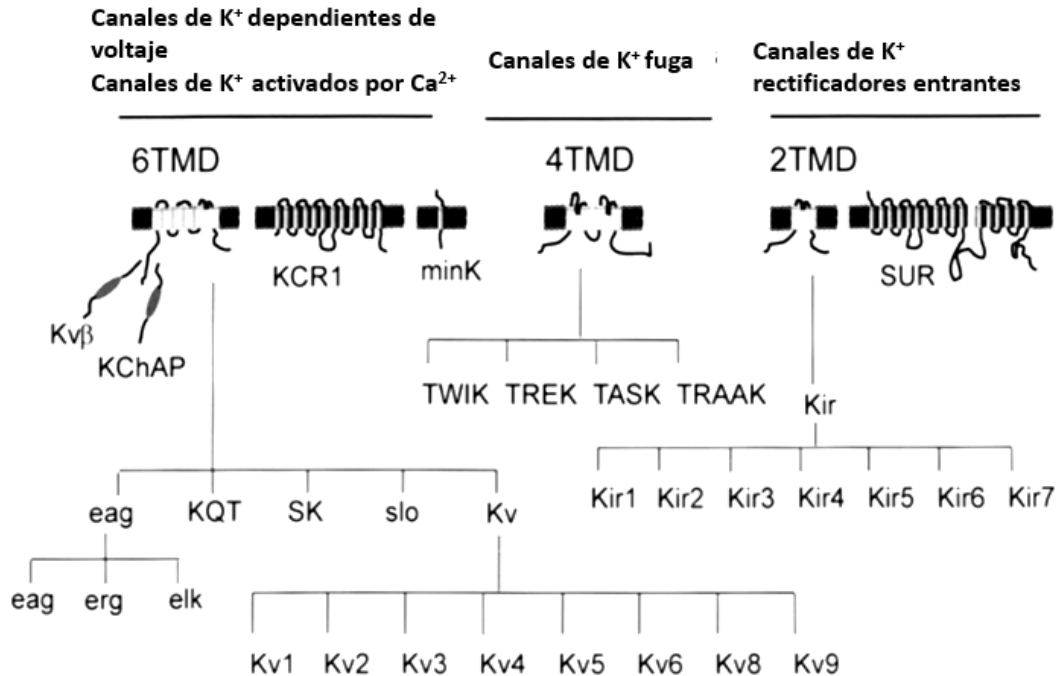


Figura 1. Esquema de los tres grupos de canales de K⁺. Los canales de K⁺ son clasificados en tres grupos de acuerdo a la topología predicha de la membrana; algunos tienen seis dominios transmembranales, otros con cuatro dominios transmembranales y algunos con dos dominios transmembranales. Cada grupo es dividido en familias de acuerdo a la similitud de sus secuencias. Modificada de Coetzee, 1999.

IV. Canales de potasio con dos dominios de poro K2P

Entre las tres clases principales de canales de K⁺ se encuentra la familia de canales con dos dominios del poro (K2P). Las subunidades de dichos canales están definidas por cuatro hélices transmembranales (TM1-TM4) y dos dominios del poro (P1 y P2) que se dimerizan para formar el filtro de selectividad de K⁺ (Figura 2). Estos canales contribuyen a la conductancia de K⁺ y al potencial de reposo de la membrana en muchos tipos de células; también son responsables de una diversidad de corrientes en neuronas y su actividad es modulada por numerosos factores físicos y químicos incluyendo el pH, los segundos mensajeros, las señales lipídicas como los ácidos grasos insaturados, la presión mecánica, el estiramiento de la membrana, las cinasas de proteínas, la presión parcial de oxígeno, la temperatura, los neurotransmisores y los anestésicos, que puede resultar en la modulación del potencial de reposo y la excitabilidad (Jezzini *et al.*, 2006;

Vivier *et al.*, 2015; Christensen, 2016). La regulación en la expresión de subunidades de canales K2P es particularmente importante en la modulación de las propiedades funcionales de las neuronas (Jezzini *et al.*, 2006). El descubrimiento de la familia de genes de canales de K⁺ de dos dominios de poro a mediados de 1990, proveyó las bases moleculares para caracterizar las propiedades funcionales de las subunidades de canales de K⁺ de fuga y localizar los sitios nativos de expresión. Estos canales son abundantes tanto en tejidos neurales como no neurales, en los cuales están involucrados en una gran diversidad de funciones (Buckingham *et al.*, 2005).

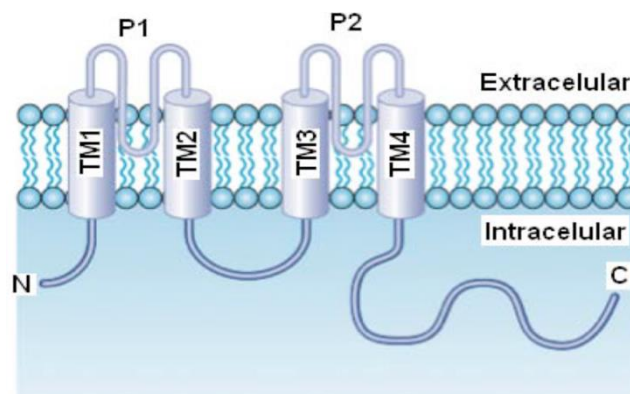


Figura 2. Organización topológica de un canal K2P. Los segmentos transmembranales son representados por los cilindros azules (TM1-TM4) y los dominios formadores del poro se representan como P1 y P2. Los extremos terminales amino y carboxilo se encuentran indicadas como N y C, respectivamente. Se representa una subunidad del dímero funcional. Tomada de Noriega, 2015.

a) *Potencial de membrana en reposo*

Aun cuando las neuronas permanecen eléctricamente quiescentes, el potencial de membrana (E_m) nunca está en verdadero reposo ya que existen proteínas de transporte activas y corrientes de fuga. En la literatura está bien aceptado que los canales K2P dan origen a las corrientes de fuga de K⁺, debido a que dichos canales permanecen abiertos durante el disparo y el reposo logrando un eflujo neto de K⁺ continuo a través de estos poros (Zheng y Trudeau, 2015).

Tomando en cuenta que el E_m de una célula en reposo es la suma de los potenciales de equilibrio para los iones que son relativamente permeables a la membrana celular, y sabiendo que el K⁺ tiene grandes corrientes de fuga, típicamente el E_m en reposo es cercano al potencial de equilibrio de potasio (E_K) (Brohawn *et al.*, 2012; Enyedi & Czirjak, 2010).

Ahora bien, considerando lo anterior, una corriente de fuga de potasio no es dependiente de voltaje, lo que significa que la probabilidad de apertura del canal es la misma a cualquier valor del E_m ; esta corriente es también independiente de las concentraciones del ion a ambos lados de la membrana. Otra característica importante es que la amplitud de la corriente sigue muy de cerca los cambios en el E_m , lo que significa que el canal no presenta cinética de inactivación, de activación ni de desactivación; de esta manera un cambio en el E_m resulta en una alteración “inmediata” de la corriente de fuga de K^+ . Idealmente la corriente de fuga de potasio no tiene un componente rectificador, pero en soluciones fisiológicas al existir diferentes concentraciones de potasio a ambos lados de la membrana existe una pequeña rectificación; si las concentraciones fueran iguales a ambos lados la relación corriente voltaje sería una línea que pasa por el origen (Figura 3) (Enyedi y Czirjak, 2010).

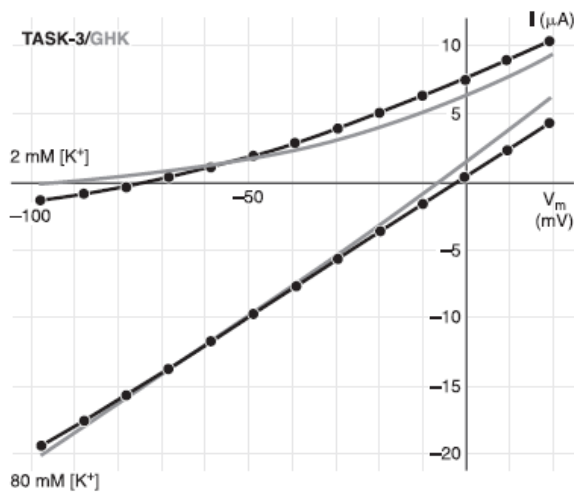
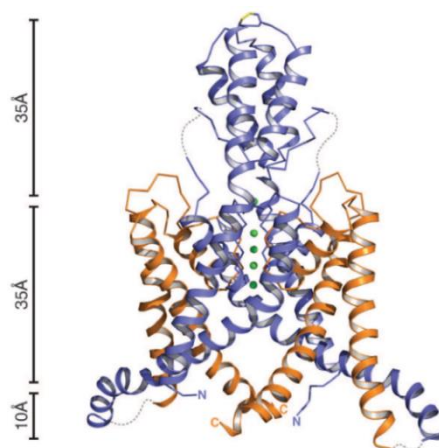


Figura 3. Relación Corriente-Voltaje (I-V) para canales K2P. Comparación entre la relación I-V a concentraciones fisiológicas (2 mM) y concentraciones simétricas de K^+ (80 mM) de un canal TASK-3 en ovocito de *Xenopus* en E_m de -100 a +20 mV. La curva en color gris es la predicción de la corriente por la ecuación Goldman-Hodgjin-Katz (GHK). Tomada de Enyedi y Czirjak, 2010.

b) Estructura de los canales K2P

Cada subunidad principal de estos canales está formada por 4 TM y dos dominios del poro; tanto el extremo carboxilo como el amino residen en el citoplasma y estos canales operan como homo- o hetero-dímeros. El grupo de MacKinnon (2012) obtuvo por cristalografía la estructura del canal TRAAK a una resolución de 3.8 Å (Figura 4). Se puede observar en ella un bucle externo en cada subunidad que se extiende cerca de 35 Å más allá de la membrana celular para formar un dominio de capucha sobre la región superior al poro bifurcando la entrada al poro para la conducción de K^+ ; esto puede explicar porque las neurotoxinas peptídicas no puedan bloquear estos poros debido al acceso limitado que tendrían al poro de conducción.

Figura 4. Estructura tridimensional del canal TRAAK. Representación esquemática de la estructura cristalográfica del canal TRAAK (K2P); se muestran de color naranja y azul las dos subunidades que forman el canal funcional. Tomada de Brohawn *et al.*, 2012.



c) *Subfamilias de los canales K2P*

Hasta la fecha en los mamíferos se han descrito quince miembros en esta familia. La nomenclatura de estos canales en la literatura sigue siendo una mezcla de los nombres comunes y los nombres de la IUPHAR. Así, basados en sus características funcionales y estructurales, los canales K2P pueden ser divididos en 6 subfamilias (Figura 5) (Christensen *et al.*, 2016; Doring *et al.*, 2006):

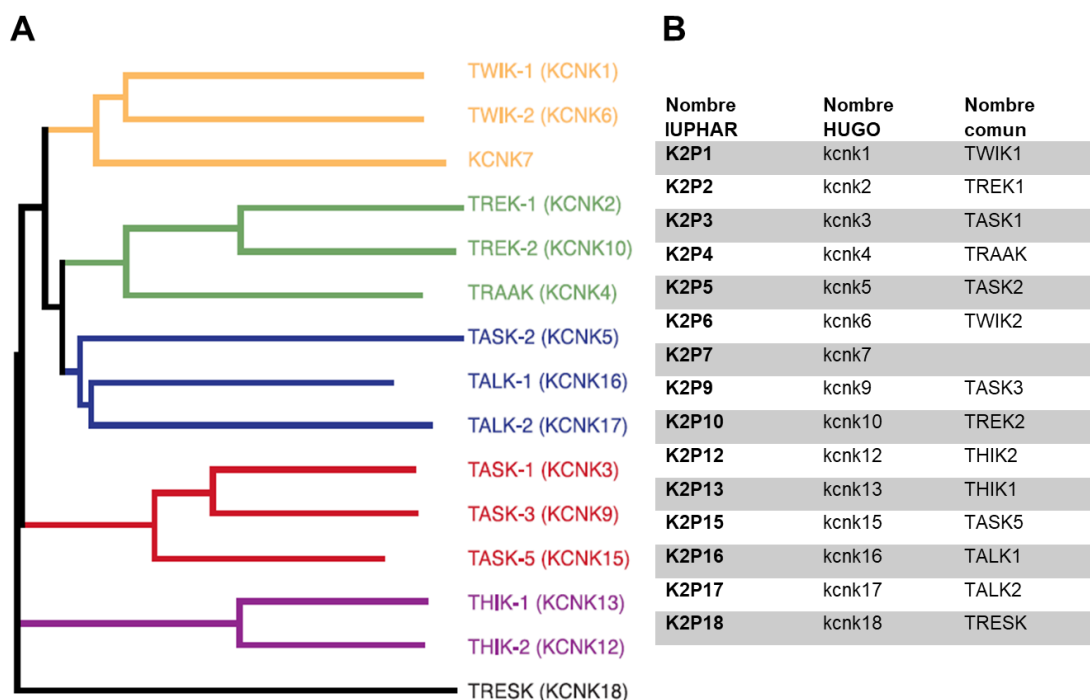


Figura 5. Dendrograma de la familia de canales de potasio de dos dominios de poro (K2P). (A) Cada nombre se presenta de color diferente. Se indican tanto los nombres convencionales como los nombres HUGO (Human Genome Organization). Tomada de Enyedi y Cziráj, 2010. (B) Tabla de los nombres usados para canales con dos dominios de poro K2P de acuerdo a la nomenclatura IUPHAR y enumerados con la relación con HUGO para cada gen. Los nombres comunes son de acuerdo con las características biofísicas y/o farmacológicas en los primeros reportes de cada canal. Tomada de IUPHAR, Guide to pharmacology, 2007.

1) TWIK, canales rectificadores entrantes débiles de K⁺ (TWIK-1, TWIK-2 y KCNK7);

Se ha demostrado que este grupo de canales está presente en placenta, en pulmones, en riñón, en el sistema nervioso central, en neuronas granulares cerebelares y en el músculo cardíaco. Las subunidades formadoras de estos canales son TWIK-1, TWIK-2 y KCNK7. El canal TWIK-1 fue el primer canal de esta familia en ser clonado de riñón humano y el primero en ser identificado (Christensen *et al.*, 2016).

Uno de los mecanismos reguladores de este canal es que son silenciados por la proteína SUMO (small ubiquitin-like modifier); la desumoilación puede activar el canal permitiendo su apertura y en consecuencia permitiendo el paso de corrientes rectificantes de potasio (Christensen *et al.*, 2016; Zheng & Trudeau, 2015).

Esta familia de canales también presenta inhibición ante un pH ácido en el medio extracelular y es sensible a concentraciones de K⁺ externas (pH 6.7 y 4 mM K⁺); esta inhibición es causada por la protonación de un residuo de His en la porción externa de la primera asa de cada subunidad, y de esta manera el canal se vuelve menos selectivo a potasio en un pH ácido. Así, las corrientes de fuga de estos canales determinan el E_m en neuronas granulares cerebelares y su respuesta a cambios en el pH, pO₂ y anestésicos volátiles.

Los canales TWIK también son sensibles al halotano, lo que es importante en neuronas granulares cerebelares ya que este anestésico volátil aumenta la probabilidad de apertura del canal (incremento del 300%), lo que permite mayor corriente de fuga de K⁺ y una hiperpolarización disminuyendo la excitabilidad de la neurona. También, las corrientes en este canal pueden ser incrementadas por la cinasa de proteína C y la activación de la proteína G acoplada al receptor de serotonina (Christensen *et al.*, 2016; Zheng & Trudeau, 2015).

Este grupo de canales también está implicado en el mantenimiento del E_m en cardiomiocitos y en la regulación ante la hipokalemia (concentraciones de 3 mM de potasio en sangre), debido a que en estas condiciones el canal pierde su selectividad a K⁺ y permite el paso de Na⁺ para que la célula pueda ser despolarizada (Zheng & Trudeau, 2015).

2) TREK, canales de K⁺ sensibles a lípidos relacionados con TWIK (TREK-1, TREK-2 y TRAAK);

Los canales TREK nombrados así por ser canales de K⁺ relacionados a TWIK y los canales TRAAK por ser canales de K⁺ activados por ácido araquidónico relacionados a TWIK, fueron descubiertos en 1996 como los segundos canales K₂P en mamíferos; se presentan en el SNC principalmente en neuronas estriatales, neuronas del hipocampo y neuronas granulares cerebelares, también se presentan en el SNP en neuronas somato sensoriales, así como en miocitos. Este grupo de canales formado por TREK-1, TREK-2 y TRAAK presentan una estructura con 28% de similitud con los canales TWIK y son caracterizados por una estructura tridimensional similar (Vivier *et al.*, 2015; Zheng & Trudeau, 2015).

Las propiedades funcionales de estos canales permiten alterar la excitabilidad celular debido a que llegan a ser permeables a Na⁺, esto a causa de que su ARNm presenta una secuencia de Kozak que genera una variante del canal con 56 residuos iniciales menos, lo que afecta la conductancia de potasio permitiendo el paso de sodio con una permeabilidad relativa casi diez veces mayor (Zheng y Trudeau, 2015).

Estos canales son integradores polimodales de señales al ser sensibles a ácido araquidónico, anestésicos y drogas. También son regulados por estiramiento de la membrana (apertura de canal), por temperatura (temperaturas de 32–37 °C inducen la activación del canal) y a pH intracelular (un pH ácido permite la apertura del canal) (Vivier *et al.*, 2015). Su sensibilidad a la temperatura contribuye a la regulación térmica de neuronas nociceptivas, activándose para incrementar la temperatura corporal hasta 37 °C y falla cuando la temperatura se acerca a 43 °C; esto es causado ya que el canal cambia la excitabilidad neural al disminuir la corriente de fuga de potasio y por lo tanto aumenta la excitabilidad de las neuronas nociceptivas (Zheng & Trudeau, 2015).

3) TASK, canales de K⁺ acido-sensibles relacionados con TWIK (TASK-1, TASK-3, y TASK-5);

Este grupo está formado por canales en los cuales la corriente de fuga de potasio es bloqueada por la protonación del residuo de His en la boca externa del poro; el grupo está formado por TASK-1, TASK-3 y TASK-5. Expresados en el SNC y SNP, son conocidos por regular las corrientes que despolarizan las neuronas durante la acidificación; también se presentan en riñón, en músculo cardíaco y en células glomerulares adrenales en donde son selectivos a potasio, independientes de voltaje y rectificadores entrantes de K⁺ (Doring *et al.*, 2006; Zheng y Trudeau, 2015).

Los cambios en la magnitud de las corrientes de fuga están correlacionas con la lenta cinética de despolarización en neuronas somatosensoriales que presentan estos canales en respuesta a la acidificación. La proteína formadora del canal al ser traducida puede ser retenida en el retículo endoplasmático ya que requiere ser fosforilada por la proteína 14-3-3 β para ser transferida a la membrana plasmática (Doring *et al.*, 2006).

4) TALK, canales de K⁺ activados por pH alcalino relacionado con TWIK (TALK-1, TALK-2 y TASK-2 ácido-sensible);

Los miembros de este grupo, nombrado por ser canales de K⁺ alcalino-sensibles relacionados con TWIK, son sensibles a pH extracelulares alcalinos >7.5. El grupo está formado por los canales TALK-1, TALK-2 y TASK-2, este último nombrado por la familia de los canales ácido-sensibles hasta que se descubrió que su rango de sensibilidad es alcalino. Esta sensibilidad a pH alcalino es debida a los residuos básicos cercanos a segundo dominio de poro que afectan las propiedades de filtro de selectividad.

Estos canales han sido implicados en la regulación de conductancias de potasio apicales que facilitan la secreción de bicarbonato desde las células epiteliales en páncreas. Así como TASK-2 se ha relacionado con la regulación de bicarbonato en riñón, ratones “knockout” presentan fallas en la reabsorción de bicarbonato, acidosis metabólica e hipotensión (Zheng y Trudeau, 2015).

5) THIK, canales de K⁺ inhibidos por halotano (THIK-1 y THIK-2);

Nombrados así por ser canales de K⁺ inhibidos por halotano relacionados a TWIK, este grupo está formado por los canales THIK-1 y THIK-2 y se presentan en mamíferos en corazón, en músculo esquelético, en páncreas y riñón, así como en el SNC en el núcleo retrotrapezoide donde al ser inhibidos, la conductancia disminuye en las neuronas quimiorreceptoras del sistema respiratorio central de este núcleo para preservar la respiración adecuada durante la anestesia. Como ya se mencionó son inhibidos por halotano con una concentración de 2.8 mM lo que bloquea la corriente de potasio de fuga (Jezzini *et al.*, 2006; Zheng y Trudeau, 2015).

6) TRESK, canales de K⁺ de la médula espinal relacionados con TWIK.

El último grupo de canales en ser identificados es el grupo de canales de K⁺ de la médula espinal relacionados a TWIK, y su función al igual que el resto es permitir el paso a las corrientes de fuga de K⁺; este grupo está formado por los canales TRESK-1. En roedores estos canales son sensibles a la acidificación al exterior de la célula debido a la protonación en un residuo de His cercano al dominio de poro, pero en humano este residuo es cambiado por Tyr lo que vuelve al canal insensible al pH ácido. Algo a destacar de estos canales es que están regulado por Ca²⁺ intracelular que activa a la proteína fosfatasa calcineurina dependiente de la calmodulina que, a su vez, desfosforila la Ser²⁶⁴ permitiendo la unión de la proteína 14-3-3β que inhibe el canal (Zheng y Trudeau, 2015).

Existe una alta expresión en la raíz del ganglio dorsal donde determina la excitabilidad de las fibras nociceptivas somatosensoriales por lo que su función se ve relacionada al dolor. Este canal es activado por el ácido lisofosfatídico, un mediador inflamatorio que reduce la señal nociceptiva en neuronas ganglionares del asta dorsal. También se ha relacionado este canal con la migraña y su mutación se ha asociado con migraña hemipléjica familiar al aumentar la excitabilidad de las neuronas del ganglio del trigémino (Park *et al.*, 2016; Zheng y Trudeau, 2015).

Así, un gran número de genes de los canales K₂P se han encontrado mediante la búsqueda en los pocos genomas secuenciados a partir de organismos modelo, por ejemplo, aproximadamente 15 en humano, 11 en *Drosophila melanogaster* y más de 50 en *Caenorhabditis elegans*, que representa la mayor familia para canales K₂P en un organismo hasta ahora secuenciado. Aunque entre los vertebrados estos canales presentan una baja similitud en sus secuencias (~45%), estos canales se pueden asociar debido a la conservación de sus propiedades funcionales, lo que plantea la posibilidad de que los miembros de las familias funcionalmente diferenciadas puedan ser identificables en base a las características funcionales de las regiones que contengan. Por otra parte, nuestro grupo de trabajo ha detectado que la excitabilidad de dichas neuronas se ve afectada por una corriente de fuga de K⁺ sensible a variaciones en temperatura, gracias a registros electrofisiológicos en neuronas de sistema neurosecretor órgano X – glándula sinusal del acocil *Procambarus calrkii* (datos no publicados).

V. *Sistemas neuroendocrinos*

El sistema endocrino y el sistema nervioso actúan para lograr y mantener la estabilidad del medio interno (homeostasis). Cada uno de estos sistemas puede trabajar por separado, o bien hacerlo conjuntamente como un sistema neuroendocrino único que ejerce sus funciones reguladoras mediante mensajeros químicos a través de las células peptidérgicas que son productoras de estos mensajeros químicos, y que evolutivamente aparecen en las redes nerviosas más primitivas sin formar órganos especializados en la secreción (Nässel, 1996). Estas neuronas especializadas en el control a distancia de células efectoras han evolucionado para formar agregados celulares —por ejemplo, los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo y órganos neurohemales— donde las terminaciones axónicas entran en contacto con capilares y senos venosos —por ejemplo, la neurohipófisis— donde vierten su contenido hormonal (Scharrer, 1978). En ambos casos, la liberación de los productos hormonales está regulada por condiciones internas de las células, así como por respuestas a factores ambientales con lo que se controlan funciones del organismo. Así, el sistema neuroendocrino es capaz de regular muchas de las funciones del organismo, tales como el desarrollo, la reproducción, la alimentación, el metabolismo, etc. En vertebrados, el sistema neuroendocrino está formado por células parvocelulares y magnocelulares en el hipotálamo que proyectan a la hipófisis; las neuronas magnocelulares forman dos grandes núcleos en el hipotálamo: los núcleos paraventricular y supraóptico, y sus axones recorren el tracto hipotálamo-neurohipófisis donde liberan productos hormonales a la circulación periférica desde la hipófisis posterior (Siverman y Zimmerman, 1983).

En tanto, en invertebrados los sistemas neuroendocrinos son el sistema *pars intercerebellaris – corpus cardiacum* de los insectos y el órgano X – glándula sinusal en los crustáceos. Estos tres sistemas son homólogos tanto funcional como morfológicamente (Hartenstein, 2006).

VI. *Órgano X y glándula sinusal*

Los acociles son considerados como una especie de crustáceos clave en las comunidades acuáticas debido a que son los invertebrados móviles de agua dulce más grandes, son de larga vida, actúan como omnívoros politróficos y alteran las redes tróficas de los hábitats que invaden (Momot, 1995). *P. clarkii* es un acocil nativo del sur de los Estados Unidos de América y el norte de México; es el más ampliamente cultivado y distribuido del mundo por ser considerado una de las especies comerciales más importantes, y actualmente ha sido introducido a la mayoría de los continentes (Palma,

2012). Este organismo es considerado una de las especies más invasivas del mundo debido a su gran plasticidad ecológica, tolerancia a un amplio rango de condiciones físicas, químicas y biológicas, adaptabilidad para cambiar de ambiente y alta fecundidad. Su expansión ha contribuido a la pérdida de la biodiversidad en los hábitats invadidos (Elio *et al.*, 2005; Manfrin *et al.*, 2014).

Los acociles como el resto de los crustáceos son animales ectotérmicos, por lo que los factores ambientales afectan su biología, sobre todo la temperatura ambiental ya que es muy variable durante el día y entre temporadas, lo que hace que sea importante investigar el efecto de los ciclos de temperatura ambiental sobre ellos (Dong *et al.*, 2015). En este sentido podría ser importante determinar la presencia de canales de la familia K2P sensibles a temperatura y sus repercusiones en la fisiología de dicho organismo.

El tallo ocular es un órgano presente en los crustáceos que contiene a las estructuras visuales, así como otras que se han asociado a funciones olfativas, mecanorreceptoras y neurosecretoras; en él se pueden identificar a la lámina ganglionar, la médula externa (ME), la médula interna, la médula terminal, la glándula sinusal (GS) y el órgano X (OX). Estas dos últimas estructuras forman el sistema Órgano X – Glándula Sinusal (OX/GS), que es la estructura neurosecretora más importante en los crustáceos, constituida por cerca de 120 neuronas monopolares cuyos somas constituyen el OX y sus axones se extienden para formar un tracto que termina en una asociación con una región vascularizada que forma la glándula sinusal. Actualmente se sabe que la GS está formada por terminales nerviosas encargadas del almacenamiento y liberación de neurohormonas dispuestas en vesículas formadas en los somas del OX, así como por células gliales (Figura 6) (Barral, 1986; Alvarado-Alvarez *et al.*, 1999).

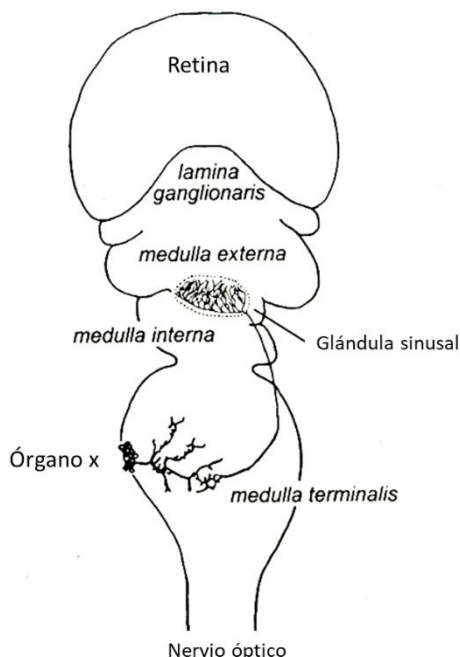


Figura. 6. Representación del tallo ocular del acocil *P. clarkii*. Vista dorsal del tallo ocular donde se muestran las zonas anatómicas que lo forman incluido el sistema peptidérgico órgano X – glándula sinusal. En la *medulla terminalis* se encuentra el cúmulo celular que forma el órgano X, y en el quiasma de la médula externa se encuentran las terminaciones axónicas de las neuronas del órgano X que forman la glándula sinusal. Tomada de Garduño, 2000.

Así, el tallo ocular contiene el complejo neurosecretor OX/GS, donde en los somas de las neuronas del OX se sintetizan al menos ocho productos hormonales peptídicos, transportados a través de sus axones y liberados en la GS, cerca de la ME; entre estas neurohormonas se encuentra la superfamilia de hormonas llamadas hormonas hiperglicemiantes de crustáceo (Crustacean Hyperglycemic Hormone, CHH) que se ha observado intervienen en procesos fisiológicos como la muda, el crecimiento, la osmorregulación, la madurez sexual, la regulación del metabolismo, respuestas a estímulos ambientales, la regulación de niveles de glucosa en la hemolinfa y en la regulación del ritmo circadiano del animal. También se encuentran la neurohormona concentradora de eritrocitos (HCE) que promueve la concentración de los pigmentos contenidos en los eritróforos tegumentarios y la supresión del riego sanguíneo, y la hormona dispersora del pigmento distal de la retina (HDPR) que promueve la migración del pigmento retiniano distal a la posición de adaptación a la luz en condiciones de adaptación a la oscuridad; ambas hormonas de la familia de las cromatoforotropinas varían sus niveles en hemolinfa en un ciclo de 24 h debido a la estimulación de la vía visual al provocar excitación o inhibición de grupos de neuronas en el OX. Otras hormonas como la inhibidora de la muda (HIM) que interviene en el ciclo de cambio del exoesqueleto de los crustáceos, y la hormona inhibidora de la vitalogénesis que está involucrada en procesos de actividad gonadal, junto con la CHH, son parte de la familia de hormonas metabotrópicas (Manfrin *et al.*, 2014; Fanjul, 1998; Garduño, 2000).

El sistema neurosecretor OX/GS se encuentra formado por células nerviosas especializadas que conservan las propiedades generales de las neuronas, aunque presentan diferencias electrofisiológicas con las neuronas no secretoras como la base iónica de sus potenciales y la duración de los mismos. Estas neuronas son capaces de generar potenciales de acción con patrones de disparo variables; los registros obtenidos de neuronas muestran que éstas presentan potenciales de acción rápidos en el axón y lentos en el soma. Estas neuronas pueden ser silentes y requerir de una inyección de corriente despolarizante para generar actividad eléctrica o pueden ser neuronas que disparan espontáneamente ya sea en forma de trenes o de manera tónica (García y Aréchiga, 1998).

Los potenciales de acción rápidos son generados en el segmento inicial del axón por una corriente entrante de sodio sensible a tetrodotoxina (TTX) seguidos de potenciales lentos, que en las terminales axónicas se producen de manera inducida por corrientes entrantes de calcio al igual que en los somas de las células nerviosas del acocil. Las corrientes de potasio detectadas son la rectificadora entrante (I_K), que se activa a potenciales de membrana de -40 mV, sensible al tetraetilamonio (TEA), y la corriente

transitoria de salida (I_A), que se activa a -52 mV y se encuentra parcialmente inactiva durante el reposo y es sensible a la 4-aminopiridina (4-AP); en cambio las corrientes de calcio se encuentran en un rango de activación de -30 a -20 mV y se bloquean por Cd^{2+} y Zn^{2+} de manera reversible e irreversible, respectivamente (Onetti *et al.*, 1986; Garduño, 2000).

En conjunto esta variedad de corrientes iónicas otorga una amplia gama de patrones de actividad eléctrica en las neuronas del *P. clarkii*, con una amplitud de las señales que oscila entre 40 y 75 mV cuando se emplean microelectrodos intracelulares y entre 50 y 400 μ V con el registro extracelular, que permiten regular la liberación de hormonas de las neuronas del sistema OX/GS. Además, en estas células existe un acople eléctrico a nivel axonal entre subpoblaciones productoras de una misma hormona para coordinar y amplificar la respuesta neurosecretora (Alvarado-Álvarez *et al.*, 1993;).

VII. Antecedentes

Se conoce poco sobre los canales de potasio con dos dominios de poro y de sus funciones en los organismos por lo que algunos investigadores se han propuesto dilucidar su función; por ejemplo, Doring y colaboradores en 2006 lograron identificar diez genes en el genoma de la mosca de la fruta *D. melanogaster*, cuyas secuencias de aminoácidos predichas presentan las características estructurales esenciales de los canales de potasio de dos dominios del poro. Dos subunidades identificadas en *Drosophila sp* mostraron similitud de aminoácidos con canales de K^+ ácido-sensibles relacionados con TWIK (TASK) (38–43%). Además, por medio de la técnica de northern blot se encontraron transcritos de TASK (dTASK) predominante en la fracción de la cabeza de las moscas adultas, y cuando se expresó heterológamente en células de *Drosophila sp* S2, dTASK-6 dio lugar a la activación selectiva rápida de corrientes de K^+ que dependían del pH externo y se encontró que los elementos estructurales en el bucle extracelular M1-P1 de dTASK-6 estaban implicados en la sensación del protón (Doring *et al.*, 2006).

Jezzini y colaboradores en (2004, 2006) identificaron las primeras dos secuencias de canales K2P (Ack2p1 y Ack2p2) en el molusco *Aplysia californica*. La secuencia de aminoácidos de Ack2p1 es homóloga a los canales K2P del grupo de los inhibidos por halotano en mamíferos (THIK), con 46% de identidad con THIK-1 y 48% con THIK-2. También identificaron la distribución de dicho canal en el sistema nervioso central del molusco encontrando que se expresa específicamente en neuronas centrales de todos los ganglios principales del molusco, siendo la mayor expresión de Ack2p1 en un grupo

de 30 células ubicadas en la región dorsal media del ganglio pleural derecho; esta distribución es consistente con los datos en mamíferos donde THIK solo se expresa en poblaciones neurales restringidas, sugiriendo que su participación en el mantenimiento fenotípico neural como la funcionalidad de estas neuronas en sus redes. En tanto que Ack2p2 tiene una identidad del 24% con TALK-1 de humanos, de igual manera se analizó su distribución en el SNC encontrando que dicho canal se expresa en la región ventral de los ganglios pedales en neuronas con diámetros de 30–40 μm , así como en los ganglios pleurales, ventrales y cerebelares en neuronas de diámetro similar (Jezzini *et al.*, 2004; Jezzini *et al.*, 2006).

El canal TWIK-1 contribuye a la corriente de fuga de K^+ en diversos tipos de células, en el corazón humano está codificado por el gen *KCNK1*, se expresa en la aurícula y su función fisiológica no se conoce, por lo que Christensen y colaboradores (2016), utilizando registros electrofisiológicos en ovocitos de *Xenopus*, mostraron que los canales de la subfamilia TWIK, provenientes tanto del pez cebra como de humanos, producen corrientes de K^+ que son sensibles a la concentración externa del ion, así como a pH ácido, demostrando que TWIK-1 tiene un papel altamente conservado en la función cardiaca.

Finalmente, Manfrin y colaboradores (2014) obtuvieron el transcriptoma completo del tallo ocular del acocil, del cual el 7.13% corresponden a secuencias que codifican para proteínas de membrana en el pedúnculo ocular del *P. clarkii*.

VIII. Justificación

La fisiología de los canales K2P nativos sigue siendo poco conocida y la mayoría de los datos sobre la funcionalidad de los canales K2P se deriva cuando las subunidades K2P son expresadas en sistemas heterólogos permitiendo la caracterización de las propiedades biofísicas y farmacológicas de dichos canales. Así, el uso de organismos modelo está mejorando nuestra comprensión de los canales iónicos y por lo tanto es oportuno tener en cuenta su potencial en la aclaración de las funciones de los canales K2P y cómo estas funciones se relacionan con su estructura (Buckingham, 2016). También, trabajar con un modelo homólogo en invertebrados, sirve para tener información que podría ser útil si se extrapola la función de estos sistemas en vertebrados. Además, nuestro grupo de trabajo ha detectado que la excitabilidad de las neuronas del OX/GS se ve afectada por variaciones en temperatura (datos no publicados).

HIPOTESIS

La identificación de secuencias de ARN que codifican para subunidades formadoras de canales K2P en el transcriptoma del tallo ocular del *P. clarkii* permitirá obtener los ADN codificantes y su posterior subclonación en vectores de expresión.

OBJETIVO GENERAL

Clonar las secuencias que potencialmente codifiquen para subunidades de canales de potasio de dos dominios de poro presentes en el tallo ocular del acocil *P. clarkii*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Identificar en el transcriptoma del tallo ocular de *P. clarkii*, transcritos que potencialmente codifiquen para canales K2P por su homología a subunidades de la mosca *Drosophila*.
- ❖ Diseñar oligonucleótidos específicos que permitan la amplificación de las subunidades candidatas.
- ❖ Obtener ARN total proveniente del tallo ocular de *P. clarkii*.
- ❖ Amplificar por transcripción reversa acoplada a la PCR los ADNc de las subunidades detectadas en el tallo ocular de *P. clarkii*.
- ❖ Clonar los amplicones para cada subunidad en un vector y amplificarlas en cepas bacterianas competentes de *E. coli*.
- ❖ Caracterizar por análisis de restricción los plásmidos aislados de las células transformantes.
- ❖ Determinar por secuenciación tipo Sanger las secuencias de los ADNc para las subunidades amplificadas.
- ❖ Subclonar los ADNc en un plásmido de expresión para células eucariotas para su posterior caracterización electrofisiológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Identificación de transcritos que potencialmente codifiquen para canales K2P en el tallo ocular de P. clarkii

Para la identificación de subunidades formadoras de canales de K2P presentes en el transcriptoma del tallo ocular de acocil *P. clarkii*, publicado por Manfrin *et al.* (2014), se realizó un alineamiento con secuencias de dichos canales presentes en *Varroa jacobnosi* (número de acceso GenBank XP_022707888.1), *Limulus polyphemus* (número de acceso GenBank XP_022248476.1) y *D. melanogaster* (número de acceso GenBank NP_511112.1) utilizando el algoritmo TBLASTN de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) usando la base de datos de transcriptomas ensamblados (TSA) y con los parámetros predeterminados en el algoritmo de búsqueda, con el cual se comparan las secuencias de consulta con las proteínas potencialmente reportadas en los transcriptomas ensamblados. En este trabajo se utilizó el transcriptoma ensamblado para *P. clarkii*, evaluando identidad, similitud y homología de las secuencias. Con dicho proceso se identificaron las subunidades presentes en el transcriptoma y se reconocieron características de las secuencias de aminoácidos generales encontradas de los canales K2P, es decir la presencia de cuatro hélices transmembranales y el duplicado del motivo de filtro de selectividad obteniéndose tres secuencias que potencialmente codifican para canales K2P.

II. Extracción de ARN total del tallo ocular

Se obtuvo el ARN total proveniente del tallo ocular del acocil *P. clarkii* a través de la extracción de ARN por el reactivo TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA), que es una modificación a la técnica de Chomczynski (1987), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se eliminaron los residuos de ADN genómico con 2 U/100 µl de ADNasa I libre de ARNasa (New England Biolabs, Ipswich, MA), seguida de una precipitación con isopropanol. Para determinar la concentración y el grado de pureza del ARN se midió su absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro de luz UV (Genesys 10S UV-Vis Thermo Scientific).

III. Diseño de oligonucleótidos específicos

A partir de las secuencias previamente encontradas se diseñaron los oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos fueron diseñados tanto en sentido, como en antisentido, para flanquear las secuencias codificantes de las subunidades. El programa utilizado para el diseño de oligonucleótidos fue el Clone Manager (Sci-Ed Software, Denver, CO). Se diseñaron 4 oligonucleótidos para cada una de las subunidades, nombrándose el primero Pck2Pxf1, siendo x el nombre de la subunidad A, B o C; el segundo diseñado más hacia el extremo 3' con respecto del primero para realizar una PCR anidada posterior fue nombrado Pck2Pxf2. El tercer oligonucleótido diseñado en antisentido nombrado Pck2Pxr1 y el cuarto diseñado más hacia el extremo 5' también para realizar posteriormente una PCR anidada fue nombrado Pck2Pxr2 (Tabla 1). Se utilizaron las siguientes especificaciones para el diseño de los oligonucleótidos: un contenido de GC del 50–60%, se evitaron las secuencias complementarias a sí mismas o con otros oligonucleótidos, una temperatura de fusión (T_m) de 60 °C y los oligonucleótidos no se debían hibridar a otro sitio en el molde.

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de las subunidades de canales K2P del tallo ocular de *P. clarkii*.

Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
pcK2PAf1	GCAGCATCAAAGACCTCTAC	pcK2PAr1	GAATTCTGCGGGTTTATGCATTTCG
pcK2PAf2	CGGCCTACAAGTTATCCAC	pcK2Par2	GAATCCACTGCACTACTTAGCTCTC
pcK2PBf1	CATTAACCCGCTGTGCTC	pcK2PBr1	GAATTCAGAATGCACGCTACACTG
pcK2PBf2	GCCGTGCTTCATAAACTAC	pcK2PBr2	GAATTCTACTGGGAGCCAATACTG
pcK2PCf1	AGCTGATGCGAAGAAAGG	pcK2PCr1	TCGGTTGGTTCCT
pcK2PCf2	GCAGAGGGTGAGATGAAG	pcK2PCr2	ATCCTTCGGCACTGTTAC

Los oligonucleótidos se recibieron liofilizados y se rehidrató cada uno en 250 μ l de regulador TE 1 \times (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) y se determinaron sus concentraciones con su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro. Con los datos del coeficiente de extinción molar (ϵ) y la ecuación de Lambert-Beer ($Abs = c\epsilon x$) se calculó la concentración para cada uno de los oligonucleótidos en la solución concentrada. En seguida se prepararon alícuotas de trabajo de 30 μ l las cuales contenían una concentración final de 10 μ M de cada oligonucleótido.

IV. *Transcripción en reversa acoplada a la amplificación de ADN por la reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR)*

A partir del ARN total de *P. clarkii* se sintetizó el ADN complementario (ADNc) en presencia de la transcriptasa reversa ProtoScript II (New England Biolabs, Ipswich, MA) en reacciones con volúmenes finales de 20 μ l. Inicialmente se hizo una mezcla de 6 μ l de agua libre de ARNasas, 4 μ l de ARN total (347 ng/ μ l) y 1 μ l de una mezcla equimolar de cuatro oligonucleótidos, pcK2PAr1, pcK2PBr1, pcK2PCr1, pcGABA2r2 (120 μ M en total, 30 μ M de cada uno); el último oligonucleótido en antisentido, que permite amplificar el ADNc de una subunidad formadora de receptores a GABA_A β del acocil caracterizada previamente por Valladares Hernández (2016), fue utilizado como control positivo. Esta mezcla se incubó a 70 °C por 3 min y enseguida se enfrió rápidamente a 4 °C. Posteriormente se añadió a la mezcla 1 μ l de dNTPs (10 mM en total), 4 μ l de regulador para ProtoScript II 5 \times , DTT (concentración final 10 mM), 1 μ l inhibidor de ARNasas RiboLock (40 U/ μ l) y un 1 μ l de la enzima transcriptasa reversa ProtoScript II (200 U/ μ l). Esta mezcla se incubó a 42 °C por 1 h y enseguida a 80 °C por 5 min para inactivar la enzima, y finalmente a 4 °C hasta que la reacción se retiró del termociclador (Tabla 3 y 4.). A continuación, se diluyó en agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 100 μ l y se guardó a -20 °C para su posterior uso.

Se realizó una amplificación por la PCR a partir del ADNc sintetizado previamente utilizando los oligonucleótidos específicos para las subunidades de canales K2P detectados en el transcriptoma del acocil; las reacciones de amplificación, en volúmenes finales de 25 μ l ajustados con agua libre de nucleasas, contuvieron: regulador de la enzima Q5 1 \times , intensificador (“enhancer”) 1 \times , dNTPs 0.2 mM de cada uno, 0.4 μ M de cada oligonucleótido (sentido y antisentido), 0.5 U de la enzima Q5 (New England Biolabs, Ipswich, MA) y 5 μ l del ADNc sintetizado previamente.

Las reacciones fueron incubadas en un termociclador (Veriti® 96-Well Thermal Cycler, applied Biosystems) bajo el siguiente esquema de ciclado:

- i) 95 °C / 120 s;
- ii) 95 °C / 30 s; 55 °C / 30 s; 72 °C / 75 s; 15 ciclos;
- iii) 95 °C / 30 s; 50 °C / 30 s; 72 °C / 75 s; 20 ciclos;
- iv) 72 °C / 5 min.

V. Amplificación por PCR anidada

Posteriormente se utilizaron oligonucleótidos en sentido más hacia el extremo 3', y en antisentido más hacia el extremo 5' respecto a los oligonucleótidos usados anteriormente (PCR anidada, Figura 7), con el fin de aumentar la sensibilidad de la técnica y amplificar eficientemente los fragmentos de ADN que incluyeran los ADNc de las subunidades. La composición de esta amplificación es la misma que la inicial, exceptuando que ahora los moldes (5 µL) fueron los fragmento obtenidos en la reacción de amplificación inicial.

Tabla 2. Oligonucleótidos específicos utilizados para la amplificación por PCR anidada para cada una de las subunidades.

	Oligonucleótido en sentido	Oligonucleótido en antisentido
Subunidad A	pcK2PAf2	pcK2PAr2
Subunidad B	pcK2PBf2	pcK2PBr2
Subunidad C	pcK2PCf2	pcK2PCr2

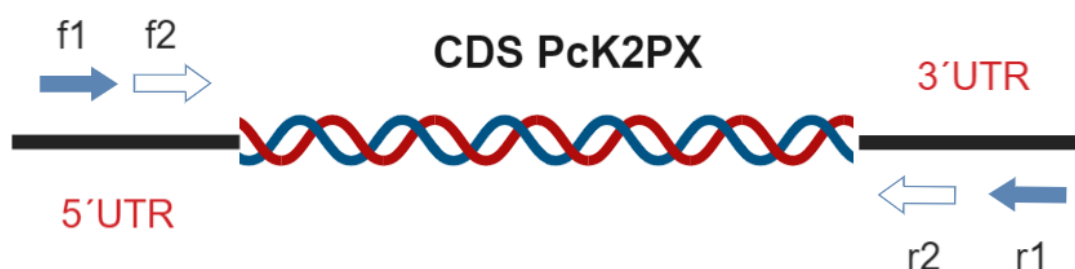


Figura 7. Localización relativa de los oligonucleótidos diseñados para las secuencias de las subunidades Pck2P. Esquema donde se pueden observar la ubicación de los oligonucleótidos generados en las regiones no traducidas 5' y 3' que flanquean las secuencias codificantes de las subunidades Pck2P.

VI. Electroforesis por gel de agarosa

Los amplicones y fragmentos resultantes de las digestiones con endonucleasas de restricción fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (regulador TBE 0.75×, con bromuro de etidio [BrEt] en una concentración final de 0.25 µg/ml). Para cargar las muestras de ADN en el gel de agarosa fueron previamente mezcladas con regulador de carga 6× (30% glicerol, 0.25% azul de bromofenol y 0.25% xilén-cianol). Se utilizaron estándares de pesos moleculares de 1 kpb (mil pares de bases) (0.5 µg/carril, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, y 1 mM EDTA, ThermoScientific). Los

fragmentos de ADN se separaron a voltaje constante (80 V) durante 70 min y fueron detectados en un transiluminador de luz ultravioleta Gel Doc™ EZ (BioRad, Hércules) con 0.2 s de exposición. Las imágenes fueron procesadas mediante el software Image Lab (BioRad, Hércules).

VII. *Purificación de los fragmentos por escisión de gel de las subunidades amplificadas de ADNc de P. clarkii.*

La purificación se llevó a cabo utilizando el “kit” de extracción GeneJet (Thermo Scientific) cortando las bandas que correspondieran a los fragmentos de ADN del gel con una hoja de bisturí; se estimó el volumen de la agarosa pesándola y asumiendo una densidad 1 g/ml. A continuación, se agregó un volumen igual de regulador de unión y se disolvió a una temperatura de 60 °C, se transfirió a una columna de purificación GeneJet de silica-gel en un microtubo de recolección. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min y se descartó el líquido colectado. Se añadieron 700 µl de regulador de lavado y se centrifugó en las mismas condiciones por 2 min. Después se transfirió la columna a un tubo esterilizado de 1.5 ml y se añadieron 30 µl de regulador de elución (Tris-HCl 10mM, EDTA 0.1 mM, pH 8.0) y se centrifugó por 1 min. El eluido se conservó a -20 °C hasta su uso.

VIII. *Ligación de los insertos amplificados de ADNc al vector de clonación pJET1.2/blunt*

Una vez purificados los fragmentos de ADN deseados, estos se ligaron al vector pJET1.2/blunt de 2,974 pb (Thermoscientific) que contiene la región codificante para la enzima de restricción (Eco47IR) que se interrumpe con la ligación de un inserto de ADN en el sitio de clonación. Como resultado, solo las células bacterianas con plásmidos recombinantes pueden formar colonias. Las moléculas de vector pJET1.2/blunt que no disponen de insertos expresan dicha enzima de restricción letal, que mata la célula *E. coli* hospedera después de la transformación. Así mismo, para mayor comodidad en el mapeo y manipulación del inserto, el sitio de clonación múltiple del vector de clonación pJET1.2/blunt contiene dos secuencias de reconocimiento BglIII que flanquean el sitio de inserción. Además, el vector contiene un promotor T7 para las transcripciones *in vitro* e *in vivo*, así como para la secuenciación del inserto.

Las reacciones de ligación se prepararon según las cantidades recuperadas del ADN amplificado, de tal manera que se cumplieran las siguientes condiciones: 1) una relación

molar inserto:vector $\geq 3:1$; 2) un total del ADN (vector + inserto) de 100–200 ng; y 3) un volumen final de 20 μ l. Las reacciones además contuvieron el regulador de la ligasa del fago T4 1 \times y 0.5 U de la ligasa del fago T4, como se muestra para cada caso en la Tabla 3.

Tabla 3. Reactivos usados en la ligación con el vector pJET1.2. El volumen usado del ADN amplificado varió según lo necesario para cumplir las condiciones necesarias y se llevó a un volumen final de reacción de 20 μ l con agua libre de nucleasas.

Reactivo	pcK2PA	pcK2PB	pcK2PC
H ₂ O	3.9 μ l	12.75 μ l	11.5 μ l
Inserto pcK2Px	12.6 μ l	3.75 μ l	5 μ l
pJET1.2/blunt (50 ng/ μ l)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Regulador para ligasa del fago T4 (10x)	2 μ l	2 μ l	2 μ l
T4 ADN ligasa (5 U/ μ l)	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l

IX. Transformación de bacterias competentes de *Escherichia coli*

Se clonaron los insertos en bacterias de *E. coli* de la cepa DH5 α mezclando las células competentes con la reacción de ligación y se mantuvo a 4 °C por 30 min. Posteriormente, se expuso la mezcla a un choque térmico colocando el tubo en agua a 42 °C durante 30 s para que el ADN exógeno entrara a la célula por medio de la unión electrostática del ADN con Ca⁺² a través de los poros generados con el choque térmico, y enseguida fueron colocadas durante 2 min en frío para cerrar estos poros. Pasado este tiempo se agregaron 250 μ l de medio no selectivo LB (2% triptona, 1% extracto de levadura, 1% NaCl) y se incubaron con agitación a 37 °C durante 1 h para permitir la síntesis de las proteínas de resistencia al antibiótico presente en el plásmido. Posteriormente las células fueron sembradas en cajas de Petri con medio LB con 100 μ g/ml de ampicilina o kanamicina y se incubaron a 37 °C durante 16 h.

X. Purificación de ADN plasmídico por miniprep por lisis alcalina

Se seleccionaron colonias de bacterias aisladas de los cultivos obtenidos en la transformación; estas fueron inoculadas en medio LB con 100 μ g/ml de ampicilina e incubadas durante 16 h a 37 °C/200 rpm. Se recuperaron las células por centrifugación a 13,000 rpm durante 30 s. El ADN plasmídico se purificó por medio de una miniprep por lisis alcalina (Engebrecht *et al.*, 1991). Brevemente, el paquete de bacterias fue

resuspendido en 100 μ l de GTE (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0), se agito mediante un vortex y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Luego se añadieron 200 μ l de NaOH-SDS (0.2N NaOH y 1% p/v de SDS), se mezcló por inversión y se incubó a 4 °C por 5 min. Después se añadieron 150 μ l de acetato de potasio 5 M (pH 4.8), se mezcló por inversión y se incubó a 4 °C por 5 min. En seguida se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min y se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos donde se agregaron 900 μ l de etano al 95% y se incubó a 4 °C durante 10 min; a continuación, se centrifugó por 5 min a 13,000 rpm, se retiró el sobrenadante y se agregaron 600 μ l de etanol al 70% para lavar la pastilla; se centrifugó nuevamente por 3 min y después de retirar el sobrenadante se dejó secar a 42 °C hasta que la pastilla estuviera libre de etanol. Al final se resuspendió en 30 μ l de regulador de elución con ARNasa (50 μ g/ml).

XI. *Análisis de restricción*

Para comprobar la identidad y los tamaños de los fragmentos amplificados y clonados, se realizaron análisis de restricción con enzimas que presentaran sitios de reconocimiento tanto en el plásmido como en el inserto clonado. Se usaron diversas enzimas en las condiciones recomendadas por los fabricantes, y en las condiciones individuales para cada una de ellas, por ejemplo: tiempo de digestión, temperatura, concentración de sales y condición de sales (estas características las presenta el regulador para cada enzima). Se muestran las condiciones de una reacción típica en la Tabla 4. Además, se realizaron análisis de restricción *in silico* para obtener los tamaños de fragmentos esperados para cada una de las reacciones de digestión utilizando el programa A Plasmid Editor (ApE; Daves, 2013).

Tabla 4. Reactivos usados en una digestión típica de un volumen final de 10 μ l usando agua libre de nucleasas, las enzimas necesarias según el plásmido y el inserto que se debía caracterizar y con los reguladores indicados.

Reactivo	Volumen
H ₂ O	Aforar a 10 μ l
Regulador	1 \times
Enzima(s)	3–4 U
ADN	100–200 ng

XII. *Secuenciación de los fragmentos seleccionados*

A partir de los análisis de restricción se seleccionaron los plásmidos que fueron enviados a secuenciar; a estos plásmidos se les determinó la concentración de ADN, se tomaron alícuotas y se enviaron a secuenciar utilizando los oligonucleótidos específicos en sentido pJET Forward (CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC) y en antisentido pJET Reverse (AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG). Se enviaron a secuenciar por el método de terminación de la cadena (Sanger *et al.*, 1997) con nucleótidos acoplados a fluoróforos, en la Unidad de Secuenciación del Laboratorio de Biología Molecular de la FES Iztacala.

XIII. *Subclonación en el vector de expresión pIRES2-EGFP*

El vector de expresión pIRES2-EGFP contiene el sitio interno IRES entre el sitio múltiple de clonación y la región codificante para la EGFP (proteína verde fluorescente), generando plásmidos bicistronicos, de tal manera que la secuencia codificante para los insertos se encuentre al inicio del transcrito y antes de la secuencia IRES, y posteriormente se encuentre la secuencia para la proteína verde fluorescente, la cual se utilizara como gen reportero para aquellas células posteriormente transfectadas exitosamente. Por lo cual se realizó la subclonación por medio de digestiones con las enzimas apropiadas para generar los extremos compatibles adecuados, tanto de los plásmidos pJET1.2/blunt que contenían los insertos positivos, así como del vector pIRES2-EGFP. A continuación, los fragmentos de ADN deseados se purificaron y se ligaron para formar los nuevos plásmidos; con estas reacciones se transformaron bacterias competentes de *E. coli* y las transformantes se seleccionaron en medio con kanamicina (100 µg/mL), que es el antibiótico para el cual este vector presenta un gen de resistencia. Las colonias resultantes se crecieron en medio con kanamicina y los plásmidos se purificaron por columna y se realizaron varios análisis de restricción para caracterizarlos. Todas estas técnicas fueron realizadas con los mismos parámetros previamente descritos.

RESULTADOS

I. Identificación de tres secuencias candidatas para canales K2P

La identificación en el transcriptoma del tallo ocular del acocil *P. clarkii* (Manfrin *et al.*, 2015) de secuencias putativas codificantes para canales de potasio de dos dominios del poro se realizó mediante el algoritmo TBLASTN, usando como sondas las secuencias de proteínas de canales de dos dominios de poro presentes en *V. jacobnosi* (GenBank XP_022707888.1), *L. polyphemus* (GenBank XP_022248476.1) y *D. melanogaster* (GenBank NP_511112.1). Esta búsqueda permitió identificar en dicho transcriptoma tres secuencias que podrían codificar canales de potasio de la familia de dos dominios de poro, que además de contener los cuatro dominios transmembranales, presentan por duplicado del motivo de filtro de selectividad canónicos de los canales K2P, es decir **T-I-G-X-G**, lo cual dota a los posibles canales de selectividad al ion potasio.

II. Transcripción reversa acoplada a la amplificación de ADN por la reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Se obtuvo el ADNc a partir del ARN total del tallo ocular del acocil utilizando los oligonucleótidos antisentido específicos para las secuencias de subunidades de canales K2P anteriormente mencionados en lugar de utilizar el oligo dT de uso convencional; posteriormente se realizó una amplificación por la PCR con un par de oligonucleótidos específicos por subunidad, uno en sentido y otro en antisentido. Una vez finalizada la PCR, por electroforesis en gel de agarosa se verificó la longitud de los fragmentos que debían presentar un tamaño de 1,500–2,000 pb (Figura 8). Este tipo de análisis no permite el determinar con exactitud los tamaños de los amplificados, sin embargo, es posible reconocer en la fotografía del gel que las longitudes de los tres amplificados muestran aproximadamente las longitudes predichas para cada caso, esto es 1,569 pb, 1,901 pb y 1,473 pb para Pck2PA, Pck2PB y Pck2PC, respectivamente obtenidas gracias al análisis *in silico* como se mencionó previamente.

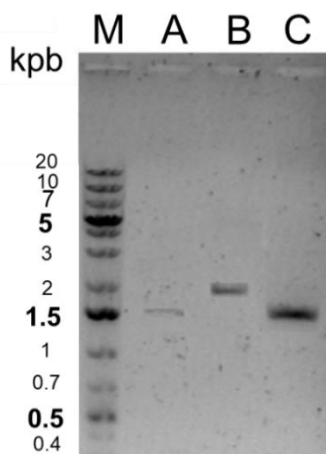


Figura 8. Amplificación inicial por la PCR de los ADNc para las subunidades de canales K2P de *P. clarkii*. Fotografía de gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. Pck2PA (A), 1,569 pb; Pck2PB (B), 1,901 pb; Pck2PC (C), 1,473 pb; M, marcadores de peso molecular de 1,000 pb.

III. Amplificación por PCR anidada

Después de la PCR inicial se obtuvieron 3 fragmentos que fueron nombrados Pck2PA, Pck2PB y Pck2PC, y que corresponden potencialmente a los 3 ADNc de subunidades de los canales K2P del acocil. Los fragmentos amplificados fueron sometidos a una segunda amplificación por PCR anidada, con el propósito de aumentar la sensibilidad y el rendimiento de la técnica. En seguida se identificaron los sitios de restricción que existen en las secuencias y se realizó el análisis *in silico* para cada una de ellas y así compararlo con lo obtenido después de la digestión y separación de los fragmentos por medio de la electroforesis en gel de agarosa, donde se esperaban fragmentos de 1,539 pb para Pck2PA, y su digestión con las enzimas BamHI de 1,000 y 532 pb, PstI de 1,316 y 223 pb y SacI de 942 y 597 pb. Para Pck2PB se predecía un fragmento de 1,362 pb, y su digestión con las enzimas Sall fragmentos de 984 y 378 pb, BglIII de 762 y 600 pb y Bsu36I de 1,199 y 163 pb. Finalmente, la amplificación debía generar una banda de 1,303 pb para Pck2PC, y su digestión con las enzimas PstI fragmentos de 670, 423 y 210 pb, con NgoMIV de 1,072 y 231 pb y con Bspel de 775 y 528 pb. En la Figura 9 se puede observar una fotografía del gel de agarosa con dichos fragmentos y reacciones de digestión donde el tamaño de las bandas es muy similar a los tamaños esperados mencionados previamente con lo que se comprueba la identidad de dichos fragmentos.

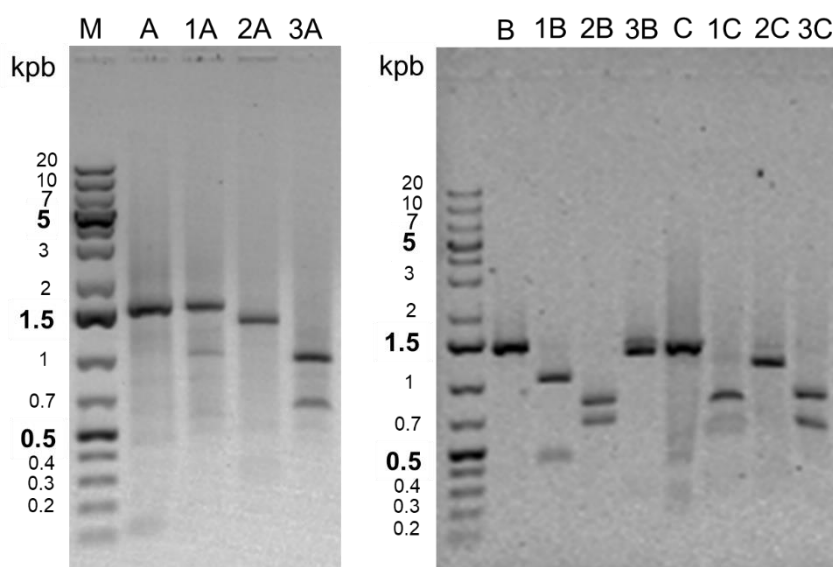


Figura 9. Análisis de restricción de la amplificación por la PCR (anidada) de las secuencias Pck2Px. Fotografía de gel de agarosa al 0.8% teñido con EtBr. Secuencia Pck2PA (A), 1,539 pb; Pck2PB (B), 1,362 pb; y Pck2PC (C), 1,303 pb, M, marcador de peso molecular; 1A, BamHI (1,000 pb, 535 pb); 2A, PstI (1,316 pb, 223 pb); 3A, SacI (942 pb, 597 pb); 1B, Sall (984 pb, 378 pb); 2B, BglIII (762 pb, 600 pb); 3B, Bsu36I (1,199 pb, 163 pb); 1C, PstI (670 pb, 423 pb, 210 pb); 2C, NgoMIV (1,072 pb, 231 pb); 3C, Bspel (775 pb, 528 pb).

IV. Clonación de los fragmentos amplificados en el vector pJET1.2/blunt

Una vez corroborada la identidad de los tres fragmentos amplificados por el análisis de restricción, se procedió a realizar su ligación en el vector de clonación pJET1.2-blunt para la construcción de tres plásmidos que se nombraron pJET1.2-PcK2Px (donde x es el nombre de la secuencia) (Figura 10).

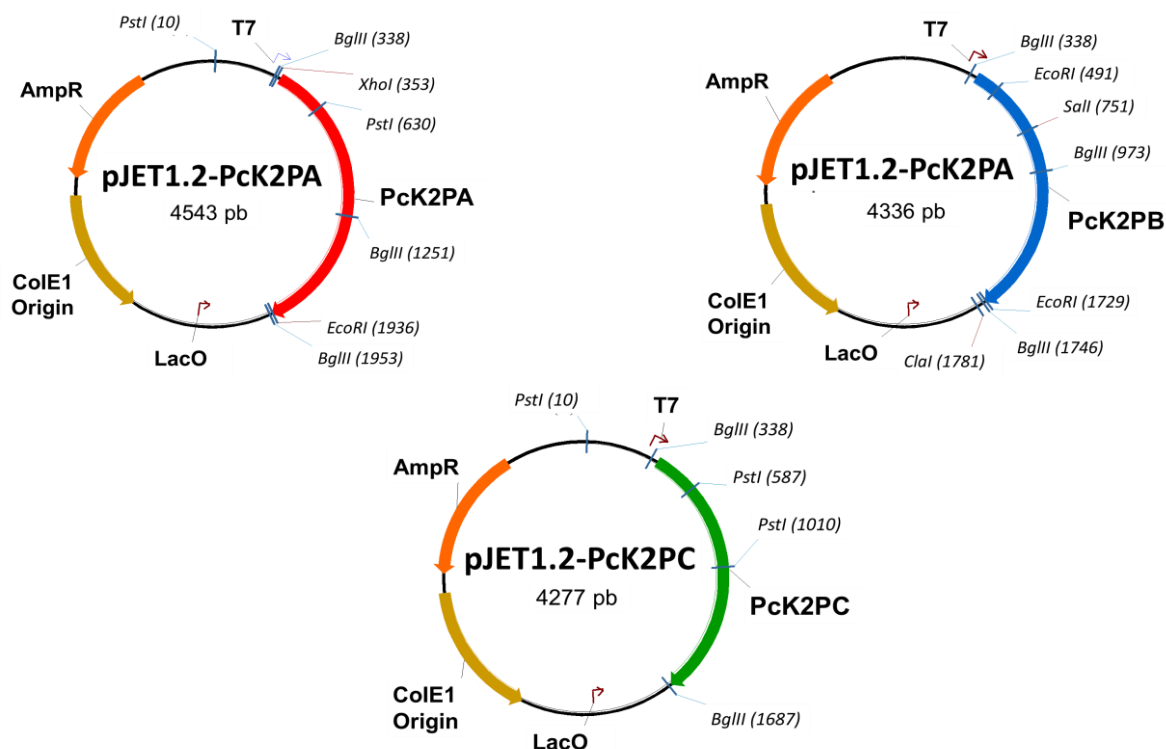


Figura 10. Construcción de los plásmidos pJET1.2-PcK2Px. Se obtuvieron los plásmidos pJET1.2 – PcK2PA (4,553 pb), pJET1.2 – PcK2PB (4,336 pb) y pJET1.2 – PcK2PC (4,277 pb). En color negro se muestra la porción que corresponde al vector de clonación pJET1.2/blunt, de rojo al inserto PcK2PA, de azul al inserto PcK2PB y de verde al inserto PcK2PC. Además, se muestran las enzimas de restricción que se utilizaron en este trabajo y su posición en los plásmidos.

Una vez obtenidos los plásmidos se transformaron con ellos bacterias *E. coli* competentes que se incubaron a 37 °C por 16 h en cajas de Petri con medio LB–agar y ampicilina, y para verificar que el tamaño del inserto y del plásmido correspondiera con lo esperado, se realizó un análisis de restricción con la endonucleasa BglIII, que está presente a ambos flancos del sitio de inserción y también dentro de los insertos; para ello se seleccionaron 4 colonias crecidas en dichas cajas de Petri por cada uno de los tres plásmidos, se sembraron en medio LB y se purificaron por la miniprep alcalina; gracias al análisis *in silico* se esperaban tamaños de bandas de 2,928, 913 y 702 pb para PcK2PA, 2,928, 773 y 635 pb para PcK2PB, y para PcK2PC de 2,928 y de 1,349 pb, los cuales son muy similares a los tamaños de las bandas presentes en la Figura 11

para los carriles de los plásmidos 1A, 4A, 1B, 4B, 2C, 3C y 4C, es decir, dos plásmidos positivos para Pck2PA, dos para Pck2PB y tres para Pck2PC. (Figura 11).

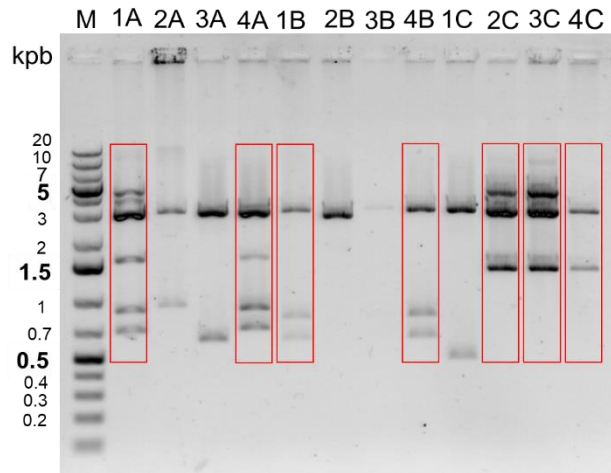


Figura 11. Análisis de restricción con la enzima de restricción BgIII de los plásmidos purificados de las colonias transformantes para los productos de ligación de los ADNc de Pck2Px. Fotografía de gel de agarosa al 0.8% teñido con EtBr. M, marcador de peso molecular para ADN de 1,000 pb; Para el Inserto pck2PA (A) son positivas 1A y 4A, con tres bandas de 2,928, 913 y 702 pb; para el Inserto pck2PB (B) son positivas 1B y 4B con tres bandas de 2,928, 773 y 635 pb, para el Inserto pck2PC (C) son positivas 2C, 3C y 4C con bandas de 2,928 y 1349 pb.

Después de verificar la presencia del inserto en el plásmido y los tamaños, se realizó un nuevo análisis de restricción para los plásmidos positivos, para los insertos Pck2PA y Pck2PC se utilizó la endonucleasa PstI, mientras que para el inserto Pck2PB se utilizaron las enzimas Sall y ClaI. De acuerdo al análisis *in silico* todas las digestiones tuvieron un resultado positivo exceptuando la digestión del plásmido 4C, con el cual se obtuvo un patrón de corte distinto al esperado. Este análisis además permitió identificar la orientación del inserto en los plásmidos (Figura 12).

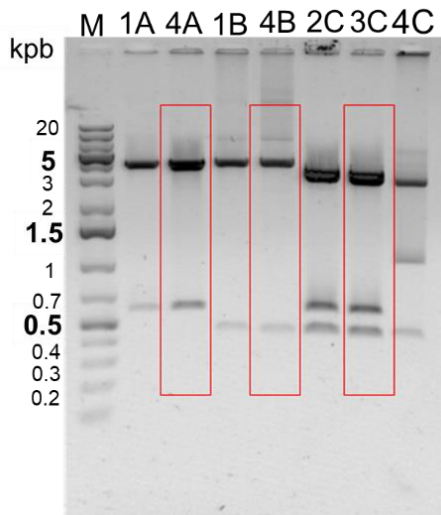


Figura 12. Análisis de restricción de los plásmidos positivos para las clonas Pck2PA-C. M, marcador de peso molecular para ADN de 1,000 pb; pJET1.2 – pck2PA; 1A y 4A, PstI (3,923pb, 620pb); pJET1.2 – pck2PB; 1B y 4B, Sall/ClaI (3,307pb, 1029pb); pJET1.2 – pck2PC; 2C, 3C y 4C, PstI (3,277pb, 577pb, 423pb). Los carriles que están marcados son los tres plásmidos con los que se continuó y realizó la secuenciación. Fotografía de gel de agarosa al 0.8% teñido con EtBr

V. Secuenciación de los tres plásmidos

Ya identificados y corroborada la presencia de los ADNc para las subunidades de los canales K2P del acocil, se seleccionaron tres de ellos, uno para cada subunidad, y se solicitó la secuenciación de los mismos en el Laboratorio de Bioquímica Molecular–UBIPRO, en la FES Iztacala, utilizando los oligonucleótidos en sentido y antisentido del vector pJET1.2/blunt, y se obtuvieron los electroferogramas con los cuales se determinó la secuencia exacta de los tres plásmidos (Figura 13).

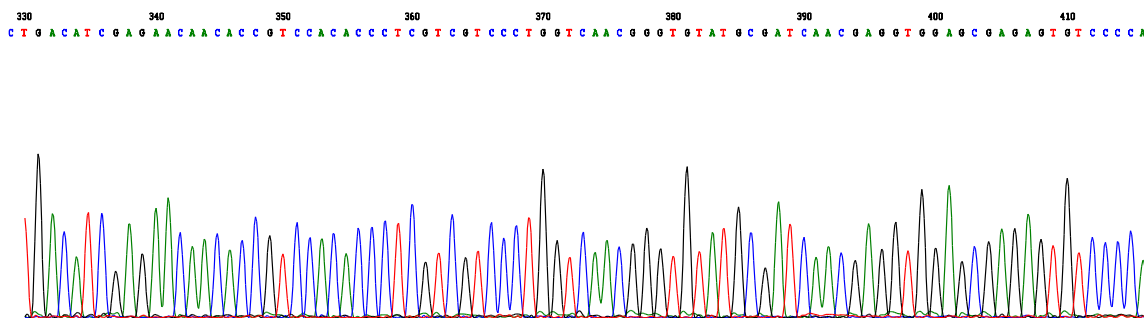


Figura 13. Electroferograma del plásmido pJET1.2 – PcK2PA. Se muestra como ejemplo la secuencia del plásmido pJET1.2 – pcK2PA. Secuenciación por el método de terminación de cadena (Sanger *et al.*, 1997), con nucleótidos acoplados a fluoróforos.

VI. Purificación de los fragmentos clonados en pJET1.2/blunt

Para purificar los fragmentos se realizó la digestión de los tres plásmidos, se escogieron las enzimas de restricción que flanquearan la secuencia de la subunidad para recuperarla del vector. Se usaron los plásmidos 4A, 4B y 2C que fueron los que presentaron una mayor concentración de ADN. Para el plásmido pJET1.2-PcK2PA se utilizaron las enzimas EcoRI y XhoI y se esperaban dos bandas, una del vector de 2,960 pb y una del inserto de 1,583 pb; para el plásmido pJET1.2-PcK2PB se utilizó la enzima EcoRI y se esperaban dos bandas, una del vector de 3,098 pb y una del inserto de 1,238 pb; y para el plásmido pJET1.2-PcK2PC se utilizó la enzima BglII y se esperaban dos bandas, una del vector de 2,928 pb y una del inserto de 1,349 pb, las cuales como se observa en el gel de la Figura 14 están presentes.

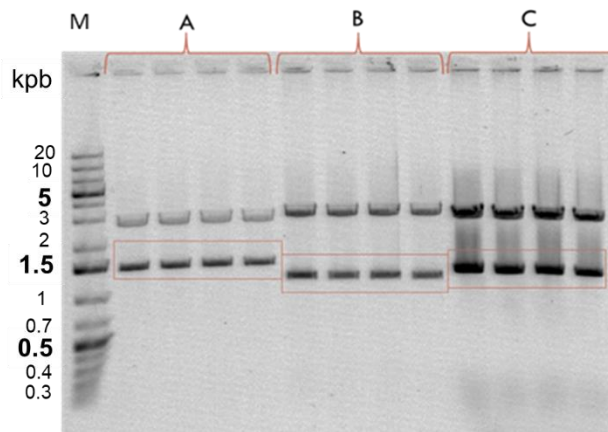


Figura 14. Digestión de los plásmidos. M, marcador de peso molecular para ADN de 1,000 pb; pJET1.2 – Pck2PA; A, EcoRI y XhoI (2,960 pb, 1,583 pb); pJET1.2 – Pck2PB; B, EcoRI (3,098 pb, 1,238 pb); pJET1.2 – Pck2PC; C, BglII (2,928 pb, 1,349 pb). Fotografía de gel de agarosa al 0.8% teñido con Sybergold.

Una vez purificados los insertos por escisión de gel, se digirió el vector de expresión pIRES2-EGFP con las mismas enzimas que los plásmidos con pJET1.2/blunt para obtener los extremos cohesivos apropiados para poder ligar los insertos con el vector; de tal forma, el vector pIRES2-EGFP se digirió con EcoRI/XhoI para ligarlo al inserto Pck2PA, con EcoRI para ligar el inserto Pck2PB y con BglII para ligar el inserto Pck2PC; para las tres digestiones el tamaño esperado de la banda era de 5,300 pb que es el tamaño del vector (Figura 15). En estos dos últimos casos se incubaron las digestiones con 1 U de fosfatasa alcalina de ternera (FastAP, ThermoFisher Scientific) por 1 h a 37 °C con el fin de evitar la presencia de falsos positivos, esto es moléculas del vector recircularizadas sin inserto alguno.

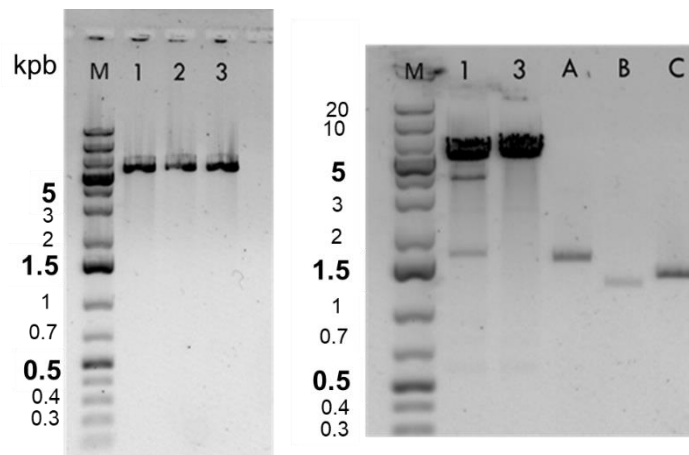


Figura 15. Verificación de los tamaños de las bandas esperados para las digestiones de los plásmidos con pJET1.2/blunt y del vector pIRES2-EGFP. M, marcador de peso molecular para ADN de 1,000 pb; 1, pIRES2-EGFP con EcoRI y XhoI (5.3 kpb); 2, pIRES2-EGFP con EcoRI (5.3 kpb); 3, pIRES2-EGFP con BglII (5.3 kpb); A, Pck2PA, (1,583 pb); B, Pck2PB (1,238 pb); C, Pck2PC (1,349 pb). Fotografía de gel de agarosa al 0.8% teñido con EtBr.

VII. Construcción de los plásmidos con el vector de expresión pIRES2-EGFP

Se realizó la ligación de los insertos pck2PA y pck2PC al vector de expresión pIRES2-EGFP esperándose, de acuerdo al análisis *in silico*, tamaños de bandas de 6,875 y 6,657 pb para los plásmidos pIRES2-Pck2PA y pIRES2-Pck2PC respectivamente, como se puede observar en la fotografía del gel en la Figura 16. Con estas reacciones se transformaron bacterias *E. coli* competentes que se sembraron en placas de medio LB–agar con kanamicina. En cuanto a la ligación del inserto Pck2PB con el vector no se obtuvieron resultados positivos, lo cual se explicará más adelante. Posteriormente, debido a la presencia de una cantidad similar de colonias de bacterias en las cajas de Petri donde se sembraron bacterias transformadas con el control de la ligación, es decir únicamente el vector sin la capacidad de ligarse sobre sí mismo, se realizó un tamizaje por amplificación por la PCR utilizando los mismos oligonucleótidos específicos para comprobar que el plásmido (vector pIRES2-EGFP ligado a los insertos Pck2PX) haya transformado a las bacterias antes de ser purificado por miniprep alcalina usando el “kit” anteriormente mencionado; se tamizaron ocho colonias para cada uno de los insertos Pck2PA y Pck2PC y de acuerdo al análisis *in silico* se esperaban longitudes de 1,539 y 1,303 pb respectivamente, las cuales se asemejan a lo obtenido (Figura 17).

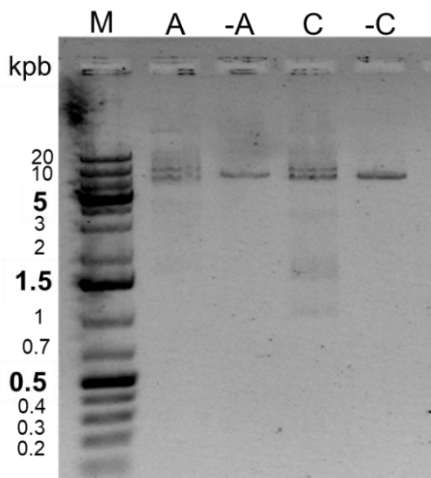
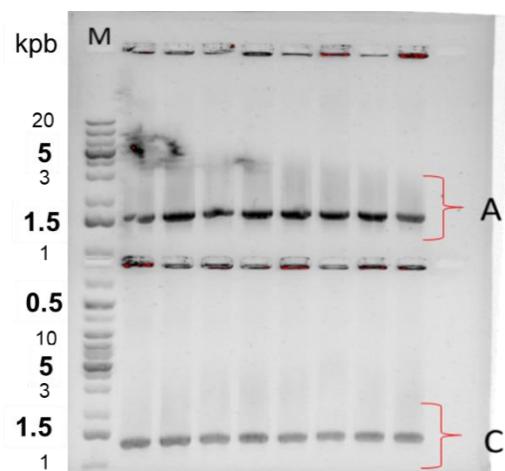
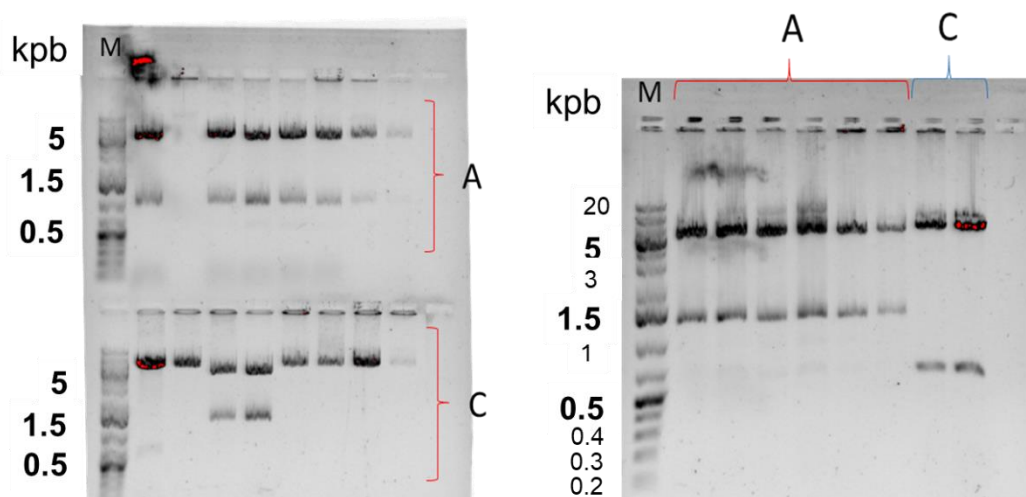


Figura 17. Tamizaje por PCR de las colonias con los plásmidos pIRES2 – Pck2PA y pIRES2 – Pck2PC. M, marcador de peso molecular de 1,000 pb; A, Amplificado del inserto Pck2PA (1,539 pb); C, Amplificado del inserto Pck2PC (1,303 pb). Fotografía de gel de agarosa al 0.8% teñido con EtBr.

Figura 16. Ligación de pIRES-EGFP – Insertos pck2pX. Fotografía de gel de agarosa al 0.8% teñido con EtBr. M, marcador de peso molecular; A, pIRES2 – Pck2PA (6,875pb); C, pIRES2 – Pck2PC (6,657pb) –A y –C, Controles negativos que presentan un fragmento de 5,300 pb correspondiente al tamaño del vector pIRES-EGFP.



Ya que el tamizaje por la PCR de las colonias comparado con el análisis *in silico* indicó que todas las colonias analizadas resultaron positivas, se sembraron las mismas colonias en cajas con agar-LB y kanamicina para posteriormente purificar los plásmidos, usando en este caso un “kit” de purificación por lisis alcalina; estos plásmidos fueron caracterizados por medio de análisis de restricción. Para el plásmido pIRES2-PcK2PA se utilizó la enzima BamHI, esperándose de acuerdo al análisis *in silico* dos bandas, una de 5,850 pb y otra de 1,025 pb, con lo cual se obtuvieron seis plásmidos positivos al presentar las bandas los tamaños esperados. Mientras que para el plásmido pIRES2-PcK2PC se usó la enzima XhoI esperándose también dos bandas, una de 5,319 pb y la segunda de 1,338 pb obteniéndose solo dos plásmidos positivos (Figura 18). Se realizó un segundo análisis de restricción ahora solo con los plásmidos positivos en el análisis de restricción anterior, para pIRES2-PcK2PA se usó la enzima PstI y se esperaban dos bandas de 5,560 pb y 1,315 pb y para el plásmido pIRES2-PcK2PC también se esperaban dos bandas de 6,100 pb y 557 pb con la enzima BspEI, siendo todos los plásmidos positivos debido a que los tamaños de las bandas en el gel de dichas digestiones en la fotografía del gel de la Figura 19 tiene el tamaño esperado por el análisis *in silico*. Finalmente se obtuvieron dos plásmidos: pIRES2-PcK2PA de 6,875 pb y pIRES2-PcK2PC de 6,657 pb (Figura 20).



Figuras 18 y 19. Análisis de restricción de los plásmidos pIRES2-PcK2PA y pIRES2-PcK2PC. M, marcador de peso molecular; A, plásmido pIRES2-PcK2PA; C, plásmido pIRES2-PcK2PC. Del lado izquierdo se observa el primer análisis de restricción; para el plásmido A se esperaban dos bandas con la digestión con BamHI, una de 5,850 pb y otra de 1,025 pb, mientras que para C usando la enzima XhoI se obtuvieron también dos bandas, una de 5,319 pb y otra de 1,338 pb. Del lado derecho se presenta el segundo análisis de restricción para el plásmido A se esperaban dos bandas, una de 5,560 pb y otra de 1,315 pb con la enzima PstI, mientras que para C usando la enzima BspEI se obtuvieron también dos bandas, una de 6,100 pb y otra de 557 pb. Fotografía de gel de agarosa al 0.8% teñido con EtBr.

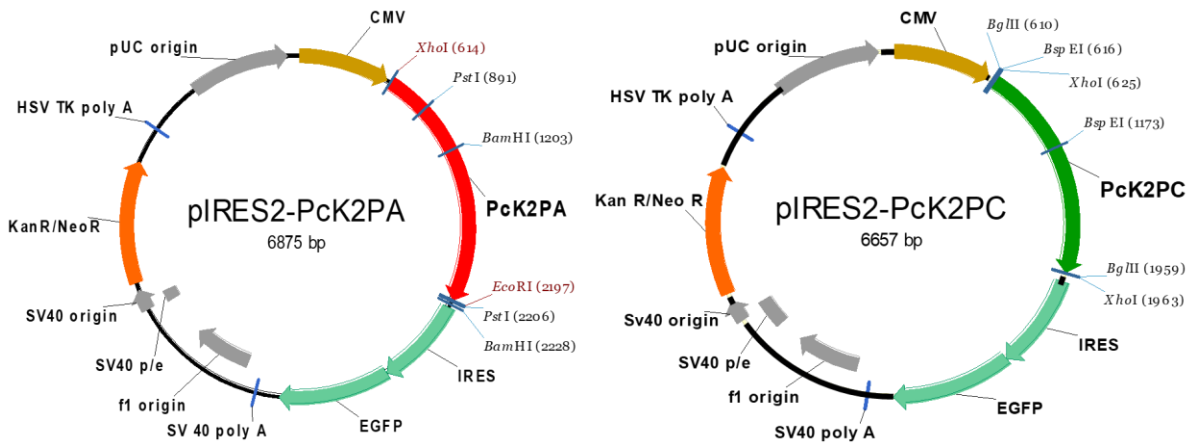


Figura 20. Construcción de los plásmidos pIRES2 – PcK2PA (6,875 pb) y pIRES2 – PcK2PC (6,657 pb). De color negro se muestra la región que corresponde al vector de expresión pIRES2-EGFP, de color rojo al inserto PcK2PA y de color verde al inserto PcK2PC. Además, se muestran las enzimas de restricción y su posición que se utilizan en este trabajo.

Debido a que los sitios de restricción presentes en el plasmido pJET1.2–PcK2PB no son útiles para la subclonación de este ADNc en el vector pIRES2–EGFP, razón por la cual la ligación del inserto PcK2PB y el vector de expresión nunca fue positiva, se realizó una subclonación en el vector de clonación pBluescript II KS(-), previo a la subclonación en el vector de expresión pIRES2–EGFP, para aprovechar los sitios de restricción presentes en el sitio múltiple de clonación del vector pBluescript II KS(-) y con ellos facilitar la ligación al vector pIRES2–EGFP. Por ello, se digirió el vector pBluescript II KS(-) con la enzima EcoRI para tener los extremos cohesivos que pudieran unirse al inserto PcK2PB digerido con la misma enzima previamente, ambas cadenas de ADN fueron ligadas y el plasmido resultante de 4,196 pb fue transformado en células competentes de *E. coli*, posteriormente purificado y caracterizado por medio de un análisis de restricción con la enzima Sall, para el cual, el análisis *in silico* resultaba en dos bandas, una de 3,191 pb y la segunda de 1,005 pb las cuales se pueden apreciar en solamente tres plásmidos en el gel de la Figura 21.

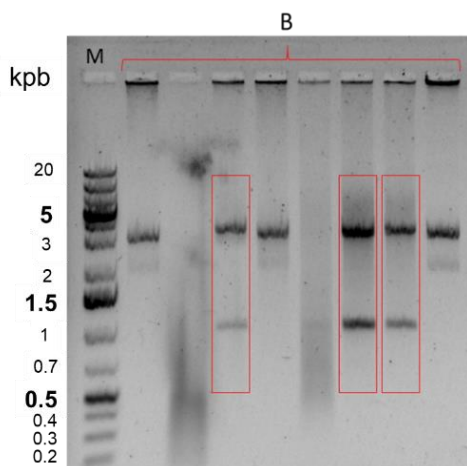
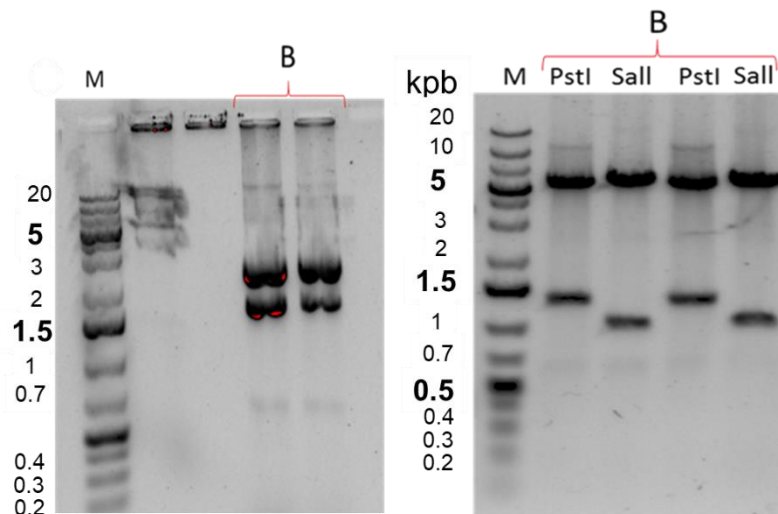


Figura 21. Análisis de restricción del plásmido pBlueScript–PcK2PB. M, marcador de peso molecular de 1 kpb; B, plásmido PcK2PB (3,191 pb, 1,005 pb). Solo se obtuvieron tres colonias positivas que cumplían con el patrón esperado para la enzima. Fotografía de gel de agarosa al 0.8% teñido con EtBr.

Una vez comprobada la identidad del plásmido a través del análisis de restricción, se digirió el plásmido con las enzimas XbaI y XhoI, cuyos sitios de corte se sitúan flanqueando el inserto, en tanto que el vector pIRES2–EGFP fue digerido con NheI y XhoI para generar los extremos compatibles y se logró la ligación generando el plásmido pIRES2–PcK2PB. Una vez transformado el plásmido y purificado se realizó un análisis de restricción para comprobar la identidad con la enzima Bsu36I, esperándose de acuerdo al análisis *in silico* tres bandas, una de 2,567 pb, la segunda de 2,388 pb y una tercera de 1,632 pb; solamente dos plasmidos coincidieron con dicho patrón como se observa en el gel de la Figura 22. Para dichos plásmidos positivos se realizó un segundo análisis de restricción, ahora con las enzimas Sall y PstI por separado; para la primer enzima se obtuvieron tres bandas, una de 5,550 pb, otra de 1,005 pb y la última de 32 pb, esta última debido al tamaño no se puede ver en la fotografía del gel; para la enzima PstI se obtuvieron dos bandas, la primera de 5,289 pb y la segunda de 1,298 pb, ambos patrones coinciden con lo esperado con el análisis *in silico* por lo que las cuatro digestiones fueron positivas (Figura 23). Finalmente se puede indicar que se obtuvo el plasmido pIRES2–pcK2PB de 6,587 pb ya que estos patrones de digestiones coinciden con los esperados (Figura 24).



Figuras 22 y 23. Análisis de restricción del plásmido pIRES2 – PcK2PB. M, marcador de peso molecular de 1 kpb; B, plásmido pIRES2–PcK2PB. Del lado izquierdo se observa el primer análisis de restricción con la enzima Bsu36I, obteniéndose una banda de 2,567 pb, una de 2,388 pb y una tercera de 1,632 pb. Se obtuvieron dos plásmidos positivos. Del lado derecho se presenta el segundo análisis de restricción para los plásmidos previamente positivos. Para la enzima PstI se obtuvieron dos bandas, una de 5,289 pb y la segunda de 1,298 pb; para la enzima Sall fueron tres bandas las obtenidas una de 5,550 pb, otra de 1,005 pb y una tercera de 32 pb que no se distingue por su tamaño, siendo ambos plásmidos positivos. Fotografía de gel de agarosa al 0.8% teñido con EtBr.

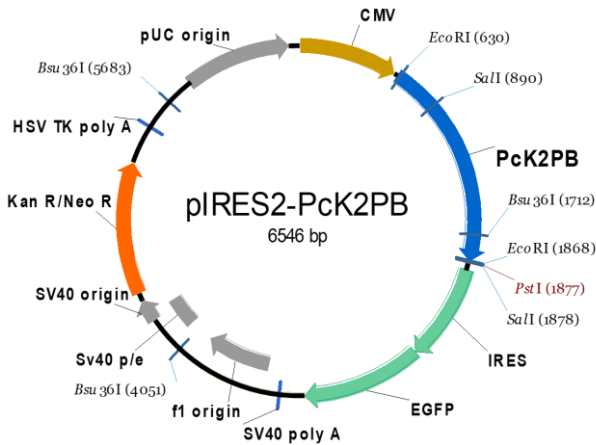


Figura 24. Construcción del plásmido pIRES2 – PcK2PB (6,587 pb). De color negro se muestra la porción que corresponde al vector de expresión pIRES2 - EGFP, de color azul el inserto PcK2PB. Además, se muestran las enzimas de restricción que se utilizaron en este trabajo y su posición.

VIII. Purificación de los tres plásmidos pIRES2 – PcK2PA, pIRES2 – PcK2PB y pIRES2 – PcK2PC.

Una vez identificados y caracterizados los tres plásmidos, una alícuota de cada uno de ellos se usó para transformar bacterias competentes de *E. coli* y a partir de las colonias que se expandieron, se purificaron los plásmidos por miniprep por columna a los cuales se les realizaron análisis de restricción con la enzima PstI para comprobar la identidad de los tres plásmidos finales; de acuerdo al análisis *in silico*, para el plásmido pIRES2–pck2PA se esperaban bandas de 5,560 pb y de 1,315 pb, para el plásmido pIRES2–pck2PB se esperaban bandas de 5,289 pb y de 1,298 pb y para el plásmido pIRES2–pck2PC se esperaban bandas de 5,528 pb, de 706 pb y de 423 pb, dichas bandas se pueden apreciar en la Figura 25. De esta manera se caracterizaron los tres plásmidos a través del análisis de restricción.

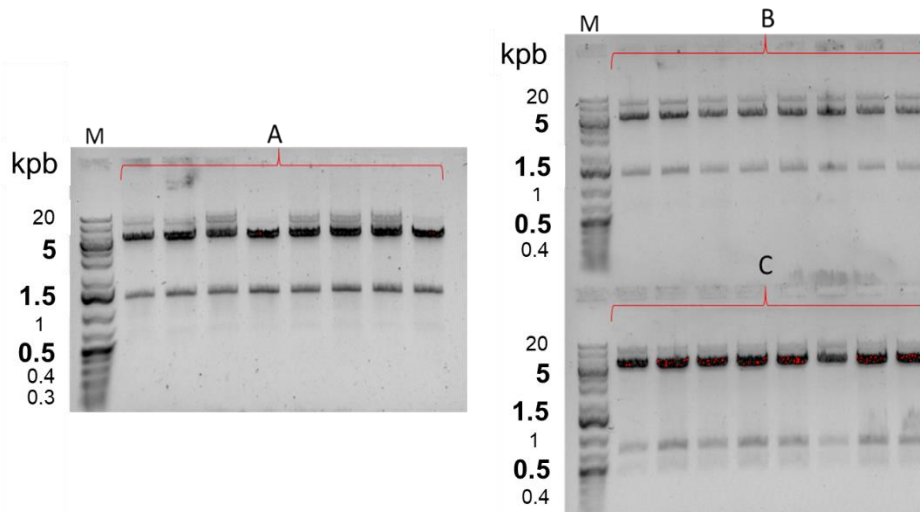


Figura 25. Análisis de restricción de los plásmidos pIRES2–PcK2PA, pIRES2–PcK2PB y pIRES2–PcK2PC con la enzima PstI. M, marcador de peso molecular; A, plásmido pIRES2 – pcK2PA (5,560 pb y 1,315 pb); B, plásmido pIRES2 – pcK2PB (5,289 pb y 1,298 pb); C, plásmido pIRES2 – pcK2PC (5,528 pb, 706 pb y 423 pb). Fotografía de gel de agarosa al 0.8% teñido con EtBr.

IX. *Análisis in silico de las secuencias de aminoácidos predichas para las subunidades Pck2P*

Como se mencionó con anterioridad existen regiones dentro de la secuencia de subunidades para canales K2P que son distintivas. La Figura 26 muestra las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de los datos de secuenciación de las tres subunidades, donde se resalta la presencia de los cuatro dominios transmembranales (TM1–TM4) identificados con el programa de predicción de hélices transmembranales en proteínas TMHMM Server v.2.0 (Krogh *et al.*, 2001; Sonnhammer *et al.*, 1998; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) y los dos dominios de poro (P1 y P2); las secuencias predichas de aminoácidos tienen longitudes de 417 aminoácidos (aa), 358 aa y 402 aa para las subunidades A, B y C, respectivamente.

Figura 26. Análisis *in silico* de los dominios característicos de canales K2P de las tres secuencias de aminoácidos predichas de subunidades de Pck2P. Se muestra la secuencia de aminoácidos predichos para las subunidades Pck2PA–C, donde se pueden ver dentro de recuadros color azul los cuatro dominios transmembranales (TM1–TM4) y dentro de recuadros color negro los dos dominios de filtro de selectividad para K⁺ (P1 y P2); estos dominios están presentes en las tres subunidades. De color azul se muestran los aminoácidos ácidos, de color rosa los básicos, de color verde los polares sin carga y de color rojo los no polares o hidrofóbicos.

```

pcK2PA      -----MDSHQSVVLCVVYAMFLMLGGVMFMFLEHEMSETI      35
pcK2PB      MVDGKMVSETLKNMYP SQLPTLTKMAKSNLRLLAYIVLYLIFLVLGAAIFSAIEAP--DEI      58
pcK2PC      -----MKKQNVRTVSLIVCTFTYLLVGA AVFDALESEHER--      35
              .. : : * : : : * : : : * : : : * : : :
                    TM1

pcK2PA      EVTEPPEWTRLKEVALQVEPPPDEGELLSLALWLPKACPD IENNTVHTLVVPGQRVYAIN      95
pcK2PB      EMMRAIRRRRS-----KFLLDFFC--ISDSLEELIVEI-----IS      92
pcK2PC      -----RKSELLFEIEKQLKEN-----YSIEESDY--LLL-----      62
              *                *... *::

pcK2PA      EVERECPHLHVENVTVEVRYPWGFMDALFFSMTVITITIGYGNISPSQAPAQITCILYSLV      155
pcK2PB      ANNRG----VSAAKNVTSEPNWSFGQSFPPSSSTIVITIGYGHVHPLSEGGKIFCIIYAI      148
pcK2PC      -----ETVVLQGVPHKAGQQWKFAGAFYYATTVLTITIGYGHSTPNTVSGKVFTILYAMV      116
              * * : : : : * : : : * : : : * : : :
                    P1                TM2

pcK2PA      GIPLTGILLAWSSEFFG-EQ--LFKLFKSKLDVQKQHSRGVIMATAIYIFIGFV-VFIF      211
pcK2PB      GIPMTFILLTALVERLLL PATWLLYWLNSKLGHL YQ-PFNI RVFH LAIVGVIAFV-LFMV      206
pcK2PC      GIPLCLVLFHSGIGERLNMVSSIAIRHIKKILKQD TDATEID---LI-LVVTTLSTITIT      172
              ***: :*: * : : : : * : : : : : : :
                    TM3

pcK2PA      IPGAVFVTL E-EWTVVESIYYAYITLTTIGFGDLVPGQGYD GW-SLYIYQICVILWVLIG      269
pcK2PB      FPSLIFAKLEPGWDFLDSL YYCFISLTTIGLGDYIPGDAQDQP-MRPLYKV CITGYLLLG      265
pcK2PC      SGAAVFSRYE-RWSYFDSVYYCVITLTTIGFGDMVALQKDHALDQKPEYVAFALIFILFG      231
              . : * * * : : : * : : : * : : : * : : :
                    P2                TM4

pcK2PA      LGYWVMVNFITKALKSKKLQSSVMRS AEEMR---KIMQQMGIKQHDPTFLRQHSKATLN      326
pcK2PB      LTFVMLLLHL YNDI-PQLNLGLFLLRSAEAAPGDPERMRLSGTAGVTPKYTQQHNDQTVR      324
pcK2PC      MAIVAASLNLFVLR F-----VTMNTEDERRDEAEALQAAA-----GAVR      270
              : : : : : : : : : : : : : : : :

pcK2PA      LMLQLS--NIIAVQGGGT DNGIGVNGSG---PSSPGGHSSPASPP-----LSP-I      370
pcK2PB      QNVKVV--SR-----PV--D---SPSPEEDTTPVHAQ-----MPPII      354
pcK2PC      LEGDVITANGSILSGQCPQEGASF TDLTSVCSCTCASCHAFPFRPSYSFRKRSMNLSYIL      330
              . : . . . . . : * : : :

pcK2PA      PGISALFGNGLSR--SAPLSHLMGPMRREENDESKCTEEITT VTVRYKS-----      417
pcK2PB      PGNQ-----      358
pcK2PC      PRRQRRQQRRDQQQQHREQQHQQQMQQREEQE--REREIQTHTDTQEELCSSSESGV      388
              * .

pcK2PA      -----      417
pcK2PB      -----      358
pcK2PC      LHTPTHAQKRNSV      401

```

X. Identidad de las tres subunidades para canales K2P

Una vez deducida la secuencia de aminoácidos e identificados los dominios presentes en las subunidades, se realizó una comparación de cada secuencia con las de las proteínas depositadas en las bases de datos de proteínas del National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), a fin de determinar a qué tipo de canal pertenece tentativamente cada subunidad. De igual forma se realizó un alineamiento múltiple mediante el programa Clustal Ω (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) empleando subunidades provenientes de diferentes especies que se tomaron como representativas.

Para el caso de la subunidad Pck2PA, ésta presenta un 39% de identidad con la secuencia para canal TREK-1 de *Homo sapiens* (número de acceso GenBank NP_001017425.2), un 33% de identidad con la secuencia predicha para el canal TREK-1 del ácaro *Varroa jacobsoni* (número de acceso GenBank XP_022707888.1), un 38% de identidad con la secuencia para canal TREK-2 de *H. sapiens* (número de acceso GenBank sp P57789) y un 36% de identidad con la secuencia para canal TRAAK de *Mus musculus* (número de acceso GenBank AF056492.2) (Figura 27).

Por su parte la subunidad Pck2PB tiene un 44% de identidad con la secuencia para canal TWIK-1 de *H. sapiens* (número de acceso GenBank XP_011542486.1), un 64% de identidad con la secuencia predicha para el canal TWIK-1 para la termita *Zootermopsis nevadensis* (número de acceso GenBank XP_021923983.1), un 64% de identidad con la secuencia para canal TWIK-1 de la termita *Cryptotermes secundus* (número de acceso GenBank XP_023727351.1), un 63% de identidad con la secuencia para canal TWIK-1 de la cacerolita de mar *Limulus polyphemus* (número de acceso GenBank XP_022248476.1) y un 62% de identidad con la secuencia para canal TWIK-1 del alacrán de corteza *Centruroides sculpturatus* (número de acceso GenBank XP_023224491.1) (Figura 28).

En tanto que para la subunidad Pck2PC se obtuvo un 52% de identidad con la secuencia para canal TASK-1 del ratón *M. musculus* (número de acceso GenBank AF065162.1), un 70% de identidad con la secuencia para canal TASK-1 de la avispa *Copidosoma floridanum* (número de acceso GenBank XP_023248373.1), un 71% de identidad con la secuencia para canal TASK-1 (KCNK3) de la chinche *Cimex lectularius* (número de acceso GenBank XP_014252976.1), un 52% de identidad con la secuencia para canal TASK-3 de *H. sapiens* (número de acceso GenBank AF212829.1) y un 63% de identidad con la secuencia predicha para el canal TASK-6 para la mosca *D. melanogaster* (número de acceso GenBank NP_650300.2) (Figura 29).

XI. Regiones importantes dentro de las tres secuencias Pck2P

Además de los dominios característicos previamente descritos (TMs, dominios capuchón y dominios de poro), existen otras regiones características que definen el comportamiento y función de esta familia de canales que pueden ser utilizadas como indicios de la identidad de las secuencias. Estas regiones fueron identificadas con ScanProsite (Stand-alone tool to scan PROSITE) (prosite.expasy.org/) y con el alineamiento múltiple.

Dentro de la secuencia Pck2PA se encuentran tres sitios consenso para la *N*-glicosilación (N-X-S/T) en la posición N⁷⁷, N¹⁰⁷ y N³⁴⁸, también se identificaron cuatro sitios blancos para la proteína caseína cinasa II en la S¹⁸⁰, en la T²¹⁸, en la T²²³ y en la S²⁹⁵. Y finalmente se encontraron dos sitios blancos para ser fosforilados por la enzima PKC en la S²⁸⁵ y en la T⁴¹¹(Figura 27).

En la secuencia Pck2PB se encuentran dos sitios consenso para la *N*-glicosilación (N-X-S/T) en la posición N¹⁰³ y N¹⁰⁹, también se identificaron cuatro sitios blancos para la proteína caseína cinasa II en las posiciones S⁵⁰, S⁷⁹, S⁸¹ y S³⁴⁸. Además, se encontraron cuatro sitios blancos para ser fosforilados por la enzima PKC en las T¹⁰, T²¹, T³¹¹ y T³²². Así mismo, se encontró un sitio dependiente de fosforilación por proteína dependiente de AMPc y GMPc en la posición S⁶⁹ (Figura 28).

Finalmente, para la secuencia Pck2PC se encuentran dos sitios consenso para la *N*-Glicosilación (N-X-S/T) en las posiciones N⁵¹, N²⁷⁹ y N³²⁵, también se identificaron 11 sitios blancos para la proteína caseína cinasa II (S³¹, S⁵³, S¹²⁷, T¹⁵⁵, S¹⁷⁹, S¹⁸⁵, T²⁵¹, S²⁹³, T³⁷¹, T³⁷⁵ y S³⁸²). Además, se encontraron dos sitios blancos para ser fosforilados por la enzima PKC en la S¹⁰⁵ y en la S³¹⁸. Otros sitios que se encontraron fueron los blancos de fosforilación por proteína dependiente de AMPc y GMPc en las posiciones S³⁸, S³²³ y S⁴⁰⁰. Por último, se encontraron tres sitios sensibles a *N*-miristoilación en las posiciones G¹¹⁷, G²⁸⁰ y G²⁹¹ (Figura 29).

pcK2PA	QLSNIIAVQGGGTDNGIGVNGSGPSSPGGHSSPASPLSPIPGISALFGN-----GLSR-	383
hTREK-1	KLS---AELAGN-----HNQELTPCRRTLSVNH-----TS-----ERDV-	395
vTREK-1	-ES---EREGGCG-----TY--KAV--LSGRPGSRVTIVEHPNSESSESGDIERL	355
hTREK-2	MER---RRLGLDQ-----RAHSLDMLSPEKRSVFAALD-----TGRFKASSQES-	415
mTRAAK	SLP---AP-----PAVVEPAGRPGSPAPA-----E-KVETPSPT-	338
pcK2PA	-----SAPLSHLMG--PMRREENDESKCTEEIT-----TVTVRYKS--	417
hTREK-1	-----LPPLL-KTESIYLN-----LTPHCAGEEI-----AVIENIK-----	426
vTREK-1	LTLVEVLKEESSQNLFRTKQLLEDTERDLLSFCREDSASSAGGIALSHIPSTTNRHSLP	415
hTREK-2	-----IN--N-RPNLRLKGPQLNKHGQGAEE-----DNIINKFGSTSRLLTKRKN	458
mTRAAK	-----ASALDYPSENLAFIDESSDTQSERGCAL-----PRAPRGRRRPN	377
pcK2PA	-----	417
hTREK-1	-----	426
vTREK-1	VLLTPSPPTSGDLSLGDVGPVSVGAGAISSSTGNTNLMSPRAEFASSPGNASLLGRSFQSF	475
hTREK-2	KDLKKTLL-----PEDVQKIYKTFRNY	479
mTRAAK	PSKKPSR-----PRGPGRL-----	391
pcK2PA	-----	417
hTREK-1	-----	426
vTREK-1	LYRKRPDILDLESGGGQKNNSNASHRMASNRGNSSH--SDGSAVGSCGPAPRHRDSNLNR	533
hTREK-2	SLDEEKKEEETE--KMCNSDNSSTAMLDCIQQAELENGMI---PTDTKDREPENNS	532
mTRAAK	-----RDKAV--PV-----	398
pcK2PA	-----	417
hTREK-1	-----	426
vTREK-1	-FDRVNGFDQLDELGALDADLESSRM	558
hTREK-2	LLEDNR-----	538
mTRAAK	-----	398

Figura 27. Alineamiento múltiple entre la secuencia de aminoácidos predicha para Pck2PA y secuencias de subunidades de la subfamilia de canales TREK. Las secuencias con las que se comparó provienen de *H. sapiens* (hTREK-1 y hTREK-2), *V. jacobsoni* (vTREK-1), y *M. musculus* (mTRAAK). Las regiones se resaltan con recuadros de distintos colores, con líneas solidas las pertenecientes a Pck2PA y con líneas punteadas a las de las secuencias de referencia. De color azul se muestran las hélices transmembranales (TM1-TM4). De color morado se muestran las hélices extracelulares (E1-E2). De color negro los motivos de filtro de selectividad (P1-P2). De color rojo la C⁷³ que forma puentes disulfuro. Con flechas azules el W²⁶⁴ y el E²⁹⁹, claves en la apertura del canal y la T³²⁴, clave para la sensibilidad a halotano. De color verde los sitios de *N*-glicosilación. De color dorado los sitios blancos para la proteína caseína cinasa II. De color carmesí los sitios blancos para la proteína PKC. También se observa una línea roja sobre una pequeña secuencia de 14 residuos relacionada a la sensibilidad mecánica.

		TM1	
pcK2PB	MVDGKMVSEFLK N MYP - SQLPFLK AKSNLRLLAYIVLYLIFLVLGAAIFSAIEAPDEIE		59
hTWIK-1	-----MLQSLAGSSCVR LVERFIRSAWCFGLVLG YLLYLVFGAWVFSSVEI PYEDL		51
zTWIK-1	-----MQL -PGFGGVGLNRSTARLLVLAALYILFVLGAAIFSAIEGPEEAQ		46
lTWIK-1	-----MFISKSNRLIVLTAFYLLFLVIGASIFSAIEAPKEID		38
cTWIK-1	-----MKL -PGLGGVGLNRSTARLLVLAALYILFVLGAAIFSAIEGPEEAQ		46
eTWIK-1	-----MGM SKSNVRLFILSAFYILFVLVIGASIFSAIEAPQEQIN		38
	: * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *		
	E1 E2		
pcK2PB	MMRAIRRRRSKFLLDFFCTSDSDEELIVEIISANNRGVSAAKNVTSEPNW SFGQSFFFS		119
hTWIK-1	LRQELRKLKRRFLEEHECSEQQLEQFLGRVLEASNYGVSVLSNASGNWDFTSALFFA		111
zTWIK-1	RVKQLRQLRRKFLVNHKCVSDDDEKLIIEVVKASNRGVSAARNVSGEPNWSFGQSLFFS		106
lTWIK-1	IIRSLRNRRRAKFLQDHSCDKDEDEELIVEIIRANNRGVSAANNVTMEPNWSFGQSFFFS		98
cTWIK-1	RVKQLRQLRRDFLLDHKCVRDDDEKLIIEVVKASNRGVSAARNASGEPNWSFGQSLFFS		106
eTWIK-1	IIRNLRLNRSQFLQENTCKDDEEYLVIVTINANNRGVSAVNNVTMEPNWSFGQSLFFS		98
	: * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *		
	P1 TM2		
pcK2PB	STIVTITIGYGHVHPLSEGGKIFCIIYAIIGIPMTFILLTALVERLLL PATWL -LYWLN SK		178
hTWIK-1	STVLSITTYG YHTVPLSDGGKAF CIIYSVIGIPFTLLFLTAVVQRITVHVTRRPVLYFHIR		171
zTWIK-1	STVVTITIGYGHV TPLSKGGKIFC ILYAMLGIPLT LVLLTALVERLMVPTTML -LQCLNSR		165
lTWIK-1	GTVVTITIGYGHV TPLSKGGKMF CVLYGLGIPLTL LLLTAYVERLMIPTTWI -LHFLNSK		157
cTWIK-1	STVVTITIGYGHV TPLSKGGKIFC ILYAMLGIPLT LVLLTALVERLMVPTTML -LQCLNSR		165
eTWIK-1	STVITITIGYGHV TPLSEGGRVFCIVYALIGIPITL LLLTAYVERLMIPTTLC -LOFLNSR		157
	* : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
	TM3 P2		
pcK2PB	LGHLYOPFNIRVFH LAIVGVIAFVLFMVFP S LIFAKLEPGWDFLDSLYYCFISLTTIGLG		238
hTWIK-1	WGF - -SKQVVAIVHAVLLGFVTVSCFFFIPAAVFSVLEDDWNFLESFYFCFISLSTIGLG		229
zTWIK-1	LGHLYOPFNIRLLHLFLVGSLLVCLFFLTPAAFFATLEPEWDFLDSLYYCFISLTTIGLG		225
lTWIK-1	LGHLYOPFNIRMLHFSIIAAAILAFFFLIPAAIFSYLEPDWDYLDYLYYCFISLTTIGLG		217
cTWIK-1	LGHLYOPFNIRLLHLFLVGSLLVCLFFLTPAAIFATLEPEWDFLDSLYYCFISLTTIGLG		225
eTWIK-1	LGHLYOAFHIRILHLSVGVLVVLVFFFIPAGIFAYLEPDWDYLDYLYYCFISLTTIGLG		217
	* . : : * : : : . : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
	TM4		
pcK2PB	DYIPGDAQDQPMRPLYKVCITGYLLLGLTFVMLLLHLYNDIPQLN-LGLFLLRSAEAAPG		297
hTWIK-1	DYVPGEGYNQKFRRELYKIGITCYLLLGLIAMLVVLETFCELHELKKFRKMFYVKDKDED		289
zTWIK-1	DYIPGDSPNQPYRPIYKVATTGYLLVGLTFMMLTLTVFYDIPQLN-FGLFFLMRSDETTG		284
lTWIK-1	DYIPADNINQKMRPLYKVCATFYLLIGLAFMMLFSLVLYDIPQLN-FSLFFLLKSDQVAG		276
cTWIK-1	DYIPGDSPNQPYRPVYKVATTGYLLVGLTFMMLTLTVFYDIPQLN-FGLFFLMRSDETTG		284
eTWIK-1	DLIPGDSSHQDYRPLYKVCTTGFLLIGLTFMMLFLATLYDIPQLN-FSLFFLLKSDA-ST		275
	* : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
	↓ ↓		
pcK2PB	DPER-----MRLSG-TAG-VTPKYTQQHNDQTVRQNV--KVSRPVDSPSEEDTPVHA		348
hTWIK-1	QVHII EHDQLSFSISITDQAAGMKEDQKQNEPFVATQSSA-----CVD-----GPNH-		336
zTWIK-1	DPEK-----VRLQT--PGAVGPKYTQQLDG GVGRRAVVRVKSRRDSDSPED-TTPVHA		336
lTWIK-1	DPEK-----MRLAT-ETG--GPKYTQQIDEPTTRHIKAVP----RMDSSSPED-NP----		319
cTWIK-1	DPEK-----VRLQT--PGAVGPKYTQQLDG GIGRRAVVRVKSRRDSDSPED-TTPVHA		336
eTWIK-1	DPEK-----MRLHP-STGMFGPKYTQQIDEPTIRHV KAVP----HPASSSPEE-NP----		320
	: . : : : * : * : : *		
pcK2PB	QMPPIIPGNQ 358		
hTWIK-1	----- 336		
zTWIK-1	RP----- 338		
lTWIK-1	----- 319		
cTWIK-1	RP----- 338		
eTWIK-1	----- 320		

Figura 28. Alineamiento múltiple entre la secuencia de aminoácidos predicha para Pck2PB y secuencias de subunidades de la subfamilia de canales TWIK. Las secuencias con las que se comparó provienen de *H. sapiens* (hTKIK-1), *Z. nevadensis* (zTWIK-1), *L. polyphemus* (ITWIK-1), *C. secundus* (cTWIK-1) y *C. sculpturatus* (eTWIK-1). Las regiones se resaltan con recuadros de distintos colores; con líneas sólidas las pertenecientes a Pck2PB y con líneas punteadas a las de las secuencias de referencia. De color azul se muestran las hélices transmembranales (TM1-TM4). De color morado se muestran las hélices extracelulares (E1-E2). De color negro los motivos de filtro de selectividad (P1-P2). De color rojo la C⁷⁷ que forma puentes disulfuro y la H¹²² relacionada con la sensibilidad al pH. Con flechas azules la K³¹³ y la K³²⁸ y un par de I³⁵³⁻³⁵⁴, claves para la degradación por endosomas. De color verde los sitios de N-glicosilación. De color dorado los sitios blancos para la proteína caseína cinasa II. De color carmesí los sitios blancos para la proteína PKC.

Figura 29. Alineamiento múltiple entre la secuencia de aminoácidos predicha para pck2PC y secuencias de subunidades de la subfamilia de canales TASK. Las secuencias con las que se comparó provienen de *M. musculus* (mTASK-1), *C. floridanum* (cTASK-1), *C. lectularius* (iTASK-1), *H. sapiens* (hTASK-3) y *D. melanogaster* (dTASK-6). Las regiones se resaltan con recuadros de distintos colores; con líneas sólidas las pertenecientes a Pck2PC y con líneas punteadas a las de las secuencias de referencia. De color azul se muestran las hélices transmembranales (TM1-TM4). De color morado se muestran las hélices extracelulares (E1-E2). De color negro los motivos de filtro de selectividad (P1-P2). De color rojo las H⁷² y H⁹⁸ cruciales para la sensibilidad al pH. De color verde los sitios de N-Glicosilación. De color carmesí el sitio blanco para la proteína PKC. También se observa una línea roja sobre una pequeña secuencia de 6 residuos relacionada a la sensibilidad al halotano.

XII. Análisis filogenético

Con las tres secuencias putativas (pcK2PA-C), algunas de las secuencias de referencia utilizadas previamente y otras secuencias de canales de otras subfamilias, se realizó un cladograma que muestra la relación entre las subunidades formadoras de canales K2P y las tres secuencias putativas. El análisis evolutivo se realizó en MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) (Figura 30)

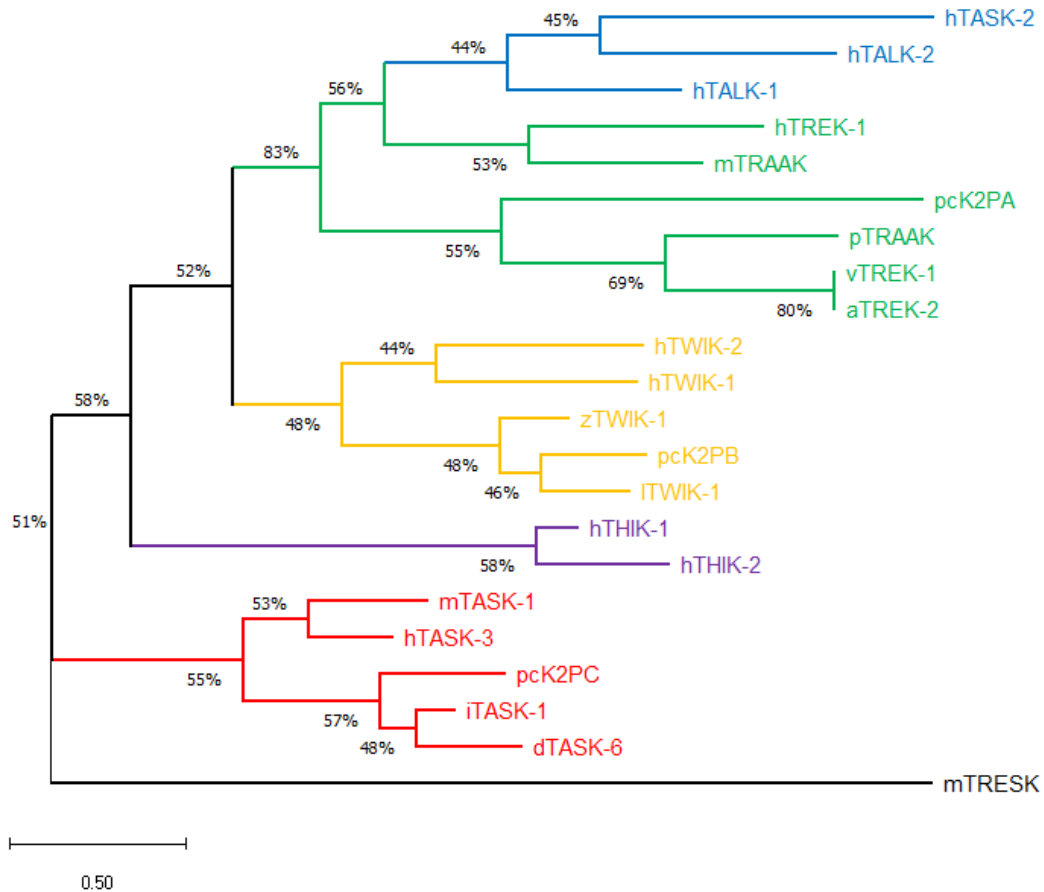


Figura 30. Análisis evolutivo por el método de máxima probabilidad. La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de máxima probabilidad basado en el modelo de matriz JTT (Jones *et al.*, 1992). Se muestra el árbol con la más alta probabilidad (log -18142.29). El porcentaje de árboles donde los taxones fueron agrupados se muestra junto a las ramas. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo mediante la aplicación del método de Neighbor-Join a una matriz de distancias pareadas las cuales se estimaron mediante el método de JTT y se seleccionó la topología con más alta probabilidad. El árbol se dibujó a escala, con longitudes de ramas medidas respecto al número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 22 secuencias de aminoácidos. Existió un total de 699 posiciones en el último conjunto de datos.

DISCUSION

En el presente trabajo se clonaron, a partir del ARN aislado del tallo ocular del acocil *P. clarkii*, tres ADNc que potencialmente codifican para subunidades integrantes de la familia de canales K2P en ese organismo. Las subunidades fueron denominadas Pck2PA, Pck2PB y Pck2PC. Los canales K2P constituyen la familia de canales de K⁺ más joven descubierta hace casi 20 años (Manfrin *et al.*, 2014). Desde su descubrimiento, ha existido un creciente interés en esta familia con estudios experimentales reportados desvelando progresivamente sus funciones. Estos canales son responsables de una diversidad de corrientes de fuga en las neuronas y otros tipos de células que dan por resultado la modulación del potencial de reposo y la excitabilidad (Jezzini *et al.*, 2006).

Las secuencias clonadas fueron seleccionadas mediante el alineamiento con secuencias de otros organismos tales como *D. melanogaster*, *Aplysia sp.*, *Rattus norvegicus* y *C. elegans*, utilizando como criterios las siguientes características: 1) la presencia del motivo TXGYG que determina la selectividad del canal; y 2) una topología predicha con cuatro segmentos transmembranales. Con estos criterios se eligieron las tres secuencias candidatas a clonar y posteriormente a caracterizar.

El análisis de las secuencias de cada una de las subunidades clonadas permitió determinar que el marco abierto de lectura para Pck2PA contiene 1,254 pb que codifican una proteína de 417 aa, para Pck2PB el marco de lectura es de 1,077 pb que codifica para 358 aa y para la subunidad Pck2PC el marco de lectura es de 1,206 pb que codifican para 401 aa. Como lo reporta Lotshaw (2007), la secuencia deducida de aminoácidos para canales K2P está entre los 300 y 500 aminoácidos, y exhiben una topología similar que consiste en un extremo amino terminal intracelular seguido por cuatro dominios transmembrana (TM1-TM4) y un extremo carboxilo terminal largo también citosólico. Como puede verse en la Figura 26, estas regiones terminales y los cuatro dominios transmembranales se encuentran, por lo que las tres secuencias presentan la topología descrita previamente, confirmando la identidad putativa de las tres subunidades.

También, dentro de la estructura primaria de las subunidades se puede distinguir que las regiones que están entre los cuatro dominios TM son secuencias cortas, a excepción de la secuencia que une TM1 y TM2, que es de alrededor de 80 aa y dentro de las cuales se presenta el primer dominio de poro (P1) como lo describe Lotshaw (2007) para todos los canales K2P. Parte de esta región entre TM1 y TM2 es extracelular y en ella se encuentran secuencias consenso para la N-glicosilación (N-X-S/T) en la posición

N⁷⁸ y N¹⁰⁸ para la subunidad Pck2PA, en la posición N¹⁰³ y N¹⁰⁹ para la subunidad Pck2PB y en la posición N⁵¹ para la subunidad Pck2PC, como lo reporta Lotshaw (2007), al igual que menciona que los canales K2P en esta región también presentan residuos de Cys a excepción de los canales TWIK-2, TASK-2 y los pertenecientes a la familia TASK o THIK; estos residuos de Cys, que pueden formar enlaces disulfuro útiles para la dimerización de dos subunidades para canales K2P, para la subunidad Pck2PA son la C⁷³ y la C¹⁰¹, para la subunidad Pck2PB es la C⁷⁷, en tanto que la subunidad Pck2PC no presenta este residuo (Figuras 27, 28 y 29). Esta dimerización atribuida a esta región forma una hélice α anfipática que media la interacción entre subunidades (Lotshaw, 2007).

De esta manera, canales K2P funcionales se ensamblan formando dímeros en los que cada subunidad aporta dos dominios de poro para formar el filtro de selectividad de acuerdo a la organización estructural conocida de otras clases de canales de K⁺, donde el filtro de selectividad está constituido por cuatro dominios de poro. Así, el ion potasio difunde rápidamente cruzando la membrana a través de los canales de potasio, los cuales, sin excepción, presentan una secuencia de aminoácidos crítica para la selectividad que permite la permeabilidad para K⁺ principalmente. Gracias a experimentos de clonación y mutagénesis se ha comprobado la conclusión de que todos los canales para potasio tienen la misma constitución del poro, y la mutación de esta secuencia crítica puede eliminar la capacidad del canal para discernir entre los iones de K⁺ y Na⁺ (Doyle *et al.*, 1998; Lotshaw, 2007).

Por lo que una vez obtenidas las secuencias de las subunidades se localizaron estos aminoácidos críticos que conforman el motivo de dominio de poro (**T-I-G-X-G**), siendo el primer motivo de selectividad dentro de las subunidades **T-I-G-Y-G** para las tres subunidades, en tanto que el segundo motivo de poro fue **T-I-G-F-G** para las subunidades Pck2PA y Pck2PC, y para la subunidad Pck2PB fue **T-I-G-L-G** (Figura 26).

El dominio de poro es la región más altamente conservada en los canales K2P seguida de las porciones transmembranales, sugiriendo una importante y muy conservada función para este canal, la Thr y la Gly residuales del motivo de selectividad al potasio están completamente conservadas (Jezzini *et al.*, 2004; 2006), lo que confirma la identidad putativa de estas subunidades como canales K2P y que esta región de las subunidades es crítica para la permeabilidad al ion K⁺.

Los iones de K⁺ usualmente atraviesan la membrana desde el medio intracelular ingresando en la cavidad central llena de agua, posteriormente se deshidratan en el filtro

de selectividad debido a los cuatro sitios de unión a K^+ uniformemente espaciados formados por los oxígenos carbonilos de la secuencia TIGXG y la cadena lateral de Thr; así, cuatro iones K^+ pueden unirse a estos sitios donde cada ion se encuentra en medio de dos capas de oxígeno proteico que, debido a su disposición, pueden simular los oxígenos del agua que rodean al ion K^+ en solución, y dado que la energía de transferencia de los iones de la cavidad central al filtro de selectividad es baja, la conducción neta de iones ocurre a velocidades cercanas al límite de difusión (Kuang, *et al.*, 2015).

De esta manera el motivo de dominio de poro que forma el filtro de selectividad actúa como una máquina eficiente que conduce iones de K^+ ; cualquier cambio que influya en la integridad del motivo de dominio de poro puede cambiar su selectividad, por lo que la presencia en duplicado de estos dominios bien conservados en los canales K2P es fundamental.

Ahora bien, otra región característica de los canales K2P es el dominio que conecta la primera hélice transmembranal (TM1) y el primer dominio de poro (P1); esta región típicamente de 56 aa es comúnmente llamada torreta, del inglés *turret* o *cap*. Dicha torreta extracelular contiene dos hélices, E1 y E2, que se extienden aproximadamente 35 Å sobre la membrana lipídica, directamente en la parte extracelular del poro de filtro de selectividad (Miller y Long, 2012). Un residuo de Pro que está conservado en los canales K2P se localiza entre la hélice TM1 y la hélice E1; Miller y Long (2012) reportan que esta Pro para el canal TWIK-1 de humano está la posición 47, mientras que para la secuencia Pck2PA es la P⁵⁵, para la secuencia Pck2PB es la P⁵⁵, en tanto que para Pck2PC dicha Pro no se encuentra (Figuras 27, 28 y 29). Otro residuo conservado en este dominio es la Cys; como ya se mencionó, los residuos de Cys forman puentes disulfuro útiles para la dimerización de subunidades de K2P, el cual es, de acuerdo con Miller y Long (2012) en hTWIK-1, el residuo C⁶⁹, siendo para Pck2PA la C⁷³ y para Pck2PB la C⁷⁷; esta Cys está localizada justo entre las hélices E1 y E2 y aparece en casi todos los canales K2P. Los residuos finales de la hélice E2 se extienden fuera del filtro de selectividad siguiendo una curva pronunciada que se produce por una Gly conservada (G⁸⁹; Miller & Long, 2012), la cual está presente en las secuencias de Pck2PA (G⁸⁸) y Pck2PB (G⁹⁷). De esta manera, las hélices E1 y E2 forman un núcleo hidrófobo en la parte extracelular del poro gracias a la interacción de los aminoácidos hidrofóbicos que las conforman, creando una bifurcación al acceso extracelular de los iones al poro de selectividad conservada en la mayoría de los canales K2P y que explica la incapacidad de algunos bloqueadores clásicos de canales de K^+ para ejercer sus efectos por el lado extracelular (Figuras 27, 28 y 29).

I. Pck2PA

Como ya se mencionó, el alineamiento múltiple con las cuatro subunidades utilizadas como referencia (hTREK-1, hTREK-2, vTREK-1 y mTRAAK) sugiere que la secuencia putativa pck2PA pertenece a la familia de los canales TREK debido a la similitud de 33–39% (Figura 27).

La familia de canales TREK es el grupo de canales K2P mejor estudiados hasta ahora; esta familia fue descubierta en 1996 y produce una corriente de K⁺ rectificadora entrante inhibitoria. Estos canales no presentan una gran actividad bajo condiciones basales, pero pueden ser activados bajo un gran rango de estímulos (Vivier *et al.*, 2015; Levitz *et al.*, 2016).

Vivier *et al.* (2015) reportan sitios característicos dentro de la secuencia del canal TREK-1, específicamente para el extremo carboxilo terminal y su influencia en la compuerta extracelular tipo C a través de la hélice transmembranal TM4; estos sitios son el E³⁰⁶ en el extremo carboxilo y el W²⁷⁵ en la hélice TM4, los cuales dentro de la secuencia Pck2PA, y de manera homóloga, son el E²⁹⁹ y el W²⁶⁴; estos residuos son clave en la respuesta del canal ante la acción de ácidos grasos polinsaturados y su mutación produce un fenotipo que simula la acidosis.

En tanto que en la revisión hecha por Lotshaw (2007) se reporta que la Ser³³³ en TREK-1 (o S³⁴⁸ en una isoforma pequeña de TREK-1) y S³⁶⁴ en el canal TREK-2, son fosforiladas por la PKA, contrario a lo que se muestra en la Figura 27 donde no hay ningún sitio de fosforilación por PKA dentro de la secuencia Pck2PA. En los canales TREK-1 esta fosforilación es importante debido a que inhibe fuertemente el canal y lo convierte de un canal independiente de voltaje con alta probabilidad de apertura a un canal dependiente de voltaje que muestra una baja probabilidad de apertura en potenciales negativos, aunque también se menciona que este residuo o un equivalente no necesariamente aparece en otras especies ortólogas.

De manera similar Lotshaw (2007) también reporta una pequeña secuencia de ocho aminoácidos (298-VISKKTKEE-306), la cual está conservada tanto en TREK-1 como en TREK-2 y está cargada positivamente, que es necesaria para la mecanosensibilidad (parecida la secuencia RKKEEP en el canal MscL de *E. coli* también mecanosensible). En la subunidad Pck2PA se encuentra la secuencia 285-KSKKLQSSVMRSAEE-299, que por la presencia de tres K y una R se encuentra cargada positivamente y podría cumplir la función de mecanosensibilidad reportada; además la S²⁸⁶ es un sitio de fosforilación para la PKC, la S²⁹⁶ es el blanco de la proteína caseína cinasa II (Figura 24) y el E²⁹⁹ podría ser homólogo a el E³⁰⁶ que Honoré (2001) reporta como posible

sensor primario del pH citosólico responsable de la modulación de la mecanosensibilidad y la apertura del canal. Otro sitio clave para los canales de la familia TREK es la Thr³²² (Lotshaw, 2007), sitio que de ser truncado elimina la sensibilidad al anestésico volátil halotano y que se encuentra en la subunidad Pck2PA como la Thr³²⁴.

Ahora bien, y como se observa en la Figura 27, el extremo N terminal de la secuencia A es muy corto, apenas seis aa, y el extremo carboxilo muy largo, similar a lo reportado por Fink *et al.* (1998) para los canales TRAAK de ratón, a diferencia de los canales TREK-1 y TREK-2 que presentan el extremo amino terminal más largo (de 40–60 aa aproximadamente). Además, Fink *et al.* (1998) reporta dos sitios consenso de *N*-glicosilación presentes en el canal TRAAK, seis sitios para fosforilación por la PKC y tres sitios de fosforilación para la proteína caseína cinasa II, mientras que en la secuencia de Pck2PA también existen varios sitios consensos para estas proteínas pero no se encuentran en las mismas posiciones; además, reporta una sola secuencia consenso para la PKA y como ya se mencionó no hay ningún sitio para esta cinasa de proteína en la secuencia Pck2PA (Figura 27).

La mayoría de estos sitios, como lo reporta Fink *et al.* (1998), se encuentran en el extremo carboxilo terminal donde estos residuos claves traducen el comportamiento del canal, por lo que la subunidad Pck2PA al dimerizarse y formar un canal funcional podría ser activada por cambios fisicoquímicos (presión, despolarización, calor y/o acidosis intracelular), ácidos grasos polinsaturados (ácido araquidónico) y anestésicos volátiles (cloroformo y halotano). Tras esta activación, el extremo C-terminal se asociaría a la bicapa lipídica y a través de la hélice TM4 el canal se abriría por su puerta extracelular tipo C. Por otro lado, la activación de la PKC (vía DAG/PLC/Gq) inhibiría el canal por la fosforilación de las secuencias consenso en el extremo carboxilo terminal, el cual se disociaría de la bicapa lipídica y la hélice TM4 se desplazaría lateralmente al estado de reposo impidiendo el flujo de los iones K⁺ al igual que otros canales de la familia (Vivier *et al.*, 2015).

Aunque las similitudes de la secuencia putativa Pck2PA con los canales de la familia TREK son varias y la mayoría sugiere fuertemente su identidad, hace falta una caracterización tanto electrofisiológica como farmacológica para corroborarlo; sin embargo, existe ya un fuerte indicio no solo de esta identidad, si no de la función de las regiones, dominios o sitios encontrados en la estructura primaria y secundaria de esta subunidad putativa.

II. Pck2PB

De acuerdo con el alineamiento múltiple de la Figura 28 con las cinco subunidades utilizadas como referencia (hTWIK-1, zTWIK-1, ITWIK-1, cTWIK-1 y eTWIK-1), se sugiere que la secuencia putativa pck2PB pertenece a la familia de los canales TWIK debido a la similitud de 44–64%.

El canal TWIK-1 fue el primer canal de la familia de los K2P en ser descubierto y su expresión en mamíferos juega un papel importante en la excitabilidad de las células del corazón y del cerebro; por otra parte, la importancia fisiológica de los canales TWIK-1 ha sido cuestionada debido a las dificultades encontradas en el registro de corrientes funcionales en sistemas heterólogos (Christensen *et al.*, 2016; Miller y Long, 2012)

Como se mencionó anteriormente, el segundo dominio de poro que presenta la subunidad putativa Pck2PB (T-I-G-L-G) no es un motivo usual; este motivo no está del todo conservado en comparación al resto de los filtros de selectividad de canales de K⁺. Esto es similar a lo reportado por Lesage *et al.* (1996) donde explican que al remplazar la Leu por Ile o Thr la actividad del canal se pierde, mientras que al remplazar la misma Leu por Phe la actividad del canal se conserva, lo que indica la importancia del motivo GLG en la función del canal.

Por otra parte, a diferencia de Lesage *et al.* (1996) que reportan solo una secuencia consenso de N-glicosilación, en la secuencia Pck2PB se encontraron dos sitios (N¹⁰³ y N¹⁰⁹); estos sitios tanto en la secuencia de Lesage como en la aquí reportada se encuentran entre las hélices TM1 y TM2; Lesage y su equipo concluyen que la glicosilación ocurre durante la dimerización, aunque no es necesario para este proceso, mientras que la C⁶⁹ forma un puente disulfuro esencial para la dimerización, lo que concuerda con lo previamente mencionado sobre la C⁷⁷ en la secuencia putativa Pck2PB. Ahora, una diferencia importante es que Lotshaw en 2007 reporta que el canal TWIK-1 y Twik-2 solo presentan un sitio de fosforilación para la PKC mientras que, como se puede ver en la figura 28 para la secuencia Pck2PB existen 4 sitios: T¹⁰, T²¹, T³¹¹ y T³²². En cambio, ni en la secuencia Pck2PB ni en lo reportado por otros autores los canales de la familia de los TWIK presentan sitios de fosforilación para la PKA.

Christensen *et al.* (2016) señalan que los canales TWIK-1 son generalmente internalizados por endosomas de reciclaje debido a un pequeño motivo en el extremo carboxilo terminal formado por dos Ile (I²⁹³ e I²⁹⁴) las cuales se asocian con la proteína formadora de vesículas endocíticas clatrina, y que su mutación (I293A-I294A) previene la endocitosis constitutiva y permite que los canales lleguen a la membrana celular habilitando el registro de corrientes TWIK-1 *in vitro* (Felicangeli *et al.*, 2010). Por otra

parte, Feliciangeli *et al.* (2010) reportan que este motivo de di-isoleucinas usualmente está acompañado de residuos ácidos en posiciones -4 o +3 a partir del motivo, a diferencia de como se observa en la subunidad Pck2PB, donde el motivo de di-isoleucinas (I³⁵³ e I³⁵⁴) es acompañado en la posición -4 por una Gln y en la posición +3 por una Asn, ambos aminoácidos polares sin carga.

Ahora bien, varios autores, entre ellos Miller *et al.* (2012) han descrito que los canales TWIK-1 presentan una secuencia de aproximadamente 10 aa anfipáticos a continuación de la hélice TM4 y han logrado reconocer experimentalmente que esta secuencia, llamada *hélice C*, juega un papel importante en la activación del canal debido a que es la zona que responde a diversos estímulos incluidos ciertos fosfolípidos, acidificación intracelular y estiramiento de la membrana. Esta pequeña secuencia no ha sido reconocida dentro de la subunidad Pck2PB debido a la poca información que hay sobre ella; además, dentro de esta secuencia se ha reportado la presencia de una K en la posición 274 (K²⁷⁴), que es el sitio potencial de la modificación post-transduccional SUMOilación, la cual consiste en la unión covalente con un pequeño polipéptido de tipo ubiquitina, SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) que causa una débil expresión funcional de TWIK-1, y que la desSUMOilación o una mutación dirigida (K247E) provoca un aumento considerable en la expresión funcional (Lotshaw, 2007; Miller *et al.*, 2012).

La unión covalente de SUMO necesita una secuencia consenso, ΨKXE/D, donde Ψ es un aa hidrofóbico grande (L, I o V), K es la lisina modificada por SUMO, X es un aa cualquiera y E/D pueden ser ácido glutámico o aspártico (Sampson *et al.*, 2001; Flotho y Melchior, 2013). Así, en el análisis de la secuencia predicha de aminoácidos de la subunidad Pck2PB, esta secuencia consenso no está presente y pese a que no todas las secuencias consenso son dianas de SUMO, y algunas proteínas sustrato son modificadas por SUMO en K no localizadas en secuencias consenso, no existe evidencia para sugerir que esta subunidad putativa para canal TWIK-1 sea blanco de esta modificación postraducciona a pesar de que existan K en el extremo terminal carboxilo (K³¹³ y K³²⁸) que al igual de la K²⁷⁴ reportadas en otras subunidades no esté dentro de una secuencia consenso (Flotho y Melchior, 2013; Miller *et al.*, 2012).

Ahora bien, el canal TWIK-1 desSUMOilado, según Lotshaw (2007), es altamente sensible al pH extracelular debido a la presencia de la H¹²² que se encuentra inmediatamente después del primer motivo de filtro de selectividad; en el caso de la secuencia Pck2PB esta H se encuentra en la posición 130, que al igual que lo previamente dicho, está inmediatamente después del filtro de selectividad.

Del mismo modo que la subunidad anterior, existe evidencia que sugiere que la secuencia de Pck2PB sea la de un canal similar a TWIK-1, sin embargo, es necesario un análisis tanto electrofisiológico como farmacológica para corroborar esta sugerencia.

III. Pck2PC

En la Figura 29 se puede observar el alineamiento múltiple con las cinco subunidades utilizadas como referencia (mTASK-1, cTASK-1, iTASK-1, hTASK-3 y dTASK-6), que sugiere que la secuencia putativa Pck2PC pertenece a la familia de los canales TASK debido a la similitud de 52–72%.

Los canales de la subfamilia TASK son bien conocidos por ser sensibles a la acidez extracelular con lo cual son inhibidos al igual que pueden ser inhibidos vía proteínas G_q acopladas a receptores, en tanto que pueden ser activados por la despolarización de la membrana y anestésicos volátiles, y son sensibles al oxígeno ya que en condiciones de hipoxia el canal es inhibido, por lo que son funcionalmente muy importantes en el sistema nervioso, cardíaco y en otros tipos celulares (Musset *et al.* 2006; Buckler *et al.*, 2000).

Pese a eso, los canales TASK son mejor conocidos por su sensibilidad a cambio en el pH extracelular dentro de los rangos fisiológicos. Varios autores, entre ellos Lotshaw (2007) a través de estudios de mutagénesis han identificado el residuo de H en la posición 98 que está bien conservado en los canales de la subfamilia TASK, incluida la secuencia putativa Pck2PC como se puede ver en la Figura 29. Este residuo (al igual que en el canal TWIK-1) se encuentra inmediatamente después del motivo de filtro de selectividad firma y es el primero responsable en la sensibilidad al pH. Otro residuo clave para la sensibilidad al pH es la H⁷² reportada por Doring *et al.* (2006) que se encuentra en la misma posición en la secuencia Pck2PC.

Otra característica importante de esta subfamilia es que el anestésico halotano incrementa la probabilidad de apertura del canal sin afectar la amplitud de corriente unitaria, así, a través de mutaciones dirigidas se logró identificar una secuencia conservada de seis aminoácidos (VLRFM/LT) que es necesaria para la sensibilidad al anestésico, así como otras funciones regulatorias importantes como la modulación a la respuesta a proteínas G acopladas a un receptor. Dicha secuencia está localizada muy cerca de la hélice TM4 en los canales TASK, al igual que en la secuencia pck2PC con una V en vez de M/L que, debido a que la V y la L son aminoácidos alifáticos, la secuencia podría tener la misma función (Döring *et al.*, 2008; Lotshaw, 2007).

También se ha reportado que los canales TASK tienen varias secuencias consenso para fosforilación tanto por la PKA como por la PKC, pero la secuencia Pck2PC solo presenta dos sitios de fosforilación para la PKC, las S¹⁰⁵ y S³¹⁸.

Finalmente, un sitio de suma importancia para los canales TASK es el residuo 70, en el cual los canales TASK-1 presentan una K mientras que los canales TASK-3 presentan un E; este sitio es crucial para la sensibilidad de cationes divalentes (Mg²⁺ y Ca²⁺). En la secuencia Pck2PC no está presente ninguno de estos residuos, en cambio hay una V, la cual no se encuentra dentro de las mutaciones realizadas por Musset *et al.*, (2006) por lo que quizá esta secuencia putativa no sea sensible a cationes divalentes.

Al igual que las subunidades anteriores, tanto el porcentaje de identidad como los sitios dentro de las secuencias comparadas, dan pistas de la identidad de la subunidad Pck2PC, pero es importante un análisis de naturaleza tanto electrofisiológica como farmacológica para corroborar esta identidad putativa.

I. Análisis filogenético

El análisis filogenético mostrado en la Figura 30 por el método de máxima probabilidad arroja resultados que concuerdan con los alineamientos múltiples descritos previamente. Con un ancestro común se encuentran las subfamilias TWIK, TREK y TALK similar a lo que reporta Enyedi y Czirjak (2010), mientras que las otras tres subfamilias están apartadas. Concordando con lo que ya se ha mencionado, la secuencia Pck2PA se encuentra agrupada con la subfamilia TREK compartiendo un ancestro común con las subunidades presentes en invertebrados, como es de esperarse, y más alejada a las secuencias de vertebrados lo que podría explicar las diferencias que presentan pese a tener características similares. Casos similares ocurren, como es de esperar, con las secuencias Pck2PB y Pck2PC, ambas agrupadas con las subfamilias de canales TWIK y TASK respectivamente compartiendo ancestros comunes con canales reportados en invertebrados, lo que refuerza los resultados previamente discutidos.

CONCLUSIONES

A través de la metodología realizada y los análisis de los datos obtenidos se consiguió detectar tres secuencias putativas para subunidades de canales de la familia K2P en el transcriptoma del tallo ocular del acocil *P. clarkii*, las cuales fueron clonadas y ligadas en un vector de expresión (pIRES2-EGFP). También se analizaron las secuencias putativas para K2P con herramientas bioinformáticas con lo cual se ha obtenido

evidencia que sugiere que la secuencia pcK2PA pertenece a la subfamilia de canales TREK, pcK2PB pertenece a la subfamilia de canales TWIK y pcK2PC pertenece a la subfamilia de canales TASK.

Pese a estos resultados no podemos afirmar la identidad de las secuencias debido a que hay que determinar que dichas secuencias expresen canales funcionales y que, de ser así, estos canales presenten un comportamiento similar a lo descrito para estas subfamilias en diferentes condiciones electrofisiológicas, así como farmacológicas.

PERSPECTIVAS

Como se ha indicado, se requiere más evidencia para determinar la identidad de las subunidades clonadas, por lo que se propone realizar la transfección de los plásmidos obtenidos en un sistema heterólogo y determinar si existe expresión de las proteínas. De expresarse estas secuencias, se propone realizar una evaluación electrofisiológica y farmacológica a través de una rampa de voltaje en la modalidad de célula completa en condiciones de K^+ simétrico, además de determinar las conductancias unitarias de cada canal en la modalidad de "cell attached". También se propone realizar estas maniobras en cultivo primario de las células del OX/GS, así como la determinación de la distribución de expresión de estas subunidades dentro del tallo ocular.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y P. Walter. 2016. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science. Pp 617-650
- Alvarado-Álvarez, R.; R. Becerra & U. García. 1993. Electrotonic coupling between neurosecretory cells in the crayfish eyestalk. *Brain Res*. 613: 43-48
- Alvarado-Álvarez, R.; U. García & H. Arechiga. 1993. A high-resolution *in vitro* bioassay to identify neurons containing red pigment concentrating hormone. *Journal of Experimental Biology*. 202: 1777-1784.
- Barral J. A. 1986. Analisis de la actividad eléctrica espontanea en neuronas secretoras del tallo ocular del acocil *Procambarus clarkia Girard* (Crustacea, decapoda). Tesis de licenciatura. FES Iztacala UNAM. México.
- Buckingham S. D.; J. F. Kidd, R. J. Law, C. J. Franks y D. B. Sattelle. 2005. Structure and function of two-pore-domain KC channels: contributions from genetic model organisms. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. Vol.26 No.7.
- Buckler K.; A. Williams & E. Honore. 2000. An oxygen, acid and anaesthetic sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *Journal of Physiology*, 525.1.Pp. 135-142.
- Christensen, A., Chatelain, F., Huttner, I., Olesen, M., Soka, M., Feliciangeli, S., Horvat, C., Santiago, C., Vandenberg, J., Schmitt, N., Olesen, S., Lesage, F. and Fatkin, D. 2016. The two-pore domain potassium channel, TWIK-1, has a role in the regulation of heart rate and atrial size. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 97. Pp.24-35.
- Coetzee W.; Y. Amarillo, J. Chiu, A. Chow. 1999. Molecular diversity of K channels. *Annual New York Academic of science*. Pp 233-285.
- Davis. W. 2013. A plasmid Editor 2.0.45. Software. Aviable in: <http://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>
- De Castro E, Sigrist CJA, Gattiker A, Bulliard V, Langendijk-Genevaux PS, Gasteiger E, Bairoch A, Hulo N. 2006. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res*. 34(Web Server issue): W362-5.
- Dong C.; S. Bai, L. Du. 2015. Temperature regulates circadian rhythms of immune responses in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish & Shellfish Immunology* 45. Pp 641-647.
- Doring F.; H. Scholz, R. P. Kuhnlein, A. Karschin y E. Wischmeyer. 2006. Novel Drosophila two-pore domain K⁺ channels: rescue of channel function by heteromeric assembly. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 24.Pp. 2264-2274.
- Doyle D. A., Cabral J. M., Pfuetzner R. A., Kuo A., Gulbis J. M., Cohen S. L., Chait B. T., MacKinnon R. 1998. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280. Pp. 69–77.

- Elio S. M.; E. Padoa-Schioppa, J. Ott, F. Bernardi, G. F. Ficetola. 2014. Assessing the consequences of biological invasions on species with complex life cycles: Impact of the alien crayfish *Procambarus clarkii* on Odonata. *Ecological Indicators*. 46. Pp 70–77.
- Engebrecht J.; R. Brent, M. Kaderbhai. 1991. Current Protocols in Molecular Biology
- Enyedi P. & Czirjak G. 2010 Molecular Background of Leak K⁺ Currents: Two-Pore Domain Potassium Channels. *Physiol Rev* 90. Pp. 559–605
- Fanjul M. A.; F. F. De Miguel, B. F. Pardo, H. Gonzalez, M. H. Masseur, E. Moreno, J. Perez-Leon. 1998. Biología funcional de los animales. Siglo XXI editores. México. Pp. 241-243
- Feliciangeli S., Tardy M.P., Sandoz G., Chatelain F.C., Warth R., Barhanin J., Bendahhou S., Lesage F. 2010. Potassium channel silencing by constitutive endocytosis and intracellular sequestration. *J. Biol. Chem.* 285. Pp4798–4805.
- Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M & Lazdunski M. 1998. A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *The EMBO journal*.17. Pp. 3297–3308
- Flotho A & Melchior F. 2013. Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 82. Pp. 357–385.
- García U. & H. Arechiga. 1998. Regulation of crustacean neurosecretory cell activity. *Cell. Mol. Neurobiol.* 18.Pp. 81-99
- Garduño T. J. 2000. Caracterización de un sistema de transporte para GABA en neuronas peptidérgicas de acocil. Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias. CINVESTAV. México.
- Hartstein, V. 2006. The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective. Review. *The journal of endocrinology.* 190. Pp 555-570.
- Jezzini, S.H., & Moroz, L.L. 2004. Identification and distribution of a two-pore domain potassium channel in the CNS of *Aplysia californica*. *Brain research. Molecular brain research*, 127 1-2. Pp. 27-38.
- Jezzini S. H.; S. Reagin, A. B. Kohn, L. L. Moroz. 2006. Molecular characterization and expression of a two-pore domain potassium channel in the CNS of *Aplysia californica*. *Brain research.* Pp 47-56.
- Jones D.T., Taylor W.R., and Thornton J.M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8. Pp. 275-282.
- Kuang Q., Purhonen P., Hebert H. 2015. Structure of potassium channels. *Cell Mol. Life Sci.* 72. Pp. 3677–3693.
- Kumar. A.; S. Kumari. R. Kumar. N. Swain. 2014. Regulation of TRP channels by steroids: Implications in physiology and diseases. *General and Comparative Endocrinology.* 220. Pp. 23–32

- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35. Pp. 1547-1549
- Krogh A., B. Larsson, G. von Heijne, and E. L. L. Sonnhammer. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3). Pp. 567-580.
- Lacinova L. 2005. Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys*. 24. Pp. 1-78
- Leigh D. Plant, Douglas A. Bayliss, Daniel L. Minor, Jr., Gábor Czirják, Péter Enyedi, Florian Lesage, Francisco Sepúlveda, Steve A.N. Goldstein. Two P domain potassium channels, introduction. Last modified on 30/03/2017. Accessed on 23/01/2019. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology, <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyIntroductionForward?familyId=79>.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G. and Barhanin, J. 1996. A pH-sensitive yeast outward rectifier K⁺ channel with two pore domains and novel gating properties. *J. Biol.Chem.*, 271. Pp. 4183-4187.
- Levitz J., Royal P., Comoglio Y., Wdziekonski B., Schaub S., Clemens D. M., et al. 2016. Heterodimerization within the TREK channel subfamily produces a diverse family of highly regulated potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113. Pp. 4194–4199.
- Lodish, H.; A. Berk, P. Matsudaria, C. Kreiger, M. Scott, S. Zipurski, S. Damell. 2016. *Molecular cell biology*. 7th ed. (Biología celular y molecular. Editorial medica panamericana. Pp. 147-192.
- Lotshaw, D.P. 2007 Biophysical, pharmacological, and functional characteristics of cloned and native mammalian two-pore domain K⁺ channels. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 47. Pp 209-256.
- Mackinnon R.; S. Brohawn, J. del Marmol. 2015. Crystal structure of the human K2P TRAAK, a lipid and mechano-sensitive K⁺ ion channel. *Science*. Vol 335.
- Manfrin C.; M. Tom, G. Moro, M. Gerdol. P. G. Giulianini. A. Pallavicini. 2014. The eyestalk transcriptome of red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Gene*. 557. Pp 28–34.
- Miller AN, Long SB. 2012. Crystal structure of the human two-pore domain potassium channel K2P1. *Science*. 335, Pp. 432–436.
- Momot, W. 1995. Redefining the Role of Crayfish in Aquatic Ecosystems. *Reviews in Fisheries Science*. 3. Pp. 33-63.
- Musset B, Meuth SG, Liu GX, 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. Pp639–657.
- Nässel, D. R. 1996. Peptidergic neurohormonal control systems in invertebrates. *Currente opinion in neurobiology*. 6. Pp. 842 - 850

- Nerbonne J. M. 2016. Functional and Molecular Diversity of Native Neuronal K⁺ Channels. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Noriega N. R. 2015. Búsqueda de moduladores para los canales de potasio TASK-1 y TASK-3 (4TM/2P). Tesis que para optar el grado de Doctor en ciencias. Facultad de Química. UNAM. México.
- Onetti C., R. Valdiosera, E. García & U. García. 1986. Potassium currents in neurosecretory cells. Soc. Neurosci. Abstr. 12: 1342
- Palma A. I. 2012. Efecto de la temperatura baja sobre el ritmo de actividad locomotora de *Procambarus clarkii* (acocil). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM. México. Pp. 16,17.
- Park H.; K. Eun-Jin, H. Jaehee, H. Jongwoo y K. Dawon. 2016. Effects of analgesic and antidepressants on TREK-2 and TRESK currents. Korean Journal of physiological pharmacol. Pp 379-385.
- Ranade, S.;R. Syeda, and A. Patapoutian. 2015. Mechanically activated ion channels. Neuron 87Pp.1162–1179.
- Scharrer, B. 1978. Neurosecretory and neuroendocrine activity. Concept on the evolution of the neurosecretory. Neuron. Pp. 9-14
- Silverman A. J. & E. A. Zimmerman. 1983. Magnocellular neurosecretory system. Annual review of neuroscience. 6: Pp.357-380.
- Sonnhammer E., G. von Heijne, and A. Krogh. 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In J. Glasgow, T. Littlejohn, F. Major, R. Lathrop, D. Sankoff, and C. Sensen, editors, *Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, Pps 175-182.
- Tamargo J. M. 2004. Los poros y los canales iónicos regulan la actividad celular. Real academia nacional de farmacia. 70 Pp. 9-31.
- Valladares-Hernández I. U. 2016. Contribución de los extremos amino y carboxilo de la subunidad α del canal HVA CaV α 2.2 en su regulación por las subunidades CaV β . Tesis que para obtener título de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Vivier D.; K. Bennis, F. Lesage, S. Ducki. 2015. Perspectives on the Two-Pore Domain Potassium Channel TREK-1 (TWIK-Related K⁺ Channel 1). A Novel Therapeutic Target. Journal of Medicinal Chemistry.
- Zheng J. & M. Trudeau. 2015. Two pore domain potassium channels. En Handbook of ion channels. USA. CRC press.

