



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**Clonación y caracterización electrofisiológica de dos subunidades
formadoras de receptores al GABA en *Procambarus clarkii***

TESIS

Que presenta:

Biól. Iván Uriel Valladares Hernández

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de

Neurobiología celular y molecular

Directores de Tesis:

Dr. Ubaldo García Hernández

Dr. Juan Manuel Arias Montaña

Ciudad de México

Septiembre, 2016

Para la realización del presente trabajo se contó la beca CONACYT (398157), además del financiamiento otorgado (CONACYT, CB-2009-01-131778); también se contó con el apoyo 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 IN216215, 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 (UNAM); 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).

AGRADECIMIENTOS

A mis sinodales de tesis: Dr. José Antonio Gilberto Arias Montaña y al Dr. Jesús Valdés Flores por la revisión y asesoramiento durante la realización del presente trabajo, así como su culminación.

A los Drs. Ubaldo García Hernández y Juan Manuel Arias Montaña, que me han enseñado tanto, por la oportunidad de trabajar juntos así como la confianza brindada.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Nahum, Miguel, Paco, Santiago, Lalo, Emmanuel y Erick chirris, por permitirme aprender de Uds., así como por el apoyo poco sutil que me dieron.

A Rosana que me ha ayudado mucho en el trabajo de laboratorio.

DEDICATORIAS

Agradezco y dedico el presente trabajo a mi familia, a mis amigos y a todas aquellas personas que me han apoyado durante todo este tiempo, porque sin ustedes en mi vida, en la escuela o en el trabajo, mi vida académica y personal no sería la misma.

Para mis padres, que siempre serán de las personas más importantes en mi vida. No hay forma de agradecerles todo lo que me han dado, y este logro es también de ustedes. Les agradezco las valiosas enseñanzas que me han dado, pero sobre todo que crean en mí.

Para mis hermanas, porque han sido parte esencial en mi formación académica y ahora, de mi vida profesional. Les agradezco haber crecido con ustedes de tantas formas y espero poder compartir muchísimos logros más juntos.

Para mi pequeña y gran Sofía, mi más genuina e inigualable inspiración en el mundo, mis ganas de seguir adelante, mi amor chiquito. Porque para ti serán todos mis logros. Contigo he aprendido tanto, mucho más de lo yo puedo hacer por ti. Siempre recuerda que tú eres y serás mi más grande motivación.

Para Paulina, que me ha apoyado en tantas circunstancias, por el afecto que me brindas y por la gran persona que has sido. Te admiro y te quiero mucho.

Para mis amigos de la maestría, mis amigos de ambos laboratorios, mis amigos de la carrera y aunque no mencione a cada uno de ustedes, saben que son muy importantes para mí. Les agradezco por todas aquellas experiencias vividas en el cursos, en las salidas, pero sobre todo por formar parte de mi vida.

Tabla de contenido

Resumen	i
Abstract.....	ii
Sistemas neuroendocrinos y su importancia en los organismos	1
Canales iónicos activados por ligando, LGICs	7
Receptores activados por GABA	8
Receptores al GABA ionotrópicos.....	8
Estructura de los receptores a GABA.....	9
Naturaleza iónica de la respuesta a GABA en neuronas del OX	11
Farmacología de la respuesta a GABA en neuronas del OX.....	13
Clonación y expresión de una subunidad de los receptores a GABA de las neuronas del OX del acocil	15
Justificación.....	17
Hipótesis	18
Objetivos	19
General.....	19
Particulares	19
Materiales y métodos	19
Animales, mantenimiento y disección.....	19
Extracción de ARN total	20
Identificación de subunidades formadoras de receptores GABA, con filtro de selectividad catiónico.....	20
Diseño de oligonucleótidos y síntesis de ADNc	21
Clonación de las secuencias putativas de receptores a GABA.....	23
Análisis de las secuencias de aminoácidos de las subunidades clonadas	23
Registro electrofisiológico.....	25
Análisis de resultados	26
Resultados.....	27
Identificación de dos secuencias, candidatas ser responsables del flujo catiónico en receptores GABA.....	27
Análisis bioinformático de las secuencias putativas.....	28
Clonación molecular de las secuencias putativas	35

Clonación de la subunidad pcGABA _A 2	35
Clonación de la subunidad pcGABA _A 3	38
Evaluación funcional de las subunidades clonadas	41
Registro electrofisiológico de la subunidad pcGABA _A 2	43
Registro electrofisiológico de la subunidad pcGABA _A 3.....	43
Coexpresión de las subunidades pcGABA _A 2 y pcGABA _A 3	44
Coexpresión de las subunidades pcGABA _A 2 y pcGABA _A β.....	45
Coexpresión de las subunidades pcGABA _A β y pcGABA _A 3	47
Discusión	50
Excitación mediada por GABA	50
Las subunidades pcGABA _A 2 y pcGABA _A 3 son funcionales en un complejo heteromérico .	52
Importancia biológica de las subunidades pcGABA _A 2 y pcGABA _A 3	54
Conclusiones	56
Perspectivas	57
Referencias bibliográfias.....	58

Resumen

Las neuronas del órgano X forman parte del sistema neuroendocrino en crustáceos. Éste sistema regula una gran variedad de funciones vitales en el organismo y a su vez es regulado hormonal y sinápticamente. Se ha demostrado que el ácido γ -aminobutírico (GABA) es capaz de regular la actividad eléctrica en estas neuronas a través de la activación de receptores $GABA_A$, sin embargo, la manera en como lo hace es al menos evocando dos tipos de corrientes, una corriente transitoria catiónica y otra corriente sostenida aniónica. Se ha sugerido que la corriente transitoria está mediada por receptores al $GABA_A$ con selectividad catiónica. En el presente trabajo se clonaron los ADNc de dos subunidades formadoras de receptores al $GABA_A$ que presentan en la región que forma el filtro de selectividad al Asp, un aminoácido cargado negativamente, lo que sugiere una permeabilidad catiónica. Dichas subunidades, nombradas pc $GABA_{A2}$ y pc $GABA_{A3}$, se expresaron transitoriamente en la línea celular HEK 293T. No se evocaron corrientes iónicas cuando se les expresó individualmente, lo cual sugiere que no tienen la capacidad de formar receptores homoméricos. Por otro lado, la cotransfección entre estas subunidades resultó en una corriente catiónica pequeña, mientras que la combinación con la subunidad pc $GABA_{A\beta}$ mostró corrientes muy interesantes. Con pc $GABA_{A2}$ se evocan corrientes aniónicas muy sostenidas, y con la subunidad pc $GABA_{A3}$ se registró una corriente bifásica, es decir, presentaba dos componentes: uno de ellos fue sensible a cambios en la concentración de Na^+ extracelular como se observa en los registros obtenidos de las neuronas del OX; el otro componente es sostenido, sin embargo, aún falta elucidarse la naturaleza iónica de dicha corriente.

Abstract

X organ neurons are part of the neuroendocrine system in crustaceans. This system regulates a variety of vital functions in the body and in turn is regulated hormonal and synaptically. It has been shown that the γ -aminobutyric acid (GABA) is able to regulate the electrical activity in these neurons at least by the activation of GABA_A receptors. However, the way GABA does this is evoking two types of currents, a transient cationic current and an anionic sustained current. It has been suggested that the transient current is mediated by cationic-selective GABA_A receptors. In this work, the cDNA for two forming GABA_A receptor subunits were cloned, which include in their selectivity filter the negatively charged amino acid Asp, suggesting a cationic permeability. These subunits, named pcGABA_A2 and pcGABA_A3, were transiently expressed in HEK 293T cells. No ionic currents were evoked when they were expressed individually, suggesting that they do not have the ability to form homomeric receptors. On the other hand, cotransfection between these subunits resulted in a small cationic current, while the combination of pcGABA_A β with either subunit showed very interesting currents. With pcGABA_A2 evoked currents were anionic and highly sustained, and with pcGABA_A3 a biphasic current is registered. One of the components of this last current was sensitive to changes in the concentration of extracellular Na⁺, as seen in records obtained from OX neurons, while the other component is sustained. However, it still remains to be elucidated the ionic nature of such current.

Sistemas neuroendocrinos y su importancia en los organismos

Las neuronas peptidérgicas, son productoras de mensajeros químicos de naturaleza péptica y evolutivamente aparecen en las redes nerviosas más primitivas (hydra, estrellas de mar, planarias), sin formar órganos especializados en la secreción, pero sujetas a modulación de tipo hormonal (Nässel, 1996). Estos grupos neuronales especializados en el control a distancia de células efectoras, evolucionó hacia la formación de agregados celulares (ejemplo, núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo) y órganos neurohemales donde los botones terminales entran en contacto estrecho con capilares o senos venosos (ejemplo, la neurohipófisis), donde vierten su contenido hormonal, que a diferencia de las vesículas sinápticas que contienen neurotransmisores, las hormonas vienen empaquetadas en gránulos electrodensos (Scharrer, 1978). La actividad secretora de estos sistemas es modulada hormonal y sinápticamente y su función está asociada tanto al plan genético que presentan las células además de la influencia de los distintos factores ambientales. Por ejemplo, los estímulos ambientales tales como la dieta, el estrés, la temperatura, la luz, etc., ejercen efectos en la secreción hormonal y en las funciones corporales las cuales son reguladas por el sistema neuroendocrino. De hecho, la gran mayoría de las hormonas, si no es que todas, son secretadas de maneja rítmica o pulsátil, lo que a su vez está regulado por mecanismos infradianos, circadianos y ultradianos (Weiss *et al.*, 1992).

Los sistemas neuroendocrinos regulan en mayor o menor medida, prácticamente todas las funciones del organismo, dentro de las cuales se incluye el crecimiento corporal, el desarrollo y control del sistema reproductivo, así como el metabolismo de proteínas, carbohidratos, ácidos grasos, minerales, vitaminas y enzimas. Además, regula tareas específicas en el sistema inmune, en el sistema cardiovascular, así como en el riñón, el hígado,

el páncreas, el intestino, entre tantas más. Por lo tanto, el sistema neuroendocrino ejerce un papel vital en la regulación de funciones corporales durante toda la vida del organismo (Meites *et al.*, 1987).

En los vertebrados, el sistema neurosecretor está formado células hipotalámicas que proyectan a la neurohipófisis. Estas células tienen sus cuerpos celulares en los núcleos paraventricular y supraóptico (núcleos magnocelulares), y sus axones corren a través de la eminencia media y el tallo infundibular para terminar en el lóbulo posterior de la hipófisis. Este tracto es la única conexión directa entre el hipotálamo y la hipófisis, y permite a las neuronas magnocelulares liberar vasopresina y oxitocina en la circulación periférica desde la hipófisis posterior (Figura 1). Las hormonas de las glándulas blanco también pueden actuar en el hipotálamo, en la hipófisis o en ambos para ayudar a regular su secreción. De igual manera, la hipófisis también puede regular al hipotálamo para inhibir su propia secreción (Silverman y Zimmerman, 1983).

Por otra parte, en los invertebrados también se encuentran representados los sistemas neuroendocrinos. Los más representativos son: 1) el sistema *pars intercerebralis – corpus cardiacum* de los insectos; y 2) el sistema órgano X – glándula sinusal de los crustáceos. Como puede verse en la Figura 1, estos tres sistemas son equivalentes morfológica y funcionalmente (Cooke, 1985; Hartenstein, 2006).

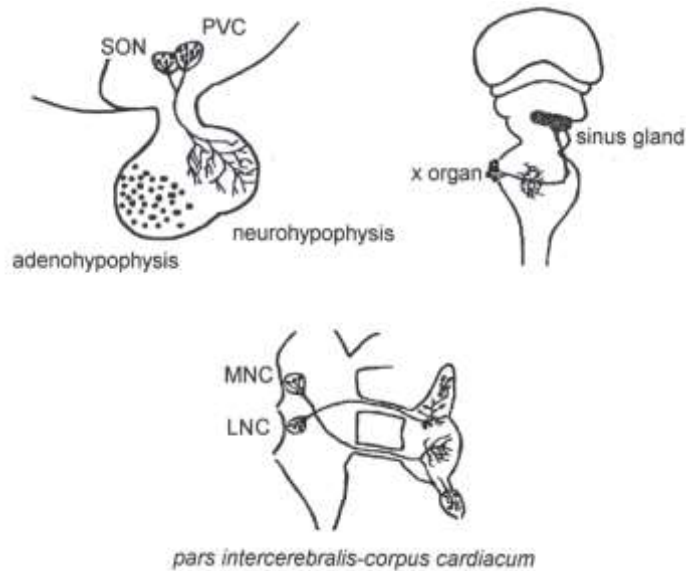


Figura 1. Sistemas neurosecretores. Estos sistemas están constituidos por neuronas monopolares cuyos cuerpos celulares se agrupan formando núcleos; sus axones son amielínicos y forman tractos, sus botones terminales no establecen sinapsis químicas con otras neuronas y finalizan en la proximidad de lechos venosos u órganos neurohemales, donde vacían su contenido hormonal.

El órgano X – glándula sinusal (OX-GS) es un sistema neurosecretor que secreta una gran variedad de neuropéptidos, los cuales regulan una amplia variedad de funciones, por ejemplo, la motilidad, los niveles de azúcar en sangre, la reproducción, la posición pigmentaria de la retina y del tegumento, así como la actividad neuronal (Figura 2). Este sistema está formado por neuronas peptidérgicas, las cuales comparten las propiedades de las células nerviosas, tales como la generación y propagación de potenciales de acción, pueden ser activadas sinápticamente y la despolarización de sus terminales induce la liberación de sustancias con actividad biológica. Por lo tanto se les considera como elementos eferentes en reflejos fisiológicos. El sistema OX–GS del acocil consta de un grupo de aproximadamente 150 cuerpos neuronales; cada soma contribuye con un axón amielínico y proyecciones colaterales en la neuropila de la médula terminal donde recibe aferencias sinápticas que regulan su actividad eléctrica y por consecuencia su actividad secretora (Stuenkel y Cooke, 1988).

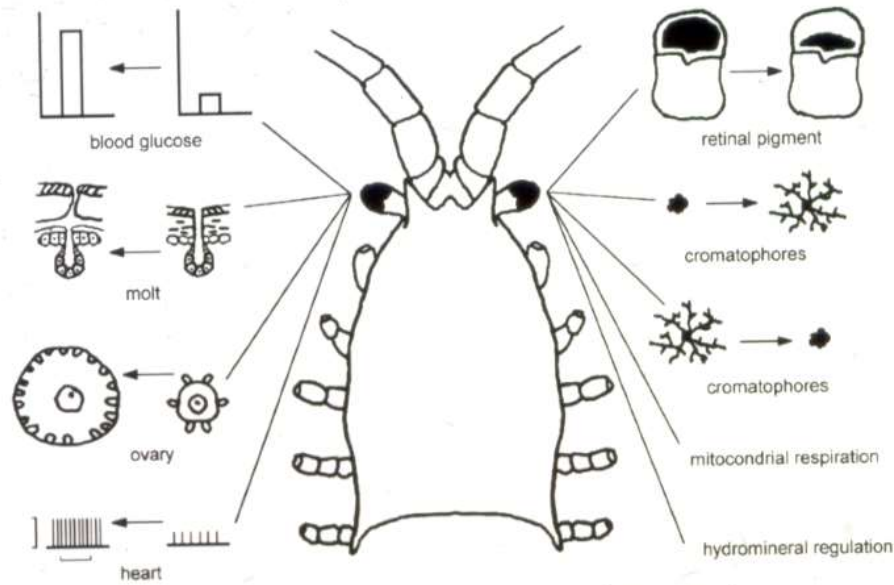


Figura 2. Funciones que regula el sistema OX-GS a través de sus productos de secreción. Las hormonas que produce se dividen en cromatoforotrópicas (relacionadas con el movimiento de los pigmentos visuales y cromatóforos tegumentarios) y metabotrópicas (relacionadas con los niveles de glucosa circulante, la muda, la maduración ovárica y la frecuencia cardíaca).

El sistema OX-GS regula procesos esenciales en los crustáceos gracias a la liberación de sus productos hormonales, que a su vez es dependiente de la actividad eléctrica de dicho sistema (Stuenkel, 1985). Una característica electrofisiológica importante de este sistema es la presencia de un acople eléctrico entre subpoblaciones productoras de una misma hormona. Los contactos eléctricos se establecen a nivel axonal en la neuropila de la médula terminal y fueron identificados por la inyección somática de amarillo lucifer. Por estudios inmunocitoquímicos se observó que las neuronas que se marcan para un mismo neuropéptido son adyacentes. Esto hace posible que el acople eléctrico funcione como un amplificador de la respuesta neurosecretora (Alvarado-Álvarez *et al.*, 1993).

La relación entre la vía visual y la modulación la actividad eléctrica de neuronas peptidérgicas en el tallo ocular, fue sugerida por Cebada y García (2007), quienes mostraron por cromatografía líquida de alta presión la liberación de GABA e histamina de tallos oculares aislados en condiciones de adaptación a la oscuridad (Figura 3) y probaron que esta última se libera de los fotorreceptores en el primer relevo sináptico de la vía visual, mientras que el GABA parece ser liberado de interneuronas que se localizan en el tercer quiasma óptico y electrofisiológicamente modifican la excitabilidad de las neuronas del OX (Figura 4).

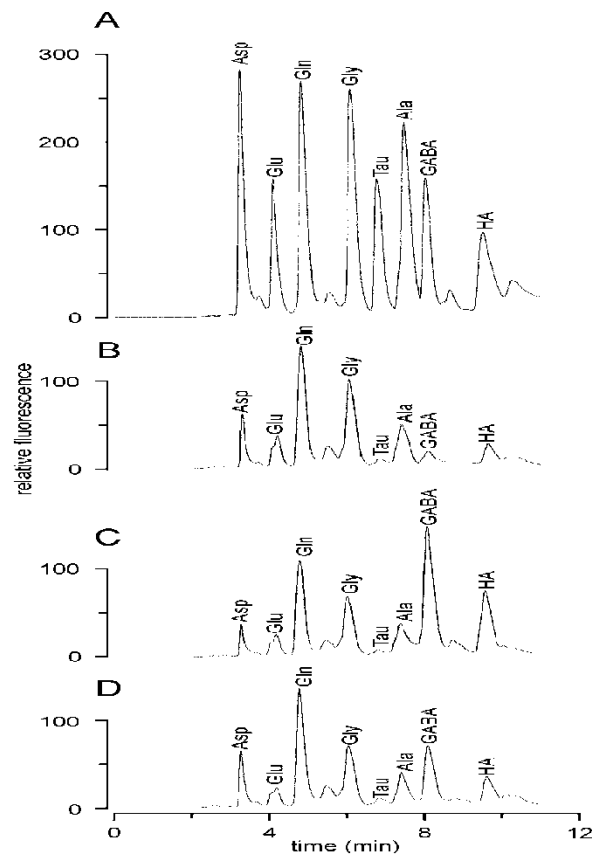


Figura 3. Perfiles cromatográficos de los aminoácidos no esenciales, GABA e histamina, liberados de retinas aisladas del acocil por estimulación luminosa. A. Estándares de calibración tratados para detección fluorométrica. B. Liberación basal en condiciones de adaptación a la oscuridad. C. Liberación inducida por un pulso de 350 lx de luz blanca durante 60 s. D. Regreso a las condiciones de oscuridad. Nótese que durante la estimulación aumentaron de forma significativa los picos correspondientes a GABA e histamina (tomado de Cebada y García, 2007).

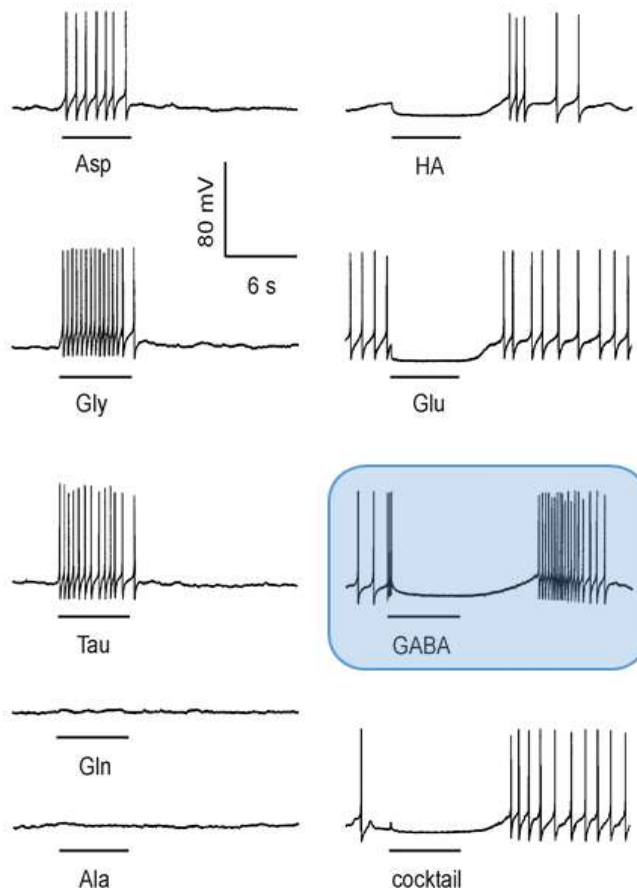


Figura 4. Efecto en la excitabilidad de una neurona del OX por aminoácidos no esenciales, GABA e histamina, así como de un coctel que contiene la concentración relativa de cada una de las sustancias determinadas en dializados de hemolinfa correspondientes a las 7 PM. Nótese que el GABA provocó primero excitación, seguida de inhibición, y durante el lavado un nuevo aumento de la excitabilidad (registros tomados de Cebada y García, 2007).

De esta manera se evidencia cómo es que este sistema es regulado, si bien por factores ambientales, también por la excitabilidad que caracteriza a las neuronas de este órgano. Dicha excitabilidad está mediada por una gran variedad de proteínas especializadas de la membrana plasmática como lo son los canales iónicos, pero principalmente por los receptores ionotrópicos (ya que estos son los traductores de las señales químicas o neurotransmisores), los cuales permiten el flujo de iones inorgánicos específicos, lo cual regula el voltaje a través de la membrana.

Dentro de los receptores que median la transmisión sináptica rápida encontramos a todos aquellos pertenecientes a la superfamilia de canales iónicos activados por ligando (LGIC), o bien, receptores ionotrópicos, los cuales se describirán brevemente a continuación.

Canales iónicos activados por ligando, LGICs

Como ya se mencionó, la transmisión sináptica rápida es mediada por canales iónicos activados por ligando (LGIC, derivado de su nombre en inglés ligand-gated ionic channels), los cuales son proteínas transmembranales alostéricas, que responden a la unión de un neurotransmisor con un cambio conformacional que causa que el poro iónico del canal se abra. Subsecuente a dicho evento se propicia la permeación de iones a través del poro que genera cambios en el potencial eléctrico transmembranal (Keramidas *et al.*, 2004).

La similitud estructural entre los LGICs es la base para designarlos en distintos grupos. Este arreglo se extiende desde la secuencia de aminoácidos hasta la estructura secundaria y terciaria de cada subunidad. Todas las subunidades de los LGICs presentan de una longitud similar y exhiben el mismo patrón de hidrofobicidad, lo que sugiere un topografía muy similar entre ellos. Además, cada subunidad tiene una región terminal amino muy grande, predominantemente hidrofílica. Este dominio terminal amino es extracelular y contiene numerosos sitios de glicosilación en donde también se sabe se encuentra la región de unión al ligando (Karlin y Akabas, 1995).

Otras características adicionales al dominio extracelular son que todas las subunidades de los LGICs tienen cuatro dominios transmembranales, designadas como M1 a M4, los cuales están conectados por asas extramembranales; las asas que conectan a los segmentos M1 a M2 y M2 a M3 son de longitud pequeña, mientras que el asa intracelular que conecta a M3 y M4 es comparablemente más larga (Miyazawa *et al.*, 2003). Se sabe que esta asa interacciona con proteínas del citoesqueleto, siendo responsable para

la localización de los LGICs en la membrana postsináptica así como algunas modulaciones funcionales (Keramidas *et al.*, 2004).

La selectividad de los LGICs se le confiere ciertos residuos cargados que flaquean el dominio M2, el cual forma las paredes internas del canal. Generalmente, una carga positiva neta es encontrada en la región intracelular de los LGICs selectivos a aniones, y algunos residuos de arginina cargados positivamente ocupan la posición O' en los receptores activados por glicina (GlyR), o activados por el ácido γ -aminobutírico (GABA_ARs y GABA_CRs). En contraste, aminoácidos con carga neta negativa se localiza en las posiciones adyacentes en los LGICs selectivos a cationes (Galzi *et al.*, 1992).

Dentro de los receptores que se incluyen en la familia de los LGICs están: los receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR); los receptores serotoninérgicos (5-HT₃); los receptores glicinérgicos (GlyR); los receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGluR); y los receptores gabaérgicos GABA_A y GABA_C (Ortells y Lunt, 1995).

Receptores activados por GABA

Particularmente, los receptores activados por GABA puede mediar dos tipos de respuestas: la inhibición rápida (< 100 ms) y la inhibición lenta (> 100 ms). La primera está mediada por receptores a GABA ionotrópicos (GABA_A y GABA_C) y al influjo del ion cloruro que permiten; mientras que la segunda respuesta resulta de la activación de receptores a GABA metabotrópicos (GABA_B) los cuales se acoplan a proteínas G y afectan la excitabilidad celular por medio de segundos mensajeros (Enna y Bowery, 1997; Gassmann y Bettler, 2012). A continuación se profundizará sobre los receptores a GABA ionotrópicos debido a que son objeto del presente estudio.

Receptores al GABA ionotrópicos

La corriente que resulta de la activación del receptor GABA_A muestra un aumento en la permeabilidad del ion cloruro y es bloqueada por un compuesto de origen vegetal, la picrotoxina. Esta corriente fue observada originalmente

en preparaciones nerviosas y musculares de acocil (Furschpan y Potter, 1959). Farmacológicamente se caracterizó por el efecto que producen sus antagonistas, la bicuculina, la picrotoxina y el agonista muscimol (Olsen y Tobin, 1990).

Por otro lado, la respuesta inhibitoria mediada por el receptor GABA_C fue caracterizada como insensible a bicuculina y a baclofen, pero activada por el ácido *cis*-aminocrotónico; además, dicha respuesta se consideraba similar a la mediada por los receptores GABA_A (debido al influjo de cloruro), pero no era modulada por barbitúricos ni por benzodiazepinas. Tras la clonación de la subunidad ρ , se pudo reproducir la respuesta dada por el receptor GABA_C, y fue hasta 1998 que la Unión Internacional de Farmacología propuso que los receptores GABA_C en realidad eran un subtipo de los receptores GABA_A pero conformados de forma diferente, por lo que le asignó el nombre de receptores GABA ρ (Johnston, 1997).

Estructura de los receptores a GABA

La estructura de los receptores a GABA ionotrópicos consiste en un arreglo pentamérico, conformado por distintas subunidades las cuales son agrupados por la homología que presenta cada una de ellas en sus secuencias de aminoácidos. Se han descrito a la fecha 19 distintas subunidades: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π y ρ 1-3 (Sigel y Steinmann, 2012).

Como se mencionó, los receptores GABA_A y GABA ρ forman parte de la superfamilia de receptores ionotrópicos activados por ligando (LGICs), y se ensamblan de manera pentamérica para dar lugar a un poro central (Chang *et al.*, 1996). Estructuralmente cada subunidad tiene dominios terminales NH₂ y COOH extracelulares, y cuatro segmentos transmembranales, llamados M1–4 conectados por asas extramembranales de longitud variable.

Es en el dominio terminal NH₂ donde se localizan los sitios de unión al GABA, mientras los segmentos transmembranales forman al canal, siendo

particularmente importante el segmento transmembranal 2 (M2) el que delinea y forma el poro. Por otro lado, la identificación de aminoácidos presentes en la posición -2 y -1 (Pro y Ala, respectivamente) en el asa intracelular que une a los segmentos transmembranales M1 y M2, y el aminoácido +13 (Thr) en el M2, ha permitido sugerir que su presencia es crucial para la selectividad iónica del receptor (Figura 5). Sin embargo, resulta más sorprendente el hecho de que dicha selectividad se le atribuye más a la subunidad β , en un receptor heteropentamérico ($\alpha_2\beta_3\gamma_2$), que a cualquier otra subunidad (Jensen *et al.*, 2002).

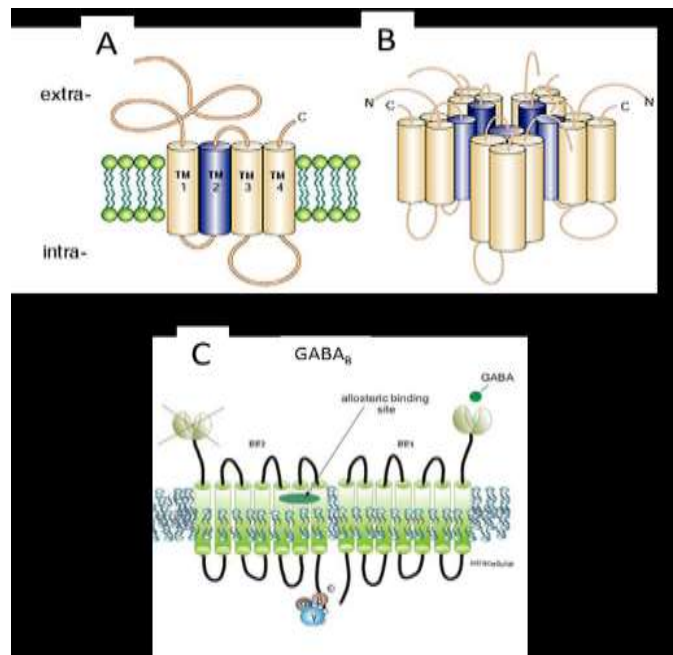


Figura 5. Estructura de los subtipos de receptores a GABA. A) topología de las subunidades que conforman el receptor pentamérico. Nótese al TM2 como el segmento que forma el poro del receptor. B) los receptores GABA_A y GABA_ρ son receptores ionotrópicos que se arreglan en pentámeros. C) Estructura de los receptores GABA_B y su formación de dímeros; estos receptores interactúan con proteínas G heterotriméricas.

En años recientes, se ha incrementado el interés sobre los receptores ionotrópicos a GABA que se expresan en invertebrados, debido a fenómenos contradictorios a la inhibición clásica mediada por GABA. Es decir, se ha reportado la activación de los receptores a GABA capaces de permitir flujo catiónico y por lo tanto favorecer la excitación celular (Beg y Jorensen, 2003;

Gisselmann *et al.*, 2004). De manera particular, en el sistema OX-GS del acocil se ha descrito una excitación mediada por GABA, donde los responsables moleculares no han quedado esclarecidos.

Naturaleza iónica de la respuesta a GABA en neuronas del OX

Como se indicó anteriormente, el efecto que el GABA produce en el sistema OX-GS ha resultado ser un tanto controversial, ya que no solo se registra un efecto inhibitor, sino que también presenta un efecto excitador. En la Figura 6A se muestra el efecto del GABA en una neurona del OX en condiciones de fijación de corriente y de fijación de voltaje (trazos superiores e inferiores, respectivamente), obtenidos a un mismo valor de potencial de membrana (-60 mV), en distintas concentraciones de sodio extracelular, y cuando el interior celular se dializó con una solución que contenía 10 mM de KCl, lo que permite predecir un potencial de equilibrio para el cloruro (E_{Cl}) de -80 mV. Como puede observarse, la despolarización inicial va acompañada de una ráfaga de potenciales de acción, y se correlaciona temporalmente con una corriente entrante transitoria cuya amplitud depende de la concentración extracelular de sodio. La fase de inhibición del disparo celular coincide temporalmente con la corriente saliente, la cual aumenta en amplitud cuando la concentración extracelular de sodio disminuye. En la Figura 6B se muestra un registro en fijación de corriente donde se evalúa el cambio en la resistencia de entrada durante la perfusión de GABA a 10 μ M, observándose una caída del 90% para el valor de la resistencia de entrada. La Figura 6C muestra el efecto del GABA cuando se cambió el E_{Cl} , dializando la célula con una solución que contenía 240 mM de KCl. En dicha condición experimental, la corriente sostenida cambia de dirección y produce despolarización asociada al disparo de potenciales de acción (Garduño *et al.*, 2002).

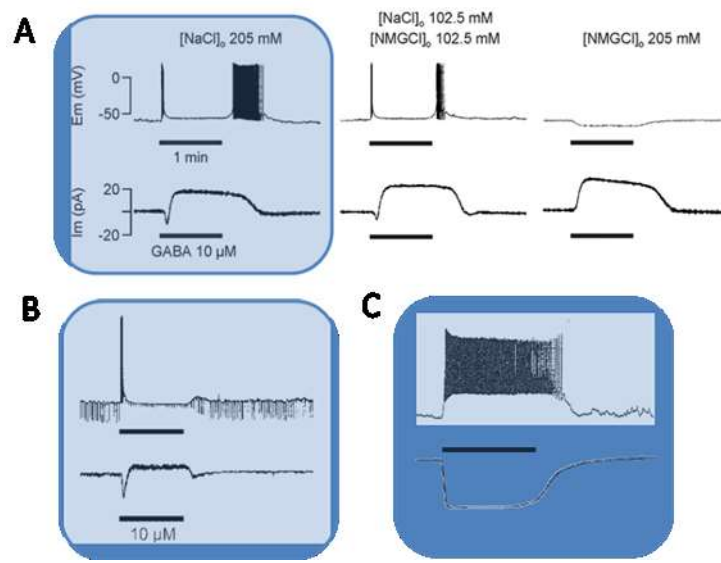


Figura 6. A) Naturaleza iónica de la despolarización debida a GABA y su correlación con la corriente entrante transitoria en neuronas del OX (ver texto). B) Cambios en la resistencia de entrada durante la perfusión de GABA. En condiciones de fijación de corriente se inyectaron pulsos de corriente hiperpolarizante; nótese que la corriente saliente sostenida que sigue a la corriente transitoria provoca una importante caída de la resistencia de entrada que inhibe el disparo neuronal. C) Naturaleza iónica de la hiperpolarización debida al GABA y su correlación con la corriente sostenida; en condiciones de fijación de corriente, y al desplazar el E_{Cl} a 0 mV, la aplicación de GABA muestra una despolarización sostenida, indicando que el cloruro forma parte de la fase sostenida (registros tomados de Garduño et al., 2002).

Garduño et al. (2002) determinaron los valores de los potenciales de inversión de las corrientes de la respuesta a GABA en las neuronas del OX en experimentos de fijación de voltaje en la modalidad de parche perforado con gramicidina. Este ionóforo solo es permeable a cationes monovalentes y no permite la difusión del cloruro, asegurando una concentración constante de este ion en el medio intracelular. La Figura 7 muestra una familia de trazos de corriente evocados por pulsos de GABA a distintos valores de potencial de mantenimiento y las curvas I-V de las corrientes transitoria y sostenida.

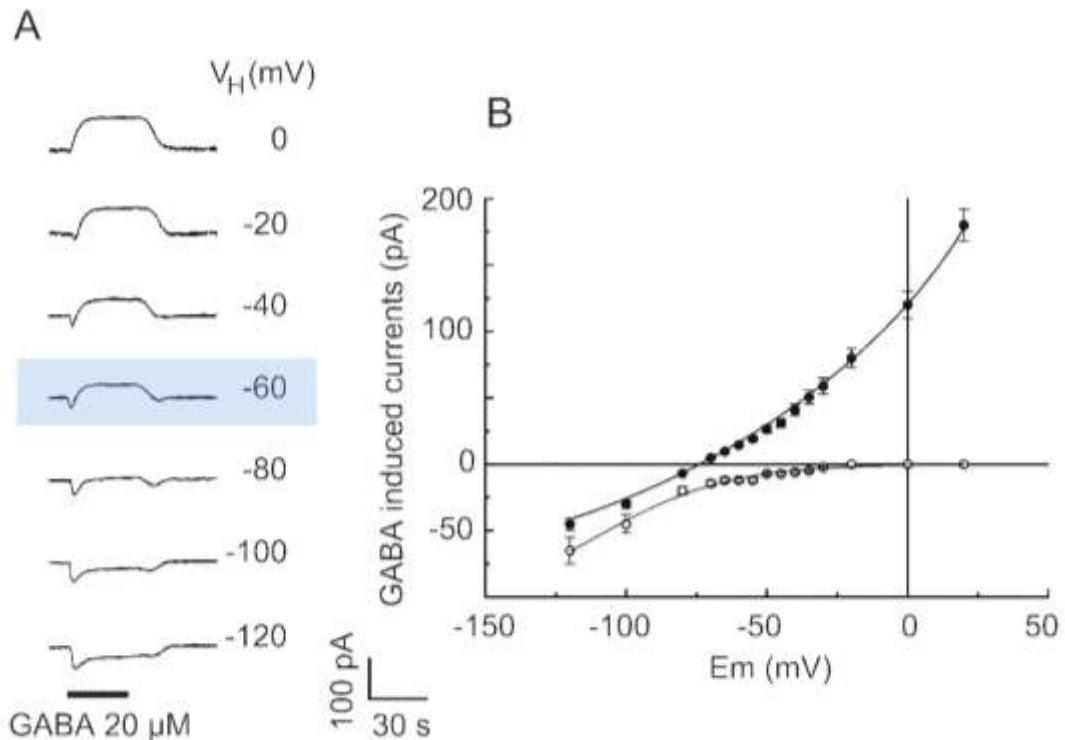


Figura 7. Dependencia al voltaje de la respuesta a GABA. A) Registros de la corriente evocada por GABA a los potenciales de mantenimiento señalados. Nótese que la corriente transitoria disminuye de amplitud progresivamente y se vuelve indetectable a 0 mV, mientras que la corriente sostenida invierte a valores de potencial cercanos a -75 mV como se muestra en B.

Haciendo un análisis de los resultados obtenidos de los trabajos anteriores, se sugiere que el GABA es capaz de evocar dos tipos de respuestas, una corriente catiónica permeable a sodio y otra corriente aniónica permeable a cloruro. Lo que permite sugerir que esta dualidad podría estar mediada por dos tipos de receptores en las células del OX.

Farmacología de la respuesta a GABA en neuronas del OX

En la Figura 8 se muestra la farmacología básica de la respuesta al GABA en las células del OX en registros realizados en condiciones de fijación de voltaje

y en cuatro valores de potencial de mantenimiento. El muscimol, agonista selectivo de los receptores a GABA_A, reproduce los efectos del GABA en las células del OX, es decir, activa con la misma eficiencia las corrientes de sodio y cloruro, mientras que el ácido *cis*-aminocrotónico (c-ACA), que es un agonista parcial y selectivo de los receptores a GABA_ρ, solo activa a la corriente de cloruro, lo que apoya la noción de que la respuesta a GABA está mediada por la activación de dos receptores distintos. La bicuculina, un agonista competitivo de los receptores a GABA_A no tiene efecto sobre ninguna de las corrientes, pero ambas son bloqueadas por picrotoxina, que es un antagonista no competitivo de los receptores GABA_A y cuyo mecanismo de acción es impedir el flujo iónico a través de los canales.

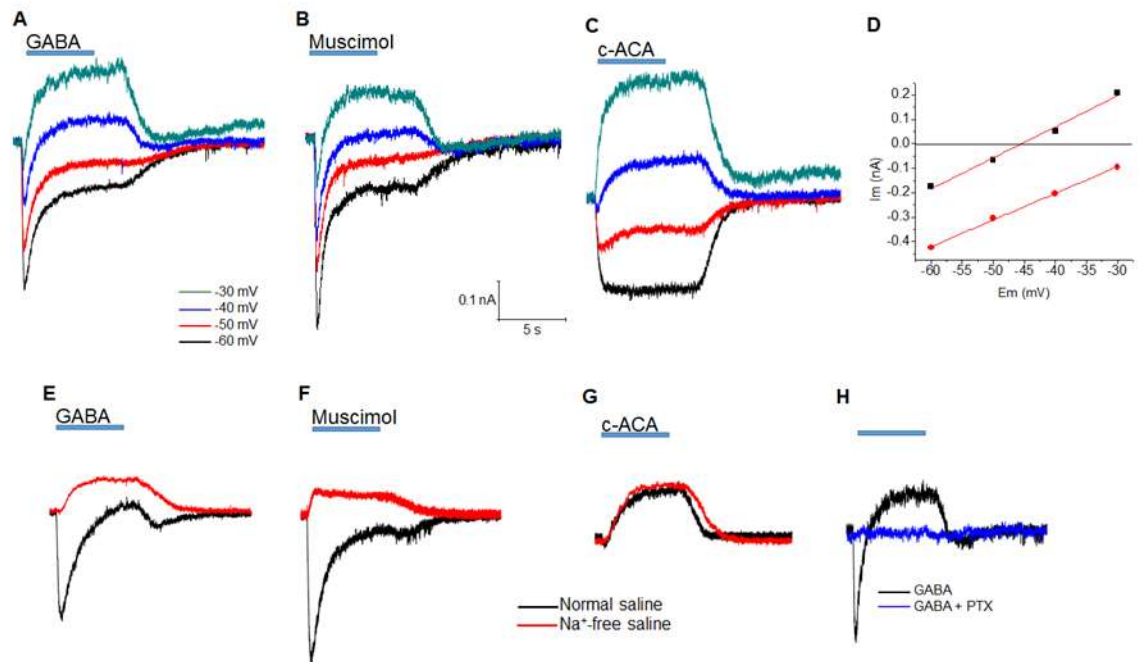


Figura 8. Farmacología de los receptores a GABA de las neuronas del OX. A–C) Efectos de diferentes agonistas para receptores GABA_A y GABA_B. D) potenciales de inversión de las corrientes sostenida debida a cloruro (puntos negros,) y transitoria, debida a sodio (puntos rojos), de acuerdo a las condiciones iónicas en que se obtuvieron los registros. E–G) Registro de las corrientes a -60 y -50 mV de potencial de mantenimiento, en presencia (trazos negros) y ausencia (trazos rojos) de sodio extracelular. H) Trazos control (negro) y efecto de la picrotoxina (trazo azul) a -40 mV de potencial de mantenimiento (Jiménez-Vázquez et al., 2016).

Clonación y expresión de una subunidad de los receptores a GABA de las neuronas del OX del acocil

Únicamente tres tipos de canales homoméricos selectivos a cloruro y activados por el GABA se han descrito: a) en la retina de vertebrados se identificó que la subunidad GABA_p1 forma receptores homopentaméricos, b) en *Caenorhabditis elegans*, a partir de una biblioteca de ADNc, se aisló una secuencia que codifica para un canal de cloruro activado por el GABA; dichas subunidades fueron evaluadas en sistemas de expresión heterólogos, y se

observó que fueron capaces de funcionar como un complejo homopentamérico (Cutting *et al.*, 1991; Beg y Jorensen, 2003); y c) en nuestro laboratorio, el año pasado se clonó una nueva subunidad de receptores a GABA del acocil *Procambarus clarkii*, que expresada en células HEK 293 es capaz de formar receptores ionotrópicos homoméricos al GABA y que genera corrientes de cloruro, insensibles a la bicuculina y bloqueadas por la picrotoxina. El análisis farmacológico de esta subunidad determinó que el orden de potencia de los agonistas probados fue: GABA > ácido *trans*-4-aminocrotónico (*t*-ACA) = ácido *cis*-4-aminocrotónico (*c*-ACA) > muscimol (Jiménez-Vázquez *et al.*, 2016) (Figura 9).

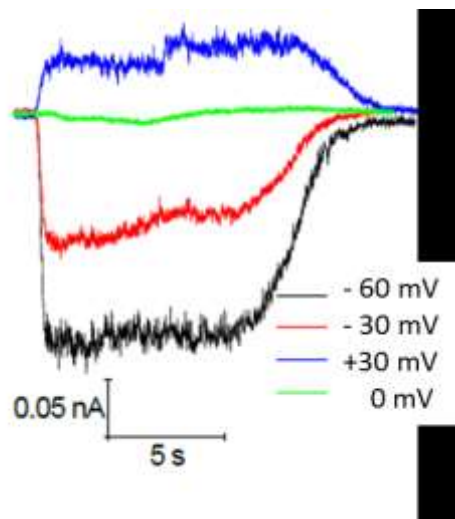


Figura 9. Corriente evocada de la subunidad $pcGABA_{A\beta}$, clonada por Jiménez-Vázquez *et al.*, (2015).

Por otro lado, Manfrin *et al.* (2015) publicaron el transcriptoma del tallo ocular del acocil *P. clarkii*, donde es posible identificar secuencias de subunidades formadoras de receptores a GABA de tipo ionotrópico, siendo de particular interés aquellas que posean un filtro de selectividad catiónico. Estos antecedentes nos permiten plantear la pregunta central de este trabajo: ¿cuáles son los determinantes moleculares que subyacen a la corriente catiónica evocada por GABA en neuronas del órgano X del acocil *P. clarkii*?

Justificación

Los primeros trabajos sobre la caracterización de los receptores a GABA sugirieron que sus efectos sinápticos se debían a la activación de un solo tipo de receptor, el cual al unir el ligando aumentaba la conductancia a cloruro (inhibición GABAérgica convencional), descrita en las sinapsis periféricas de los crustáceos (Boistel y Fatt, 1958; Kuffler y Edwards, 1958; Takeuchi y Takeuchi, 1965, 1966). Sin embargo, en años recientes se ha demostrado que el GABA también puede mediar respuestas excitatorias bajo distintas condiciones: a) dependiendo del gradiente electroquímico del cloruro, las células con un potencial de membrana en reposo más negativo que el potencial de equilibrio de ese ion, tenderán que generar una respuesta despolarizante tras la activación de los receptores a GABA (Chen *et al.*, 1996); b) como el receptor-canal de cloruro no es perfectamente selectivo a una sola especie iónica, existe una fracción de permeabilidad para bicarbonato HCO_3^- que en condiciones fisiológicas desvía significativamente el potencial de inversión de la respuesta mediada por cloruro (Kaila y Voipio, 1987). Como los iones HCO_3^- no están distribuidos pasivamente, sus niveles intracelulares están determinados por los mecanismos celulares de regulación del pH; entonces cualquier interferencia en el balance ácido-base puede resultar en un cambio en la dirección de la respuesta a GABA (Thomas, 1984).

Además, la estimulación continua de los receptores a GABA_A puede reducir el gradiente de cloruro más rápido que el gradiente de HCO_3^- resultando así un eflujo de este último, y por consecuencia en una respuesta despolarizante; c) otra posibilidad es la presencia de transportadores de GABA; estos son de tipo electrogénico y utilizan el gradiente electroquímico de sodio para movilizar GABA hacia el interior de la célula. Como su estequiometría tiene una relación $2\text{Na}:1\text{Cl}:1\text{GABA}$, en cada ciclo de transporte, cuya duración es de 40 ms, se deja una carga positiva debida a sodio que eventualmente provoca despolarización (Hilgemann y Lu, 1999); d) otra explicación alternativa es que

las respuestas excitatorias se deban a la activación de receptores para el GABA cuyo filtro de selectividad permita el flujo de cationes. Beg y Jorensen (2003) y Gisselmann *et al.* (2004), han descrito subunidades formadoras de receptores a GABA que median un flujo catiónico, y Jiménez-Vázquez *et al.* (2015) sugieren que la corriente transitoria de sodio debida a GABA en las neuronas del OX sea mediada por un receptor a GABA de tipo catiónico.

Hipótesis

La corriente catiónica medida por GABA en las neuronas del OX está asociada a la expresión de subunidades cuyo filtro de selectividad contiene las determinantes moleculares en la región TM2 que permiten la permeación de sodio. Con el fin de probar dicha hipótesis se proponen los siguientes:

Objetivos

General

Clonar, expresar y evaluar electrofisiológicamente, subunidades formadoras de receptores ionotrópicos para GABA del tallo ocular del acocil *P. clarkii*, en las cuales la secuencia de aminoácidos que forman el poro de selectividad sugieran una corriente catiónica y que reproduzca la corriente excitadora mediada por el GABA.

Particulares

1. Identificar en las base de datos del transcriptoma del tallo ocular de *P. clarkii*, secuencias que sugieran determinantes de filtro de selectividad catiónico de receptores ionotrópicos para GABA.
2. Clonar las secuencias putativas a ser formadoras de receptores a GABA.
3. Expresar las subunidades clonadas en las células HEK 293T, y evaluar electrofisiológicamente su funcionalidad y su comportamiento cinético.

Materiales y métodos

Animales, mantenimiento y disección

Todos los experimentos se realizaron utilizando acociles adultos de la especie *P. clarkii*. Los especímenes, provenientes del Río Conchos (Chihuahua, México), fueron mantenidos en el bioterio en agua recirculante a ~ 20 °C, con ciclos luz/oscuridad de 12 h/12 h y alimentados *ad libitum* con zanahorias. Para la disección, los animales fueron previamente anestesiados colocándolos en un recipiente con hielo durante un lapso de 35 min. El tallo ocular se extrajo cortando cuidadosamente con tijeras de disección y se colocó en solución salina la cual contenía (en mM): 205 NaCl, 5.4 KCl, 13.5 CaCl₂, 2.6 MgCl₂ y 10 HEPES, ajustada a un pH de 7.4 con NaOH. El exoesqueleto y el tejido conectivo que rodean al tejido nervioso fueron removidos bajo el microscopio. Una vez limpio se colocó en un homogeneizador para la extracción del ARN total.

Extracción de ARN total

El ARN total fue extraído utilizando la metodología basada en Trizol (Sambrook y Russell, 2001), lavando previamente todo el material usado con NaOH 1N. Se disecaron 6 tallos oculares y se depositaron en un homogeneizador, al cual se le agregaron 100 µl de Trizol. El tejido fue homogeneizado durante 30 s y en seguida transferido a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, se añadieron dos volúmenes de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 s. Posteriormente, la mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 2–5 min, y transcurrido este tiempo se centrifugó a 18,000 g durante 10 min. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo nuevo (evitando tocar la interfase) y se le adicionaron 0.7 volúmenes de isopropanol. Inmediatamente se mezcló el contenido invirtiendo el tubo varias veces y se incubó a temperatura ambiente por 5 min, para finalmente centrifugar la mezcla a 18,000 g durante 5 min. El sobrenadante se removió con cuidado, la pastilla se lavó con etanol al 75% y se centrifugó a 18,000 g durante 10 min. Finalmente, el etanol se eliminó por completo, la pastilla se resuspendió con agua libre de nucleasas y se almacenó a – 20 °C hasta su uso. El ARN total extraído se cuantificó por absorbancia de luz UV en un Epoch™.

Identificación de subunidades formadoras de receptores GABA, con filtro de selectividad catiónico.

Para la identificación de subunidades adicionales que formen receptores a GABA ionotrópicos en *P. clarkii*, se realizó un alineamiento de la secuencia clonada por Jiménez-Vázquez *et al.*, (2016). Para esto se utilizó la herramienta

bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), particularmente la herramienta tblastn, utilizando la base de datos de transcriptomas ensamblados (TSA), con los parámetros predeterminados, en la cual se compara la secuencia de consulta (query sequence) con las proteínas potenciales reportadas por los transcriptomas ensamblados (en este caso, el transcriptoma ensamblado para *P. clarkii*), evaluando identidad, similitud y homología en las secuencias.

Dicho proceso se repitió utilizando como secuencias de consulta a las reportadas para GRD y LCCH3 (Gisselman *et al.*, 2004), y EXP-1 (Beg y Jorensen, 2003), las cuales se ha mostrado que son capaces de formar receptores a GABA ionotrópicos con selectividad catiónica. De esta manera se delimitó el número de secuencias por aquellas que presenten las siguientes características: 1) que tengan una longitud de 400-500 aminoácidos; 2) que los extremos NH₂ y COOH sean extracelulares; 3) que las secuencias presenten sitios de unión a GABA (motivos YFRQHW y TFFA); 4) que presenten el asa de cisteínas (Cys-loop); y 5) que presenten un filtro de selectividad con una carga negativa que sugiera una permeabilidad a cationes.

Diseño de oligonucleótidos y síntesis de ADNc

A partir del análisis bioinformático, se obtuvieron las secuencias de nucleótidos de las subunidades de nuestro interés. Con estas secuencias se diseñaron oligonucleótidos específicos que se muestran en la Tabla 1, y con las características provistas por el programa Clone Manager 9, Profesional Edition.

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para las secuencias propuestas.

Secuencia		Oligonucleótidos
pcGABA _A 2 (secuencia GBEV01010683.1)	Sentido	pcGABA2- f 1 – gt gt t t gcgaggt t aagc pcGABA2- f 2 – cgcgaggat at gt aagcc
	Antisentido	pcGABA2- r 1 – ggacacaact cgt cat gt ag pcGABA2- r 2 – aaaggt acggaagggt aagg
PcGABA _A 3 (secuencia GBEV01011095.1)	Sentido	pcGABA3- f 1 - gt caagcgagagt ct gaag
		pcGABA3- f 2 – cagcacagggaat ccat ac
		pcGABA3- i f 3 – ccct cgt t at cagcagct a
		pcGABA3- i f 4 – cgggt acacggagaaagat
Antisentido	pcGABA3- r 1 – cct agcat agcgacact agg	
	pcGABA3- i r 2 – gt ccgcact t at cat ggt t g	
	pcGABA3- i r 3 – cct cct ccgt cat aat t t cg	

El ADNc fue sintetizado a partir del ARN total obtenido utilizando la transcriptasa reversa ProtoScript® II (enzima recombinante de la transcriptasa reversa M–MULV: Moloney Murine Leukemia Virus), dNTPs, el oligonucleótido linker–dT (CCTAGGTTCGACCGGTGATGAATTC[T]₁₈) y los oligonucleótidos en antisentido (reverse) diseñados para nuestras secuencias. La retrotranscripción se realizó en dos fases: en la primera, 4 µl de ARN total (347 ng/µl) en conjunto con 1 µL de una mezcla de oligonucleótidos (linker–dT; pcGABA2r1; pcGABAA2r2 y pcGABAA3r1) a una concentración final de 120 µM; se incubaron a 65 °C durante 5 min y a continuación la mezcla se enfrió rápidamente en hielo; en la segunda fase se añadieron 4 µL del regulador de reacción (5×), 1 µL del inhibidor de ARNasas (RiboLock; 40 U/µL), 1 µL de dNTPs (10 mM cada uno) y 1 µL de ProtoScript® II (200 U/µl), todo en un volumen final de 20 µl. Posteriormente, la mezcla total se incubó a 42 °C durante 60 min con un ciclo final de 5 min a 80 °C para inactivar a la transcriptasa reversa. Una vez terminada la reacción se agregaron 80 µL de H₂O libre de nucleasas al ADNc y éste se almacenó a – 20 °C hasta su uso.

Clonación de las secuencias putativas de receptores a GABA.

Como molde para la amplificación del ADN (para cada una de las secuencias propuestas), se utilizó el ADNc sintetizado. Las amplificaciones por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron mezclando: 5 µl de regulador de reacción (5×), 1 µl de dNTPs (5 mM cada uno), 0.5 U de la polimerasa Q5 DNA pol (una polimerasa de ADN de alta fidelidad), 5 µl del potenciador de reacción (enhancer 5×), 1 µl del oligonucleótido específico en sentido (10 µM), 1 µl del oligonucleótido específico en antisentido (10 µM), 5 µl del ADNc recién sintetizado, a un volumen final de 25 µl ajustado con H₂O. Una vez ensambladas las reacciones, se incubaron en un termociclador bajo el siguiente esquema: I) 95 °C/2 min; 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. Los amplicones fueron detectados en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con bromuro de etidio (EtBr) y purificados por columna de afinidad. La inserción en el vector pJet1.2/blunt se realizó como lo indica el fabricante. Una vez obtenidos los plásmidos, se analizaron por restricción y por secuenciación. Adicionalmente, se realizó un análisis comparativo de las secuencias clonadas con las reportadas por Manfrin *et al.*, (2015). La amplificación de los plásmidos fue mediante transformación por choque térmico de bacterias de la cepa de *E. coli* DH5α.

Las subunidades clonadas fueron insertadas en el vector de expresión bicistrónico pIRES2-EGFP, en el sitio BglIII. Dicho vector contiene el promotor del citomegalovirus (CMV) que promueve de manera intensificada la expresión de dichas subunidades.

Análisis de las secuencias de aminoácidos de las subunidades clonadas

Las secuencias clonadas fueron analizadas por medio de distintas herramientas bioinformáticas. Una de estas herramientas fue el BLAST. Dicho análisis con BLAST se realizó de dos maneras, la primera fue el BLAST

“general”, en el cual se identificaron las secuencias similares a las predichas por los ADNc clonados, sin parámetros de exclusión predeterminados, arrojando como resultado aquellas secuencias que presenten una alta similitud y alto porcentaje de identidad. El segundo análisis con BLAST se realizó restringiendo la búsqueda de secuencias similares a los contenidos de los grupos roedores y primates. Con las secuencias obtenidos se realizó un cladograma utilizando el programa MEGA 6, mediante el algoritmo “Maximun likelihood” (Jones *et al.*, 1992).

La predicción de estructura transmembranal se realizó por medio del software en línea TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). La masa molecular de las subunidades aisladas fue calculada utilizando una herramienta bioinformática en línea Protein Molecular WeightCalculator (<http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>). Los sitios de N-glicosilación fue predicha por el programa NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

Mantenimiento de las células HEK 293T.

Para evaluar que las subunidades clonadas fueran funcionales, se utilizó la línea celular HEK 293T (ATCC® CRL-11268™). Las células se mantuvieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, 50 U/ml de penicilina y 50 mg/ml de estreptomycin. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Aproximadamente 1–3 × 10⁶ células fueron sembradas en cajas Petri de cultivo (35 mm) un día antes de la transfección, la cual se realizó con 2 µg del ADNc de cada subunidad clonada, utilizando el método de polietilenimina (PEI, 25 kDa) (Reed *et al.*, 2006). Después de la transfección (24 - 72 h), aproximadamente 10³ células fueron sembradas en cámaras de registro precubiertas con poli-L-Lisina e incubadas al menos 1 h antes de su uso. Las células transfectadas fueron identificadas por epifluorescencia

utilizando a la proteína verde fluorescente (GFP) como marcador al momento del registro.

Para determinar el tipo de corriente que pudieran generar las diferentes subunidades clonadas (incluyendo la de Jiménez-Vázquez *et al.* (2016)), se transfectaron las tres clonas solas o en combinación de dos, utilizando 2 µg de ADNc en todos los casos.

Registro electrofisiológico

Las células HEK transfectadas se registraron en fijación de voltaje utilizando la configuración en célula completa de la técnica del patch clamp (Sakmann y Neher, 1983). Todas las corrientes fueron obtenidas en solución salina normal que consiste (en mM): 120 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂ y 10 HEPES, pH 7.4 ajustado con NaOH. La composición de la solución interna fue (en mM): 120 KCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, ajustada a pH 7.4 con NaOH. Las pipetas de registro se fabricaron con capilares de borosilicato (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) con resistencias de 5-10 MΩ, y se llenaron de solución interna. La aplicación del agonista consistió en disolver GABA (a una concentración final de 100 µM), en la solución externa y fue aplicado mediante flujo por gravedad. Las corrientes fueron registradas con un amplificador Axopatch 200A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), filtradas a 10 kHz y digitalizadas (5 kHz) a la computadora utilizando una interfaz Digidata 1440A en conjunto con pClamp 10 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Tales corrientes evocadas por GABA se evaluaron a diferentes potenciales de mantenimiento, desde -60 a +40 mV con intervalos de 2 min entre cada aplicación. La cámara de registro fue diseñada para mantener perfusión continua a un flujo de 1 ml/min.

Para el caso de los experimentos de sustitución iónica, la composición de las soluciones varió dependiendo el ion a evaluar. Para evaluar el papel que desempeña el Na⁺ en las corrientes, se sustituyó este ion de manera parcial (al 50 %) y total, por un catión no permeable NMDG⁺ (cloruro de N-metil-D-glucamina, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para evaluar el

papel del cloruro, los iones Cl^- fueron reemplazados con el anión metanosulfonato (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA).

La composición de las soluciones para la evaluación de la permeabilidad al sodio fue (en mM): 1) al 50 %, 60 NaCl, 60 NMDG–Cl, 5 KCl, 2 MgCl_2 , 2 CaCl_2 y 10 HEPES, ajustada a pH 7.4 con NMDG; y 2) al 100 %, 120 NMDG–Cl, 5 KCl, 2 MgCl_2 , 2 CaCl_2 y 10 HEPES, ajustada a pH 7.4 con NMDG. La solución interna no fue modificada. La composición de la solución para evaluar las corrientes dependientes de cloruro fue (en mM): 20 NaCl, 100 NaCH_3SO_4 , 2 KCl, 2 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 8 KCH_3SO_4 y 10 HEPES pH 7.4 ajustado con NaOH.

Análisis de resultados

Las corrientes generadas por la aplicación del GABA en las células transfectadas se registraron con el programa WinWCP V4.7.3 (University of Strathclyde) y el análisis de éstas, así como la elaboración de las gráficas se realizó usando el software pClamp 10.4 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Las respuestas de las células registradas fueron normalizadas con los valores máximos promediados de al menos 6 células.

Resultados

Desde hace más de 20 años se describió el efecto bifásico del GABA en las neuronas peptidérgicas del órgano X, así como la naturaleza iónica de la corriente transitoria entrante y de la corriente sostenida, tanto en función de la concentración del agonista como del potencial de mantenimiento (García *et al.*, 1994). Sin embargo, hasta el año pasado Jiménez-Vázquez *et al.*, (2015) clonaron una subunidad de los receptores a GABA del sistema OX-GS (pcGABA_{Aβ}) que cuando se expresa en células HEK reproduce la cinética y farmacología de la corriente de cloro observada en las neuronas del OX. También demostraron que dicha subunidad es capaz de formar receptores homoméricos funcionales. La evidencia proporcionada por Jiménez-Vázquez *et al.* (2015), sugiere que la corriente transitoria entrante de sodio es debida a otra entidad molecular y con la información generada por Manfrin *et al.* (2015) en relación al transcriptoma del tallo ocular, se tiene el punto de partida para la búsqueda de otras subunidades del receptor a GABA que sean capaces de reproducir las corrientes nativas.

Identificación de dos secuencias, candidatas ser responsables del flujo catiónico en receptores GABA

Tras el análisis de las secuencias depositadas en la base de datos por Manfrin *et al.*, (2015), en donde se enlistan todos los transcritos del tallo ocular del acocil *P. clarkii*, se pudieron identificar al menos dos secuencias candidatas que podrían formar receptores activados por GABA que además contienen filtros de selectividad cargados negativamente lo que sugiere una selectividad catiónica, y que podrían explicar la corriente transitoria observada en las neuronas del OX. En la Figura 10 se muestra un alineamiento múltiple usando como referencia la secuencia reportada por Jiménez-Vázquez *et al.* (2015), indicada como pcGABA_{Aβ}. En todas esas secuencias se pueden identificar los sitios de unión a GABA y el par de cisteínas separadas por 13 aminoácidos que forman el Cys-loop (Amin y Weiss, 1993).

Pc_11123_PcGABA2	-----MAASR---SSSDMARLSHNIISAILE	22
pcGABAAB	-----MRSSGWPLARLALHLLMLLTRSYCSLAEVMSTYRPAVVKAFETMTDGNISAILD	54
Pc_10711_PcGABA3	MRSRAARRVSLWLWSAVV--ALVLWAPRGAAG-----RTSEHLDNVTQIE	45
	GBP *:: ::	
Pc_11123_PcGABA2	NLLKNYNNQVRPGYHEGRITLVKFSLLIRSMGPISEKDMKYSMECYLRQEWSDDRLRFN-	81
pcGABAAB	SLQTGYDKRIRPKYGESH-VDVGITMHISSISSEVQMDFTLDFYFRQHWDPRLSFPD	113
Pc_10711_PcGABA3	MLLDGYDIRLRPNFGGEP-CYIGMDITIASFDSISEVNMODYTITVYLNQYKDERLAFSS	104
	GBP	
Pc_11123_PcGABA2	-GPLEQLTLNIKMLEALWKPITYFHNGLGSYVHMTTRPNKLRINQSGDILYSMLRTIKA	140
pcGABAAB	RGGLDELTVGSEYLQKIWVPTFFAFNEKKSYPFHATTSNEMLRITNQGVKRLSIRLTITA	173
Pc_10711_PcGABA3	SDEL--LTLPGDFAEKIWPPTFFAFNDKSSYLHDVTEKNKMVRLHGDGSITYGMRFTTTL	162
	Cys-loop	
Pc_11123_PcGABA2	ICPMELRNFPMDKQSCFLVISSYGYTEKDVKFWDKK--LVSFVPGMALSQFEILNTKCS	198
pcGABAAB	SCPMNLQYFPMDRQLCIEIESFGYSMDHRLSHAGDRSVWIESDVSLPQFRVLGYNRK	233
Pc_10711_PcGABA3	ACMMDLHYYPDLSQNCVEIESYGYTVADVVMYWKDI--PVVGVEEAELPQFTIMGYEAN	220
	TM1	
Pc_11123_PcGABA2	NYSVRWRSSKGMYSALRVNFNLSRSAGYFLQVYVPCILIVVLSWVSFWINREASDQVVG	258
pcGABAAB	T--IISSTSTGNYSRLCEIMFVRSMGYYLQIYIPSSLIVVISWVSFWLNRSAPAVS	291
Pc_10711_PcGABA3	D--RTEELATGVYRRLSISFNLRNIGYFVQTYLPSILIVMLSWVSFWINHEASAVVA	278
	TM2	
Pc_11123_PcGABA2	LGITTVLTLSTISLDTRIDLPKVHYATALDWFILMSFGYCIATLLQFAGVHFFTKVGSGE	318
pcGABAAB	LGVTTLVLTMTTLMSSSTNALPKISYVKSIDVYLGTCFVMVFASLLIYAAVGYMG--KRIQ	349
Pc_10711_PcGABA3	LGITTVLMTTISTGVRSSLPRISYVKAIDIYLVKCFVFVFAALLIYAAVNYTYNGQRAK	338
	TM3	
Pc_11123_PcGABA2	IM----TEED-----EWDVVEIHDCCDLEQLQELEEYDTSLEAPLDGRRRDIVFLNV	367
pcGABAAB	MRKNRILAIQKMAEQR--KAATLDHSHASQDH--PDHA-----PKQTEVR-----YK	392
Pc_10711_PcGABA3	KKAKKMKESNGQNKQSPAIKADGIAANEIEIELQDIR-----MSPIPSI-----RQ	385
	TM4	
Pc_11123_PcGABA2	NHDKCGRGGAGGGGGTLYATLNSDAGVLNHAGDTLATFKSTETQTEKKERCWTQFYHCV	427
pcGABAAB	LHDPK----AHSKGGTLENT-----INGRADEEA-----PPPI-----ANL	424
Pc_10711_PcGABA3	RHNSK----FFSSEGLQDIKFPSPFRINR-NYSFPTRSSIHA-----PRAP-----NRK	430
	TM4	
Pc_11123_PcGABA2	LGDENYRRERQRTASLQRSMNSVSIIDTVSRIFFPPLSYGLLNLYWYSYDTELVFNWTD	487
pcGABAAB	LPHKDINKGLNKLKLYGCSF----SGLDKYSRIVFPVCFVCFNLMYWIYLHIS-----D	473
Pc_10711_PcGABA3	RVISSLKKGASAIKGAIPTIKDVNIIDKYSRVIFFPLSFIFFNTVYVWFYIL-----	481
	TM4	
Pc_11123_PcGABA2	PGFDDIGIHAWDPVTGGQRKQGH	510
pcGABAAB	DSTGDLIIHNADG	486
Pc_10711_PcGABA3	-----	481

Figura 10. Comparación de dos secuencias candidatas a formar receptores a GABA catiónicos, con la subunidad clonada por Jiménez-Vázquez et al., (2015). Las secuencias Pc_11123 y Pc_10711 (número de referencia: GBEV01011095.1 y GBEV01010683.1, respectivamente) muestran sitios de unión a GABA (GABA Binding Pocket, GBP); un par de cisteínas que dan lugar al Cys-loop, así como cuatro segmentos transmembranales (TM1 – TM4).

Análisis bioinformático de las secuencias putativas

Como se mencionó, se identificaron dos secuencias que podrían formar receptores a GABA con selectividad catiónica. De éstas se dedujo ciertas características moleculares con el fin de recabar la mayor información posible de las proteínas predichas. Estas características fueron: el parentesco con otras proteínas por medio de BLAST general y enfocado a roedores y primates (ver materiales y métodos); estructura secundaria (TMHMM): peso molecular

(PMWC) y sitios de glicosilación (NetNGlyc). De dicho análisis se puede destacar lo siguiente:

1) La búsqueda por BLAST general con la subunidad Pc_10711 mostró ser semejante a subunidades del tipo “ β -like” de organismos de la clase insecta, entre los cuales están algunos dípteros, himenópteros, coleópteros y lepidópteros, así como el quelicerado *Parasteatoda tepidariorum* (XP_015925423.1); la identidad varía del 65 74 %. Todas las secuencias presentaban característica como son: los sitios de unión a GABA, el *cys-loop*, así como los aminoácidos que forman parte del filtro de selectividad.

Por otro lado, el análisis por BLAST realizado contra secuencias de vertebrados, particularmente con las encontradas en roedores y primates, mostró una identidad que va desde el 52 al 48 %. La subunidad Pc_10711 resultó ser semejante a la subunidad β 3 de las especies *Gorilla gorilla gorilla* (XP_004055908.1), *Macaca mulatta* (XP_014997204.1), *Rattus norvegicus* (EDL86448.1), *Mus musculus* (NP_001033790.1) y *Homo sapiens* (NP_000805.1) y entre todas estas secuencias se conservan los aminoácidos que forman parte del poro de selectividad. En la Figura 11 se muestra un cladograma en donde se observa que Pc_10711 podría ser un antecesor a otras subunidades “ β -like” presentes en invertebrados, y en donde LCCH3 de *Drosophila melanogaster* (AAS65370.1) forma parte del grupo.

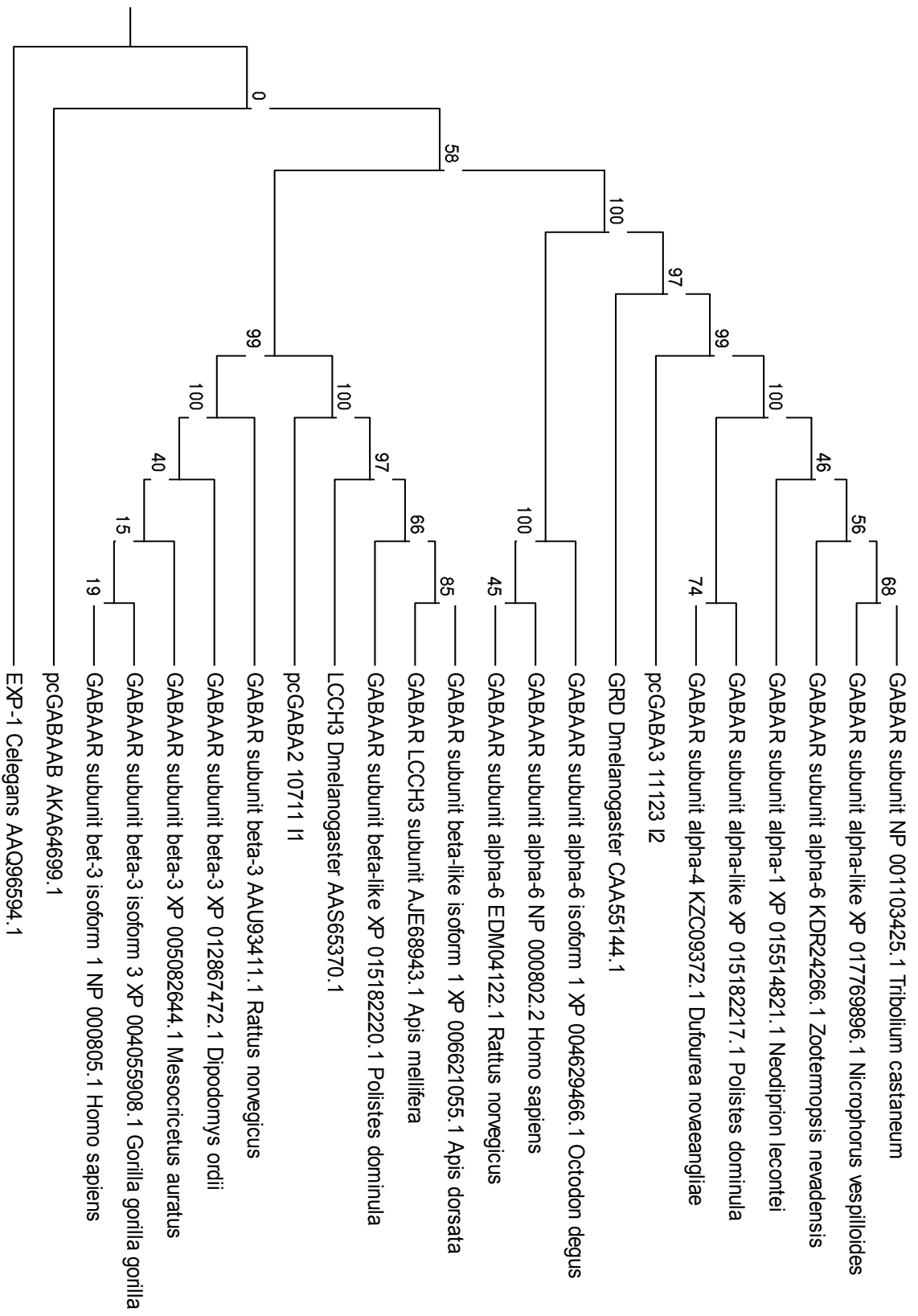


Figura 11. Análisis Análisis filogenético molecular por el método de “Maximum Likelihood”. La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de máxima probabilidad basado en el modelo de Jones et al., (1992), basado en el modelo matriz JTT. Se muestra la relación de las secuencias Pc_10711 y Pc_11123 con otras secuencias de subunidades similares. También se incluyen las secuencias de las subunidades GRD (CAA55144.1), LCCH3 (AAS65370.1), y EXP-1 (AAQ96594.1) Se muestra el árbol con la más alta probabilidad log (-3.878,8434). El porcentaje de árboles en los cuales los taxos asociados se agruparon, se muestra junto a las ramas. El árbol inicial (s) para la búsqueda heurística se obtuvo mediante la aplicación del método de Neighbor-joining a una matriz de distancias pareadas, las cuales se estimaron mediante el modelo de JTT. El análisis involucró 22 secuencias de aminoácidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen interrupciones (“gaps”), así como datos faltantes. Hubo un total de 240 posiciones en el último conjunto de datos. El análisis evolutivo se realizó en MEGA6 (Tamura et al., 2013).

Por otro lado, los análisis adicionales predicen que la subunidad es una proteína de 485 aminoácidos y tendría una masa molar 54.91 kDa. Esta secuencia presenta 5 regiones hidrofóbicas de las cuales una parece estar localizadas en el amino terminal de la proteína, mientras que las otras cuatro corresponden a segmentos transmembranales. Además, se predicen cuatro posibles sitios de N-glicosilación de los cuales dos pueden ser descartadas debido a que son predichos en la segunda asa intracelular que es el asa que conecta a los segmentos transmembranales TM3 y TM4 (Figura 12).

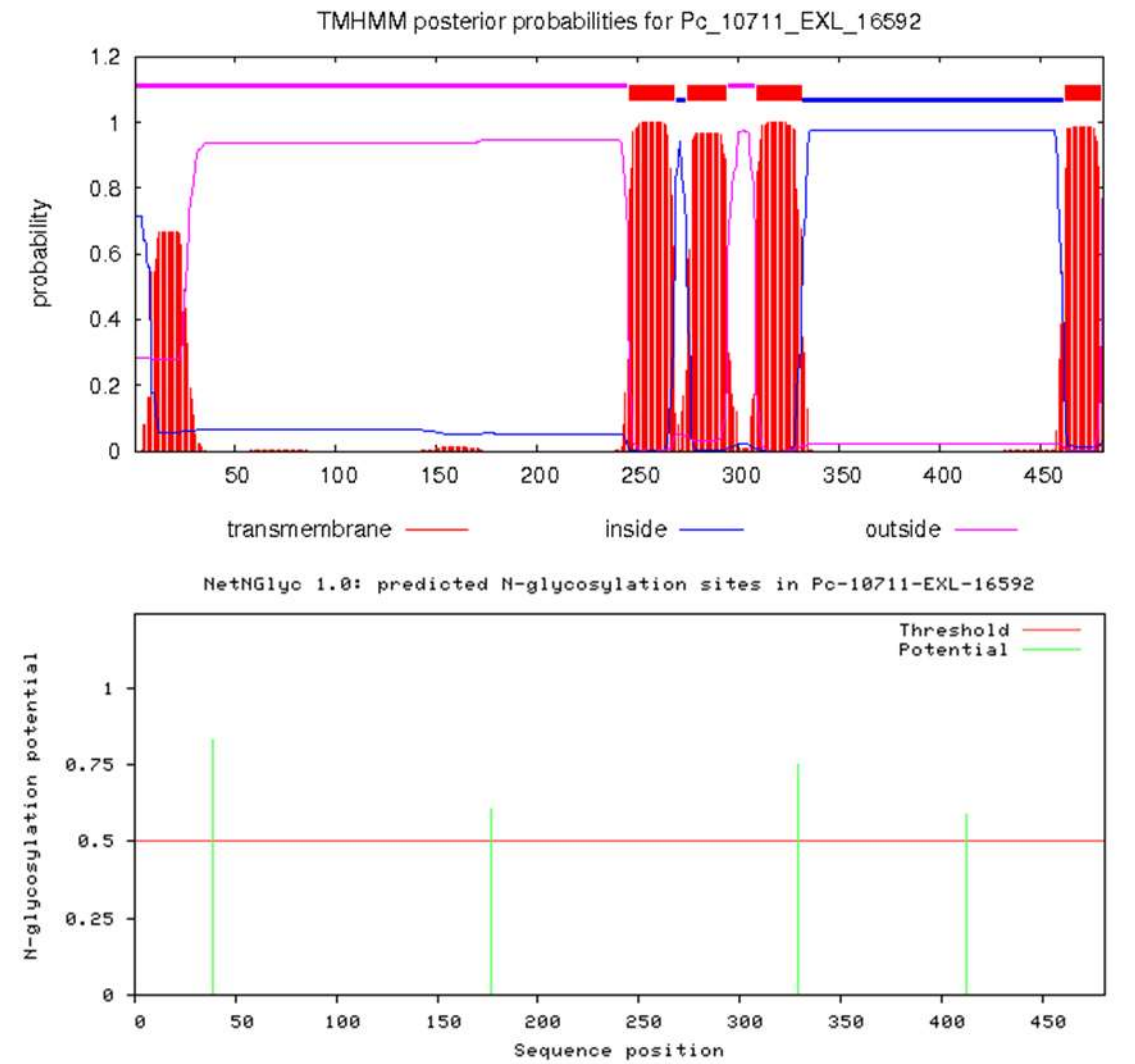


Figura 12. Predicción de la estructura secundaria y los posibles sitios de glicosilación de la subunidad Pc₁₀₇₁₁.

De acuerdo con el análisis BLAST general, la subunidad Pc₁₁₁₂₃ presenta 48-69 % de identidad con más de 100 secuencias predichas y/o reportadas del tipo "α-like", particularmente encontrados en insectos tales como himenópteros, coleópteros, lepidópteros y dípteros, así como el quelicerado *Parasteatoda tepidariorum* (XP_015925423.1). Todas estas secuencias presentaban características de sitios de unión a GABA, el *cys-loop*, e interesantemente los aminoácidos que sugieren una selectividad catiónica en

el filtro de selectividad (aminoácidos cargados negativamente, particularmente el ácido aspártico).

Con respecto a las subunidades reportadas en vertebrados (sobretudo de roedores y primates), el porcentaje de identidad varía desde el 36 al 48 %. De manera similar a lo encontrado con el BLAST general, la subunidad Pc_11123 se asemeja a una subunidad α , específicamente la subunidad $\alpha 6$ de organismos como *Gorilla gorilla gorilla* (XP_004042994.1), *Nannospalax galili* (XP_008819896.1), *Mus musculus* (NP_001093111.1), *Rattus norvegicus* (EDM04122.1) y *Homo sapiens* (AAB36480.1). A pesar de que se presenta un alto porcentaje de identidad, las secuencias difieren en los aminoácidos que forman parte del filtro de selectividad. En la Figura 11 se muestra la relación filogenética de la subunidad Pc_11123 con otras subunidades formadoras de receptores a GABA. De manera similar a Pc_10711, Pc_11123 parece ser antecesora a otras subunidades “ α -like” en invertebrados, pero sorprendentemente no incluye a la subunidad GRD de *Drosophila melanogaster* (CAA55144.1), sino que aparentemente esta última dio lugar a la subunidad Pc_11123 de *Procambarus clarkii*.

En lo que respecta a los análisis adicionales, esta subunidad es una proteína de 510 aminoácidos y presentaría una masa molar de 58.32 kDa. Esta proteína presenta 4 regiones hidrofóbicas, los cuales corresponden a los segmentos transmembranales, además tiene 5 sitios de N-glicosilación, 4 de ellos localizados en la región del amino terminal y 1 en el carboxilo terminal (Figura 13).

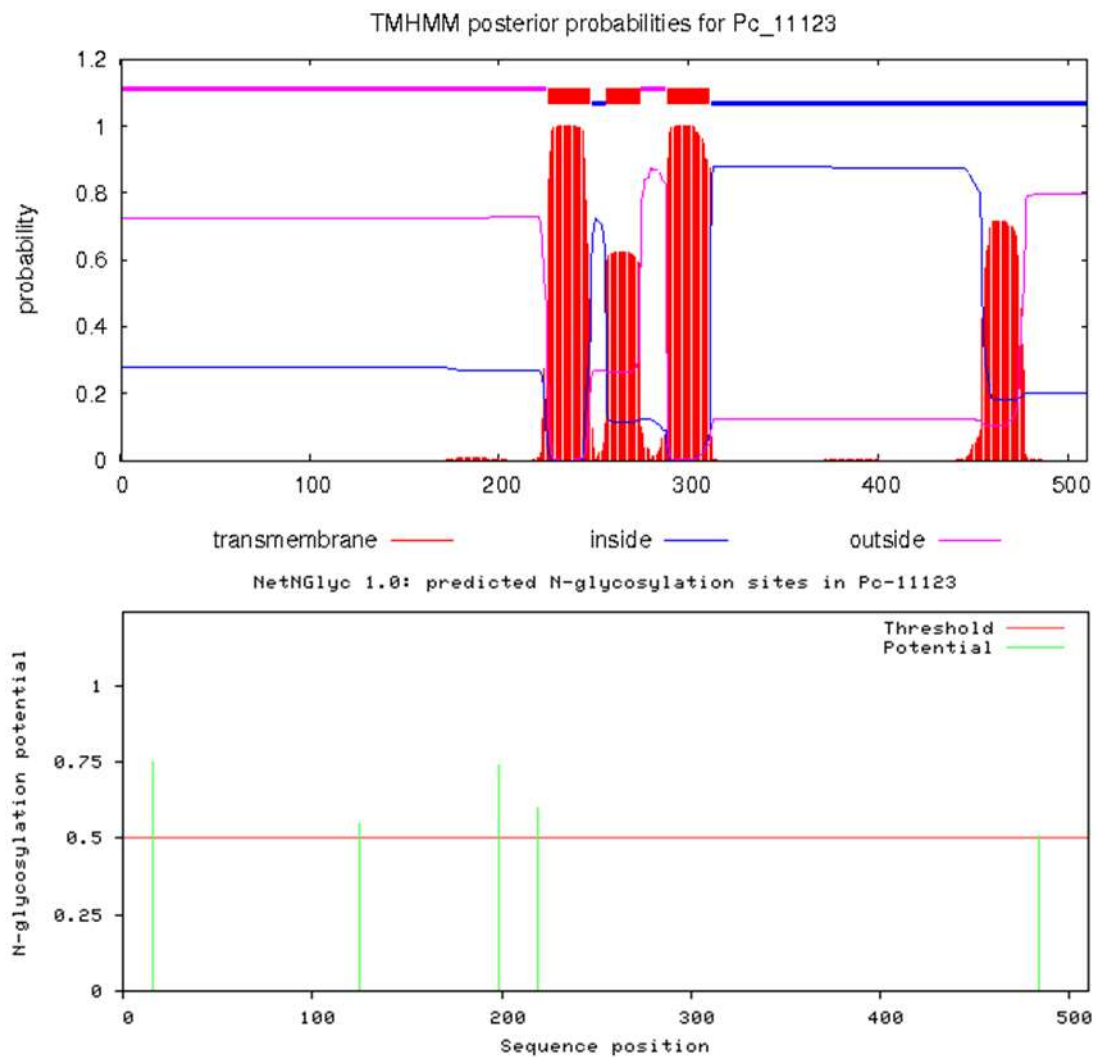


Figura 13. Predicción de la estructura secundaria y los posibles sitios de glicosilación de la subunidad Pc_11123.

Una vez que se identificaron a estas secuencias, se les caracterizó como una subunidad “ β -like” (β 3-like) a Pc_10711, asignándole el nombre de pcGABA_{A2}, y en el otro caso, se caracterizó como una subunidad “ α -like” (α 6-like) a la subunidad Pc_11123, a la cual también se le asignó un nuevo nombre, pcGABA_{A3}. Cabe resaltar que pcGABA_{A3} es la subunidad que presenta los determinantes moleculares que le podrían conferir la selectividad catiónica. Las secuencias de dichas proteínas fueron tomadas de la base de datos de Manfrin *et al.*, (2015), y con base en ellas se diseñaron oligonucleótidos específicos para ser clonadas.

Clonación molecular de las secuencias putativas

Los oligonucleótidos para las subunidades identificadas se emplearon para amplificar cada una de las secuencias candidatas mediante RT-PCR. Estos oligonucleótidos están posicionados en las regiones 5' y 3' UTR (no traducida) de cada una de las secuencias, como se muestra en la Figura 14. En la tabla 1 se enumeran los oligonucleótidos que fueron utilizados para amplificar cada una de las subunidades.

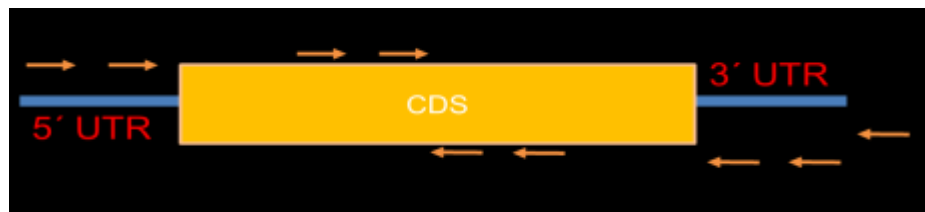


Figura 14. Localización predicha de los oligonucleótidos generados en el ADNc.

Clonación de la subunidad pcGABA_{A2}

Como ya se mencionó en materiales y métodos, la amplificación de las secuencias candidatas se realizó a partir del ADNc generado por la transcripción en reversa, utilizando como molde el ARN total obtenido del tallo ocular del acocil y como cebadores a los oligonucleótidos linker-d[T]₁₈) y a los oligonucleótidos específicos en antisentido (o reverse). Por practicidad, los oligonucleótidos se nombraron con “f” para los que estaban orientados en

sentido y “r” para los oligonucleótidos orientados en antisentido; para cada subunidad se diseñó al menos un oligonucleótido en sentido y otro en antisentido. La subunidad pcGABA_{A2} fue amplificada con la combinación de los oligonucleótidos f1-r2 y f2-r2 (carriles 3 y 4, respectivamente), siendo más eficiente la combinación f2-r2. Como se muestra en la Figura 15A, se observa un amplicón (una banda) de 1,600 pb muy intensa, el cual fue caracterizado tras digerirlo con las enzimas NheI y XbaI (Figura 15B). Para el caso de la subunidad pcGABA_{A3} no se logró amplificar con los oligonucleótidos externos (Figura 15A, carriles 6 y 7).

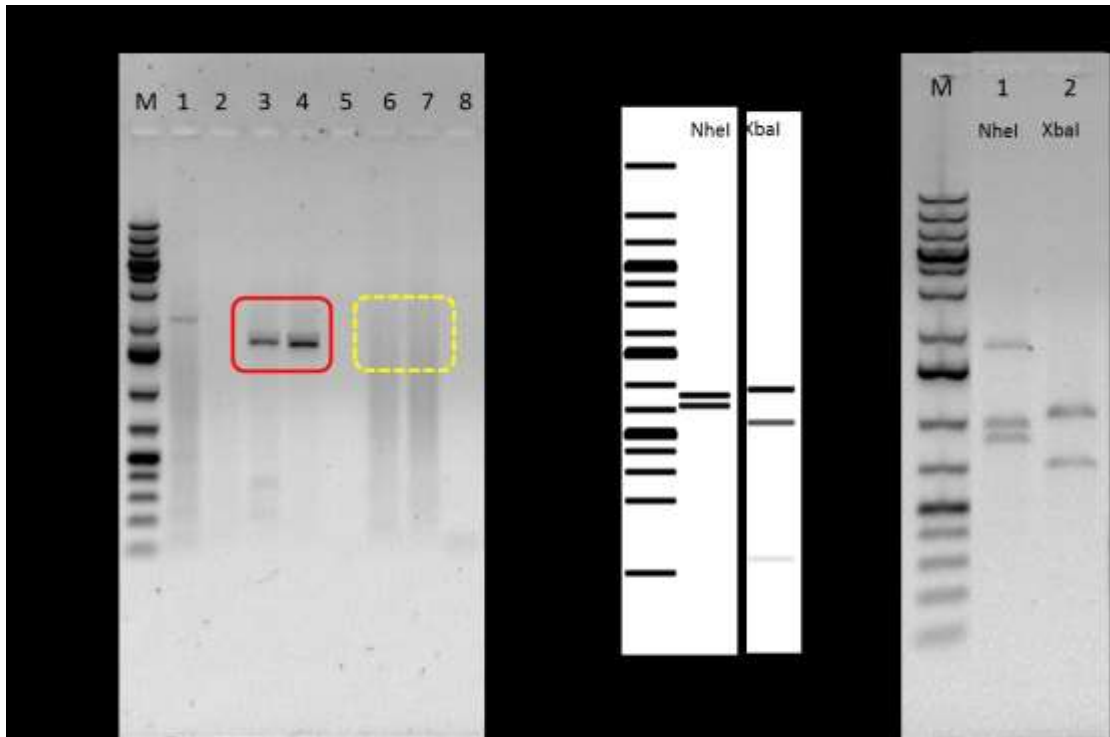


Figura 15. Clonación de la subunidad pcGABA_{A2} y caracterización por análisis de restricción. A, gel de agarosa al 0.8%, teñido con EtBr. Se muestran los amplificadores por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la combinación de oligonucleótidos f1-r1, f2-r1, f1-r2, f2-r2 (carriles 1 - 4) diseñados para la subunidad pcGABA_{A2}. Se observa un amplicón en cada uno de los carriles 3 y 4 que corresponde a la amplificación de la subunidad pcGABA_{A2} (recuadro en rojo). La subunidad pcGABA_{A3} no logró amplificarse en estas reacciones (carriles 6 y 7; recuadro amarillo). Los carriles 5 y 8 son controles negativos. B, lado derecho, análisis in silico de las digestiones con las enzimas NsiI y XmaI. Lado izquierdo, gel de agarosa al 0.8%, teñido con EtBr. Se observa que se reproducen los resultados obtenidos del análisis

in silico; carril 1, digestión con *NheI* (858 y 750 pb); carril 2, digestión con *XbaI* (926, 591 y 91 pb).

Una vez comprobado por el análisis de restricción que el amplicón obtenido corresponde a la subunidad pcGABA_{A2}, se continuó con la clonación de dicha subunidad en el vector de clonación pJet1.2/blunt (Figura 16A). Una vez obtenidas las clonas que sugerían ser las clonas pJet1.2-pcGABA_{A2}, se analizó nuevamente por análisis de restricción con las enzimas *BglII* y con *XbaI*. En la siguiente figura se muestra el análisis de restricción de tres clonas (clona 1 - 3), que habían sido obtenidas tras la amplificación del plásmido pJet1.2-pcGABA_{A2}. Se observa que la clona 1 es la única que reproduce un patrón esperado en ambas digestiones (Figura 16B). Con tales datos se concluye que se logró clonar a la subunidad pcGABA_{A2}.

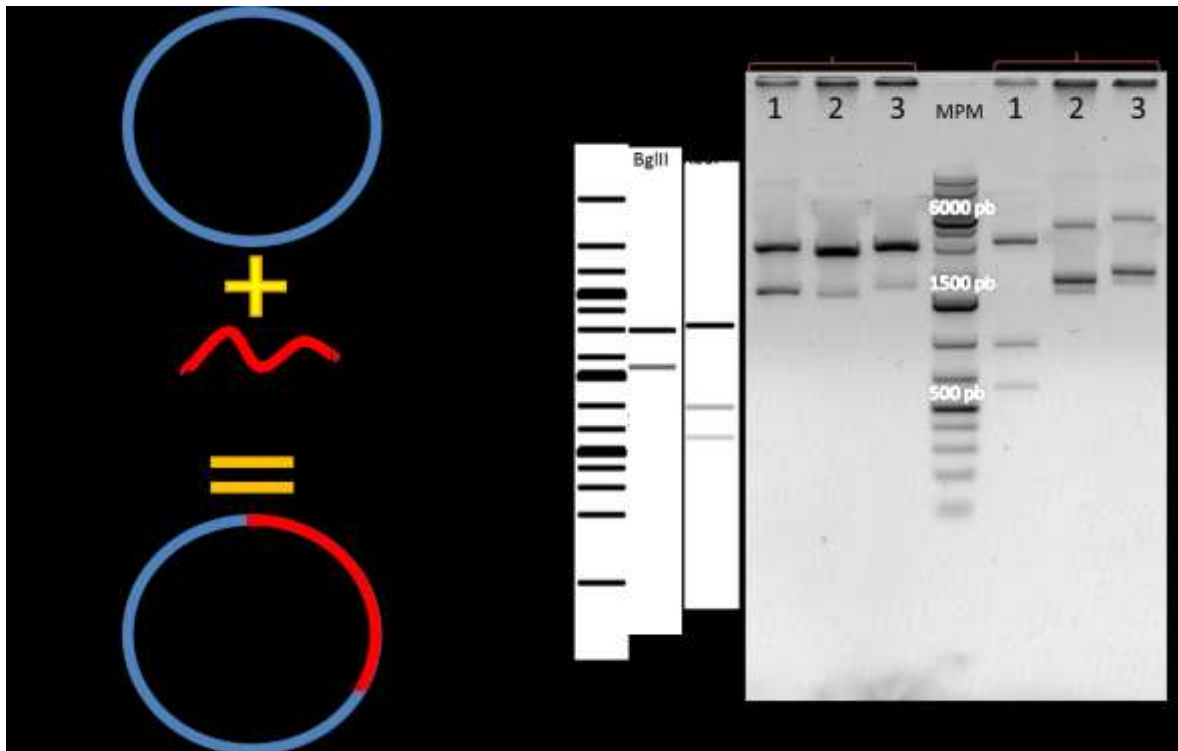


Figura 16. Caracterización por análisis de restricción de la clona pJet1.2-pcGABA_{A2}. A. Esquema de la ligación del amplicón obtenido e insertado en el vector pJet1.2. B. patrón de digestión *in silico* de la clona pJet1.2-PcGABA_{A2}, con BglIII, dos bandas (2,900 y 1,600 pb), con XbaI tres bandas (2,972, 926 y 600 pb). C, Gel de agarosa al 0.8%, teñido con EtBr donde se muestran las clonas 1 – 3 digeridas con las enzimas BglIII (lado izquierdo del MPM), y digeridas con la enzima XbaI (del lado derecho del MPM).

Clonación de la subunidad pcGABA_{A3}

Como ya se mencionó, no se logró amplificar la subunidad pcGABA_{A3} empleando los oligonucleótidos que se encuentran en las regiones no codificantes (UTR's), sin embargo, con los oligonucleótidos internos se pudo amplificar un par de fragmentos que pertenecían a la secuencia deseada. Uno de estos fragmentos se obtuvo con los oligonucleótidos f1 – ir2, y el otro fragmento con if4 – r1. Ambos fragmentos medían alrededor de 1,000 pb y se empalmaban en cierta región en la cual hay un sitio de restricción para la enzima XhoI. Por lo tanto, la estrategia para obtener la secuencia codificante (CDS) completa, fue digerir ambos fragmentos con XhoI, ligar dichos

fragmentos e insertarlos en el vector de clonación pJet1.2/blunt. En la Figura 17 se muestran los amplicones obtenidos con la combinación de oligonucleótidos f1-ir2, f2-ir2, if4-r1 (carriles 1, 3 y 5; controles negativos, carriles 2, 4 y 6)

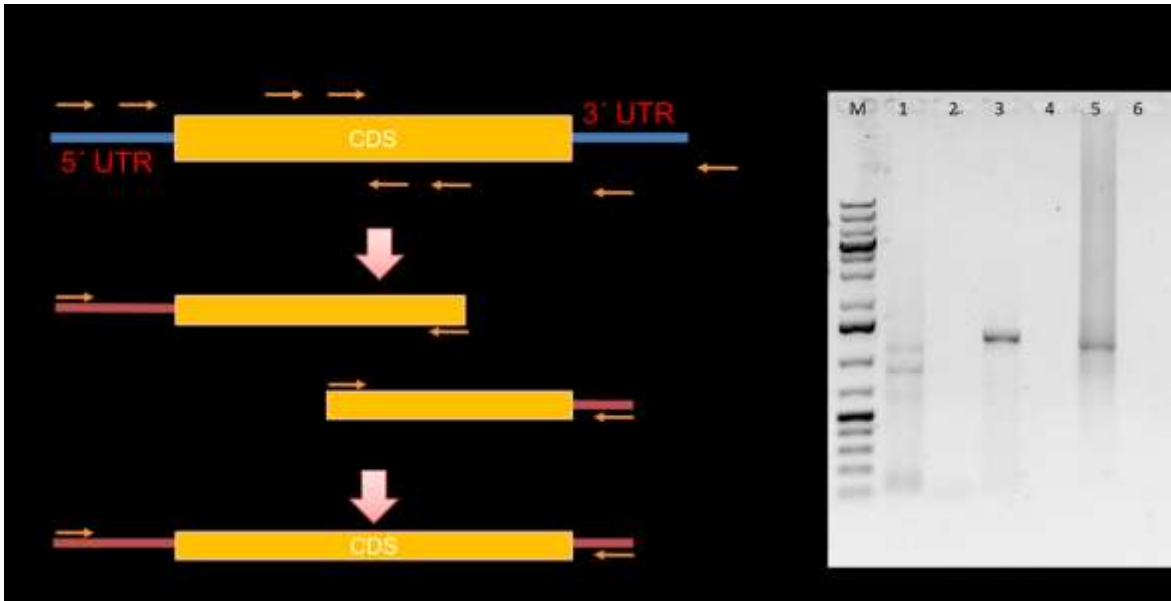


Figura 17. Estrategia utilizada para clonar la subunidad $pcGABA_{A3}$. A, la subunidad $pcGABA_{A3}$ se obtuvo mediante la amplificación y ligación de dos fragmentos. Los amplicones se consiguieron mediante la combinación de los oligonucleótidos f1-ir2 e if4-r1 y se ligaron tras la digestión con XhoI. B, gel de agarosa al 0.8% teñido con EtBr; se muestra los amplicones obtenidos con la combinación de oligonucleótidos f1-ir2, f2-ir2, if4-r1 (carriles 1, 3 y 5, respectivamente) y controles negativos (carriles 2, 4 y 6, respectivamente).

Debido a que el amplicón se puede ligar de dos formas diferentes (dos orientaciones), se realizó un análisis de restricción para evaluar el sentido en el que se ligó el amplicón (Figura 18). Esto se hizo digiriendo las 4 clonas obtenidas con las enzimas NotI – XmaI, y BspEI – EcoRV. En las digestiones se esperaban fragmentos cuyos tamaños variaban según la orientación (Tabla 2).

Tabla 2. Tamaños esperados tras la digestión de la clona pJet1.2-pcGABA_A3.

	NotI – XmaI (digestión 1, D1)	BspEI - EcoRV (digestión 2, D2)
<i>Orientación derecha</i>	3096, 1604 pb	4187, 513 pb
<i>Orientación izquierda</i>	4496, 204 pb	3435, 1265 pb

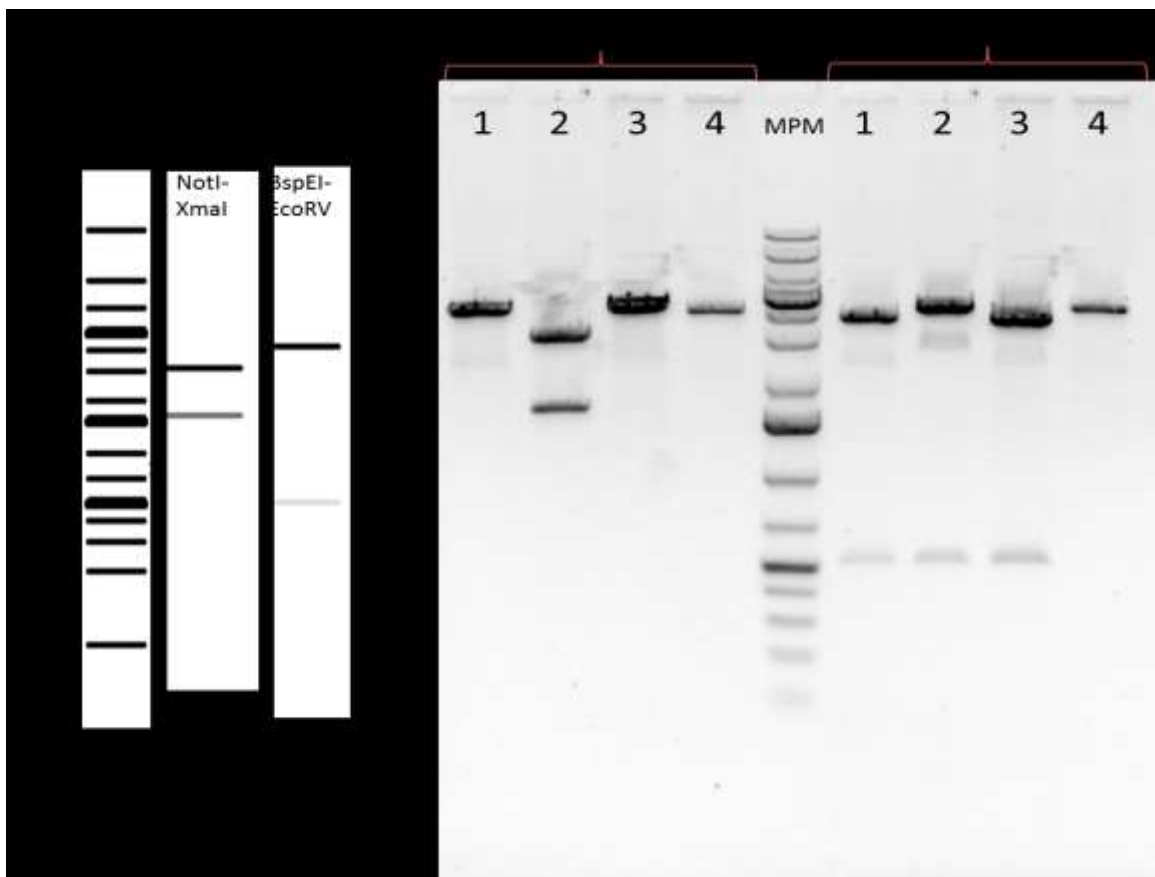


Figura 18. Caracterización de los plásmidos candidatos para pJet1.2-pcGABA_A3. Se muestra el análisis in silico de la restricción con las enzimas NotI-XmaI y BspEI-EcoRV. En la parte derecha de la figura se observa un gel de agarosa teñido con EtBr en donde el patrón esperado solo es reproducido con la clona 2, de las 4 analizadas.

Se observa que el patrón es reproducido por la clona 2, y de esta manera se obtuvieron las secuencias de las subunidades pcGABA_A2 y pcGABA_A3. Ambas

clonas se secuenciaron y presentaron diferencias con respecto a las reportadas por Manfrin *et al.*, (2015). A pesar de las modificaciones presentadas, no se alteró el marco de lectura ni tampoco la secuencia de aminoácidos. Para evaluar su funcionalidad, primero, cada una de las secuencias fue insertada en el vector de expresión pIRES2_EGFP, en el sitio BgIII. Ambas secuencias fueron analizadas por restricción y no mostraron tener ninguna modificación.

Evaluación funcional de las subunidades clonadas

Como se ha descrito desde hace algunos años, solo algunas subunidades de receptores ionotrópicos son capaces de formar receptores homoméricos funcionales. Sin embargo, la cotransfección de dos o más subunidades llega a ser suficiente para obtener un receptor funcional. En el presente trabajo se evaluó la funcionalidad de cada una de las subunidades clonadas. La línea celular HEK 293T fue utilizada como sistema de expresión heterólogo. Estas células se transfectaron transitoriamente con 2 µg de ADN plasmídico por medio del método de PEI (Reed *et al.*, 2006).

Para evaluar la capacidad funcional de cada subunidad clonada, primero se probó que las células eran capaces de ser transfectadas con alguna subunidad y que además fuera capaz de responder a la aplicación de cierto estímulo, en particular el GABA (100 µM). Para esto se utilizó como control positivo a la subunidad clonada por Jiménez-Vázquez *et al.*, (2015), es decir, la subunidad pcGABA_Aβ. Como control negativo se transfectó a las células con el vector vacío.

En todos los casos se observó una gran eficiencia en la transfección al observarse un gran número de células fluorescentes. Para el caso de la transfección con el vector vacío (pIRES2-EGFP), no se observaron corrientes iónicas, al menos no fueron detectables bajo el protocolo de estimulación.

Los resultados obtenidos con la subunidad pcGABA_Aβ fueron consistentes con lo ya reportado, es decir, esta subunidad es capaz de formar receptores homoméricos funcionales los cuales son permeables al cloruro. En la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos de la subunidad pcGABA_Aβ tras la aplicación de GABA 100 μM a diferentes potenciales de mantenimiento, la relación corriente-voltaje, así como la evaluación de la permeabilidad de dicho receptor ionotrópico.

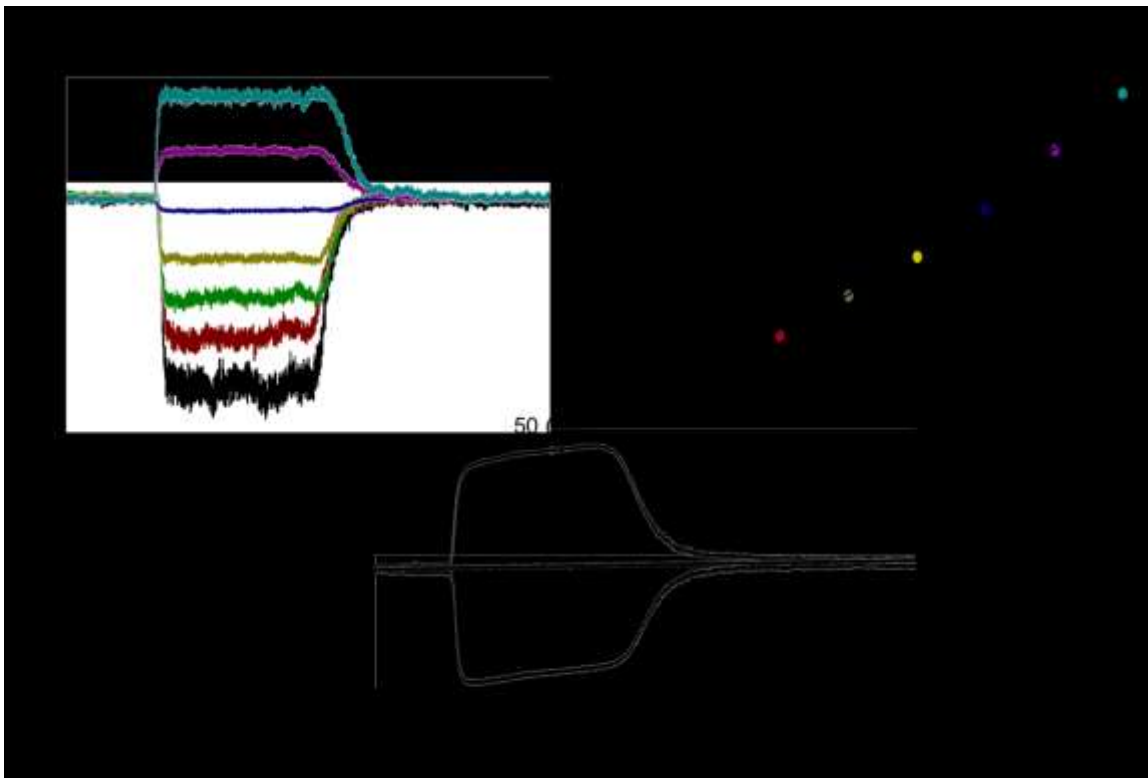


Figura 19. Corrientes evocadas por la aplicación del GABA en las células HEK 392T transfectadas con la subunidad pcGABA_Aβ. A, se muestra el registro electrofisiológico de la subunidad pcGABA_Aβ y las corrientes evocadas al aplicar GABA 100 μM a distintos potenciales de mantenimiento. B, relación corriente – voltaje de la respuesta al GABA en células que expresaban la subunidad pcGABA_Aβ por GABA. C, registros obtenidos de los receptores homoméricos pcGABA_Aβ en una condición de cloruro de N-metil-D-glucamina simétrico (150 mM NMG-Cl); en donde el cloruro es la única especie iónica que puede ser permeable.

Registro electrofisiológico de la subunidad pcGABA_{A2}

Una vez comprobado el sistema de expresión y el protocolo para la evaluación funcional, se prosiguió a la expresión de la subunidad pcGABA_{A2}. De manera similar a como se realizó con pcGABA_{Aβ}, se transfectó la subunidad pcGABA_{A2} y se identificaron las células epifluorescentes. La aplicación de GABA 100 μM a distintos potenciales de mantenimiento, no evocó corrientes detectables (Figura 20). Estos resultados sugieren que esta subunidad no es capaz de formar receptores homoméricos funcionales, tal como lo hace la subunidad pcGABA_{Aβ}.

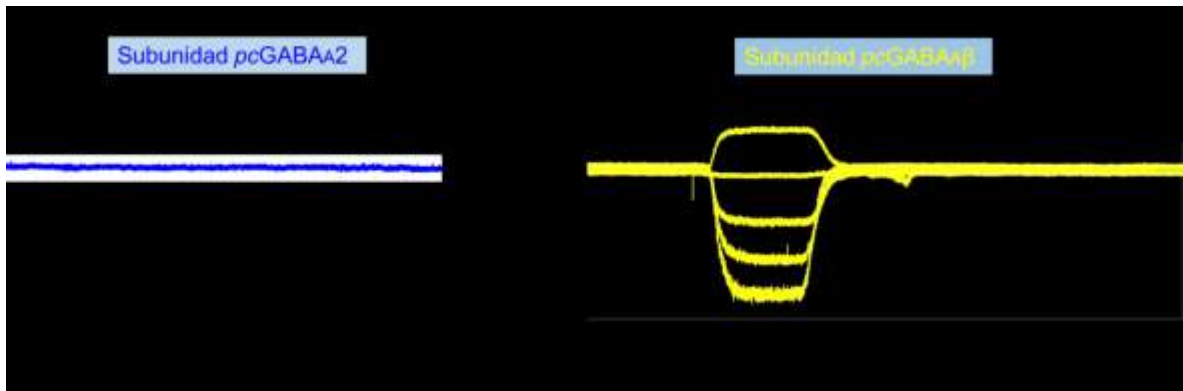


Figura 20. La subunidad pcGABA_{A2} no forma receptores homoméricos funcionales. A, registro electrofisiológico de células transfectadas con la subunidad pcGABA_{A2}. Debido a la ausencia de corrientes detectables se sugiere que esta subunidad no forma receptores homoméricos funcionales. B, se muestran de manera comparativa trazos de corriente obtenidos de células transfectadas con la subunidad pcGABA_{Aβ} como control positivo.

Registro electrofisiológico de la subunidad pcGABA_{A3}

De manera similar a lo observado con la subunidad pcGABA_{A2}, la subunidad pcGABA_{A3} tampoco fue capaz de formar receptores funcionales, es decir, no detectamos corriente a los distintos valores de potencial de mantenimiento explorados en las células que eran fluorescentes. La Figura 21 muestra la ausencia de corriente durante la aplicación de un pulso de GABA 100 μM.



Figura 21. La subunidad pcGABA_{A3} no forma receptores homoméricos funcionales. A, registro electrofisiológico de células transfectadas con la subunidad pcGABA_{A3}. No se detectan corrientes iónicas tras la aplicación del GABA, lo que sugiere que esta subunidad no forma receptores homoméricos funcionales. B, se muestran de manera comparativa trazos de corriente obtenidos de células transfectadas con la subunidad pcGABA_{Aβ} como control positivo.

Coexpresión de las subunidades pcGABA_{A2} y pcGABA_{A3}

Como se mencionó en la introducción, no todas las subunidades tienen la capacidad de formar receptores por si solas, más bien, es común que se requiera del acople de dos o más subunidades. Este punto de vista es argumentado tras lo observado con las subunidades LCCH3 y GRD de *Drosophila melanogaster*, las cuales requerían estar presentes para poder formar receptores funcionales y con permeabilidad catiónica. Con esa idea en mente, y bajo la premisa de que las subunidades pcGABA_{A2} y pcGABA_{A3} podrían ser homólogas a LCCH3 y GRD, debido a su identidad y/o composición de aminoácidos en el poro de selectividad, tal vez la coexpresión de las subunidades clonadas podría generar un receptor funcional.

Los resultados obtenidos tras la coexpresión de las subunidades pcGABA_{A2} y pcGABA_{A3} son muy interesantes, ya que se detectó una pequeña corriente entrante a 0 mV como se ilustra en la Figura 22. Dadas las condiciones iónicas de los registros, podríamos sugerir que se trata de una corriente catiónica debido a que en este potencial de mantenimiento se encuentra el E_{Cl} predicho

por la ecuación de Nernst. Es importante destacar que solo el 25% de las células cotranfectadas con estas subunidades generaron corrientes.

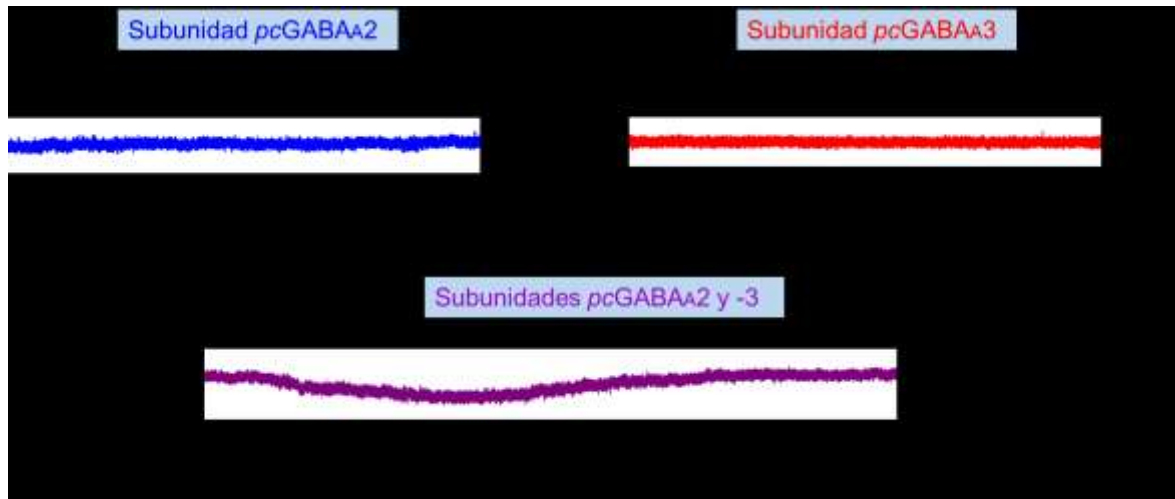


Figura 22. La coexpresión de las subunidades pcGABA_{A2} y pcGABA_{A3} forma canales funcionales que generan pequeñas corrientes entrantes a 0 mV. Las subunidades pcGABA_{A2} y pcGABA_{A3} no generan corrientes cuando son expresadas de manera independiente; sin embargo, la coexpresión de ambas subunidades da lugar a una corriente pequeña cuya naturaleza puede ser catiónica.

Coexpresión de las subunidades pcGABA_{A2} y pcGABA_{Aβ}

En años recientes se ha obtenido una gran información con respecto a la formación de receptores heteroméricos funcionales, al menos con subunidades expresadas en vertebrados. En dichos estudios se encontró que les necesaria la presencia de varias subunidades que permitan un arreglo estable y funcional del receptor (Sigel *et al.*, 1990). Tomando esto en consideración se prosiguió a evaluar la funcionalidad de las subunidades clonadas coexpresándolas con la subunidad pcGABA_{Aβ}. Lo obtenido se describe en las siguientes secciones.

La cotransfección de las subunidades pcGABA_{Aβ} y pcGABA_{A2} resultó en la formación de receptores funcionales a GABA, sin embargo, de manera cualitativa, las corrientes evocadas por el GABA mostraron que la activación ocurre con un curso temporal semejante a la generada por la expresión homomérica de la subunidad pcGABA_{Aβ}, en tanto que la fase correspondiente

a la disociación se prolongó de manera notable (Figura 23). Además, podemos sugerir que se trata de un receptor con filtro de selectividad para aniones, ya que no genera corriente al potencial de equilibrio de cloro.

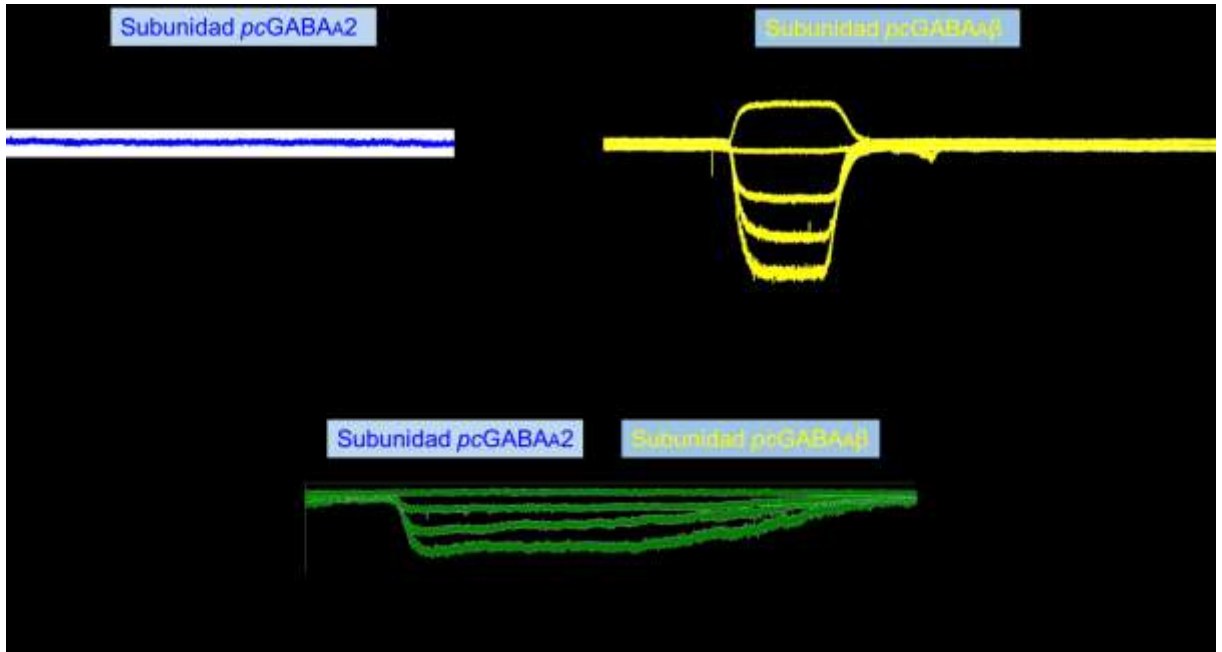


Figura 23. Lasubunidad pcGABA_A2 y pcGABA_Aβ forman receptores funcionales. Con la combinación de dichas subunidades parece generarse un receptor con comportamiento aniónico y una inactivación más lenta que la de pcGABA_Aβ.

Coexpresión de las subunidades pcGABA_Aβ y pcGABA_A3

De manera similar a la coexpresión de pcGABA_Aβ y pcGABA_A2, la cotransfección de las subunidades pcGABA_Aβ y pcGABA_A3 formó receptores funcionales que generan corrientes robustas con características cinéticas muy interesantes. Activación rápida de la corriente, desensibilización en presencia del agonista y rápida relajación de la corriente durante el lavado. Pero lo más importante fue que las corrientes evocadas por GABA a -20 mV de potencial de mantenimiento tienen un componente transitorio entrante seguido de corriente saliente, lo que las hace muy parecidas a las corrientes registradas en neuronas del OX (Figura 24). Además, la naturaleza iónica de estas corrientes tiene una importante dependencia a la concentración extracelular de sodio, como se muestra en la Figura 25. En estos experimentos se sustituyó a la mitad de la concentración extracelular de sodio reemplazándose por NMDG, un catión monovalente no permeable.

Los datos obtenidos sugieren que la combinación entre las subunidades pcGABA_Aβ y pcGABA_A3 puede formar un receptor a GABA con filtro de selectividad catiónico, es decir capaz de permear sodio. Sin embargo, la conformación del receptor debe ser determinada así como sus características farmacológicas.

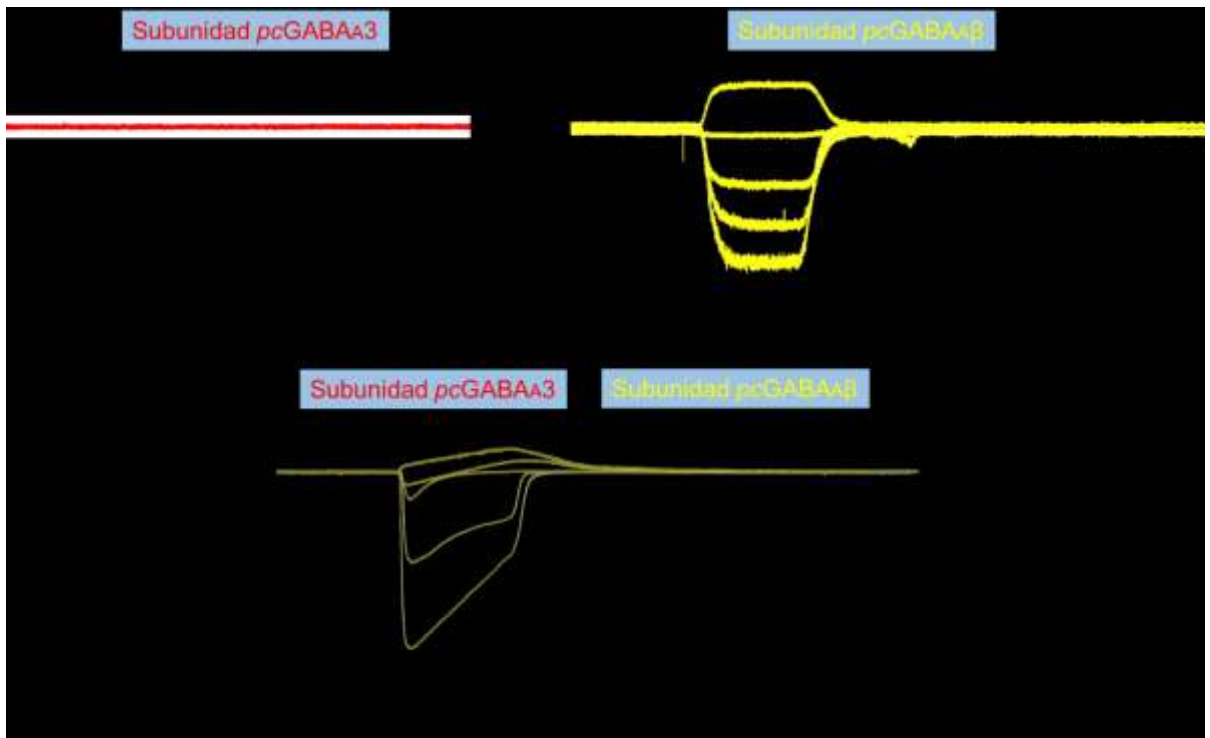


Figura 24. La subunidad $pcGABA_{A3}$ y $pcGABA_{A\beta}$ forman receptores funcionales.

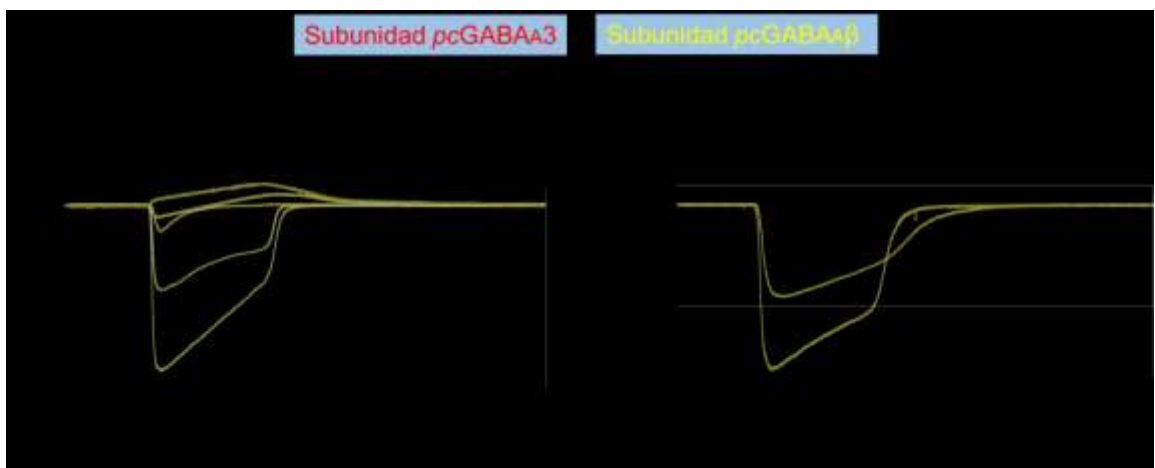


Figura 25. Dependencia del Na^+ en las corrientes generadas por $pcGABA_{A3}$ y $pcGABA_{A\beta}$.

En la Tabla 3 se resume el número de células registradas en cada condición y el tipo de corriente generada. Estas corrientes se clasificaron como aniónicas (similares a las evocadas por *pcGABA_{Aβ}*), sin corriente (como las corrientes observadas en las células transfectadas con *pcGABA_{A2}* y/o *pcGABA_A*); así como las células que generaron las corrientes que se presentan en las figuras 24 y 25, que solo se reproducen en pocas ocasiones.

Tabla 3. Condiciones experimentales registradas y tipo de corriente observada.

Condición experimental	Número de células (n)	Con corriente aniónica	Sin corriente	Con corriente catiónica
<i>pcGABA_{Aβ}</i>	3	3	3	--
<i>pcGABA_{A2}</i>	5	--	--	--
<i>pcGABA_{A3}</i>	5	--	--	--
<i>pcGABA_{A2}</i> + <i>pcGABA_{A3}</i>	8	2	6	--
<i>pcGABA_{Aβ}</i> + <i>pcGABA_{A2}</i>	15	12	3	--
<i>pcGABA_{Aβ}</i> + <i>pcGABA_{A3}</i>	30	22	5	3

Discusión

La modulación de los sistemas neuroendocrinos es de vital importancia ya que su actividad está relacionada con la supervivencia de las especies pues regulan el crecimiento, la reproducción, la muda, la frecuencia cardiaca, la temperatura, etc (Hartenstein, 2006).

Un ejemplo de sistema neurosecretor es el formado por las neuronas del órgano X, las cuales siendo un grupo celular definido de 120 neuronas, modulan funciones vitales en los crustáceos. Este órgano es la principal fuente productora de hormonas tales como la hormona concentradora de pigmentos (PCH), la hormona dispersadora de pigmentos (PDH), la hormona hiperglicémica de crustáceos (CHH), la hormona inhibidora de la muda (MIH), la hormona inhibidora de la vitelogénesis (VIH), entre otras (García y Aréchiga, 1998). La actividad eléctrica espontánea y la liberación hormonal de estas neuronas son reguladas tanto por factores ambientales como endógenos, tales como los ciclos luz/oscuridad, la temperatura, los neurotransmisores y hormonas producidas en el mismo tallo ocular y hormonas producidas en el hepatopáncreas (Cebada y García, 2007). Particularmente, el GABA provoca una respuesta bifásica en las neuronas del OX, que consiste en una corriente entrante transitoria debida a sodio que es seguida de una corriente saliente sostenida debida a cloro, entre valores de potencial de membrana de -55 y 65 mV (García *et al.*, 1994; Garduño *et al.*, 2002; Jiménez-Vázquez *et al.*, 2015).

Excitación mediada por GABA

El papel excitador del GABA mediado por receptores GABA_A se ha descrito bajo mecanismos y condiciones muy particulares, como lo es el flujo de Cl⁻ fuera de la célula durante el desarrollo (Ben-Ari, 2002), la salida de HCO₃⁻ a través del poro de permeación (Raimondo *et al.*, 2012), así como el transporte electrogénico de GABA que es un proceso dependiente de Na⁺ (Garduño *et al.*, 2002); además se ha mostrado que el GABA también puede mediar una respuesta excitadora mediante la activación de receptores tipo GABA_A los

cuales son capaces de permear un flujo catiónico que despolariza la membrana. Por lo tanto, el efecto excitador evocado por GABA en las neuronas del OX podría estar mediado por la activación de un receptor a GABA con la capacidad de permear cationes.

En el 2003 se reportó un hallazgo importante acerca de un receptor activado por GABA el cual era capaz de permear cationes. Esta subunidad, denominada EXP-1, se encuentra expresada en *C. elegans* y es la responsable de la contracción del músculo entérico en el intestino del nematodo. En dicha subunidad se presentan cambios en la región responsable de la selectividad iónica, es decir, el dominio del poro, donde se presenta el cambio de Pro y Ala por Glu, el cual tiene una carga neta negativa lo que le confiere una selectividad catiónica (Beg y Jorensen, 2003).

Un hallazgo similar fue hecho en el 2004, donde se identificaron a las subunidades GRD (GABA and glycine like receptor of *Drosophila*) y LCCH3 (Ligand-gated chloride channel homolog 3) en *D. melanogaster*. En este reporte se identificó a GRD como una posible subunidad formadora de receptores a GABA catiónicos, sin embargo, esta subunidad no fue capaz de formar receptores homoméricos funcionales. Fue hasta que se contranfectaron las subunidades GRD y LCCH3, que se favoreció la formación de un receptor a GABA con selectividad catiónica. Cabe resaltar que la subunidad GRD presenta el aminoácido Asp con carga negativa localizado en el dominio del poro el cual favorece el paso de cationes, mientras que la subunidad LCCH3 presenta las características que se encuentran en el dominio del poro en la mayoría de las subunidades formadoras de receptores a GABA (Gisselmann *et al.*, 2004).

Recientemente se ha encontrado una nueva subunidad que es capaz de formar receptores a GABA catiónicos en *C. elegans*, la subunidad LGC-35, y de manera similar a EXP-1 es capaz de formar receptores homoméricos funcionales. Esta subunidad permite tener un panorama más completo en el

proceso del peristaltismo en el nemátodo (Jobson *et al.*, 2015). En el presente trabajo se identificaron, clonaron y evaluaron subunidades con características similares a las anteriores, que nos sugieren ser formadoras de este tipo de receptores catiónicos.

Las subunidades pcGABA_{A2} y pcGABA_{A3} son funcionales en un complejo heteromérico

Como se ha mencionado, los receptores a GABA ionotrópicos son complejos multiméricos que resultan de un arreglo pentamérico entre distintas subunidades. En vertebrados se han descrito 19 subunidades formadoras de receptores a GABA de las cuales solo algunas tienen la capacidad de formar receptores homoméricos, tales como algunas subunidades β y las subunidades ρ (Simeone *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2006). En invertebrados se han descrito una gran gama de subunidades formadoras de receptores heteropentaméricos pero también existen subunidades con la capacidad de formar receptores homoméricos (Harvey *et al.*, 1991; Beg y Jorensen, 2003; Jiménez-Vázquez *et al.*, 2015; Jobson *et al.*, 2015) y heteroméricos (Lunt, 1991; Gisselman *et al.*, 2004;).

En el presente trabajo se clonaron y evaluaron dos subunidades formadoras de receptores al GABA (pcGABA_{A2} y pcGABA_{A3}) que en registros electrofisiológicos en fijación de voltaje no fueron capaces de formar receptores homoméricos funcionales. De acuerdo con Sigel y Steinmann, (2012) es posible que las subunidades que clonamos requieran de otras subunidades para formar receptores funcionales, donde cada subunidad aporta distintos aspectos biofísicos y farmacológicos al receptor. Sin embargo, la coexpresión de ambas subunidades fue capaz de producir receptores que generaron corrientes entrantes pequeñas a 0 mV de potencial de mantenimiento y que parecen ser de naturaleza catiónica, esto debido a que a dicho potencial se encuentra el E_{Cl} . Dicho resultado era esperado ya que las subunidades clonadas pcGABA_{A2} y pcGABA_{A3} presentan una identidad alta con respecto a GRD y LCCH3 (68 y 100%, respectivamente) y por lo tanto, los

determinantes moleculares en la región del filtro de selectividad de ambas subunidades favorece el flujo de cationes.

De manera interesante, al coexpresarse las subunidades pcGABA_{A2} y pcGABA_{A3} con la subunidad pcGABA_{Aβ} de Jiménez-Vázquez *et al.*, (2015), se logró tener receptores funcionales. Las combinaciones fueron pcGABA_{Aβ} + pcGABA_{A2} y pcGABA_{Aβ} + pcGABA_{A3} y en cada caso, la combinación resultó en corrientes distintivas, tanto en los aspectos cinéticos como en la especie iónica que permean.

En el caso del receptor pcGABA_{Aβ}-pcGABA_{A2} (ambas presentan el filtro de selectividad “aniónico”), se evocaron corrientes dependientes de cloruro. Sin embargo, el comportamiento de la corriente obtenida de este receptor era diferente a la obtenida por la subunidad pcGABA_{Aβ} sola, principalmente durante la fase de disociación del agonista. Dicho comportamiento se podría explicar si tomamos en cuenta que al estar formado por dos subunidades diferentes, esto parece modificar el sitio de unión a GABA haciéndolo más afín al GABA, y si el GABA se puede mantener anclado a su sitio un mayor tiempo, entonces podría mantener al canal abierto durante un mayor tiempo. Sin embargo para evaluar dicha hipótesis, es necesario realizar una curva dosis-respuesta con el agonista, así como un estudio farmacológico.

Por otro lado, con el receptor pcGABA_{Aβ}-pcGABA_{A3} se generó una o dos corrientes muy interesantes. De las principales características de estas corrientes son: 1) las corrientes son rápidas; tras la aplicación de GABA se evocan corrientes inmediatas y las mismas decaen aún en presencia del agonista y se acelera su decaimiento durante el lavado. Esto podría ser explicado a que el GABA se acopla perfectamente a su sitio de anclaje pero además provoca desensibilización. También existe la posibilidad de que tratándose de un canal catiónico no selectivo, exista una corriente de tipo saliente debida a potasio la cual contrarreste a la corriente entrante de sodio. Por supuesto, hacen falta muchos experimentos de sustitución iónica y

farmacológicos para aclarar este punto. 2) la respuesta es bifásica; a un potencial de -20 mV se observa una corriente entrante seguida de una corriente saliente. Podría tratarse de dos corrientes de sentido contrario como resultado de la activación de diferentes receptores a GABA, con permeabilidad catiónica y aniónica respectivamente, o bien a cambios en la permeabilidad de un solo tipo de receptor que pueda permear sodio y potasio. 3) la corriente es “grande”; el tamaño de la corriente iónica evocada por GABA resulta ser hasta 6 veces más grande que la obtenida del registro control (pcGABA β). Dicha respuesta podría ser resultado de la suma de las dos posibles corrientes registradas. De ser así se favorece la idea de la existencia de dos poblaciones de receptores generados, lo cual resulta más interesante, debido a que la célula es capaz de expresar los dos tipos de receptores.

El número de células que presentaban las corrientes mencionadas anteriormente (con pcGABA α 2 y pcGABA α 3) fue muy bajo. Esta eficiencia en la cotransfección de dos plásmidos es un problema común y las causas por las cuales sucede es ambiguo, sin embargo, algunos factores que están involucrados son: la cantidad de plásmido utilizado, los agentes de transfección, la confluencia celular, etc. (Huszar *et al.*, 2001; Sankpal *et al.*, 2009), así del hecho de que todos los plásmidos estaban en el vector de expresión pIRES2_EFGP y por lo tanto todas las células transfectadas o cotransfectadas se observaban fluorescentes. De esta manera la probabilidad de registrar una célula con alguna condición de nuestro interés era baja. Por lo tanto, tal vez el uso de un plásmido tricistrónico, el uso de concatámeros o el uso de otro gen reportero podrían resolver el problema mencionado.

Importancia biológica de las subunidades pcGABA α 2 y pcGABA α 3

El análisis filogenético realizado con las subunidades clonadas mostró resultados bastante interesantes. Primero, la subunidad pcGABA α 2 presenta una mayor identidad con las subunidades tipo β tanto de invertebrados como de vertebrados. Con base en su secuencia de aminoácidos, parece ser que

pcGABA_{A2} es una proteína precursora de otras subunidades que dan lugar a receptores a GABA aniónicos, tales como LCCH3 de *Drosophila melanogaster*. Por otro lado, la subunidad pcGABA_{A3} es similar a subunidades tipo α , también de invertebrados y vertebrados. Curiosamente, el análisis filogenético sugiere que esta subunidad podría ser antecesora de otras subunidades que podrían formar receptores a GABA catiónicos, pero a su vez descendiente de la subunidad GRD de *Drosophila melanogaster*. Por lo tanto, a partir de este análisis se podría considerar a ambas subunidades como ancestros de los receptores a GABA, tanto de los de tipo catiónico así como los aniónicos.

La existencia de receptores que presenten permeabilidades diferentes a las reportadas resulta asombroso (Beg y Jorensen, 2003; Gisselmann *et al.*, 2004; van Nierop *et al.*, 2005; Jobson *et al.*, 2015) y muestra cuán compleja puede ser la función de la misma entidad molecular y del papel fisiológico en el que participe. Particularmente, los receptores a GABA permeables a cloruro median la inhibición rápida en la transmisión sináptica, sin embargo, la presencia de receptores a GABA catiónicos en cualquier tejido animal podría ejercer funciones muy importantes. Concretamente, la coexistencia de diferentes tipos de receptores a GABA en las neuronas peptidérgicas del OX es extraordinaria, tanto por el hecho de que el OX regula las funciones vitales del organismo y que requiere ser modulado estrictamente, así como el papel excitador de un receptor a GABA mediando la excitabilidad neuronal a un nivel todavía incomprensible.

Conclusiones

Se clonaron dos subunidades formadoras de receptores a GABA_A, las cuales fueron pcGABA_{A2} y pcGABA_{A3}. De éstas se evaluó su funcionalidad por medio del registro electrofisiológico. Se encontró que estas subunidades no son capaces de formar receptores homoméricos funcionales y es hasta que se coexpresan con la subunidad pcGABA_{Aβ} (Jiménez-Vázquez *et al.*, 2015) que se obtienen receptores funcionales.

La coexpresión de las subunidades pcGABA_{Aβ} y pcGABA_{A2} forman receptores aniónicos con una aparente inactivación más lenta que la mostrada por la subunidad pcGABA_{Aβ}. Dicho fenómeno podría ser resultado de un cambio en la sensibilidad al GABA.

De la coexpresión de las subunidades pcGABA_{Aβ} y pcGABA_{A3} parecen formarse receptores catiónicos, sin embargo no queda claro si se da lugar a dos poblaciones de receptores (uno aniónico y otro catiónico) en la misma célula, o bien se dio lugar a un receptor con la capacidad de permear tanto sodio como potasio.

Por último, la identificación de subunidades formadoras de receptores a GABA catiónicos da paso a todo un mundo de conocimiento que parecía estar entendido. Rompe un paradigma acerca del papel inhibitor mediado por GABA y propone a los receptores a GABA catiónicos como parte de un proceso de exquisito control eléctrico en las neuronas.

Perspectivas

El primer punto que es necesario resolver involucra la coexpresión de las subunidades a evaluar. Como ya se había mencionado, el uso de vectores de expresión policistrónicos podría ayudar a garantizar que el ADNc de cada una de las subunidades está presente en la célula; sin embargo, en cuestión a la expresión, todavía se pone en duda. Otra opción podría ser el uso de otro gen reportero, como pueden ser las proteínas fluorescentes amarilla, roja o azul, con las que también se pueda distinguir cuál célula se contransfectó.

Una opción más es la elaboración de concatámeros, los cuales aseguran la expresión de las subunidades bajo estudio. Los problemas inherentes de la técnica como lo es el orden de expresión de las distintas subunidades, se ven disminuidos bajo la premisa de poder evaluar diferentes construcciones de concatámeros.

Posteriormente, se evaluarían las propiedades farmacológicas de los receptores generados; esto mediante el uso de agonistas, agonistas parciales, antagonistas y bloqueadores. Además, sería bastante interesante poder evaluar la función del receptor a nivel de canal-receptor unitario y de esta manera esclarecer cualquier incógnita concerniente al receptor.

Referencias bibliográfias

Alvarado-Álvarez, R.; García, U.; Aréchiga, H. 1993. Electrotonic coupling between neurosecretory cells in the crayfish eyestalk. *Brain Research*. 613: 43 – 48.

Amin, J., y Weiss, D. S. 1993. GABA_A receptor needs two homologous domains of the β -subunit for activation by GABA but not by pentobarbital. *Nature*. 366: 565 – 569.

Barnard, E.A.; Skolnick, P.; Olsen, R.W.; Mohler, H.; Sieghart, W.; Biggio, G.; Braestrup, G.; Bateson, A.N. 1998. International Union of Pharmacology. XV. Sub-types of γ -aminobutyric acid A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacological Reviews*. 50: 291–313.

Beg, A. A. y Jorensen, E. M. 2003. EXP-1 is an excitatory GABA-gated cation channel. *Nature Neuroscience*. 6(11): 1145 – 1152.

Ben-Ari, Y. 2002. Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nature*. 3: 728 – 739.

Boistel, J. y Fatt, P. 1958. Membrane permeability change during inhibitory transmitter action in crustacean muscle. *Journal of Physiology*. 144: 176-191.

Bowery, N.G. 1993. GABAB receptor pharmacology. *Annual Review of Pharmacology Toxicology*. 33:109–147.

Cebada, J. y García, U. 2007. Histamine operates Cl^- -gated channels in crayfish neurosecretory cells. *Journal of Experimental Biology*. 210: 3962 – 3969.

Chang, Y.; Wang, R.; Barot, S.; Weiss, D. S. 1996. Stoichiometry of a recombinant GABA_A receptor. *Journal of neuroscience*. 16(17): 5415 – 5424.

Chen, G.; Trombley, P. Q.; Van den Pol, A. N. 1996. Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurons. *Journal of physiology*. 494(2): 451 – 464.

Cooke, I.M. 1985. Electrophysiological characterization of peptidergic neurosecretory terminals. *The journal of experimental biology*. 118: 1 – 35.

Cutting, G. R.; Lu, L.; O'Hara, B. F.; Kasch, L. M.; Montrose-Rafizadeh, C.; Donovan, D. M.; Shimada, S.; Antonarakis, S. E.; Guggino, W. B.; Uhl, G. R.; Kazazian Jr., H. H. 1991. Cloning of the γ -aminobutyric acid (GABA) ρ 1 cDNA: A GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88(7): 2673 – 2677.

Enna, S.J.; Bowery, N.G.; eds. The GABA receptors, second ed. Totowa, NJ: Humana, 1997.

Furshpan, E. J. y Potter, D. D. 1959. Slow post-synaptic potentials recorded from the giant motor fibre of the crayfish. *Journal of physiology*. 145: 326 - 335

- Galzi, J.L.; Devillers-Thiery, A.; Hussy, N.; Bertrand, S.; Changeux, J.P. y Bertrand, D. 1992. Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from cationic to anionic. *Nature*. 359: 500 – 505.
- García, U.; Onetti, C.; Valdiosera, R.; Aréchiga, H. 1994. Excitatory action of γ -aminobutyric acid (GABA) on crustacean neurosecretory cells. *Cellular and molecular neurobiology*. 14(1): 71 – 88.
- García, U. y Aréchiga, H. 1998. Regulation of crustacean neurosecretory cell activity. *Cellular and molecular neurobiology*. 18(1): 81 – 99.
- Garduño, J.; Elenes, S.; Cebada, J.; Becerra, E.; García, U. 2002. Expression and functional characterization of GABA transporters in crayfish neurosecretory cells. *Journal of neuroscience*. 22(21): 9176 – 9184.
- Gassmann, M. y Bettler, B. 2012. Regulation of neuronal GABAB receptor functions by subunit composition. *Nature*. 13: 380 – 394.
- Gisselmann, G.; Plonka, J.; Push, H.; Hatt, H. 2004. *Drosophila melanogaster* GRD and LCCH3 subunits form heteromultimeric GABA-gated cation channels. *Journal of Pharmacology*. 142: 409 – 413.
- Hartenstein, V. 2006. The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective. Review. *The journal of endocrinology*. 190: 555 – 570.
- Harvey, R.J.; Vreugdenhil, E.; Zaman, S.H.; Bhandal, N.S.; Usherwood, P.N.; Barnard, E.A.; Darlison, M.G. 1991. Sequence of a functional invertebrate GABA_A receptor subunit which can form a chimeric receptor with a vertebrate α subunit. *The EMBO journal*. 10(11): 3239 – 3245.
- Hilgemann, D. W. y Lu, C. C. 1999. GAT1 (GABA:Na⁺:Cl⁻) cotransport function, database reconstruction with an alternating access model. *Journal of general physiology*. 114: 459 – 475.
- Huszar, T.; Mucsi, I.; Terebessy, T.; Masszi, A.; Adamko, S. 2001. The use of a second reporter plasmid as an internal standard to normalize luciferase activity in transient transfection experiments may lead to a systematic error. *Journal of Biotechnology*. 88:251–8
- Jensen, M. L.; Timmermann, D. B.; Johansen, T. H.; Schousboes, A.; Varming, T.; Ahring, P. K. 2002. The β subunit determines the ion selectivity of the GABA_A receptor. *Journal of biological chemistry*. 277(44): 41438 – 41447.
- Jiménez-Vázquez, E. N.; Díaz-Velásquez, C. E.; Uribe, R. M.; Arias, J. M.; García, U. 2016. Molecular cloning and expression of a GABA receptor subunit from the crayfish *Procambarus clarkii*. *Journal of neuroscience research*. 94 (2): 190 – 203.
- Jobson, M.A.; Valdez, C.M.; Gardner, J.; Garcia, L.R.; Jorgensen, E.M.; Beg, A.A. Spillover transmission is mediated by the excitatory GABA receptor LGC-35 in *C. elegans*. *The journal of neuroscience*. 35(6): 2803 – 2816.

- Johnston G.A.R. 1997. Molecular biology, pharmacology, and physiology of GABAC receptors. En: Enna, S.J, Bowery, N.G.; eds. *The GABA receptors*, second ed. Totowa, NJ: Humana. Pp 297–323.
- Jones D.T., Taylor W.R., y Thornton J.M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8: 275-282.
- Kaila, K. y Voipio, J. 1987. Postsynaptic fall in intracellular pH induced by GABA-activated bicarbonate conductance. *Nature*. 330(6144): 163 – 165.
- Karlin, A.; Akabas, M.H. 1995. Towards a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron*. 15: 1231 – 1244.
- Keramidas, A.; Moorhouse, A.J.; Schofield. P.R.; Barry, P.H. 2004. Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. Review. *Progress in biophysics and molecular biology*. 86: 161 – 204.
- Kuffler, S. W. y Edwards, C. 1958. Mechanisms of gamma aminobutyric acid (GABA) action and its relation to synaptic inhibition. *Journal of Neurophysiology*. 21(6): 589 – 610.
- Lunt, G.G. 1991. GABA and GABA receptors in invertebrates. *Seminars in neuroscience*. 3(3): 251 – 258.
- Manfrin, C.; Tom, M.; De Moro, G.; Gerdol, M.; Giulianini, P. G.; Pallavincin, A. 2015. The eyestalk transcriptome of red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Gene*. 557: 28 – 34.
- Mason, C. A. y Bern, H. A. 1977. Cellular biology of the neurosecretory neuron. In *Handbook of Physiology*, vol. I, The Nervous System, section I, Cellular Biology of Neurons, part I, pp. 651-689. The American Physiological Society, Bethesda, MD, USA.
- Meites, J.; Goya, R.; Takahashi, S. 1987. Why the neuroendocrine system is important in aging processes. *Experimental gerontology*. 22: 1 – 15.
- Minier, F. y Sigel, E. 2004. Positioning of the subunit isoforms confers a functional signature to aminobutyric acid type A receptors *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101: 7769–7774
- Miyazawa, A.; Fujiyoshi, Y.; Unwin, N. 2003. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*. 424: 949–955.
- Moreau, C. J.; Dupuis, J. P.; Revilloud, J.; Arumugam, K.; Vivaudou, M. 2008. Coupling ion channels to receptors for biomolecule sensing. *Nature Nanotechnology* 3: 620-625 doi:10.1038/nnano.2008.242
- Nässel, D. R. 1996. Peptidergic neurohormonal control systems in invertebrates. *Current opinion in neurobiology*. 6: 842 – 850.
- Nigg, E.A. 1997. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386: 779–787.

- Olsen R.W y Tobin A. J.1990. Molecular biology of GABAA receptors. *FASEB Journal*. 4: 1469–1480.
- Ortells, M.O. y Lunt, G.G. 1995. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends in neurosciences*. 18(3): 121 – 127.
- Perkins, K. L. y Wong, R. K. 1996. Ionic basis of the postsynaptic depolarizing GABA response in hippocampal pyramidal cells. *Journal of Neurophysiology*. 76(6): 3886 – 3894
- Raimondo, J.V.; Markram, H.; Akerman, C.J. 2012. Short-term ionic plasticity at GABAergic synapses. *Frontiers in synaptic neuroscience*. 4: 5
- Reed, S., Staley, E., Mayginnes, J., Pintel, D. and Tullis, G. 2006. Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors. *Journal of Virology Methods*. 138: 85-98.
- Sakmann, B. and Neher, E. 1983. Single-channel recording. New York: Plenum Press.
- Sambrook, J. y Russell, D. 2001. Molecular Cloning: A laboratory manual. New York.
- Sankpal, N.V.; Fleming, T.P.; Gillanders, W.E. 2009. Dual expression lentiviral vectors for concurrent RNA interference and rescue. *Journal of surgical research*. 156:50–6
- Scharrer, B. 1978. Neurosecretion and Neuroendocrine Activity. Concepts on the Evolution of the Neurosecretory. *Neuron*. (pp 9-14).
- Scherer, S. 1999. Nodes, paranodes and incisures: from form to function. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 14: 131 – 142.
- Schofield, P. R.; Darlison, M. G. ; Fujita, N. ; Burt, D. R. ; Anne Stephenson, F. ; Rodriguez, H. ; Rhee, L. M. ; Ramachandran, J. ; Reale, V. ; Glencorse, T. A. ; Seeburg, P. H. ; Barnard, E. A. 1987. *Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor super-family*. *Nature*. 328: 221 - 227
- Sigel, E.; Baur, R.; Trube, G.; Möhler, H. y Malherbe, P. 1990. The effect of subunit composition of rat brain GABA_A receptors on channel function. *Neuron*. 5: 703 – 711.
- Simeone, T.A.; Wilcox, K.S.; White, H.S. 2011. Topiramate modulation of β 1- and β 3-homomeric GABA_A receptors. *Pharmacological research*. 64: 44 – 52.
- Silverman, A.J.; Zimmerman, E.A. 1983. Magnocellular neurosecretory system. *Annual review of neuroscience*. 6: 357 – 380.
- Stuenkel, E.L. 1985. Simultaneous monitoring of electrical and secretory activity in peptidergic neurosecretory terminals of the crab. *Journal of physiology*. 359: 163 – 187.
- Stuenkel, E.L. y Cooke, M. 1988. Electrophysiological characteristics of peptidergic nerve terminals correlated with secretion. *Current topics in neuroendocrinology*. 9: 123 – 150.
- Tahirovic, S. y Bradkle, F. 2009. Neural polarity. *Cold Spring Harb Perspectives in Biology*. 1:a001644

Takeuchi, A. y Takeuchi, N. 1965. Localized action of gamma-aminobutyric acid on the crayfish muscle. *Journal of physiology*. 177: 225 – 238.

Takeuchi, A. y Takeuchi, N. 1966. A study of the inhibitory action of γ -aminobutyric acid on neuromuscular transmission in the crayfish. *Journal of Physiology*. 183(2): 418 – 432.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., y Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

Thomas, R. C. 1984. Review Lecture: Experimental displacement of intracellular pH and the mechanism of its subsequent recovery. *Journal of Physiology*. 354: 3 – 22.

Wakerley, J. B. y Lincoln, D. W. 1973. The milk-ejection reflex of the rat: a 20- to 40-fold acceleration in the firing of paraventricular neurones during oxytocin release. *Journal of Endocrinology*. 57: 477–493.

Weiss, K.R.; Brezina, V.; Cropper, E.C.; Hooper, S.L.; Milles, M.W.; Probst, W.C.; Vilim, F.S.; Kupfermann, I. 1992. Peptidergic co-transmission in *Aplysia*: functional implications for rhythmic behaviors. *Experientia*. 48(5): 456 – 463.

Yang, J.; Cheng, Q.; Takahashi, A.; Goubaeva, F. 2006. Kinetic properties of GABA ρ 1 homomeric receptors expressed in HEK293 Cells. *Biophysical journal*. 91: 2155 – 2162.